

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202292714 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.24

(51) Int. Cl. A61K 35/74 (2015.01)
A61K 35/76 (2015.01)
A61K 39/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.03.25

(54) ЛЕЧЕНИЕ РАССТРОЙСТВ ДЫХАНИЯ

(31) 62/994,617

(32) 2020.03.25

(33) US

(86) PCT/US2021/024239

(87) WO 2021/195435 2021.09.30

(71) Заявитель:
ТЕРНС, ИНК. (US)

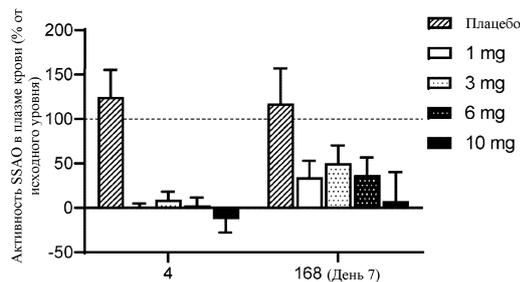
(72) Изобретатель:

Фено Мартейн, Джоунс Кристофер Т.,
Квирк Эрин К. (US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены соединения для применения в лечении расстройств дыхания.



A1

202292714

202292714

A1

ЛЕЧЕНИЕ РАССТРОЙСТВ ДЫХАНИЯ**ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ**

[1] Настоящая заявка испрашивает приоритет и преимущество предварительной заявки на патент США № 62/994,617, поданной 25 марта 2020 г., полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[2] Настоящее изобретение относится к способам и композициям для лечения индивидуума с расстройством дыхания.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[3] Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) является наиболее тяжелой формой острого поражения легких и характеризуется билатеральными легочными инфильтратами и тяжелой гипоксемией. Воспаление является ключевым фактором заболевания, частично опосредованного секрецией цитокинов и других медиаторов воспаления локальными эпителиальными клетками, что приводит к привлечению нейтрофилов, Т-клеток и активированных макрофагов в воспаленную легочную ткань и альвеолярное пространство. Gonzales JN. *Austin J Vasc. Med.* 4 июня 2015 г.; 2(1). ОРДС может быть вызван различными видами инфекции, включая вирусные, бактериальные и паразитарные инфекции, в том числе SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, вирус гриппа, метапневмовирус, вирус ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* и вирус малярии. Kyung-Yil L. *Int. J. Mol. Sci.* 2017, 18, 388; doi:10.3390/ijms18020388. ОРДС также может быть вызван вдыханием высоких концентраций дыма или химических паров, аспирационной рвоты или незавершенным утоплением. Многие люди с ОРДС не выживают, а те, кто выживает, могут иметь длительное повреждение легких (например, легочный фиброз). Alberts W.M. *American College of Chest Physicians.* 1983. 84 (3) стр. 272-4.

[4] Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (SSAO), также известная как VAP-1/АОСЗ, широко экспрессируется в различных тканях, включая печень, жировую ткань и легкие, где она действует в качестве эктофермента для расщепления первичных аминов (например, метиламина) в пероксид водорода (H₂O₂) и альдегиды. Кроме того, связанная с мембраной SSAO действует в качестве молекулы адгезии, что облегчает связывание и трансмиграцию лейкоцитов из сосудистой сети в места воспаления. Экспрессия SSAO повышена при различных воспалительных заболеваниях, что позволяет предположить, что ингибиторы SSAO могут принести клиническую пользу. У пациентов с ОРДС было зафиксировано значительное повышение экспрессии SSAO. Чрезмерное накопление в легочной ткани и альвеолярном пространстве провоспалительных клеток, особенно нейтрофилов, является движущей силой иммунопатологического механизма ОРДС (Tsui P.T. *Emerging Infectious Diseases.* 2003. Vol. 9, No. 9, Franks T. J. *Human Pathology.* 2003. Volume 34, No. 8, Liao M. (ePub перед печатью)

<https://doi.org/10.1101/2020.02.23.20026690>, Tian S. Journal of Thoracic Oncology (ePub перед печатью) <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2020.02.010>.

[5] В моделях острого заболевания легких лечение мощным ингибитором SSAO VI-1467335 (ранее PX-4728A) снижало ЛПС-индуцированную миграцию нейтрофилов в легкие и миграцию цитокин-индуцированных клеток за счет уменьшения скатывания и адгезии лейкоцитов. Schilter, H. C. *Respir. Res.* 2015, 16, 42. PXS-4681A - родственный ингибитор SSAO - также снижал трафик лейкоцитов и выработку цитокинов как в ЛПС-, так и в каррагинан-индуцированной модели воспаления легких на мышах. Foot, J. J. *Pharmacol. Expr. Ther.* 2013 347(2) 365-374. В этих исследованиях действие PXS-4681A было сопоставимо с лечением дексаметазоном - противовоспалительным глюкокортикоидом. В моделях с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ) и острым заболеванием легких, вызванным сигаретным дымом, лечение препаратом VI-1467335 подавляло инфильтрацию дыхательных путей воспалительными иммунными клетками, уменьшало степень фиброза ткани легких и улучшало функцию легких. Jarnicki, A. G. *Br. J. Pharmacol.* 2016, 173, 3161-3175. Наконец, в модели, имитирующей вирусное обострение астматического ответа, лечение препаратом VI-1467335 уменьшало воспалительные клеточные инфильтраты и гиперреактивность дыхательных путей у мышей, сенсibilизированных к клещам домашней пыли (КДП) и впоследствии инфицированных КДП и риновирусом. Schilter, H. C. *Respir. Res.* 2015, 16, 42. Тем не менее, VI-1467335 сохраняет нецелевую активность в отношении MAO-B, что может представлять проблему безопасности у некоторых пациентов.

[6] Соответственно, существует потребность в улучшенном лечении расстройств дыхания, таких как ОРДС, с применением ингибитора SSAO, который обладает большей селективностью по отношению к SSAO по сравнению с MAO-A/B.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[7] Настоящее изобретение описывает композиции и способы лечения расстройств дыхания, таких как ОРДС.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[8] На ФИГ. 1A показана активность SSAO в плазме крови по сравнению с исходным уровнем у здоровых добровольцев, которым вводили однократную дозу плацебо либо 1, 3, 6 или 10 мг соединения Формулы 5 через 4 часа и 168 часов после введения дозы.

[9] На ФИГ. 1B показана динамика активности SSAO по сравнению с исходным уровнем у здоровых добровольцев, которым вводили однократную дозу плацебо либо 1, 3, 6 или 10 мг соединения Формулы 5.

[10] На ФИГ. 1C показана динамика уровня соединения Формулы 5 после однократной дозы плацебо либо 1, 3, 6 или 10 мг у здоровых добровольцев.

[11] На ФИГ. 1D показана динамика уровня метиламина в плазме крови после однократной дозы плацебо либо 1, 3, 6 или 10 мг соединения Формулы 5 у здоровых добровольцев.

[12] На ФИГ. 2А показано изменение массы тела мышей, которым вводили дозу соединения Формулы 5, осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

[13] На ФИГ. 2В показан титр вируса в легких у мышей, которым вводили дозу соединения Формулы 5, осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в день 6 модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

[14] На ФИГ. 2С, ФИГ. 2D, ФИГ. 2Е, ФИГ. 2F, ФИГ. 2G, ФИГ. 2H, ФИГ. 2I, ФИГ. 2J, ФИГ. 2K, ФИГ. 2L и ФИГ. 2M показаны уровни цитокинов в бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛЖ) у мышей, которым вводили дозу соединения Формулы 5, осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в день 14 модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

[15] На ФИГ. 2N показаны инфильтраты клеток в БАЛЖ у мышей, которым вводили дозу соединения Формулы 5, осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в день 14 модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

[16] На ФИГ. 2O показаны результаты гистопатологической оценки легких мышей, которым вводили дозу соединения Формулы 5, осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в день 14 модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

[17] На ФИГ. 2P показана оценка фиброза легких мышей, которым вводили дозу осельтамивира или комбинированной терапии в виде соединения Формулы 5 и осельтамивира в качестве профилактического или терапевтического агента, по сравнению со здоровыми контрольными животными и животными под контролем растворителя, в день 14 модели инфицирования гриппом с риском летального исхода.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[18] В настоящем документе представлены способы лечения расстройств дыхания, таких как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), включающие введение противовоспалительного агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение ингибитора SSAO. В некоторых вариантах осуществления изобретения ингибитор SSAO представляет собой селективный ингибитор

SSAO. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение соединения, описанного в данном документе.

Определения

[19] При использовании в настоящем документе применяются следующие определения (если не указано иное). Кроме того, если какой-либо термин или символ, используемый в настоящем документе, не определен, как указано ниже, он имеет свое обычное значение, принятое в этой области техники.

[20] Предполагается, что «включают» означает, что композиции и способы включают указанные элементы, но не исключают другие. Выражение «состоящий по существу из», когда оно используется для определения композиций и способов, означает исключение других элементов, имеющих существенное значение для комбинации. Например, композиция, состоящая по существу из элементов, определенных в данном документе, не будет исключать другие элементы, которые существенно не влияют на основные и новые характеристики заявленного изобретения. «Состоящий из» означает исключение более чем следового количества, например, других ингредиентов и перечисленных существенных этапов способа. Варианты осуществления, определенные каждым из этих переходных терминов, входят в объем настоящего изобретения.

[21] «Комбинирующая терапия» или «комбинирующее лечение» относится к применению двух или более лекарственных средств или агентов для лечения, например применения соединения Формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли вместе со вторым агентом, применимым для лечения расстройств дыхания (таких как ОРДС), а также симптомов и проявлений каждого из них, которое является комбинирующей терапией. Введение в «комбинации» относится к введению двух агентов (например, соединения Формулы 1 и второго агента) любым способом, при котором фармакологические эффекты обоих проявляются у индивидуума одновременно. Таким образом, введение в комбинации не требует, чтобы одна и та же фармацевтическая композиция, одна и та же лекарственная форма или даже один и тот же путь введения использовались для введения обоих агентов или чтобы эти два агента вводились точно в одно и то же время. Оба агента также могут быть включены в одну фармацевтически приемлемую композицию. Неограничивающим примером такой отдельной композиции является композиция для перорального применения или лекарственная форма для перорального применения. Например, и без ограничений, предполагается, что соединение Формулы 1, такое как соединение Формулы 5, может быть назначено в комбинирующей терапии со вторым агентом в соответствии с настоящим изобретением.

[22] «Второй агент», как этот термин используется в данном документе, относится к агенту, который является отличным от соединения Формулы 1 или его фармацевтически приемлемой соли, и который применим в рамках способа, описанного в данном документе. Термин «второй» в связи со «вторым агентом» подразумевается как термин для отличия агента от соединения Формулы 5 или его фармацевтически приемлемой соли либо энантиомера и не предназначен для обозначения порядка введения.

[23] Термин «эксципиент», используемый в данном документе, означает инертное или неактивное вещество, которое может использоваться в производстве лекарственных или фармацевтических средств, таких как таблетки, содержащих соединение в качестве активного ингредиента. Термин «эксципиент» может охватывать различные вещества, в том числе, помимо прочего, любое вещество, используемое в качестве связующего вещества, разрыхлителя, покрытия, вспомогательного средства для сжатия/инкапсуляции, крема или лосьона, смазывающего средства, растворов для парентерального введения, материалов для жевательных таблеток, подсластителя или ароматизирующего средства, суспендирующего/гелирующего средства или средства для влажного гранулирования. Связующие средства включают, например, карбомеры, повидон, ксантановую камедь и т. д.; покрытия включают, например, ацетатфталат целлюлозы, этилцеллюлозу, геллановую камедь, мальтодекстрин, энтеросолюбильные покрытия и т. д.; добавки для прессования/инкапсуляции включают, например, карбонат кальция, декстрозу, фруктозу dc (dc=«прямо прессуемый»), мед dc, лактозу (ангидрат или моногидрат; необязательно в комбинации с аспартамом, целлюлозой или микрокристаллической целлюлозой), крахмал dc, сахарозу и т. д.; разрыхлители включают, например, кроскармеллозу натрия, геллановую камедь, натриевую соль гликолята крахмала и т. д.; кремы или лосьоны включают, например, мальтодекстрин, каррагенаны и т. д.; смазывающие вещества включают, например, стеарат магния, стеариновую кислоту, стеарилфумарат натрия и т. д.; материалы для жевательных таблеток включают, например, декстрозу, фруктозу dc, лактозу (моногидрат, необязательно в комбинации с аспартамом или целлюлозой) и т. д.; суспендирующие/гелеобразующие агенты включают, например, каррагенан, натриевую соль гликолята крахмала, ксантановую камедь и т. д.; подсластители включают, например, аспартам, декстрозу, фруктозу dc, сорбитол, сахарозу dc и т. д.; агенты для влажного гранулирования включают, например, карбонат кальция, мальтодекстрин, микрокристаллическую целлюлозу и т. д.

[24] «Индивидуум» относится к млекопитающим и включает человека и млекопитающих, отличных от человека. Примеры пациентов включают, помимо прочего, мышей, крыс, хомяков, морских свинок, свиней, кроликов, кошек, собак, коз, овец, коров и людей. В некоторых вариантах осуществления изобретения «индивидуум» относится к человеку.

[25] «Фармацевтически приемлемый» относится к безопасным и нетоксичным, предпочтительно для употребления *in vivo*, более предпочтительно для введения человеку.

[26] «Фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая является фармацевтически приемлемой. Соединение, описанное в данном документе, можно вводить в виде фармацевтически приемлемой соли.

[27] «Соль» относится к ионному соединению, образованному в результате реакции между кислотой и основанием. Если соединение, описываемое в данном документе, содержит кислотную функциональность, такие соли включают, помимо прочего, соли щелочного металла, щелочноземельного металла и аммония. Для целей

настоящего документа соли аммония включают соли, содержащие протонированные азотистые основания и алкилированные азотистые основания. Приводимые в качестве примера (но без ограничения) катионы, применимые в фармацевтически приемлемых солях, включают катионы Na, K, Rb, Cs, NH₄, Ca, Ba, имидазолия и аммония на основе аминокислот, встречающихся в природе. Когда соединения, используемые в настоящем документе, содержат основную функциональность, такие соли включают, помимо прочего, соли органических кислот, таких как карбоновые кислоты и сульфоновые кислоты, и минеральных кислот, таких как галогеноводороды, серная кислота, фосфорная кислота и тому подобное. Приводимые в качестве примера (но без ограничения) анионы, применимые в фармацевтически приемлемых солях, включают оксалат, малеат, ацетат, пропионат, сукцинат, тартрат, хлорид, сульфат, бисульфат, моно-, ди- и трехосновный фосфат, мезилат, тозилат и т. п.

