

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202291398** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.02.02

(51) Int. Cl. *C07K 14/16* (2006.01)
A61K 47/64 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.12.07

(54) **СИНТЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСПОРТЕРЫ ХЛОРИД-ИОНОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ**

(31) **62/944,606**

(32) **2019.12.06**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2020/061590**

(87) **WO 2021/111425 2021.06.10**

(71) Заявитель:
**ТАВАНТА ТЕРАПЬЮТИКС
ХАНГАРИ ИНКОРПОРЕЙТЕД (HU)**

(72) Изобретатель:

**Мандити Иштван, Малет Йозеф, Варга
Золтан, Варро Николетт, Бережки-
Закал Дороттъя, Баса-Денеш Орсоля
(HU)**

(74) Представитель:

**Гизатуллина Е.М., Угрюмов В.М.,
Строкова О.В., Христофоров А.А.,
Гизатуллин Ш.Ф., Костюшенкова
М.Ю., Парамонова К.В., Прищепный
С.В., Джермакян Р.В. (RU)**

(57) Изобретение относится к области терапии человека. В частности, настоящее изобретение относится к новому синтетическому транспортеру хлорид-ионов на основе пептида и содержащим его композициям, а также к способам лечения, уменьшения, ингибирования или контроля CFTR-опосредованных состояний у субъекта, таких как муковисцидоз.

202291398

A1

A1

202291398

СИНТЕТИЧЕСКИЕ ТРАНСПОРТЕРЫ ХЛОРИД-ИОНОВ НА ОСНОВЕ ПЕПТИДОВ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 [1] Настоящее изобретение относится к области терапии человека. В частности, настоящее изобретение относится к новому синтетическому транспортеру хлорид-ионов на основе пептидов и содержащим его композициям, а также к способам лечения, уменьшения, подавления или контроля CFTR-опосредованных состояний у субъекта, таких как муковисцидоз.

10 УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[2] Проникающие в клетку пептиды (CPP) или домены белковой трансдукции (PTD) представляют собой небольшие пептиды, содержащие менее 30 аминокислотных остатков и имеющие размер, заряд и полярность, подходящие для прохождения через клеточную мембрану. Основные характеристики этих пептидов включают их способность пересекать
15 клеточную мембрану с использованием как эндоцитоза, так и энергонезависимых путей, их высокие показатели клеточной проницаемости и их низкую клеточную токсичность и безопасность, обусловленные небольшим иммунологическим ответом или его отсутствием.

[3] В настоящее время известно о более чем 1800 различных CPP, и подавляющее большинство из них были экспериментально исследованы на предмет их различных
20 применений. CPP классифицируют по типу груза, их физико-химическим свойствам (катионные, гидрофобные, амфипатические), механизму интернализации и структурным особенностям (линейность или циклическая природа).

[4] Проникающие в клетку пептиды (CPP) используются для транспорта различных материалов (пептидов, белков, ДНК, РНК и т. д.) через биологические барьеры, такие как
25 плазматические мембраны (JP Richard, et.al., Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, стр. 585). Тем не менее, такие системы ранее никогда не использовались и не предлагались для транспорта ионов через мембраны.

[5] Несмотря на разнообразие сигнальных путей и типов клеток, выступающих мишенями терапевтических средств на основе CPP, до сих пор нет одобренных FDA
30 (Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США) лекарственных средств, конъюгированных с CPP, и на сегодняшний день было

прекращено несколько клинических исследований. Проблемы, связанные с применением лекарственных средств, конъюгированных с CPP, включают: (1) проблемы со стабильностью *in vivo* из-за частой подверженности протеолитическому расщеплению; (2) проблемы с иммуногенностью; (3) низкая эффективность из-за того, что лекарственное средство не выходит из эндосом после интернализации клетками; (4) токсичность из-за разложения вспомогательных веществ; и (5) токсичность или низкая эффективность из-за отсутствия у CPP сайт-специфичности. (L Gomes dos Reis, D Traini, Expert Opinion on Drug Delivery, 2020, 17(5), pp 647; J Habault, JL Poyet, Recent Advances in Cell Penetrating Peptide-Based Anticancer Therapies, Molecules, 2019, 24 (5), стр. 927)

10 [6] Интенсивные исследования направлены на разработку синтетических ионных каналов с использованием искусственно синтезированных соединений. Основные стратегии связаны с синтезом мономолекулярных каналов или дизайном самоорганизующихся надмолекулярных каналов. Эти синтетические транспортеры ионов или ионные каналы могут восполнять нарушенную или утраченную функцию клеточных ионных каналов (N Busschaert, PA Gale, Angewandte Chemie International Edition 2013, 52, стр. 1374) и применялись для лечения каналопатий и родственных заболеваний.

[7] Были разработаны различные искусственные хлоридные транспортеры с различной молекулярной массой, от небольших органических молекул до надмолекулярных систем. Эти соединения либо пассивно диффундируют через мембрану с хлорид-ионом, либо образуют канал в мембране, облегчающий пассивный транспорт ионов. Общим недостатком этих соединений является их токсичность. Было показано, что некоторые транспортеры повышают внутриклеточные концентрации хлорида натрия, увеличивают уровень клеточных активных форм кислорода (АФК), запускают высвобождение цитохрома с из митохондрий и индуцируют активацию каспаз, что приводит к апоптозу (SK Ko, et.al., Nat Chem 2014, 6, стр. 885). С другой стороны, было высказано предположение, что опухолевые клетки можно избирательно уничтожить с помощью искусственных хлоридных транспортеров (D de Greñu, et.al.; Chemistry – A European Journal, 2011, 17, стр. 14074).

[8] Эти соединения могут быть использованы в онкологии, так как нарушение химических градиентов внутри клеток запускает апоптоз, приводящий к гибели онкогенных клеток. Хлоридные транспортеры эффективны при лейкозе, лимфоме, миелофиброзе и мастоцитозе (S Parikh, et.al; Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia, 2010, 10, стр. 285).

- [9] Респираторные заболевания, такие как хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ), астма, муковисцидоз (МВ), бронхоэктаз, туберкулез и рак легких, являются ведущими причинами смерти, число случаев которых ежегодно увеличивается. Существует неудовлетворенная потребность в новых инструментах, которые могли бы облегчить разработку новых методов лечения заболеваний, связанных с легкими, поскольку это было признано крупнейшей терапевтической неудачей. Область биоактивных молекул (пептидов, белков и нуклеиновых кислот) – это область, в которой могут быть разработаны потенциальные новые методы лечения респираторных заболеваний (L Gomes dos Reis, D Traini, Expert Opinion on Drug Delivery, 2020, 17(5), стр. 647).
- 5
- [10] МВ является наиболее распространенным аутосомно-рецессивным генетическим заболеванием, характеризующимся полиорганной патологией и значительно сниженной ожидаемой продолжительностью жизни, вызываемым нарушением функции или экспрессии CFTR. При МВ хлоридный транспорт нарушен из-за генетических мутаций гена *CFTR*, что приводит к отсутствию или сниженной функции белка регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) (BP O'Sullivan, SD Freedman, Lancet, 2009, 373, стр. 1891). Недавние терапевтические разработки значительно увеличили ожидаемую продолжительность жизни пациентов с МВ, однако средний возраст смерти (обычно вызванной остановкой дыхания) по-прежнему составляет 31,4 года (A Orenti, et al, ECFSPR Annual Report, 2016). Кроме того, 31% пациентов с МВ имеют хронические легочные инфекции, вызываемые *Pseudomonas aeruginosa*, в то время как 83% всех пациентов с МВ нуждаются в заместительной терапии панкреатическими ферментами, что ложится тяжелым бременем как на пациентов, так и на системы здравоохранения.
- 15
- 20
- [11] Таким образом, существует значительная потребность в разработке синтетических транспортеров хлорид-ионов, которые потенциально могли бы быть использованы в заместительной терапии каналов для лечения заболеваний, связанных с нарушением регуляции транспорта анионов, таких как муковисцидоз (МВ).
- 25
- [12] Желательна пероральная доставка таких терапевтических агентов, хотя это остается нерешенной проблемой для разработчиков лекарственных средств и экспертов по доставке лекарственных средств из-за нестабильности биоактивных веществ на основе пептидов в желудочно-кишечном тракте, их низкой проницаемости и чрезвычайно быстрого клиренса (S Gupta et al., Drug Delivery, 2013, 20, стр. 237-246). Хотя муковисцидоз является системным заболеванием, поражающим, среди прочего, легкие, пищеварительную систему и репродуктивную систему, легочные инфекции и осложнения со стороны легких являются
- 30

основной причиной смерти, на которую приходится до 85% случаев. (C Martin, et.al, Journal of Cystic Fibrosis, 2016, 15, стр. 204-212). Известно, что аномальная вязкость и продукция слизи вносят вклад в патогенез МВ (C Ehre et al, The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2014, 52, стр. 136–145). Кроме того, известно, что гиперконцентрированная
5 слизь с повышенной адгезией в дыхательных путях вызывает МВ-подобное заболевание на животных моделях (M Mall et al, Nature Medicine, 2004, 10, стр. 487–493). Анализ жидкости бронхоальвеолярного лаважа у молодых пациентов с МВ показал, что накопление аномально вязкой слизи с повышенной общей концентрацией муцина и воспалительных факторов приводит к раннему патогенезу МВ (CR Esther et al, Science Translational Medicine,
10 2019, 11, стр. 1-11). Повышение вязкости слизи связано со снижением клеточной секреции хлорид-ионов, что приводит к нарушению секреции жидкости и увеличению апикальной абсорбции натрия эпителиальными клетками дыхательных путей (H Li et.al., Current Opinion in Pharmacology, 2017, 34, стр. 91-97). Эти изменения в транспорте ионов в конечном итоге приводят к закислению и уменьшению высоты жидкости на апикальной
15 поверхности дыхательных путей.

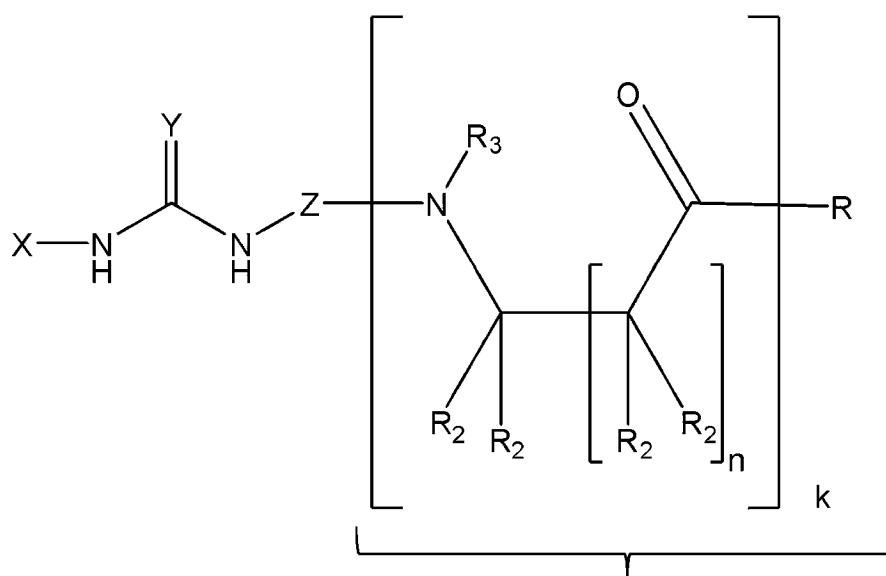
[13] У пациентов с МВ движение ресничек нарушается из-за этих изменений, и вязкий слой слизи не может быть удален из мелких дыхательных путей. Это приводит к хроническому кашлю и увеличению вероятности и частоты легочных инфекций. Было
20 продемонстрировано, что гидратационная терапия приводит образцы мокроты при МВ к околонормальным упруговязкостным свойствам, подтверждая клинические данные о том, что введение гидратирующих средств дает положительные результаты у пациентов с МВ (BE Tildy and DF Rogers, Pharmacology, 2015, 95, стр. 117-132). Следовательно, синтетический транспортер хлорид-ионов, вводимый непосредственно в легкие, мог бы
25 облегчить симптомы, связанные с высоковязким слоем слизи (независимо от мутации, вызывающей заболевание), за счет повышения уровней электролитов в слое и, таким образом, облегчения транспорта воды из эпителиальных клеток. В конечном итоге это могло бы привести к улучшению реологических свойств слоя слизи (D Schieppati, et.al, Respiratory Medicine, 2019, 153, стр. 52-59). Это подтверждается анализом образцов слизи,
30 где было показано, что разбавление (гидратация) слизи в 2 раза с 5,2% до 2,6% снижало комплексную вязкость в восемь раз (DB Hill et al, European Respiratory Journal, 2018, 52, стр. 1-11).