[28] «Терапевтически эффективное количество» или доза соединения либо композиции относится к тому количеству соединения либо композиции, которое приводит к снижению или ингибированию симптомов или продлению выживаемости пациента. Для получения результатов может потребоваться несколько доз соединения или композиции.

[29] Для целей настоящего документа «лечение» или «лечить» представляет собой подход для получения полезных или желаемых результатов, в том числе клинических результатов. Для целей настоящего изобретения, полезные или желаемые результаты включают, помимо прочего, одно или более из следующего: уменьшение одного или более симптомов, возникающих в результате болезни или расстройства, уменьшение степени тяжести течения болезни или расстройства, стабилизации течения болезни или расстройства (например, предупреждение или отсрочка ухудшения течения болезни или расстройства), задержку возникновения или рецидива болезни или расстройства, задержку или замедление прогрессирования болезни или расстройства, облегчение течения болезни или расстройства, обеспечение ремиссии (частичной или общей) болезни или расстройства, уменьшение дозы одного или более других лекарственных средств, необходимых для лечения болезни или расстройства, усиление эффекта другого лекарственного агента, применяемого для лечения болезни или расстройства, задержку прогрессирования болезни или расстройства, повышение качества жизни и (или) продление выживаемости пациента. Также под «лечением» понимается уменьшение патологических последствий болезни или расстройства. Способы по настоящему изобретению предусматривают любой один или более из этих аспектов лечения.

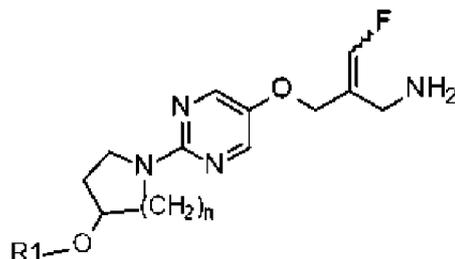
[30] Используемый в данном документе параметр или значение «приблизительно» включает и описывает этот параметр или значение как таковые. Например, «приблизительно X» включает и описывает X как таковой.

[31] Термины «необязательный» или «необязательно», используемые по всему описанию, означают, что описанное впоследствии событие или обстоятельство может произойти, но это не обязательно, и что описание включает в себя и такие случаи, когда событие или обстоятельство происходит, и такие, в которых оно не происходит.

Например, «атом азота необязательно окисляется для обеспечения N-оксидного (N□O) фрагмента» означает, что атом азота может, но не нуждается в окислении, и описание включает в себя и такие ситуации, когда атом азота не окисляется, и такие, когда атом азота окисляется.

Соединения

[32] В настоящем изобретении предусмотрены соединения Формулы 1:



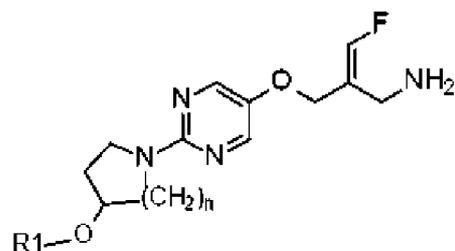
1

где n равняется 1 или 2; и R1 представляет собой H или -CH₃; или его фармацевтически приемлемая соль.

[33] Связь с фтором, которая проиллюстрирована как , указывает на то, что атом фтора и группа метоксипиримидина могут быть либо Z (zusammen, вместе), либо E (entgegen, противоположно) друг относительно друга (Brecher, J., et al., "Graphical Representation of Stereochemical Configuration", Pure and Appl. Chem, 2006, 78(10) 1897, at 1959). Структура, проиллюстрированная Формулой 1, включает соединения со стереохимической конфигурацией Z, стереохимической конфигурацией E или смесь соединений в стереохимической конфигурации Z и E. Предпочтительные соединения по настоящему изобретению характеризуются стереохимической конфигурацией E.

[34] В одной форме в настоящем изобретении предусмотрены соединения Формулы 1 в качестве свободного основания. В другой форме в настоящем изобретении предусмотрены соединения Формулы 1 в виде солей присоединения кислоты, например соли присоединения моно- или ди-HCl или соли сульфоната, предпочтительно 4-метилбензолсульфоната (тозилатной соли).

[35] В одной форме в настоящем изобретении предусмотрено соединение Формулы 2:

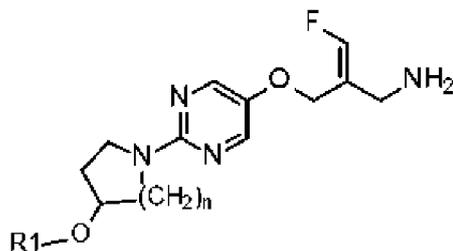


2

где n равняется 1 или 2; и R1 представляет собой H или -CH₃; или его

фармацевтически приемлемая соль.

[36] В другой форме в настоящем изобретении предусмотрено соединение Формулы 3:



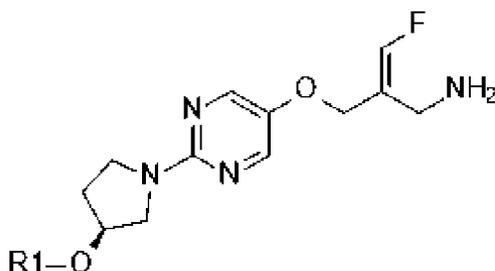
3

где n равняется 1 или 2; и R_1 представляет собой H или $-CH_3$; или его фармацевтически приемлемая соль.

[37] В одном варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено соединение в соответствии с одной из Формул 1, 2 и 3, где n представляет собой 1, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено соединение в соответствии с одной из Формул 1, 2 и 3, где n представляет собой 2, или его фармацевтически приемлемая соль.

[38] В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено соединение в соответствии с одной из Формул 1, 2 и 3, где R_1 представляет собой H, или его фармацевтически приемлемая соль. В другом варианте осуществления в настоящем изобретении предусмотрено соединение в соответствии с одной из Формул 1, 2 и 3, где R_1 представляет собой $-CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

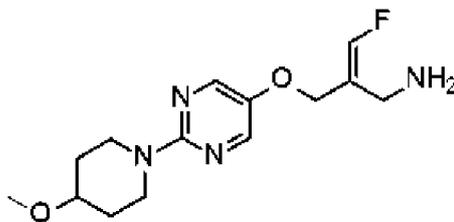
[39] В другой форме в настоящем изобретении предусмотрено соединение Формулы 4



4

где R_1 представляет собой H или $-CH_3$, или его фармацевтически приемлемая соль.

[40] В другой форме настоящее изобретение представляет собой соединение в соответствии с Формулой 5



5

или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления изобретения соединение Формулы 5 представлено в виде соли присоединения кислоты. Предпочтительно соль присоединения кислоты представляет собой соль присоединения моно- или ди-НСI или соль сульфоната, такую как соль присоединения метансульфоновой кислоты или 4-метилбензолсульфоновой кислоты с получением мезилатной соли или 4-метилбензолсульфоновой (тозилатной) соли. В одном варианте осуществления изобретения соединение Формулы 5 представлено в виде тозилатной соли.

[41] В другой форме в настоящем изобретении предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая соединение в соответствии с любой из Формул 1-5 или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент. В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция содержит соединение в соответствии с Формулой 5 или его фармацевтически приемлемую соль. Предпочтительно фармацевтически приемлемый(ые) анион(ы) для соли представляет(ют) собой моно- или дихлорид, мезилат или 4-метилбензолсульфонат (тозилат). В одном варианте осуществления изобретения соединение Формулы 5 представлено в виде тозилатной соли.

Способы

Лечение расстройств дыхания

[42] В настоящем документе представлены способы лечения расстройств дыхания, таких как острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС), включающие введение эффективного количества противовоспалительного агента. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение ингибитора SSAO. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение представляет собой ингибитор SSAO, который обладает большей селективностью по отношению к SSAO по сравнению с MAO-A и MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение является селективным ингибитором SSAO, который не ингибирует MAO-A и MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает введение соединения, описанного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение эффективного количества соединения Формулы 5 или его тозилатной соли.

[43] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описываемого в данном документе, представлены способы лечения расстройства или нарушения дыхания, предусматривающие введение индивидууму эффективного количества соединения,

описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с ОРДС. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с пневмонией. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с раком легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с астмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с острой пневмонией. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума, пострадавшего от вдыхания дыма. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума с фиброзом легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение индивидуума со сниженной функцией легких.

[44] Острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС) возникает, когда жидкость скапливается в крошечных упругих воздушных мешочках (альвеолах) в легких. Жидкость препятствует заполнению легких достаточным количеством воздуха, что означает, что в кровоток попадает меньше кислорода. Это лишает органы кислорода, необходимого для их функционирования. Диагноз ОРДС может быть поставлен на основании физикального обследования. Рентгеновский снимок грудной клетки позволяет определить, в каких частях легких находится жидкость, сколько ее, а также увеличено ли сердце. Компьютерная томография (КТ) объединяет рентгеновские снимки, сделанные под разными углами, в виде поперечных срезов внутренних органов. Компьютерная томография позволяет получить подробную информацию о структурах внутри сердца и легких. Уровень кислорода можно измерить с помощью анализа крови. Другие виды анализов крови могут служить для проверки на наличие признаков инфекции или анемии. Кроме того, для выявления ОРДС можно использовать электрокардиограмму, измеряя электрическую активность сердца. Также для диагностики ОРДС используется эхокардиограмма, выявляющая проблемы со структурами и функцией сердца. Симптомы ОРДС включают одышку, затрудненное и необычно учащенное дыхание, низкое кровяное давление, спутанность сознания и сильную усталость.

[45] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения, описываемого в данном документе, представлен способ лечения ОРДС у индивидуума, включающий введение соединения по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемой соли индивидууму, нуждающемуся в этом. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение эффективного количества соединения Формулы 5 или его фармацевтически приемлемой соли.

[46] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает снижение выраженности одного или нескольких осложнений, возникающих при ОРДС. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается вероятность образования

тромбов, коллапса легких (пневмоторакса), инфекции и (или) фиброза легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается степень когнитивных нарушений, таких как потеря памяти и ясность мышления. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается степень усталости и слабости.

[47] В некоторых вариантах осуществления изобретения способ включает лечение вирусной инфекции, предусматривающее введение соединения по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение бактериальной инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает лечение SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, вируса гриппа, метапневмовируса, вируса ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* или вируса малярии.

[48] В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания, подлежащее лечению, вызвано патогеном. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано вирусом. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано паразитами. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, вирусом гриппа, метапневмовирусом, вирусом ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis* или вирусом малярии. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано COVID-19.

[49] В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания, подлежащее лечению, вызвано экологическим фактором. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано вдыханием высоких концентраций дыма или химических паров, аспирационной рвоты или незавершенным утоплением.

[50] В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания, подлежащее лечению, вызвано основным заболеванием. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано сепсисом. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано травмой головы, грудной клетки или другой серьезной травмой. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано панкреатитом. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано переливанием крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения расстройство дыхания вызвано ожогом.

[51] В некоторых вариантах осуществления изобретения представлены способы лечения одного или более симптомов расстройства дыхания, предусматривающие введение индивидууму эффективного количества соединения, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается степень затрудненности дыхания. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается интенсивность кашля. В некоторых вариантах осуществления изобретения уменьшается боль в груди. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается уровень

слизи. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается частота или тяжесть кашля с кровью. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается уровень частоты шумного дыхания. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается выраженность фиброза легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения улучшается функция легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, предусмотренные в данном документе, увеличивают время выживания индивидуума с расстройством дыхания. В некоторых вариантах осуществления изобретения способ предусматривает введение эффективного количества соединения Формулы 5 или его фармацевтически приемлемой соли.

[52] Также в данном документе предусмотрен способ уменьшения воспаления в легких индивидуума, включающий введение индивидууму эффективного количества соединения, описанного в данном документе. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается один или более маркеров воспаления легких. В некоторых вариантах осуществления изобретения в результате лечения снижается инфильтрация дыхательных путей воспалительными иммунными клетками. В некоторых вариантах осуществления изобретения снижается уровень миелоидных клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения в легких индивидуума снижается уровень одной или более иммунных клеток или лимфоцитов. В некоторых вариантах осуществления изобретения в легких снижается уровень лейкоцитов, включая, помимо прочего, нейтрофилы и макрофаги.

[53] В некоторых вариантах осуществления изобретения после лечения соединением, предусмотренным в данном документе, уровень нейтрофилов в легких снижается на по меньшей мере 5%, по меньшей мере 10%, по меньшей мере 20%, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50% или больше. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень нейтрофилов в легких снижается на 5-50%, на 5-40% или на 5-20%.

[54] В некоторых вариантах осуществления изобретения способы, описанные в данном документе, предусматривают введение соединения по настоящему изобретению индивидууму (такому как человек) различными путями, в том числе путем парентерального, внутривенного, внутриартериального, внутрибрюшинного, внутрилегочного, перорального, ингаляционного, внутримышечного, внутритрахеального, подкожного, внутриглазного, интратекального или трансдермального введения. Например, соединение можно вводить путем ингаляции для лечения заболеваний дыхательных путей. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят интраназально.

[55] В некоторых вариантах осуществления изобретения, описываемого в данном документе, предусмотрен способ лечения заболевания, предусматривающий селективное ингибирование SSAO путем введения соединения, описанного в данном документе. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления изобретения MAO-A (моноаминоксидаза А) не ингибируется. В некоторых вариантах осуществления

изобретения MAO-B (моноаминоксидаза B) не ингибируется. В некоторых вариантах осуществления изобретения MAO-A и MAO-B не ингибируются.

[56] В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения по меньшей мере в 100 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A и (или) MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения по меньшей мере в 1000 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A и (или) MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения по меньшей мере в 10000 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A и (или) MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения в 100-10000 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A и (или) MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения в 100-1000 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A или MAO-B. В некоторых вариантах осуществления изобретения значение IC_{50} соединения по меньшей мере в 100 раз, или по меньшей мере в 1000 раз, или по меньшей мере в 10000 раз, или в 100-10000 раз, или в 100-1000 раз ниже для SSAO, чем для MAO-A и для MAO-B.

[57] Также представлены способы ингибирования активности SSAO у индивидуума в течение определенного периода времени, включающие введение индивидууму однократной ежедневной дозы соединения, описанного в настоящем документе (например, соединения Формулы 5), в течение первого периода времени, после чего следует второй период времени, когда введение соединения прекращается, при этом ингибирование активности SSAO сохраняется в течение как первого, так и второго периода времени. В некоторых вариантах осуществления изобретения первый и второй периоды времени представляют собой однонедельный период. Например, в данном документе представлен способ ингибирования активности SSAO у индивидуума в течение периода продолжительностью 14 дней, включающий введение индивидууму однократной ежедневной дозы соединения, описанного в настоящем документе (например, соединения Формулы 5), в течение первых 7 дней, после чего следует второй период времени продолжительностью 7 дней, когда введение соединения прекращается, при этом ингибирование активности SSAO сохраняется в течение всего периода времени продолжительностью 14 дней.

[58] Также в данном документе предусмотрены режимы доз для введения соединения, описанного в данном документе (такого как соединение Формулы 5), нуждающемуся в этом индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму через день. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму каждые два дня, каждые три дня, каждые четыре дня, каждые пять дней или каждые шесть дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки в течение по меньшей мере семи дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки в течение по меньшей мере 14 дней. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один

раз в сутки в течение периода от одной до четырех недель.

[59] В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг соединения, описанного в данном документе (такого как соединение Формулы 5). Количество дозы соединения, описанного в данном документе, определяют на основании свободного основания соединения, такого как свободное основание соединения Формулы 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят от приблизительно 5 мг до приблизительно 10 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 1 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 2 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 3 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 4 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 5 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 6 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 7 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 8 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 9 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидууму вводят приблизительно 10 мг соединения. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму ежедневно, например один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму еженедельно. В одном варианте осуществления изобретения соединение представляет собой соединение Формулы 5 или его фармацевтически приемлемую соль, такую как тозилатная соль.

[60] В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки в течение по меньшей мере семи дней в суточном количестве, составляющем от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг, или любое количество из следующего: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки в течение по меньшей мере 14 дней в суточном количестве, составляющем от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг, или любое количество из следующего: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение вводят индивидууму один раз в сутки в течение периода от одной до четырех недель в суточном количестве, составляющем от

приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 5 мг, или от приблизительно 1 мг до приблизительно 3 мг, или любое количество из следующего: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг. В любых таких вариантах осуществления изобретения ежедневное введение по одному варианту осуществления производится путем ингаляции. В любых таких вариантах осуществления изобретения ежедневное введение по одному варианту осуществления производится путем перорального введения дозы. В любых таких вариантах осуществления изобретения соединение по одному варианту осуществления представляет собой соединение Формулы 5 или его тозилатную соль.

[61] Также в данном документе описаны способы лечения расстройства дыхания, предусматривающие введение эффективного количества соединения, описанного в данном документе, в комбинации со вторым агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй агент представляет собой противовирусный агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй агент представляет собой антибактериальный агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй агент представляет собой ингибитор вируса гриппа, такой как осельтамивир (OTV), продаваемый под торговой маркой TAMIFLU. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй агент представляет собой нуклеотидный аналог, такой как ремдесивир. В некоторых вариантах осуществления изобретения второй агент представляет собой противовирусное соединение, описанное в работе De Clercq, E. & Li, G. Approved antiviral drugs over the past 50 years. Clin. Microbiol. Rev. 29, 695-747 (2016), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и в частности в отношении раскрытых в ней противовирусных соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение, описываемое в данном документе, вводят одновременно со вторым агентом. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединение, описываемое в данном документе, и второй агент доставляют последовательно.

Изделия и комплекты

[62] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены изделия, содержащие соединение, описанное в данном документе, или его соль, композицию, описанную в данном документе, или одну или более единичных дозировок, описанных в данном документе, в соответствующей упаковке. В определенных вариантах осуществления изобретения изделие предназначено для применения в рамках любого из способов, описанных в данном документе. Соответствующая упаковка известна из уровня техники и включает, например, флаконы, сосуды, ампулы, бутылки, банки, гибкую упаковку и т. п. Изделие может быть дополнительно стерилизовано и (или) запечатано.

[63] Настоящее изобретение дополнительно предусматривает комплекты для осуществления способов по настоящему изобретению, которые содержат одно или более соединений, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемую соль, или композицию, содержащую соединение, описанное в данном документе, или его

фармацевтически приемлемую соль. В комплектах можно использовать любое из соединений, раскрытых в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте в комплекте используют соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль. Комплекты можно применять для любого из одного или более вариантов применения, описанных в данном документе, и, соответственно, они могут содержать инструкции для лечения любого заболевания, описанного в данном документе, например для лечения расстройства дыхания, такого как ОРДС.

[64] Комплекты обычно содержат подходящую упаковку. Комплекты могут содержать один или более контейнеров, содержащих любое соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль. Каждый компонент (если имеется более одного компонента) может быть упакован в отдельные контейнеры, также как некоторые компоненты могут быть объединены в один контейнер, если это возможно, исходя из перекрестной реактивности и срока хранения.

[65] Комплекты могут быть в единичных стандартных лекарственных формах, упаковках нерасфасованного лекарственного средства (например, в многодозовых упаковках) или субъединицах. Например, могут быть предусмотрены комплекты, которые содержат достаточные дозы соединения, раскрытого в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль, и (или) дополнительное фармацевтически активное соединение, применимое для заболевания, подробно описанного в данном документе, с целью обеспечения эффективного лечения индивидуума в течение длительного периода, такого как любой из следующих: неделя, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 6 недель, 8 недель, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев или больше. Комплекты также могут также включать многократные дозы соединений и инструкции по применению и быть упакованы в количествах, достаточных для хранения и использования в аптеках (например, в больничных аптеках и аптеках, где производится компаундирование).

[66] Комплекты могут необязательно включать комплект инструкций, как правило, письменных инструкций, хотя также приемлемыми являются электронные носители информации (например, магнитная дискета или оптический диск), содержащие инструкции, относящиеся к использованию компонента(ов) способов по настоящему изобретению. Инструкции, включенные в комплект, обычно содержат информацию о компонентах и их введении индивидууму.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Общая информация

[67] Семикарбазид-чувствительная аминоксидаза (SSAO) способствует развитию неалкогольного стеатогепатита (НАСГ) путем увеличения окислительного стресса через дезаминирование первичных аминов (например, метиламина, ММА) до альдегидов, аммония и H_2O_2 , а также путем привлечения воспалительных клеток в печень, усугубляя

воспаление и повреждение печени. Уровни SSAO повышены при НАСГ и коррелируют со стадией фиброза. Соединение Формулы 5 представляет собой селективный ковалентный ингибитор SSAO, который уменьшает воспаление печени и фиброз в модели НАСГ у крыс. Было проведено клиническое исследование однократной возрастающей дозы соединения Формулы 5.

[68] Соединения, описанные в данном документе, могут быть получены с помощью способов, описанных в патентной публикации WO 2018/028517, включенной в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте и конкретно в отношении способов получения соединений, подробно описанных в данном документе.

Способы

[69] Четыре группы по 8 здоровых участников были рандомизированы для получения соединения Формулы 5 в капсуле или соответствующего плацебо в соотношении 3:1. Уровни в плазме крови соединения Формулы 5 и фармакодинамические биомаркеры определяли до введения дозы и в различные моменты времени после введения дозы. Ингибирование SSAO определяли путем измерения относительного снижения генерации H_2O_2 в плазме крови после добавления экзогенного субстрата (бензиламина). Уровни эндогенного метиламина (ММА), которые, как предполагается, повышаются при ингибировании SSAO, измеряли в плазме крови. Безопасность оценивали в течение 7 (± 3) дней после введения дозы.

[70] Образцы плазмы крови для определения концентрации соединения Формулы 5 и активности SSAO собирали через 0,25, 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48 часов (только активность SSAO) и 168 часов (только активность SSAO) после введения однократной дозы исследуемого лекарственного средства (плацебо или соединения). Фармакокинетические параметры в плазме крови определяли посредством некомпартментного анализа. Активность SSAO оценивали путем измерения уровня генерации перекиси водорода (H_2O_2) в образцах плазмы крови реципиентов плацебо и активного соединения Формулы 5. Процентное изменение общей активности аминоксидазы определяли относительно соответствующих образцов, взятых до введения дозы (на исходном уровне).

[71] Уровень SSAO-специфической аминоксидазы в плазме крови определяли с помощью кинетического анализа, в значительной степени как описано ранее (Schilter et al). Эндогенные моноаминоксидазы А и В ингибировали путем добавления паргилина к образцам плазмы крови до измерения уровней генерации H_2O_2 у реципиентов плацебо и активного вещества. Максимальное ингибирование определяли с помощью образцов до введения дозы (на исходном уровне), дополнительно обработанных высокой дозой соединения Формулы 5, и процентные изменения в SSAO-специфической активности рассчитывали относительно исходных образцов.

Результаты

[72] 32 здоровых участника (100% мужчин, 63% чернокожих, 19% азиатского, 13% европейского происхождения) принимали однократную пероральную дозу соединения

Формулы 5 (1, 3, 6 и 10 мг, n=6 каждый) или плацебо (n=2). Фармакокинетическая экспозиция соединения Формулы 5 в плазме крови увеличивалась более чем пропорционально дозе при дозе от 3 до 10 мг. Средний период полураспада соединения Формулы 5 составляет от 1 до 3 часов. Через 4 часа после введения дозы почти полное ингибирование активности SSAO в плазме наблюдалось во всех когортах доз, и продолжающееся подавление было обнаружено в течение 1 недели после однократного приема соединения Формулы 5. Максимальный уровень метиламиновой кислоты в плазме крови повышался при использовании соединения Формулы 5. Клинически значимых нежелательных явлений или отклонений лабораторных показателей от нормы зарегистрировано не было.

[73] Как показано в таблице 1, все дозы 1, 3, 6 и 10 мг соединения Формулы 5 хорошо переносились.

Таблица 1. Нежелательные явления, связанные с лечением

| | 1 1 мг тозилатной соли Формулы 5 или плацебо (n=8) | 2 3 мг тозилатной соли Формулы 5 или плацебо (n=8) | 3 6 мг тозилатной соли Формулы 5 (n=8) | 4 10 мг тозилатной соли Формулы 5 или плацебо (n=8) | Все (n=32) |
|--|--|--|---|--|---------------|
| Частота возникновения любого НЯВЛ у субъекта | 0 | 0 | 2 (25) | 3 (37,5) | 5 (15,6) |
| Частота НЯВЛ у субъектов, которые считались возможно связанными с лечением | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |
| Диагноз НЯВЛ и частота | | | | | |
| запор | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |
| контактный дерматит | 0 | 0 | 2 (25) | 0 | 2 (6,3) |
| дисгевзия | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |
| головная боль | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |
| оральный герпес | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |

| | | | | | |
|------------------------------------|---|---|----------|----------|---------|
| боль в горле | 0 | 0 | 1 (12,5) | 0 | 1 (3,1) |
| инфекция верхних дыхательных путей | 0 | 0 | 0 | 1 (12,5) | 1 (3,1) |

[74] Однократные дозы тозилатной соли соединения Формулы 5 быстро выводились из плазмы, при этом фармакокинетическая экспозиция в плазме крови увеличивалась более чем пропорционально дозе при дозе от 3 до 10 мг.

[75] Однократные дозы соединения Формулы 5 быстро и существенно снижали активность аминоксидазы плазмы у всех субъектов, как показано на ФИГ. 1А и ФИГ. 1В. Почти полное ингибирование SSAO-специфической активности наблюдали через 4 часа после введения дозы (ФИГ. 1А и ФИГ. 1В). Ингибирование активности аминоксидазы SSAO в плазме крови и дозозависимое повышение уровня метиламиновой кислоты в плазме крови сохранялось в течение 1 недели после введения однократных доз соединения Формулы 5, что указывало на сильное ковалентное взаимодействие с мишенью и поддерживало режим введения дозы один раз в сутки, несмотря на короткий период полураспада в плазме крови (ФИГ. 1А и ФИГ. 1В).

[76] Концентрации (C_{max}) для соединения Формулы 5 были более чем в 800 раз ниже концентраций IC_{50} для MAO-A и MAO-B при всех уровнях доз.

Таблица 2. Биохимическая активность (IC_{50} мкМ)

| Ингибитор SSAO | SSAO | MAO-A | MAO-B |
|---------------------------|--------|-------|-------|
| Соединение Формулы 5 | 0,0065 | >50 | >50 |
| BI 1467335 (PXS-4728A) | 0,005 | >100 | 2,7 |

[77] Наблюдали дозозависимое повышение уровня метиламина, что указывает на сильное взаимодействие с мишенью в виде SSAO в плазме крови во всем диапазоне доз (ФИГ. 1D).

Выводы

[78] Соединение Формулы 5 было безопасным и хорошо переносилось здоровыми субъектами, которым вводили однократную пероральную дозу в диапазоне от 1 мг до 10 мг. Соединение Формулы 5 ингибировало активность SSAO в течение максимум семи дней после введения однократной дозы. Это позволяет предположить, что соединение Формулы 5 может быть эффективным для лечения заболеваний или нарушений, таких как расстройства дыхания, путем селективного ингибирования SSAO. Оно также может проявлять активность SSAO в течение семи дней после однократного приема, что позволяет предположить, что ежедневное введение в течение одной недели может оказывать терапевтический эффект в течение двухнедельного периода.

Пример 2

[79] Проводили исследование фазы 2а доказательства концепции соединения Формулы 5 у пациентов с COVID-19 и тяжелой легочной дисфункцией. Проводили также

сопутствующие доклинические и клинические исследования фармакодинамики и биомаркеров. Эксперименты проводили для проверки эффекта соединения Формулы 5 в моделях острого и хронического повреждения легких, ОРДС и вирус-индуцированного повреждения легких.

Пример 3

[80] Эксперименты проводили для проверки того, может ли соединение Формулы 5 подавлять инфильтрацию воспалительных клеток в легких аналогично тому, как было продемонстрировано в работе Schliter et al. *Respiratory Research* 16:42 (2015). В кратком изложении: мышей BALB/c обезболивали и вводили им иммуногенную композицию, такую как липоглицерид, *Klebsiella pneumoniae*, пылевой клещ (*Dermatophagoides pteronyssinus*), rCXCL1. Также проводилась перевязка и пункция слепой кишки, чтобы вызвать сепсис.