[14] В то время как соединения VX (или «кафторовые»), такие как ивакафтор, лумакафтор, тезакафтор, элексакафтор и их комбинации, содержащиеся в доступных на

рынке лекарственных препаратах Kalydeco, Orkambi, Symdeko и Trikafta, эффективны для улучшения транспорта хлорид-ионов, их применение ограничено определенными мутациями гена CFTR. Более того, многие пациенты либо не отвечают на такую терапию кафторами, либо плохо ее переносят. Лечение этих пациентов является неудовлетворенной 5 медицинской потребностью, в которой синтетические транспортеры хлорид-ионов могут играть важную роль. Кроме того, сочетание этих универсально эффективных транспортеров ионных каналов с известными методами лечения муковисцидоза может привести к улучшению терапевтических результатов.

10 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы (X):



или фармацевтически приемлемые стереоизомеры, энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры, пролекарства или их комбинации, где 15

$$n = 0-10$$

$$k = 1-200$$

$X = H$, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, 20 циклоалкильные и ацильные группы, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами

Y= O, S, NH, CH₂, N-OR,

Z= C1-10 алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, циклоалкильные и ацильные группы, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами

5 R= H, OH, O-алкил, NH, N-алкил, SH, S-алкил, алкил, алкенил, алкинил, NH-NH₂,

R₂ = H, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, и образующие кольцевую систему, и гликозилированные, и

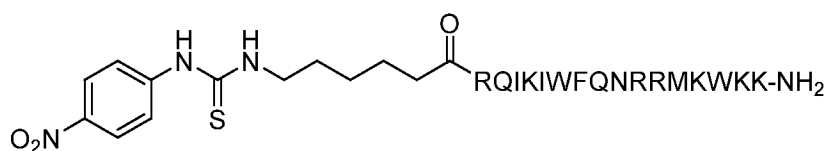
10 R₃ = H, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, в идеале замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, в идеале могут образовывать кольцевую систему и могут быть гликозилированы, и стереоизомеры, включая энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, смеси энантиомеров или их комбинации, а также их полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры и пролекарства.

15 2. Соединение, указанное в пункте 1, где указанный пептидный домен содержит один или более положительно заряженных остатков.

3. Соединение, указанное в пунктах 1 или 2, где указанный пептидный домен содержит боковые цепи аргинина или лизина.

20 4. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-3, где указанный пептидный домен содержит один или более проникающих через клеточную мембрану доменов (CPP), таких как катионные, амфипатические, гидрофобные или амфифильные CPP, выбранные из группы, состоящей из SP, pVEC, полиаргинина (аргининовый участок), транспортана, ТАТ и пенетратина, или их вариантов, обладающих по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% 82%, 83%, 84%, 85%, 25 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью любой из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 24 или 25 и обладающих активностью проникновения в клетку, предпочтительно выбранные из: остатка 48-60 ТАТ или пенетратина или их вариантов.

30 5. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (I):

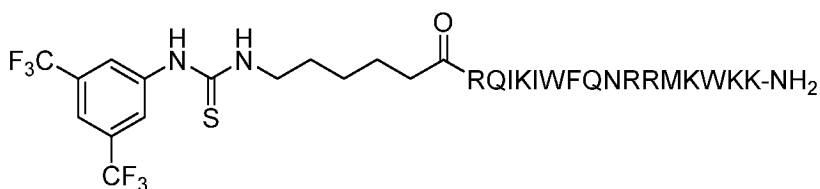


(I),

необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2537,4 дальтон.

6. Соединение, указанное в пункте 5, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

7. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (II):

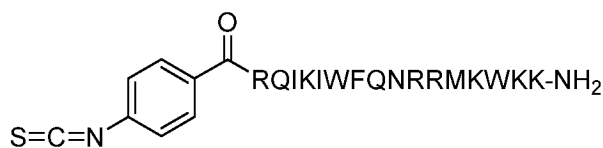


(II),

10 обязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2628,4 дальтон.

8. Соединение, указанное в пункте 7, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

15 9. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (III):

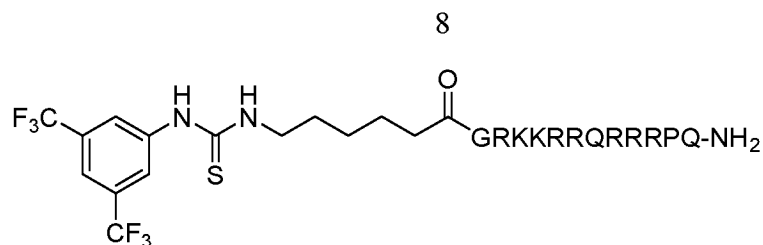


(III),

необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2405,3 дальтон.

10. Соединение, указанное в пункте 9, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

11. Соединение, указанное в пункте 1, где указанное соединение имеет формулу (IV):



необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2004,4 дальтон.

12. Соединение, указанное в пункте 11, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантимеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.
13. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанное соединение не индуцирует апоптоз или некроз в диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ.
14. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к клеткам НЕК-293 в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
15. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к трехмерным органоидам поджелудочной железы в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
16. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к фрагментам протоков поджелудочной железы в отсутствие CFTR в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.
18. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанная фармацевтическая композиция выполнена с возможностью введения, выбранного из группы, состоящей из перорального, легочного, ректального введения, введения в толстую кишку, парентерального, интрацистернального, интравагинального, внутривнутрибрюшинного, глазного, ушного, буккального, назального и местного введения; и/или выполнена в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из жидких дисперсий, гелей, аэрозолей, мазей, кремов, лиофилизированных препаратов, таблеток, капсул; и/или представлена в виде

лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из препаратов с контролируемым высвобождением, быстро плавящихся препаратов, препаратов с замедленным высвобождением, препаратов с пролонгированным высвобождением, препаратов с пульсирующим высвобождением и смешанных препаратов с немедленным высвобождением и контролируемым высвобождением; и/или представлена в виде препарата для клизмы, ионофоретического средства, покрытия имплантируемого медицинского устройства; или их комбинации.

- 5
19. Фармацевтическая композиция по пункту 17 или 18 для применения для производства лекарственного средства.
- 10 20. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 17-19 для применения для лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанная фармацевтическая композиция увеличивает содержание электролитов в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие
- 15 указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.
21. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, или композиция, указанная в любом из пунктов 17-20, для применения в терапии.
- 20 22. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, или композиция, указанная в любом из пунктов 17-20, для применения для лечения CFTR-опосредованных заболеваний, выбранных из муковисцидоза, астмы, ХОБЛ, вызванной курением, хронического бронхита, риносинусита, запора, панкреатита, недостаточности поджелудочной железы, мужского бесплодия, вызванного врожденным двусторонним отсутствием
- 25 семявыносящего протока (CBAVD), заболевания легких легкой степени тяжести, идиопатического панкреатита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), болезни печени, наследственной эмфиземы, мукополисахаридоза, хлоридных каналопатий, таких как врожденная миотония (формы Томсена и Беккера), синдрома Барттера III типа, болезни Дента, гиперэкмплексии, эпилепсии.
- 30 23. Способ лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанный способ включает введение соединения, указанного в любом из пунктов 1-12, или композиции, указанной в любом из пунктов 17-20, где указанный способ увеличивает содержание электролитов

в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.

- 5 24. Способ лечения, уменьшения, подавления или контроля по меньшей мере одного признака или симптома муковисцидоза у субъекта, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества одного или более соединений, указанных в любом из пунктов 1-12, или композиции, указанной в любом из пунктов 17-20, субъекту-человеку, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, где указанный признак или симптом связан с дыхательными путями или дыхательной системой и включает один или более из следующих: накопление аномально вязкой слизи; повышенное общее содержание муцина; повышенная концентрация медиатора аллергического воспаления; сниженная клеточная секреция хлорид-ионов; нарушение секреции жидкости; повышенная апикальная абсорбция натрия эпителиальными клетками дыхательных путей; закисление и уменьшение высоты жидкости на апикальной поверхности дыхательных путей; хронический кашель; хроническая легочная инфекция и их комбинации.
- 10
- 15
25. Фармацевтическая композиция по любому из пунктов 17-20 или способ по любому из пунктов 23-24, где указанное соединение предпочтительно выбрано из Формулы (I), (II), (III) и (IV).
- 20

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[15] Новые признаки изобретения подробно изложены в прилагаемой формуле изобретения. Лучшее понимание признаков и преимуществ настоящего изобретения будет получено путем обращения к следующему подробному описанию, в котором представлены иллюстративные варианты осуществления, в которых используются принципы изобретения, и прилагаемым графическим материалам (также обозначаемым в настоящем документе «фигура» и «ФИГ.»), где:

25

[16] На фигуре 1 показано действие Формулы (II) и Формулы (III) на жизнеспособность клеток в клетках НЕК 293. Гистограммы, на которых обобщенно проиллюстрированы действия Формулы (II) и Формулы (III) на жизнеспособность клеток. Представленные значения отражают процент от общего числа клеток. Результаты визуализированы в % от общего числа клеток (живых/апоптотических/некротических). Как видно из диаграмм,

30

некротической гибели клеток не наблюдалось. Для соединений Формулы (II) и Формулы (III) наблюдалась ограниченная степень апоптотической гибели клеток при 10 и 100 мкМ соответственно. Однако большинство клеток выжило после обработки. Эти результаты показывают, что тестируемые соединения не обладают токсичностью *in vitro* даже в более высоких концентрациях.