[81] Мышам вводили соединение Формулы 5. В моменты времени проводили измерения для оценки фармакокинетики/фармакодинамики соединения Формулы 5 и влияния соединения на воспаление в легком.

[82] Уровни MAO-A, MAO-B, DAO, LOXL2 и LOX измеряли с применением флуорогенного анализа. Измеряли общее количество клеток и нейтрофилов в легких. Измеряли скатывание и адгезию клеток. Также измеряли выживаемость.

Пример 4

[83] Старых мышей, инфицированных коронавирусом, использовали в качестве модели для ОРДС, индуцированных вирусом, как в работе Chen et al., *J. Virology* 84(3):1298-1301 (2010). В кратком изложении: адаптированный к мышам вирус SARS-CoV с титром $10^6,5$, выраженный в 50% тканевой цитопатической дозе, размножали в клетках Vero. Клетки Vero поддерживали в среде OptiPro SFM (Invitrogen, Калифорния). Самкам мышей BALB/c в возрасте от 12 до 14 месяцев интраназально вводили адаптированный к мышам вирус SARS-CoV с титром 10^5 ТЦД₅₀.

[84] Мышам вводили соединение Формулы 5. Легкие отбирали в последовательные моменты времени. Оценивали гистопатологию, заболеваемость и смертность.

Пример 5

[85] Для оценки эффективности соединения Формулы 5 применяли адаптированную к мышам модель инфицирования коронавирусом SARS.

[86] Использовали способы, описанные в работе Sheahan et al, *Sci. Transl. Med.* 9 (28 июня 2017 г.). В кратком изложении: мышей инфицировали адаптированным к мышам вирусом SARS-CoV (мышиный штамм MA15) с титром 10^4 БОЕ/50 мл (профилактические исследования) или 10^3 БОЕ/50 мл (терапевтические исследования). Roberts et al. *Plos Pathogens* (2007) Jan;3(1):e5. Животных взвешивали ежедневно для отслеживания потери веса, связанной с вирусом.

[87] Мышам вводили соединение Формулы 5.

[88] В определенные моменты времени мышей умерщвляли, и уровень вируса выявляли с помощью анализа вирусных бляшек или количественных способов

определения вирусной РНК.

Пример 6

[89] Для оценки эффективности соединения Формулы 5 использовали модель инфицирования мышей вирусом гриппа А с риском летального исхода.

[90] Контрольно-измерительные приборы и аппаратура: основные приборы, использованные в данном исследовании, включали электронные весы, ламинарный шкаф II класса микробиологической безопасности и центрифугу (Thermo & Fisher), CO₂-инкубатор (Thermo), счетчик клеток (Invitrogen), гомогенизатор TissueLyser II (Qiagen), Nanodrop 1000 (Thermo Scientific), микропланшетный мультидетектор SpectraMax (Molecular Devices), Luminex (BIO-RAD), анализатор крови (Siemens).

[91] Реагенты: ключевые реагенты, используемые в этом исследовании, включали клетки MDCK, питательную среду DME, бессывороточную питательную среду Ultra MDCK, параформальдегид, кристаллический фиолетовый, комплект для выявления цитокинов мыши (Th1/Th2 Cytokine 11-Plex Mouse ProcartaPlex™ Panel) и комплект для количественного определения гидроксипролина. В качестве положительного контроля использовали осельтамивира фосфат. PBS использовали в качестве носителя и растворителя соединения Формулы 5 и осельтамивира фосфата.

[92] Состав: осельтамивир растворяли в PBS при концентрации 0,5 мг/мл и 1,0 мг/мл. Соединение Формулы 5 растворяли в растворителе, указанном выше, в концентрациях 2,0 мг/мл и 4,0 мг/мл. Прозрачные растворы получали путем обработки ультразвуком и перемешивания. Готовили ежедневно и до использования хранили при температуре 4 °С.

[93] Вирус: Вирус гриппа А, WSN/33 штамм H1N1, $3,0 \times 10^6$ БОЕ/мл

Витальные методы

[94] 144 самки мышей BALB/c, без патогенов, в возрасте 6-8 недель, разделяли на 16 групп: здоровый контроль (1 группа), под контролем растворителя (1 группа), монотерапия осельтамивиром (положительный контроль, 2 группы), монотерапия соединением Формулы 5 (2 группы), комбинированное лечение осельтамивиром и соединением Формулы 5 (2 группы), при этом каждая группа включала 8 или 10 мышей. Когорту из 10 мышей использовали для сбора образцов в день 6, и когорту из 8 мышей использовали для мониторинга массы тела и смертности. Мыши получали растворитель или тестируемые соединения перорально по схеме с 0-го или 1-го дня по 5-й или 6-й день, причем первая доза вводилась за 2 часа до инокуляции (группа профилактики) или через 36 часов после инокуляции (группа лечения) вирусом гриппа А с риском летального исхода, штамм WSN/33 в дозе 15 000 БОЕ/мышь/50 мкл интраназально под общей анестезией. Всех мышей ежедневно контролировали в отношении потери массы тела (BWL), состояния здоровья и смертности.

[95] Мышей в группах сбора образцов умерщвляли в день 6 для титрования вируса в легких и гистологической оценки; собирали образцы жидкости для бронхоальвеолярного лаважа (БАЛЖ) для выявления цитокинов и подсчета иммунных

клеток; кровь для сбора плазмы забирали через пункцию подчелюстной вены.

[96] Мышей в группе мониторинга контролировали до конца исследования. Выживших мышей умерщвляли в день 14 и собирали образцы легких для количественного определения гидроксипролина и анализа фиброза легких в качестве показателя эффективности *in vivo*. Также собирали почки и плазму крови. Образцы плазмы крови получали путем центрифугирования (с антикоагулянтом К₂ЭДТА) при 7000×g, 4°C в течение 10 минут. Образцы плазмы хранили при температуре -80°C до передачи для дальнейших анализов.

Таблица 3. Схема и график исследования.

| | Группа | Животные | Идентификатор соединения | Дозировка (мг/кг) | Объем дозы (мл/кг) | Путь введения дозы и режим |
|--------------|--------|----------|--------------------------|-------------------|--------------------|--|
| | 1 | 8 | Не применимо | Не применимо | Не применимо | Не применимо |
| | 2 | 10 | | | | Не применимо |
| | 3 | 8 | Растворитель | 0 | 10 | ПО, 1 р/сут день 0 - день 6, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| | 4 | 10 | | | | ПО, 1 р/сут день 0 - день 5, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| ПРОФИЛАКТИКА | 5 | 8 | Соединение Формулы 5 | 20 | 10 | ПО, 1 р/сут день 0 - день 6, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| | 6 | 10 | | | | ПО, 1 р/сут день 0 - день |

| | | | | | | |
|--|----|----|---|------|-----|---|
| | | | | | | 5, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| | 7 | 8 | Осельтамивир | 5 | 10 | ПО, 2 р/сут день 0 - день 6, первую дозу вводили 2 ч П.И. |
| | 8 | 10 | | | | ПО, 2 р/сут день 0 - день 5, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| | 9 | 8 | Соединение Формулы 5 + осельтамивир | 20+5 | 5+5 | ПО, 1 р/сут/2 р/сут день 0 - день 6, первую дозу вводили -2 ч П.И. |
| | 10 | 10 | | | | ПО, 1 р/сут/2 р/сут день 0 - день 5, первую дозу вводили 2 ч П.И. |

| | | | | | | |
|---------|----|----|-------------------------|----|----|---|
| ЛЕЧЕНИЕ | 11 | 8 | Соединение Формулы 5 | 20 | 10 | ПО, 1 р/сут день 1 - день 6, первую дозу вводили +36 ч П.И. |
| | 12 | 10 | | | | ПО, 1 р/сут день 1 - день 5, первую дозу вводили +36 ч П.И. |
| | 13 | 8 | Осельтамивир | 5 | 10 | ПО, 2 р/сут день 1 - день 6, первую дозу вводили +36 ч П.И. |
| | 14 | 10 | | | | ПО, 2 р/сут день 1 - день 5, первую дозу вводили +36 ч П.И. |

| | | | | | | |
|--|----|----|---|-----------|-----|---|
| | 15 | 8 | Соединение Формулы 5 + осельтамивир | 20 + 5 | 5+5 | ПО, 1 р/сут/2 р/сут день 1 - день 6, первую дозу вводили +36 ч П.И. |
| | 16 | 10 | | | | ПО, 1 р/сут/2 р/сут день 1 - день 5, первую дозу вводили +36 ч П.И. |
| ПО - пероральное введение; 1 р/сут - один раз в сутки; 2 р/сут - два раза в сутки; П.И. - после инфицирования | | | | | | |

Пост-витальные методы

[97] Титрование вируса: титр вируса в легких определяли с помощью анализа бляшкообразования с использованием следующих процедур.

а). Посев клеток: клетки MDCK засеивали в 6-луночный планшет в концентрации $1,67 \times 10^5$ /мл, 3 мл/лунку. Планшеты инкубировали в инкубаторе с CO₂ в течение ночи с целью получения монослойных клеток.

б). Обработка образцов: образцы легких гомогенизировали с помощью гомогенизатора TissueLyser. Супернатант гомогената легкого получали с помощью центрифугирования, а затем последовательно разводили в 10 раз питательной средой.

с). Инокуляция: 0,1 мл супернатанта и последовательные разведения вносили пипеткой в засеянный 6-луночный планшет с целью абсорбирования в течение 4 часов.

д). Инкубация: жидкую питательную среду удаляли и заменяли низкоплавкой агарозной средой. После затвердевания агарозы планшеты помещали в инкубатор CO₂ на 3 дня.

е). Фиксация и окрашивание: клетки фиксировали с помощью 4% параформальдегида и окрашивали с помощью 0,5% кристаллического фиолетового с целью подсчета.

ф). Подсчет бляшек: бляшки на фотографиях визуальнo подсчитывали и рассчитывали вирусный титр, который выражали в виде Log_{10} (бляшки/г легочной ткани) = Log_{10} (бляшки/лунка * 1000 * коэффициенты разведения).

[98] Выявление цитокинов: уровни ГМ-КСФ, ИФН-гамма, ИЛ-1-бета, ИЛ-12p70, ИЛ13, ИЛ-18, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6 и ФНО-альфа в БАЛЖ выявляли с помощью комплекта Lumiplex, упомянутого выше, в соответствии с протоколом и руководством по эксплуатации, предоставленным производителем.

[99] Подсчет клеток в БАЛЖ: лейкоциты, нейтрофилы, лимфоциты и моноциты в образцах БАЛЖ тестировали с помощью анализатора крови в соответствии с руководством по эксплуатации.

[100] Выявление гистологического состава ткани легких: гистологический состав и фиброз ткани легких анализировали с помощью окрашивания гематоксилином и эозином/по Массону и количественной оценки.

а). Обезвоживание тканей: все образцы тканей, фиксированные в 10% нейтральном буферном формалине (NBF) в течение 24~48 часов, обрезали на толщину около 3~5 мм, помещали в кассету системы заливки парафином и обезвоживали в тканевом процессоре.

б). Заливка в парафин и получение гистологического среза ткани: все

обезвоженные ткани заливали в парафин с помощью системы заливки парафином, и готовые парафиновые блоки хранили при комнатной температуре (КТ) до момента получения среза.

с). Процедура окрашивания гематоксилином и эозином: перед окрашиванием все срезы ткани нагревали при 60°C в течение по меньшей мере 45 минут. Затем образцы загружали в автоматическую окрасочную машину и выполняли предустановленные процедуры.

d). Гистопатологическая оценка: срезы исследовали силами патологоанатома и производили количественную оценку на предмет повреждения легких.

[101] Количественное определение гидроксипролина: гидроксипролин определяли с помощью коммерческого комплекта в соответствии с протоколом и руководством по эксплуатации, предоставленным производителем.

Анализ данных

[102] Данные статистически анализировали для того, чтобы увидеть различия результатов в случае использования растворителя и тестируемых препаратов; $p > 0,05$ - без значимой разницы, $p < 0,05$ - значимая разница, $p < 0,01$ - чрезвычайно значимая разница. BWL (потерю массы тела) анализировали с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (Two-way ANOVA). Анализ выживаемости проводили по логранговому критерию. Титр вируса в легких, уровень цитокинов в БАЛЖ, уровень гидроксипролина и патологический анализ легких проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA).

[103] Эффективность *in vivo* тестируемых препаратов определяли с помощью BLW, пропорций выживаемости, а также титра вируса в легких. Подсчет клеток иммунной системы и уровень цитокинов использовали для оценки влияния на противовоспалительное действие. Окрашивание гематоксилином и эозином использовали для оценки патологии легких. Для оценки фиброза ткани легких использовали окрашивание по Массону и детекцию гидроксипролина.

Результаты

[104] В течение всего периода витального исследования ежедневно контролировали массу тела мышей. Потеря массы тела (BWL), которая была нормализована к массе тела в день 0 (ФИГ. 2А).

Таблица 4. Статус выживания

| Группа | Соединение, применяемое в лечении | Дозировка лечения (мг/кг) | Пропорция выживаемости (%) | Медиана времени выживания (день) | Пролонгированное время выживания* (%) | Лог-ранг Значение P* |
|--------|-----------------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------------------|----------------------|
| 1 | Не применимо | 0 | 100 | Не определено | Не определено | <0,0001 |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|---|------|------|---------------|---------------|--------------|
| 3 | Растворитель | 0 | 0 | 5 | Не применимо | Не применимо |
| 5 | Соединение Формулы 5 | 20 | 0 | 6 | 20% | 0,2280 |
| 7 | Осельтамивир | 5 | 100 | Не определено | Не определено | <0,0001 |
| 9 | Соединение Формулы 5 + осельтамивир | 20+5 | 100 | Не определено | Не определено | <0,0001 |
| 11 | Соединение Формулы 5 | 20 | 0 | 6 | 20% | 0,1041 |
| 13 | Осельтамивир | 5 | 100 | Не определено | Не определено | <0,0001 |
| 15 | Соединение Формулы 5 + осельтамивир | 20+5 | 87,5 | Не определено | Не определено | <0,0001 |
| * по сравнению с группой растворителя | | | | | | |

[105] Обнаружение титра вируса легких: всех мышей лечили, как указано, и умерщвляли в день 6 с целью титрования вируса в легких. Титрование проводили с помощью анализа бляшкообразования. Данные показаны в виде Среднего арифметического \pm SEM (среднеквадратическая погрешность среднего арифметического) и проанализированы с помощью анализа бляшкообразования (ФИГ. 2В). Если не указано иное, N=5 (N=6 для группы растворителя). Данные анализировали с помощью однофакторного дисперсионного анализа (One Way ANOVA), исправляли с помощью критерия множественных сравнений Даннета. NS - статистически незначимое ($p > 0,05$); *** $p < 0,001$ по сравнению с группой растворителя.