[17] На фигуре 2 показано действие пептидов Формулы (I) – Формулы (III) на внутриклеточный уровень Cl^- в клетках НЕК 293. Усредненные кривые внутриклеточных уровней Cl^- из 4-6 экспериментов для каждого условия. Клетки НЕК293 перфузировали внеклеточным раствором, забуференным HEPES. Введение Формулы (I) – Формулы (III) индуцировало снижение внутриклеточных уровней Cl^- (отражаемое увеличением интенсивности флуоресценции) вследствие транспорта Cl^- из цитозоля во внеклеточное пространство. В этой серии экспериментов Формула (I) – Формула (III) демонстрировали дозозависимое действие, а Формула (II) и Формула (III) оказывали схожее максимальное действие в каждой протестированной концентрации. Хотя Формула (I) также демонстрировала действие *in vitro* на внутриклеточный Cl^- , из-за токсичности ее дальнейшие исследования не проводились.

[18] На фигуре 3 показано действие пептидов I-III на внутриклеточный уровень Cl^- в клетках НЕК 293. Гистограммы максимальных изменений интенсивности флуоресценции. II и III индуцировали самый высокий максимальный ответ, тогда как все протестированные соединения продемонстрировали дозозависимое действие.

[19] На фигуре 4 показано действие Формулы (II) на внутриклеточный уровень Cl^- в органоидах поджелудочной железы. Усредненные кривые внутриклеточных уровней Cl^- из 4-6 экспериментов для каждого условия. Органоиды поджелудочной железы перфузировали внеклеточным раствором, забуференным HEPES. Удаление внеклеточного Cl^- вызывало снижение внутриклеточных уровней Cl^- (отражаемое увеличением интенсивности флуоресценции) вследствие активности CFTR (панель 1). Введение Формулы (II) в раствор, содержащий 140 мМ Cl^- , забуференный HEPES, снижало внутриклеточный уровень Cl^- . В то время как в отсутствие внеклеточного Cl^- падение внутриклеточного Cl^- было значительно выше.

[20] На фигуре 5 показано действие Формулы (II) на внутриклеточные уровни Cl^- в органоидах поджелудочной железы. Гистограммы максимальных изменений интенсивности флуоресценции. Действие Формулы (II) в отсутствие внеклеточного Cl^- было сопоставимо с действием CFTR.

[21] На фигуре 6 показано действие Формулы (II) и Формулы (III) на внутриклеточный уровень Cl^- в фрагментах протоков поджелудочной железы с нокдауном CFTR. Фрагменты протоков использовали для получения доказательств того, что CLTR2 и CLTR-ITC способны транспортировать Cl^- в присутствии или в отсутствие белка CFTR. siGLO использовали в качестве контроля трансфекции, а фрагменты протоков siCFTR обрабатывали миРНК для нокдауна экспрессии CFTR для моделирования муковисцидоза. CLTR2 и CLTR-ITC были способны транспортировать Cl^- в обработанных siGLO (контроль) и siCFTR фрагментах протоков.

[22] На фигуре 7 показано изменение массы тела животных в процессе лечения (A) и снижение плотности паренхимы легких у мышей с нокаутом гена CFTR и фиброзом легких (B-C).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[23] Проникающие в клетку пептиды представляют собой небольшие олигопептиды, обычно содержащие от 5 до 30 аминокислотных остатков. Как правило, они положительно заряжены и, как известно, обладают случайной конформацией в водной среде, однако в неполярной клеточной мембране они проявляют тенденцию к сворачиванию в спиральные конформации (C Bechara, S Sagan, FEBS Letters, 2013, 587, стр. 1693). Они могут проходить через мембраны либо прямым путем, либо везикулярным путем посредством эндоцитоза. Известно, что проникающие в клетку пептиды транспортируют различные грузы, начиная от малых органических молекул и заканчивая генами, кодирующими ДНК (JP Richard, et al, Journal of Biological Chemistry, 2003, 278, стр. 585).

[24] Синтетические транспортеры ионов или ионные каналы могут имитировать функцию естественных ионных каналов, тем самым делая возможным удовлетворение клинической потребности в заместительной терапии каналов (N Busschaert, PA Gale, Angewandte Chemie International Edition, 2013, 52, стр. 1374.). Разработка транспортеров хлорид-ионов через липидный бислой для потенциального применения в заместительной терапии каналов для лечения заболеваний, вызванных нарушением регуляции транспорта анионов, таких как муковисцидоз (МВ), представляет собой область текущих интересов. При МВ нарушение транспорта хлорида является основной причиной заболевания и связано с моногенной мутацией анионного канала регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (CFTR) (BP O'Sullivan, SD Freedman, Lancet, 2009, 373, стр. 1891).

[25] Методы лечения на основе СРР можно комбинировать с используемыми в настоящее время методами лечения МВ, поскольку механизмы действия каждого из них совершенно различны и приводят к синергизму. Методы лечения на основе СРР могут усиливать действие муколитических препаратов и методов очистки дыхательных путей, поскольку применение СРР может увеличивать гидратацию слизи. Синергические эффекты имеют место при комбинированном применении с соединениями VX, поскольку транспорт хлорид-ионов на основе СРР не зависит от наличия функционального CFTR в мембране.

[26] Были разработаны различные синтетические хлоридные транспортеры с различной молекулярной массой, от небольших органических молекул до надмолекулярных систем. Эти соединения либо пассивно диффундируют через мембрану с хлорид-ионом, либо образуют канал в мембране, открывая путь для пассивного транспорта ионов (N Busschaert, PA Gale, *Angewandte Chemie International Edition* 2013, 52, стр. 1374).