[106] Профилирование цитокинов в БАЛЖ: уровень цитокинов в БАЛЖ (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ГМ-КСФ; ИФН-гамма, ИЛ-1-бета, ИЛ-12p70, ИЛ13, ИЛ-18, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6 и ФНО-альфа) определяли для оценки иммуномодулирующего эффекта лечения соединением Формулы 5 в модели инфицирования мышей вирусом гриппа А (ФИГ. 2С-2М).

[107] Подсчет клеток в БАЛЖ (ФИГ. 2N; WBC=лейкоциты; NEUT=нейтрофилы; LYM=лимфоциты; MONO=моноциты).

[108] Оценка патологии: гистопатологическую оценку легких оценивали в день 6 с помощью окрашивания гематоксилином и эозином для каждой категории, идентифицированной в Таблице 5. Сумма оценок по категориям была представлена на

ФИГ. 20.

Таблица 5. Гистологическая оценка легких

| Ткань/орган | Гистопатологические изменения |
|---|--|
| Легкие | |
| Дыхательные (воздухопроводящие) пути | |
| | Некроз/отслоение ^a эпителия бронхиол/концевых бронхиол |
| | |
| Дыхательная зона | |
| | Отек, альвеолы ^b |
| | Образование гиалиновой мембраны, альвеолярный проток/мешочек |
| | Расширение альвеолярного протока/мешочка |
| | Воспалительная инфильтрация (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы), альвеолы |
| | Кровотечение, альвеолы |
| | |
| Интерстиций | |
| | Воспалительная инфильтрация (макрофаги, лимфоциты, нейтрофилы), интерстициальная ткань (перибронхиальные пространства, межальвеолярные перегородки, периваскулярные ^d) |
| | Заложенность, межальвеолярные перегородки |
| | Отек, периваскулярный |
| | Кровотечение, периваскулярное |
| | |
| Подсчет баллов: 1, минимальная; 2, легкая; 3, умеренная; 4, выраженная; 5, тяжелая; N, Видимых повреждений нет. ^a эти изменения сопровождались появлением клеточных обломков в просвете пораженных бронхиол; ^{b, в} основном наблюдали в альвеолярном пространстве под плеврой легких; ^d адгезию лейкоцитов наблюдали в интима сосудов; ^e в интерстиции отмечали множество рассеянных клеточных обломков. | |

[109] Оценка фиброза. Проводили окрашивание по Массону. Подсчет баллов: 0=нормальное легкое; 1 Минимальное количество коллагеновых волокон в утолщении альвеолярных или бронхиолярных стенок; 2/3 Слабое или умеренное утолщение стенок без явного повреждения структуры легких; 4/5 Усиление фиброза с очевидным повреждением структуры легких и образованием фиброзных тяжей или небольших фиброзных масс; 6/7 Сильное искажение структуры и большие фиброзные участки; 8 Фиброзное поражение всей области. ** P<0,01; *** p<0,001 по сравнению со здоровым

контролем. Планки погрешностей представляют SEM (ФИГ. 2P).

[110] Выявление гидроксипролина: уровни гидроксипролина измеряли в образцах БАЛЖ, собранных в день 14, они были ниже нижнего порога количественного определения (0,2 мкг/мкл).

[111] В комбинированной профилактической группе до конца исследования дожили 100% мышей, а в комбинированной терапевтической группе - 87,5% (Таблица 4). Комбинированное терапевтическое и профилактическое лечение показало значимое снижение титров вируса в легких (ФИГ. 2B). Комбинированное терапевтическое и профилактическое лечение снижало уровни ИЛ-12p70 (ФИГ. 2F), ИЛ-6 (ФИГ. 2L) и ФНО-альфа (ФИГ. 2M) в образцах БАЛЖ. Комбинированное профилактическое лечение показало более низкое число NEUT (ФИГ. 2N). Комбинированное профилактическое лечение показало (с помощью окрашивания гематоксилином и эозином) значительное снижение патологического повреждения, и в группе комбинированного лечения были обнаружены умеренные улучшения (ФИГ. 2O). Группа комбинированного профилактического лечения продемонстрировала умеренное снижение степени фиброза ткани легких, измеренное с помощью гистологической оценки легочной ткани путем окрашивания по Массону (ФИГ. 2P).

[112] В совокупности эти данные позволяют предположить, что терапия осельтамивиром в комбинации с соединением Формулы 5 была эффективной в снижении заболеваемости и смертности в модели инфицирования мышей вирусом гриппа А с риском летального исхода. Лечение соединением Формулы 5, либо в качестве монотерапии, либо в комбинации с осельтамивиром, не усугубляло репликацию вируса или патологию в этой модели.

[113] Все публикации, в том числе патенты, заявки на патенты и научные статьи, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в том же объеме, в каком каждая отдельная публикация, в том числе патент, заявка на патент или научная статья, были конкретно и индивидуально указаны как включенные посредством ссылки.

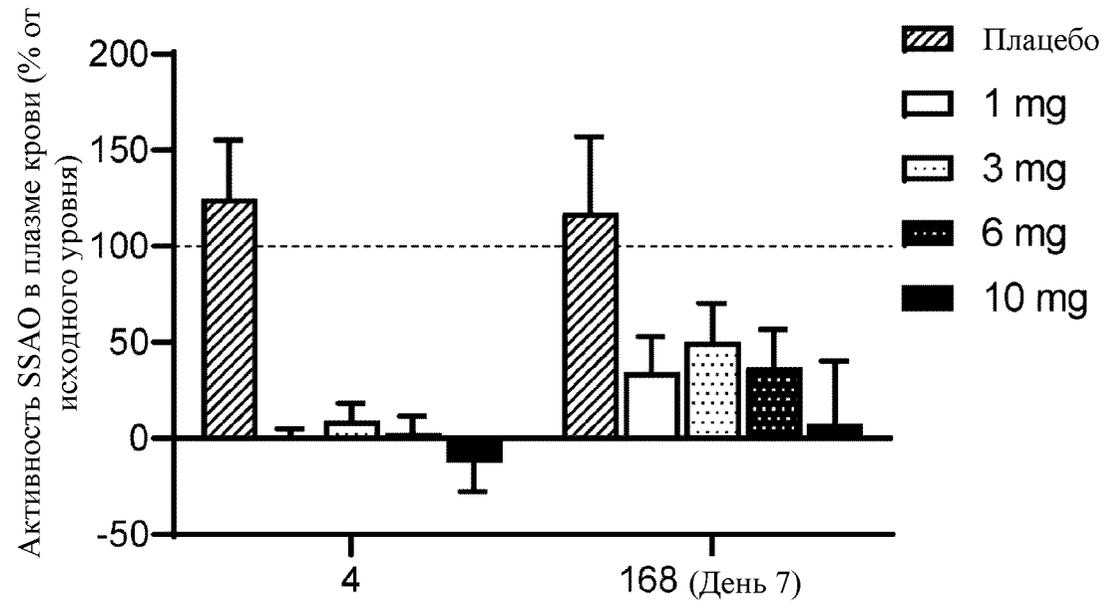
[114] Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров в целях исключения двусмысленного толкования, специалистам в данной области очевидно, что некоторые незначительные изменения и модификации будут применяться на практике в свете указанных выше идей. Таким образом, описание и примеры не следует истолковывать как ограничивающие объем настоящего изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

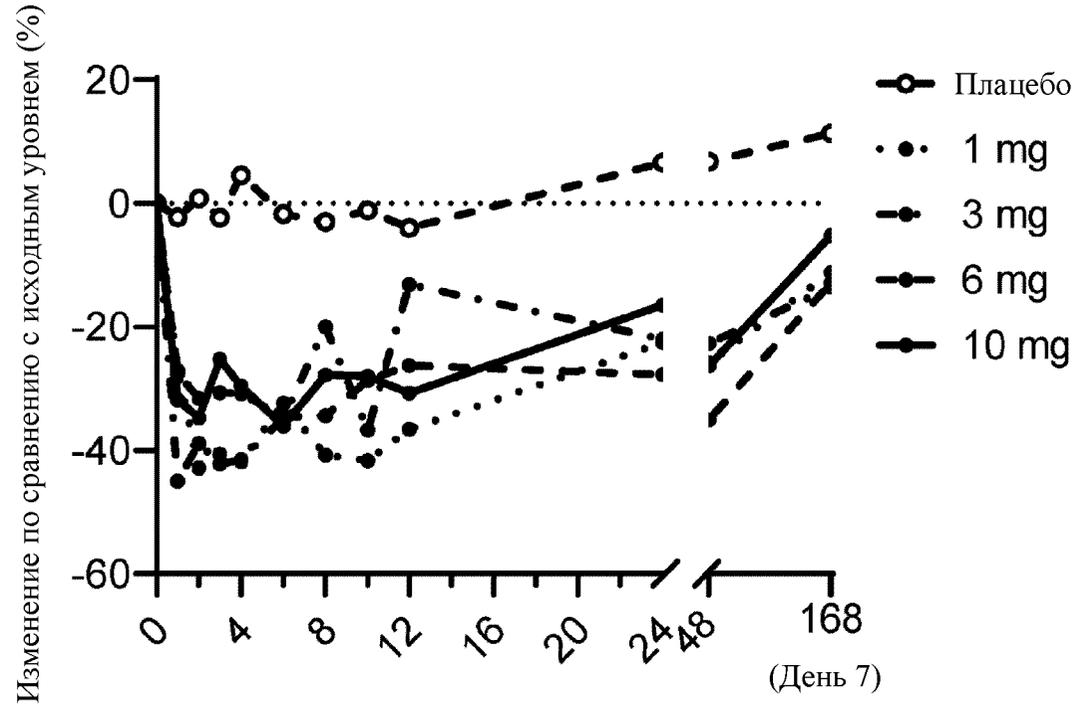
1. Способ лечения расстройства дыхания, включающий введение эффективного количества соединения Формулы 5 или его фармацевтически приемлемой соли нуждающемуся в этом индивидууму.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что расстройство дыхания представляет собой острый респираторный дистресс-синдром (ОРДС).
3. Способ по п. 1 или п. 2, отличающийся тем, что воспаление в легких индивидуума снижается.
4. Способ по любому из пп. 1-3, отличающийся тем, что уровень нейтрофилов у индивидуума снижается.
5. Способ по любому из пп. 2-4, отличающийся тем, что индивидуум страдает от острого респираторного дистресс-синдрома, вызванного патогеном.
6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что патоген представляет собой вирус или бактерии.
7. Способ по п. 5, отличающийся тем, что патоген выбран из группы, состоящей из SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, вируса гриппа, метапневмовируса, вируса ветряной оспы, *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycobacterium tuberculosis*, COVID-19 и вируса малярии.
8. Способ по любому из пп. 1-7, отличающийся тем, что соединение вводят индивидууму один раз в сутки.
9. Способ по любому из пп. 1-8, отличающийся тем, что соединение вводят в дозе от приблизительно 1 мг до приблизительно 10 мг.
10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что MAO-A и MAO-B не ингибируются.
11. Способ по любому из пп. 1-10, отличающийся тем, что соединение доставляется интраназально или посредством ингаляции.

По доверенности

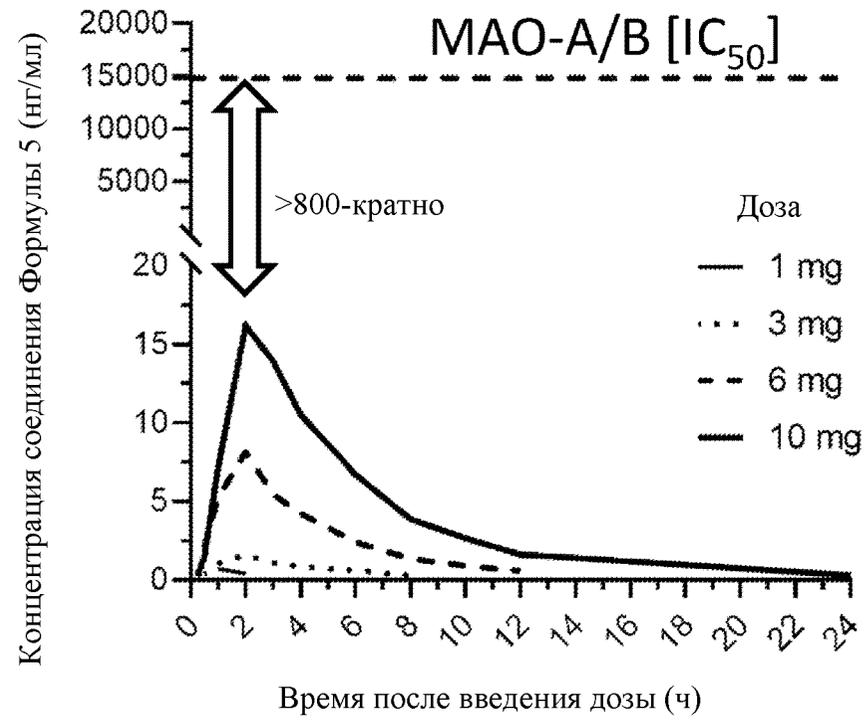
ФИГ. 1А



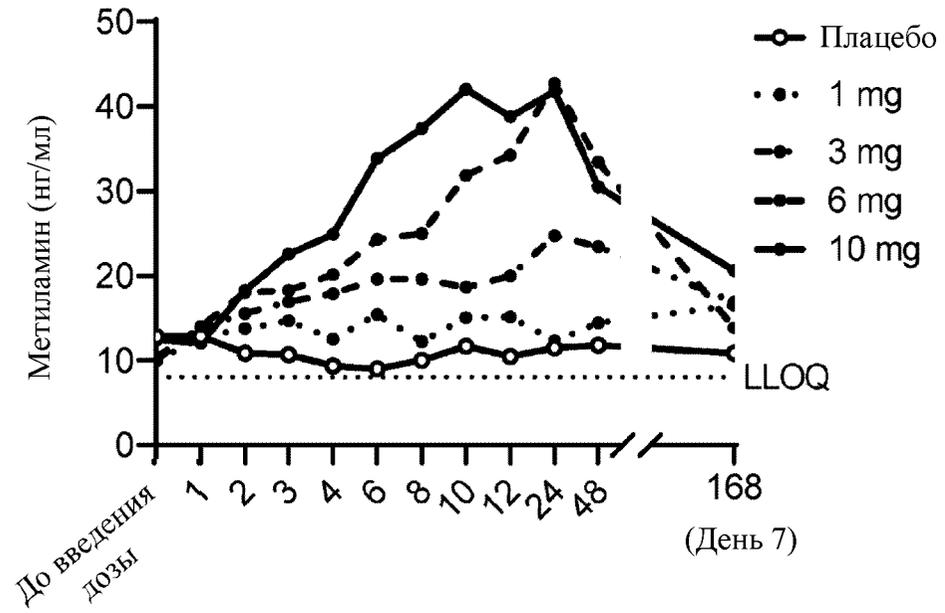
ФИГ. 1В



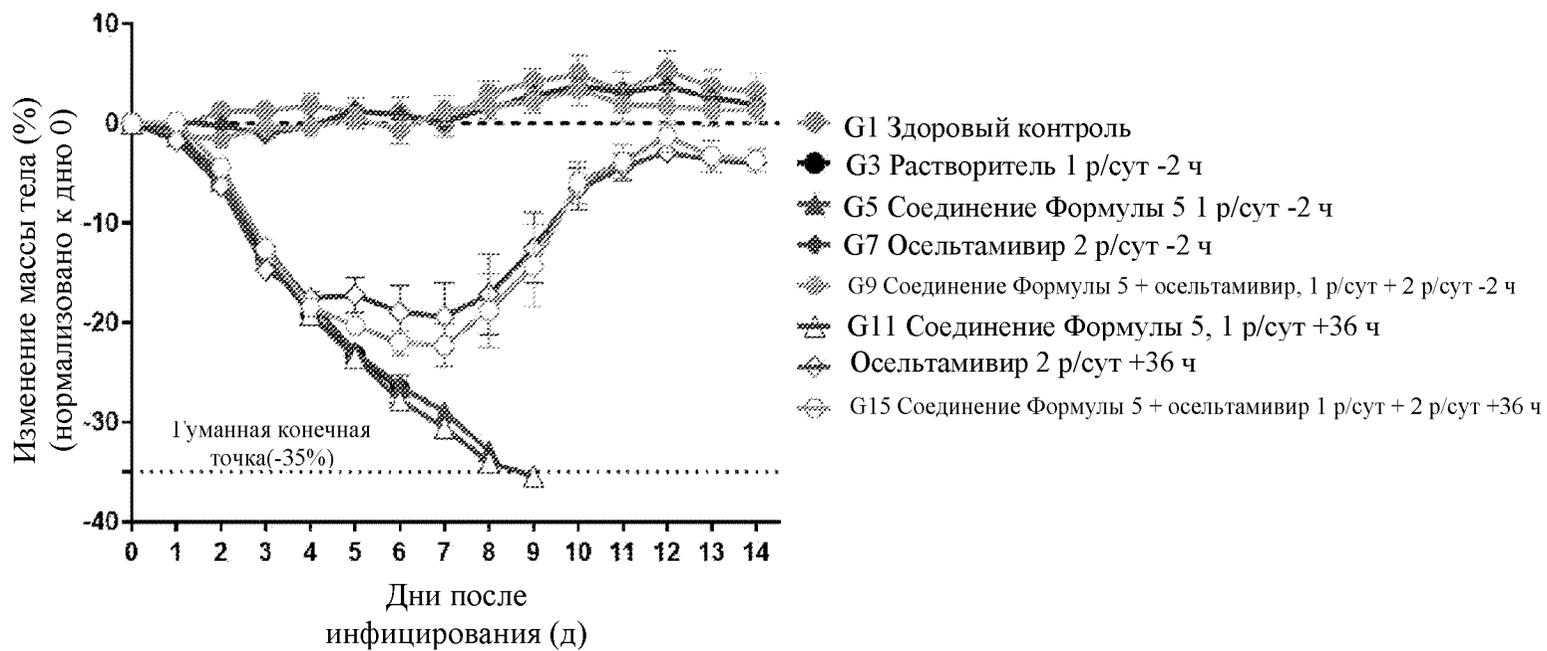
ФИГ. 1С



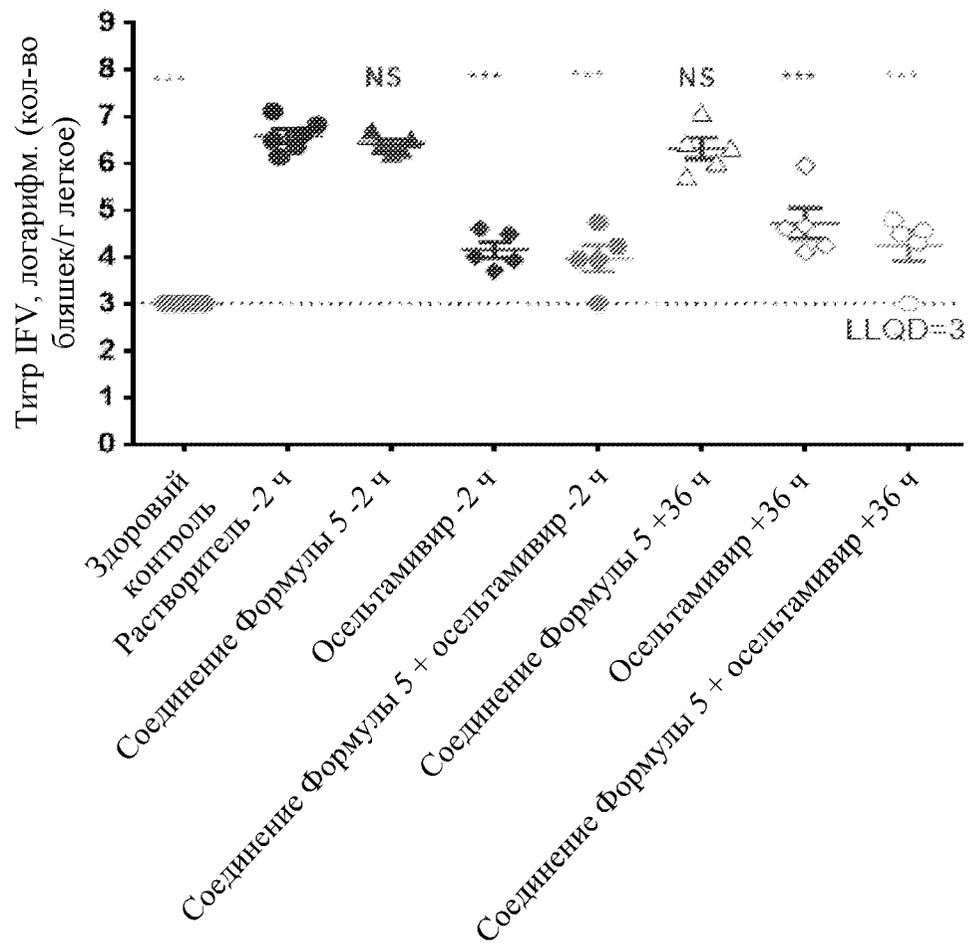
ФИГ. 1D



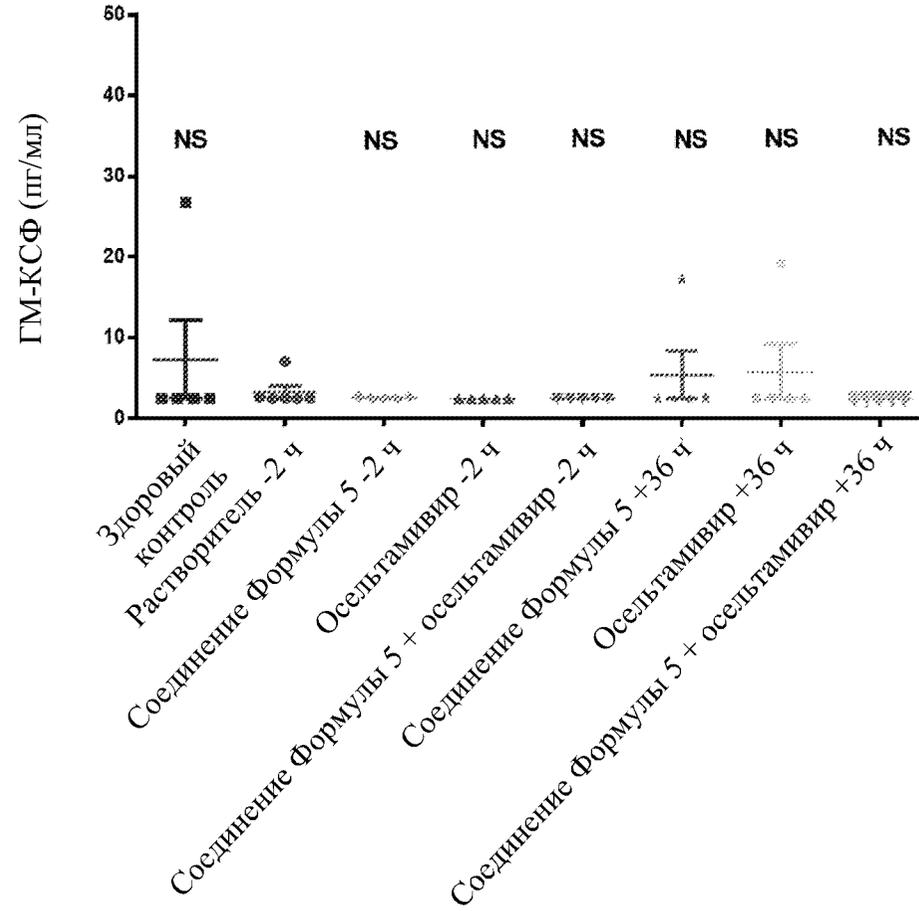
ФИГ. 2А



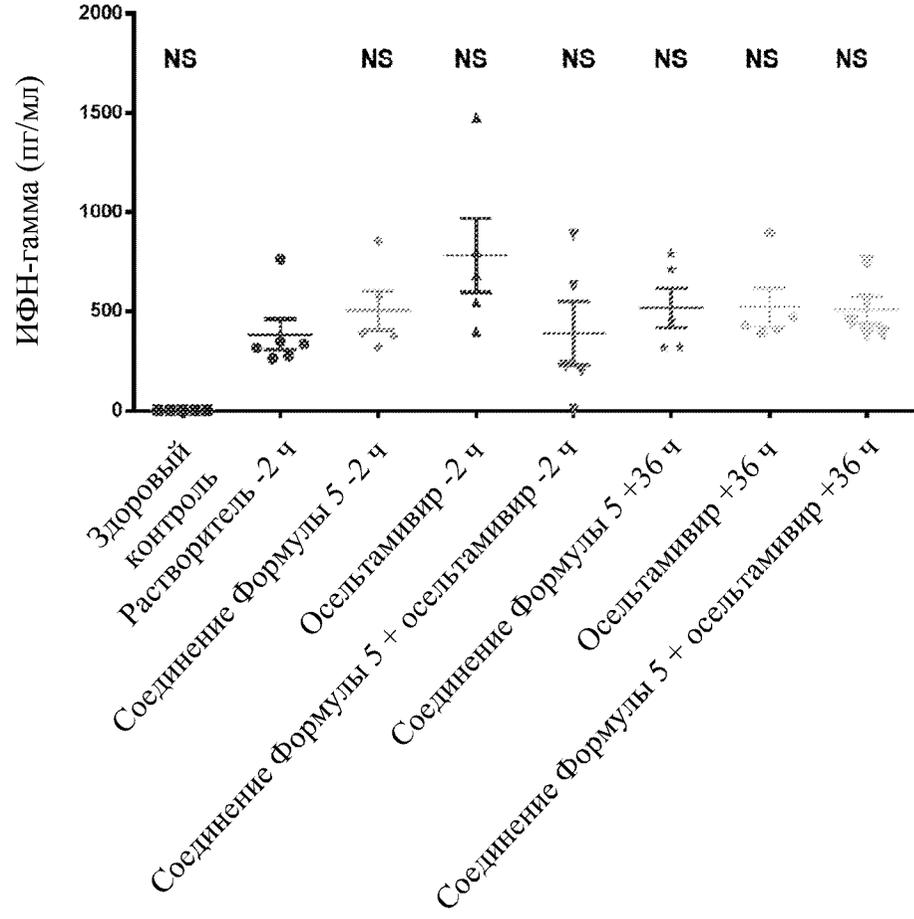