[27] В настоящее время описано более 2000 мутаций гена *CFTR*, тогда как только 159 мутаций было охарактеризовано с точки зрения предрасположенности к заболеванию (R Bolia, et al., *J Paediatr Child Health*, 2018, 54, стр. 609). Наиболее распространенным типом мутации у 85% пациентов во всем мире является делеция фенилаланина в положении 508 (F508del), однако на сегодняшний день мутации подразделяются на семь различных групп в зависимости от вызванного дефекта CFTR (K De Boeck, MD Amaral, *Lancet Respir Med*, 2016, 4, стр. 662). Мутации класса I, которые включают сдвиг рамки считывания, сплайсинг или нонсенс-мутации, которые вводят кодоны преждевременной терминации; мутации класса II, которые приводят к неправильной укладке и нарушению биогенеза белка в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР); мутации класса V, которые приводят к снижению синтеза из-за аномалий промотора или сплайсинга; и мутации класса VI, которые дестабилизируют канал CFTR в пост-ЭР компартментах и/или на плазматической мембране. Мутации же класса III и IV нарушают ворот и проводимость пор каналов соответственно, тем самым избирательно нарушая функцию CFTR. При мутациях класса VII отсутствует мРНК. Современное клиническое лечение МВ основано на терапии модуляторами CFTR.

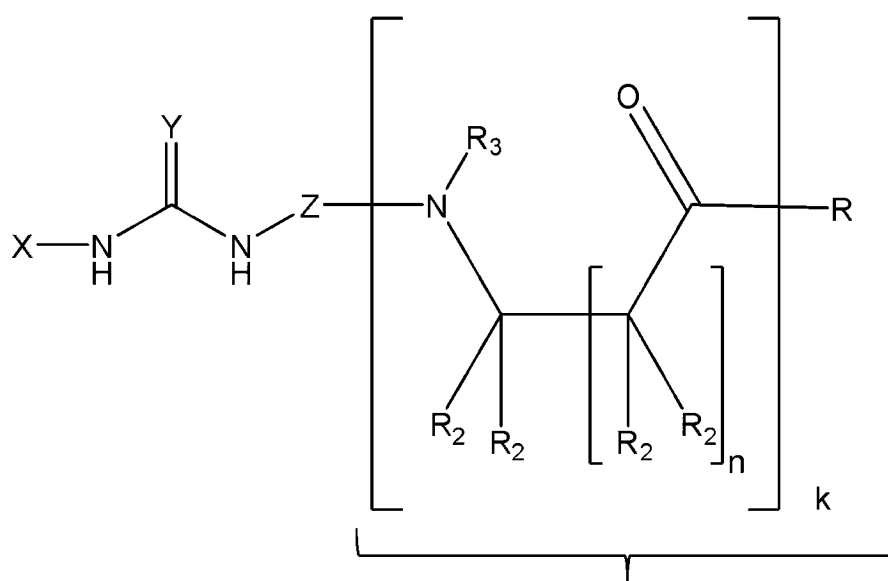
[28] Модуляторы CFTR включают ивакафтор (Kalydeco®), лумакафтор/ивакафтор (Orkambi®), тезакафтор/ивакафтор (Symdeko®) и элексакафтор/тезакафтор/ивакафтор (Trikafta™). Эти препараты могут увеличить вероятность открытого состояния CFTR и, таким образом, увеличить отток ионов через поры канала, или могут способствовать сворачиванию белка CFTR. Хотя эти препараты оказывают положительные эффекты, их

клиническое применение ограничено ограниченным числом пациентов с определенными типами мутаций гена CFTR. Заместительная терапия каналов синтетическими транспортерами хлорид-ионов на основе CPP может преодолеть серьезное ограничение современных методов лечения, поскольку такие синтетические хлоридные транспортеры могут способствовать оттоку хлорида через биологические барьеры даже при полном отсутствии белка CFTR. Таким образом, заместительная терапия хлоридных каналов может обеспечивать лечение, не зависящее от мутаций, поскольку для транспорта ионов Cl⁻ не нужен белок CFTR, и поэтому могла бы быть использована у пациентов на ранних стадиях, при этом не требуется охарактеризовывать их специфические мутации до начала такого лечения. Кроме того, существует несколько пациентов с чрезвычайно редкими мутациями, которые еще не отнесены к имеющимся классам мутаций. Лечение на основе CPP может применяться у этих пациентов без каких-либо однозначных ограничений.

[29] Синтетические соединения-транспортеры хлорид-ионов согласно настоящему изобретению либо пассивно диффундируют через мембрану с хлорид-ионом, либо образуют канал в мембране, открывая путь для пассивного транспорта ионов.

[30] Синтетические транспортеры хлорид-ионов могут применяться независимым от мутаций образом, таким образом, с применением соединений согласно изобретению можно осуществлять лечение всех пациентов с МВ.

[31] Соединения, описанные в настоящем документе, имеют следующую общую формулу:



пептид

Формула (X)

где

$n = 0-10$;

$k = 1-200$;

$X = \text{H}$, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, циклоалкильные и ацильные группы могут быть замещены N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами;

$Y = \text{O}$, S, NH, CH₂, N-OR;

$Z = \text{C1-10}$ алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, циклоалкильные и ацильные группы могут быть замещены N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами;

$R = \text{H}$, OH, O-алкил, NH, N-алкил, SH, S-алкил, алкил, алкенил, алкинил, NH-NH₂;

$R_2 = \text{H}$, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, в идеале замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, в идеале могут образовывать кольцевую систему и могут быть гликозилированы, также включая фармацевтически приемлемые стереоизомеры, энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры, пролекарства или их комбинации.

$R_3 = \text{H}$, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, в идеале замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, в идеале могут образовывать кольцевую систему и могут быть гликозилированы, также включая фармацевтически приемлемые стереоизомеры, энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры, пролекарства или их комбинации.

[32] В одном варианте осуществления изобретения пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений содержит один или более положительно заряженных остатков.

[33] В другом варианте осуществления изобретения указанный пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений содержит боковые цепи аргинина или лизина.

[34] В еще одном варианте осуществления изобретения указанный пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений представляет собой проникающие через клеточную мембрану пептиды (СРР), такие как катионные, амфипатические, гидрофобные или амфифильные СРР.

- 5 [35] В еще одном варианте осуществления изобретения указанный пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений представляет собой проникающий через клеточную мембрану пептид, выбранный из одного или более из следующих:
- a) Белок ВИЧ-TAT или его транслокационно-активное производное, такое как остатки с 48 по 60 TAT: GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 1),
 - 10 b) пептид TAT 49-57: RKKRRQRRR (SEQ ID NO: 2),
 - c) YGRKKRRQRRRP (SEQ ID NO: 3) (более длинный пептид, содержащий TAT49-57),
 - d) GRKKRRQRRRPPQ (SEQ ID NO: 4) (более длинный пептид, содержащий TAT49-57),
 - 15 e) пенетратин, имеющий последовательность RQIKIWFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 5),
 - f) вариант пенетратина W48F, имеющий последовательность RQIKIFFQNRRMKWKK (SEQ ID NO: 6),
 - g) вариант пенетратина W56F, имеющий последовательность
 - 20 RQIKIWFQNRRMKFKK (SEQ ID NO: 7),
 - h) вариант пенетратина, имеющий последовательность RQIKIWFQNRRMKFKK (SEQ ID NO: 8),
 - i) транспортан, имеющий последовательность GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 9),
 - 25 j) транспортан-27, имеющий последовательность GWYLNAGYLLGK(e-Cys)INLKALAALAKKIL (SEQ ID NO: 10),
 - k) транспортан-22, имеющий последовательность GWYLNAGYLLGK(e-Cys)INLKALAAL (SEQ ID NO: 11),

l) белок вируса простого герпеса VP22 или его транслокационно-активный гомолог из другого вируса герпеса, такой как белок UL49 MDV,

m) Пер-1, имеющий последовательность KETWWETWWTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 12),

5 n) Пер-2, имеющий последовательность KETWFETWFTEWSQPKKKRKV (SEQ ID NO: 13).

[36] В некоторых вариантах осуществления указанный пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений может представлять собой TAT, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, или его вариант, обладающий по
10 меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81 % 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью SEQ ID NO: 1 и обладающий активностью проникновения в клетку; или пенетратин, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, или его вариант, обладающий по
15 меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью SEQ ID NO: 5 и обладающий активностью проникновения в клетку.

[37] В некоторых вариантах осуществления указанный пептидный домен(ы) описанных в настоящем документе соединений может содержать или состоять из аминокислотной последовательности, указанной в любой из SEQ ID NO: 2-4 или 6-13, или
20 последовательности, по меньшей мере на 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичной любой из SEQ ID NO: 2-4 или 6-13, и обладающей активностью проникновения в клетку.

[38] В других вариантах осуществления настоящего изобретения указанный пептидный
25 домен содержит один или более проникающих через клеточную мембрану доменов, выбранных из группы, состоящей из SP, pVEC, полиаргинина (аргининовый участок), транспортана, TAT и пенетратина, или их вариантов, обладающих по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81% 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью
30 любой из SEQ ID NO: 1-13 и обладающих активностью проникновения в клетку, предпочтительно выбранных из: остатка 48-60 TAT или пенетратина, или их вариантов.

[39] В дополнительном варианте осуществления изобретения описанные в настоящем документе соединения не индуцируют апоптоз или некроз в диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ.

5 [40] В другом варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению являются амфипатическими.

[41] В одном варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению снижают внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов (Cl^-) дозозависимым образом, необязательно при введении в эпителиальную поверхность или нанесении на нее, необязательно в диапазоне концентраций от 100 нМ до 10 мкМ при применении к клеткам
10 НЕК-293.

[42] В другом варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению снижают внутриклеточную концентрацию Cl^- дозозависимым образом, необязательно при применении к ткани или органу, необязательно в диапазоне концентраций от 100 нМ до 10 мкМ при применении к трехмерным органоидам
15 поджелудочной железы.

[43] В одном варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению снижают внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов дозозависимым образом в диапазоне концентраций от 100 нМ до 10 мкМ во фрагментах протоков поджелудочной железы в отсутствие CFTR.

20 [44] В одном варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению *уменьшают фиброз легких и плотность легочной паренхимы у мышей с нокаутом *cftr* в дозе 1,64 мг/кг массы тела.*

[45] В одном варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению пригодны для лечения CFTR-опосредованных заболеваний, выбранных из
25 муковисцидоза, астмы, ХОБЛ, вызванной курением, хронического бронхита, риносинусита, запора, панкреатита, недостаточности поджелудочной железы, мужского бесплодия, вызванного врожденным двусторонним отсутствием семявыносящего протока (CBAVD), заболевания легких легкой степени тяжести, идиопатического панкреатита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), болезни печени, наследственной
30 эмфиземы, наследственного гемохроматоза, дефицита коагуляции-фибринолиза, такого как дефицит протеина С, наследственного ангионевротического отека 1 типа, дефицита процессинга липидов, такого как семейная гиперхолестеринемия, хиломикронемии 1 типа,