ФИГ. 2В



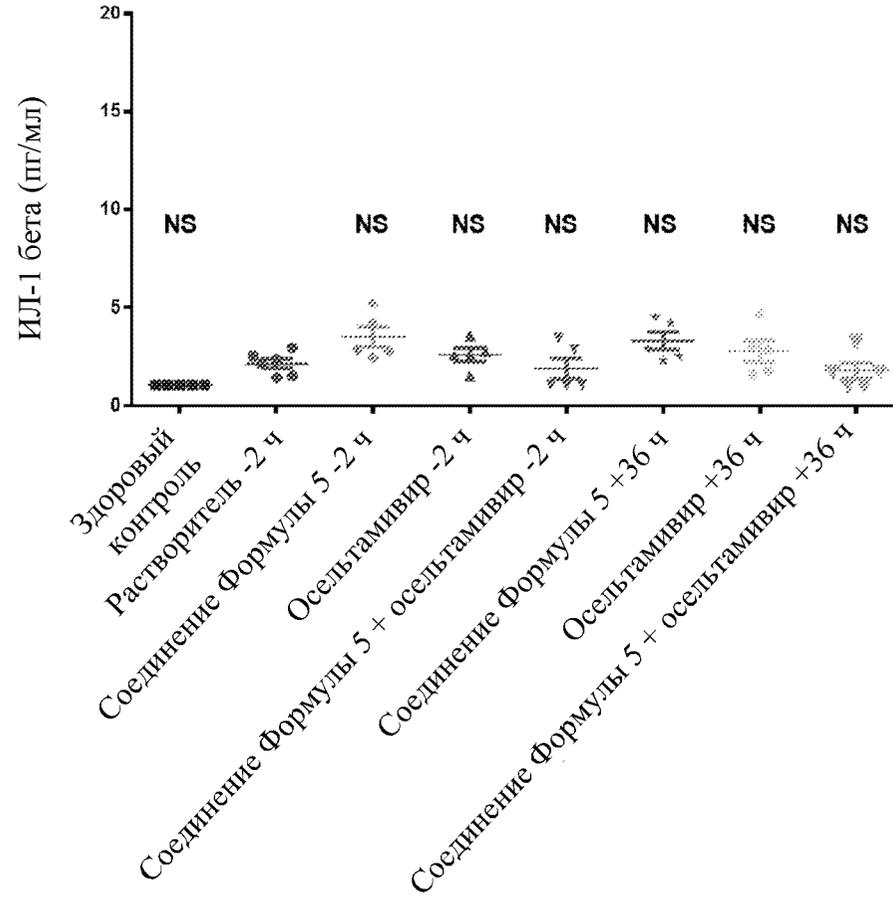
ФИГ. 2С



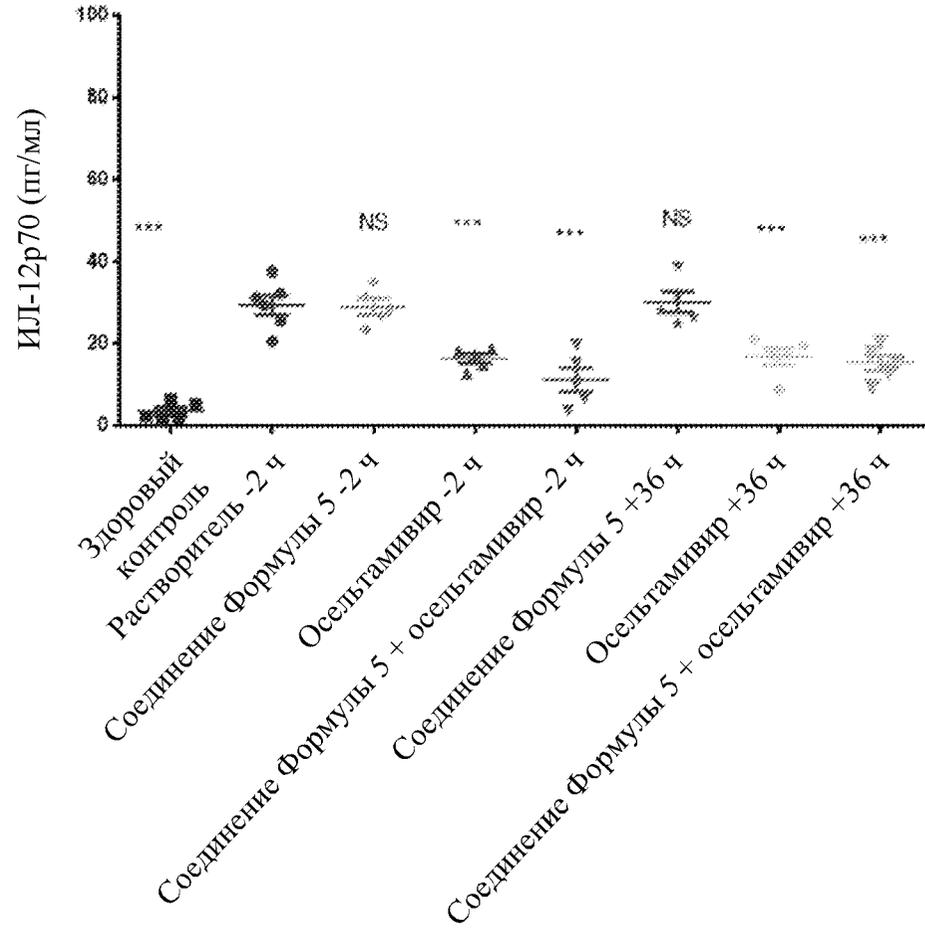
ФИГ. 2D



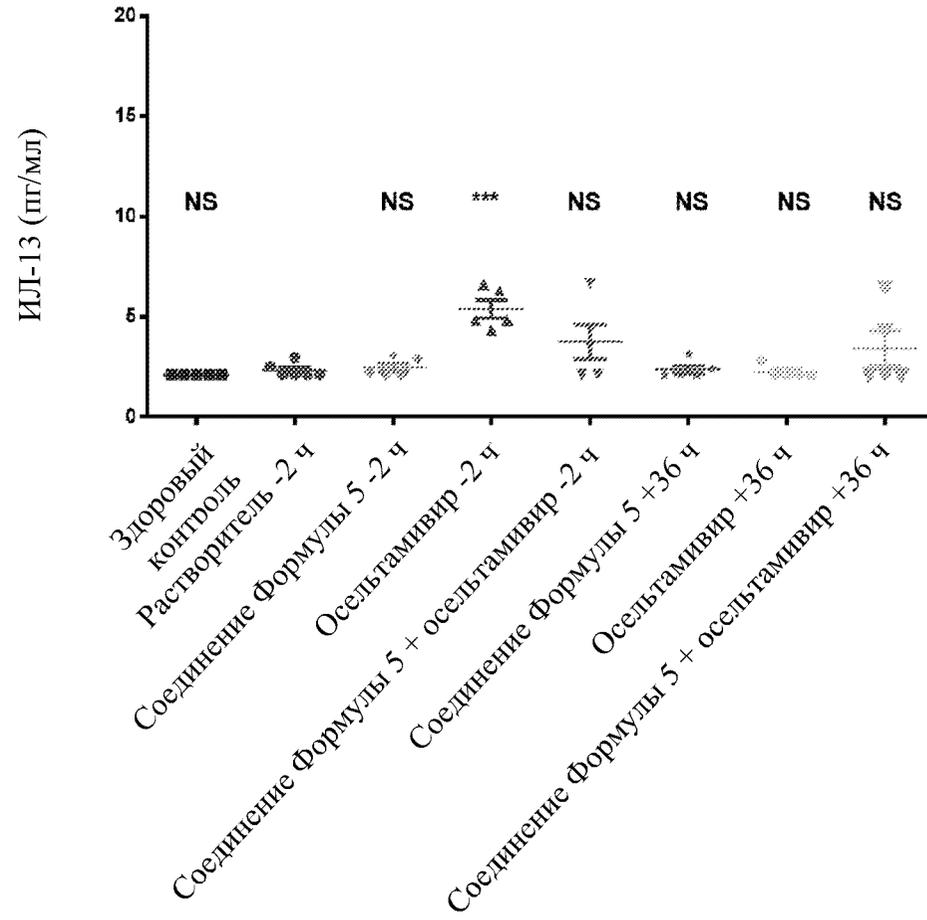
ФИГ. 2Е



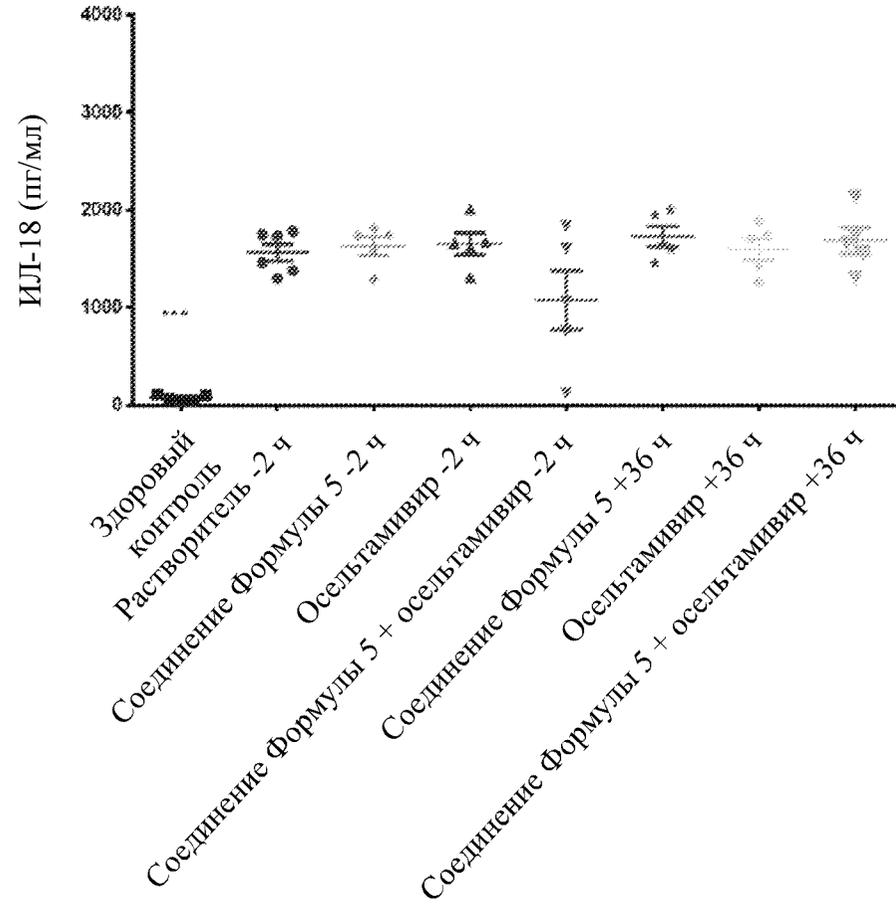
ФИГ. 2F



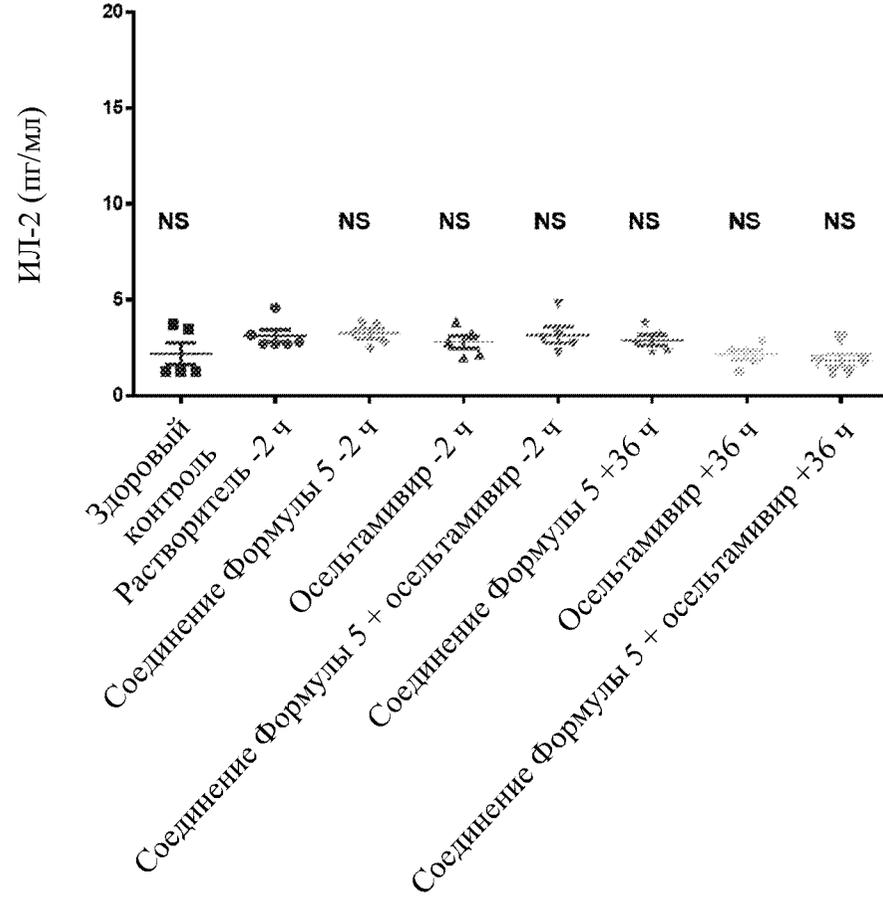
ФИГ. 2G



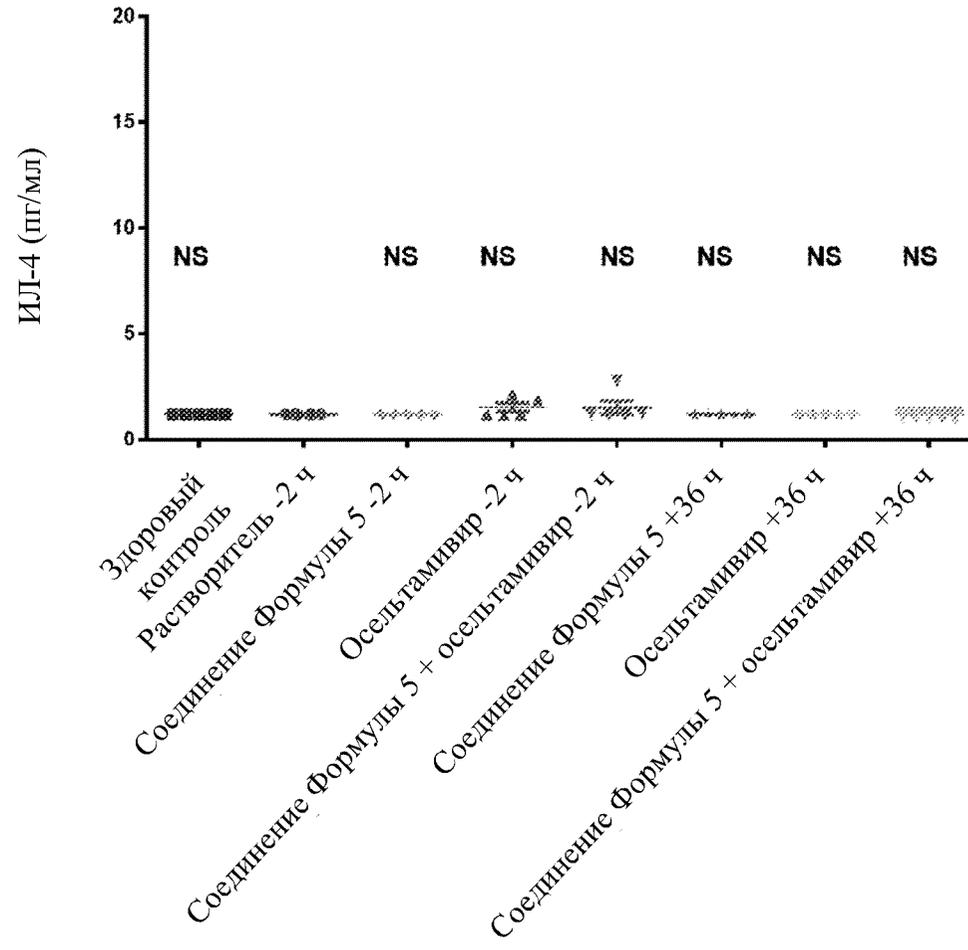
ФИГ. 2Н



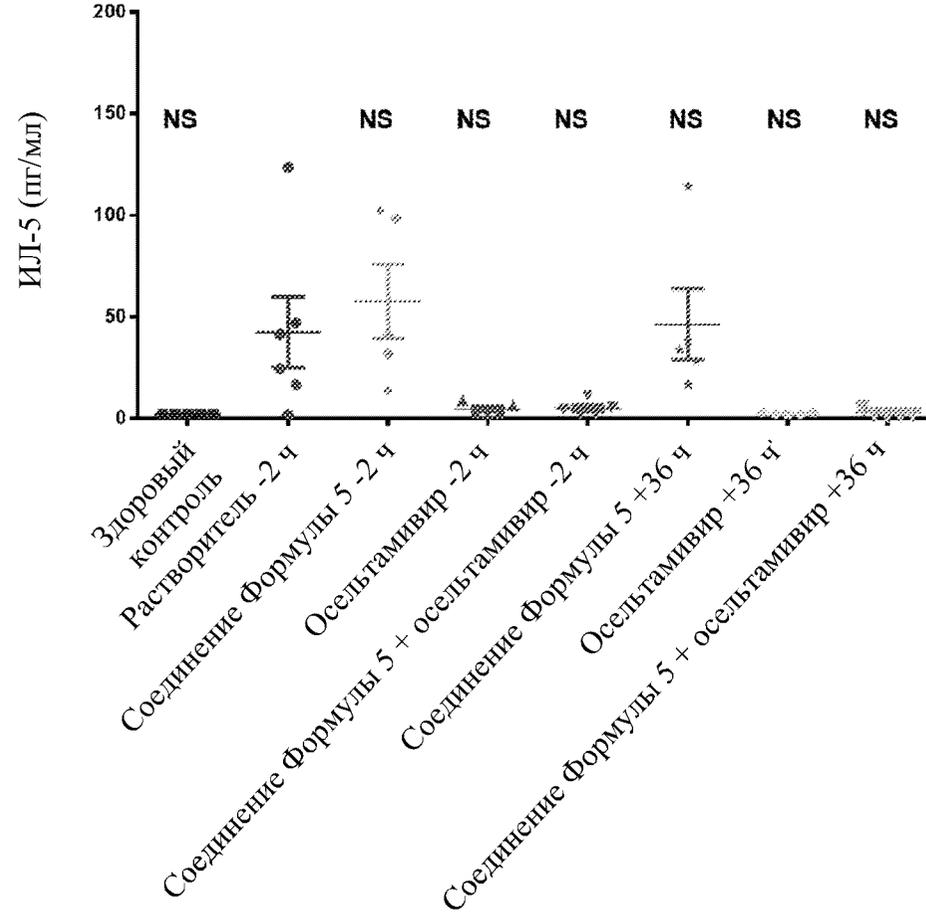
ФИГ. 2I



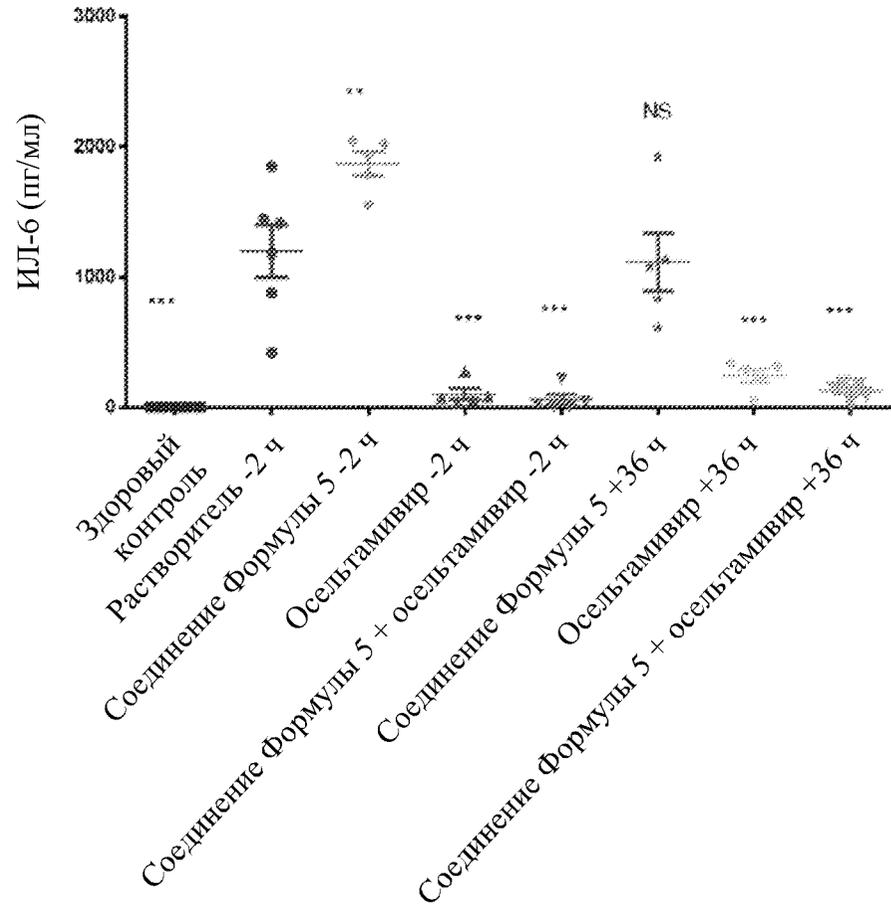
ФИГ. 2J



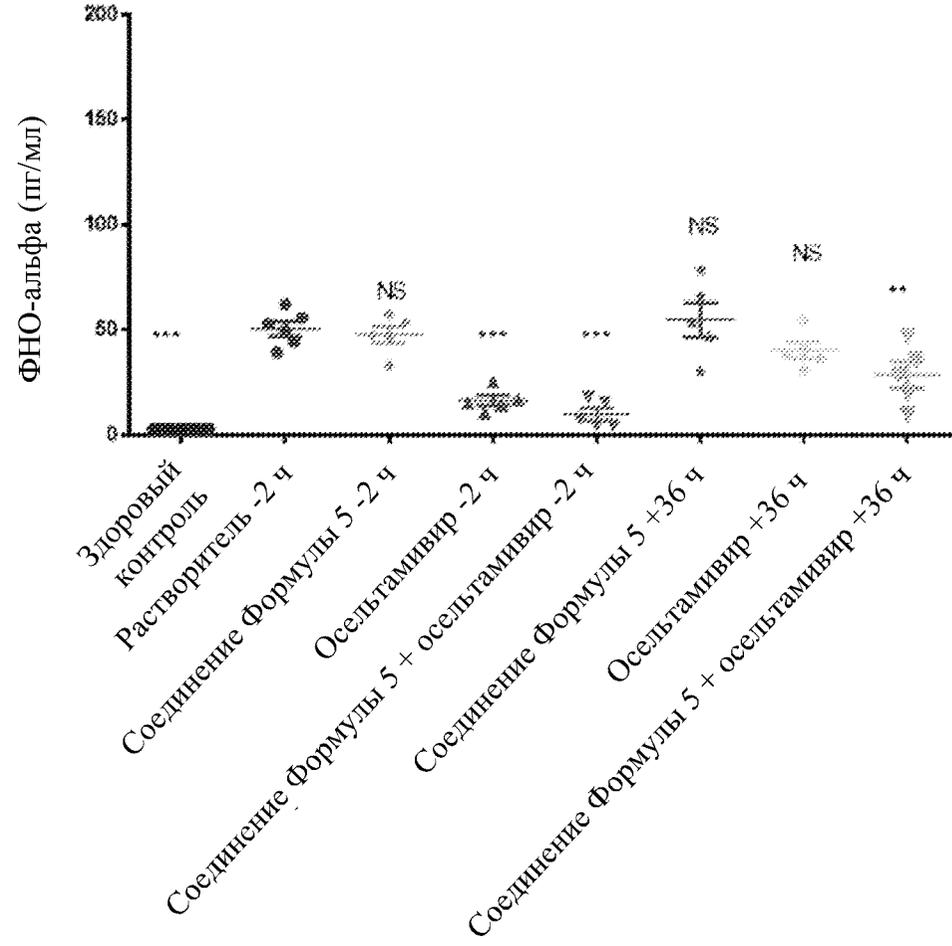
ФИГ. 2К



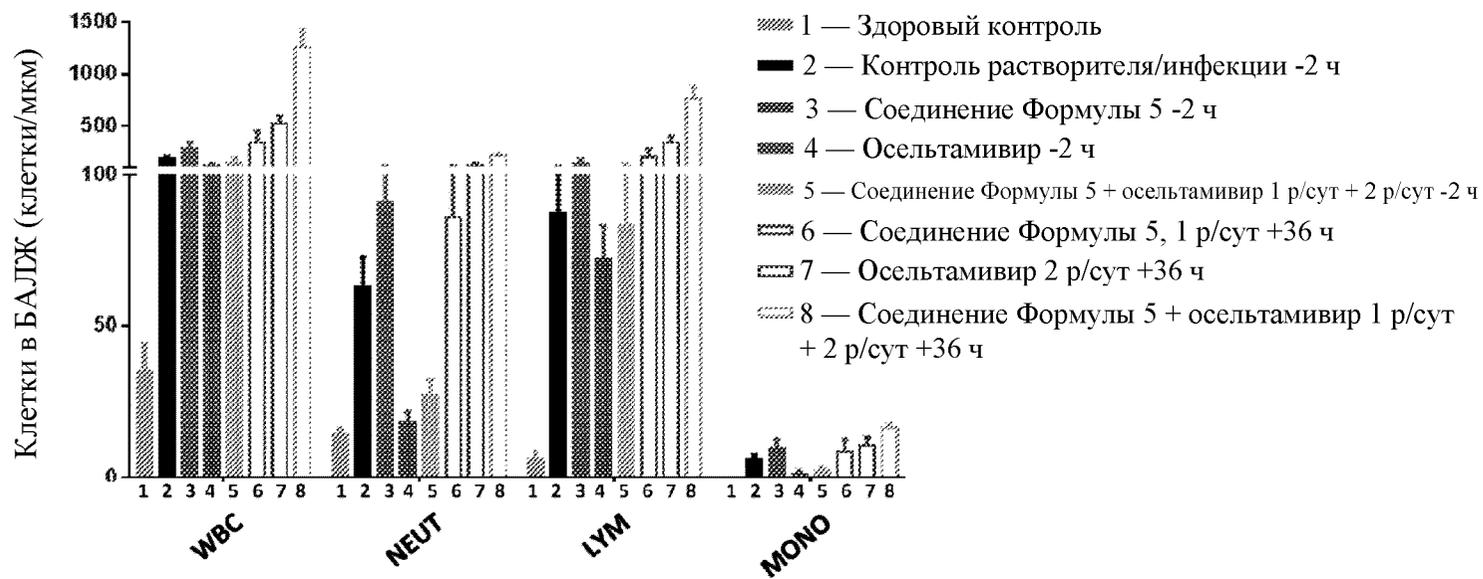
ФИГ. 2L



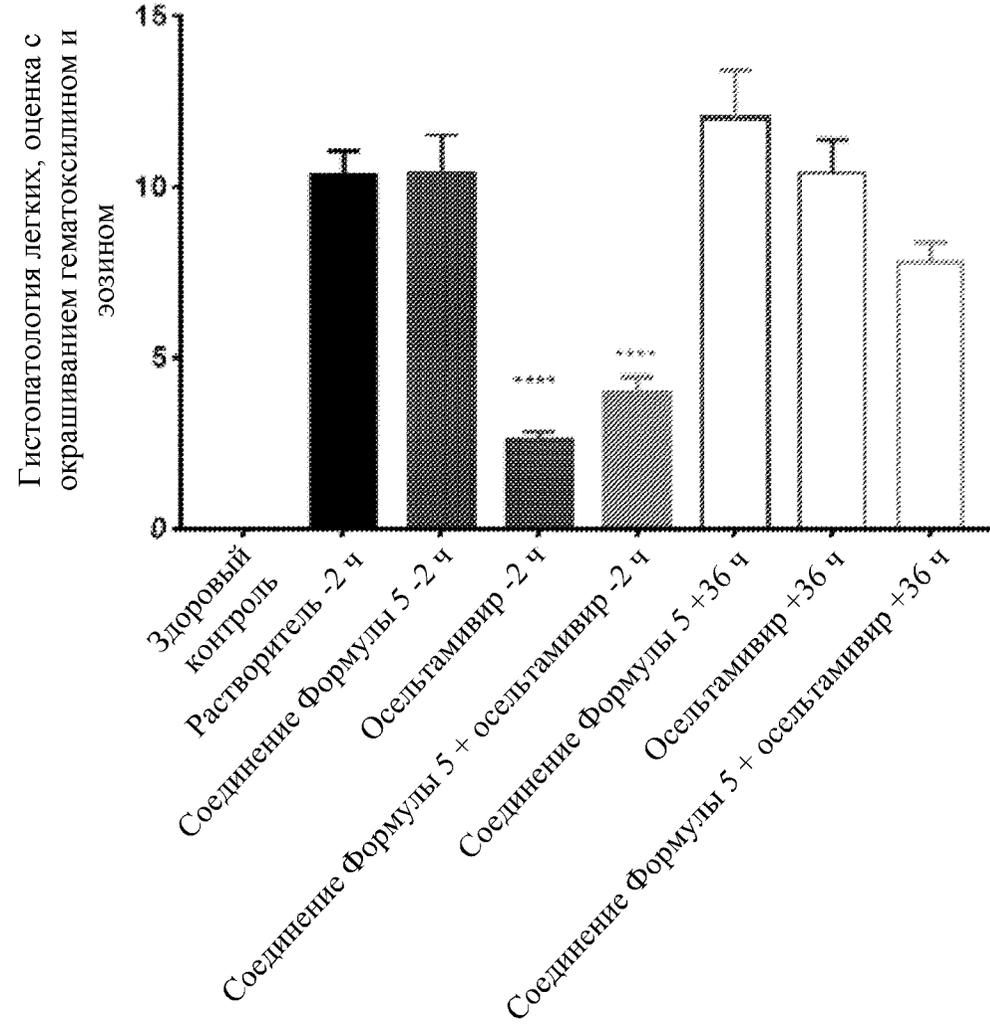
ФИГ. 2М



ФИГ. 2N



ФИГ. 20



ФИГ. 2Р