абеталипопротеинемии, лизосомных болезней накопления, таких как I-клеточная болезнь/болезнь Дери, мукополисахаридоза, болезни Сандхоффа/Тей-Сакса, синдрома Криглера-Найяра II типа, полиэндокринопатии/гиперинсулемии, сахарного диабета, карликовости Ларона, дефицита миелопероксидазы, первичного гипопаратиреоза, меланомы, гликаноза CDG I типа, врожденного гипертиреоза, несовершенного остеогенеза, наследственной гипофибриногенемии, дефицита АСТ, несахарного диабета (DI), нейрофизиального DI, нефрогенного DI, синдрома Шарко-Мари-Тута, болезни Пелицеуса-Мерцбахера, нейродегенеративных заболеваний, таких как болезнь Альцгеймера, болезни Паркинсона, бокового амиотрофического склероза, прогрессирующего надъядерного паралича, болезни Пика, некоторых полиглутаминовых неврологических расстройств, таких как болезнь Хантингтона, спиноцеребральной атаксии I типа, спинальной и бульбарной мышечной атрофии, дентато-рубро-паллидо-люисовой атрофии и миотонической дистрофии, а также губчатых энцефалопатий, таких как наследственная болезнь Крейтцфельда-Якоба (из-за нарушения процессинга прионных белков), болезни Фабри, синдрома Штраусслера-Шейнкера, ХОБЛ, болезни сухого глаза или болезни Шегрена, остеопороза, остеопении, заживления костей и роста костей (включая восстановление костей, регенерацию костей, сниженную резорбцию костной ткани и повышенное отложение костей), синдрома Горхема, каналопатий хлоридных каналов, таких как врожденная миотония (формы Томсена и Беккера), синдрома Барттера III типа, болезни Дента, гиперэксплексии, эпилепсии, лизосомной болезни накопления, синдрома Ангельмана и первичной цилиарной дискинезии (PCD), наследственных расстройств структуры и/или функции ресничек, включая PCD с транспозицией внутренних органов (также известной как синдром Картагенера), PCD без транспозиции внутренних органов и цилиарную аплазию.

[46] В другом варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению применимы для лечения пациентов с муковисцидозом, у которых имеется одна или более мутаций CFTR, включая мутации класса I (например, G542X, W1282X, R553X, Glu831X), класса II (например, F508del, N1303K, I507del), класса III (например, G551D, S549N, V520F), класса IV (например, R117H, D1152H, R374P) или класса V (например, 3849+10kbC>T, 2789+5G>A, A455E). Больной МВ может быть гомозиготным или гетерозиготным по любой такой мутации CFTR, например, гомозиготным по F508del.

[47] В дополнительном варианте осуществления изобретения соединения согласно настоящему изобретению применимы для лечения каналопатий, которые представляют собой гетерогенную группу расстройств, возникающих в результате нарушения функции

ионных каналов, расположенных в мембранах всех клеток и многих клеточных органелл, включая заболевания дыхательной системы (например, муковисцидоз) и мочевыделительной системы (например, синдром Барттера).

[48] В еще одном варианте осуществления изобретения соединения согласно изобретению получают удлинением пептидной цепи на подходящей гелевой смоле, такой как смола TentaGel® RAM, с амидным линкером Ринка. Сочетание предпочтительно проводят в две стадии, а именно, путем растворения Fmoc-защищенной аминокислоты, агента сочетания на основе соли урония O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфата (HATU) и N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в N,N-диметилформамиде (DMF) в качестве растворителя при трехчасовом встряхивании на первой стадии, а затем проводят второе сочетание с аминокислотой, HATU и DIPEA; затем смолу промывают DMF, метанолом и ДХМ, и за промывкой предпочтительно следует стадия снятия защиты с использованием 2% DBU и 2% пиперидина в DMF в две стадии с продолжительностью реакции 15 и 5 минут. После сочетания аминокислот образуется элемент тиомочевины, в результате чего свободный N-конец реагирует с определенными изотиоцианатами в щелочных условиях в DMF. После завершения построения последовательности и конструкции тиомочевины проводили расщепление с помощью TFA/воды/dl-дитиотрептола (DTT)/TIS при 0 °C в течение 1 часа.

[49] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения каналопатии у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами.

[50] В еще одном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения CFTR-опосредованного заболевания, выбранного из муковисцидоза, астмы, ХОБЛ, ХОБЛ, вызванной курением, хронического бронхита и фиброза, у субъекта, нуждающегося в этом, где указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, предпочтительно, где указанные CFTR-опосредованные заболевания представляют собой муковисцидоз.

[51] В дополнительном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения муковисцидоза у субъекта-человека, нуждающегося в этом, где указанный способ включает

введение терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе, субъекту-человеку, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, где указанный субъект находится в возрасте от 2 до 5 лет, или от 6 до 11 лет, или старше 12 лет.

5 [52] В дополнительном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения, уменьшения, подавления или контроля муковисцидоза у субъекта, где указанный способ включает одновременное, раздельное или последовательное введение субъекту (i) одного или более терапевтических агентов, и (ii) терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе.

10 [53] В дополнительном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения, уменьшения, подавления или контроля по меньшей мере одного признака или симптома муковисцидоза у субъекта, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе, субъекту-человеку, необязательно в комбинации с одним или более
15 терапевтическими агентами, где указанный признак или симптом связан с дыхательными путями или дыхательной системой и включает один или более из следующих: накопление аномально вязкой слизи; повышенное общее содержание муцина; повышенная концентрация медиатора аллергического воспаления; сниженная клеточная секреция хлорид-ионов; нарушение секреции жидкости; повышенная апикальная абсорбция натрия
20 эпителиальными клетками дыхательных путей; закисление и уменьшение высоты жидкости на апикальной поверхности дыхательных путей; хронический кашель; хроническая легочная инфекция и их комбинации.

[54] В дополнительном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения, уменьшения, подавления или контроля по меньшей мере одного признака или симптома
25 муковисцидоза у субъекта, где указанный способ включает одновременное, раздельное или последовательное введение субъекту (i) одного или более терапевтических агентов и (ii) терапевтически эффективного количества одного или более соединений, раскрытых в настоящем документе, где указанный признак или симптом связан с дыхательными путями или дыхательной системой и включает один или более из следующих: накопление
30 аномально вязкой слизи; повышенное общее содержание муцина; повышенная концентрация медиатора аллергического воспаления; сниженная клеточная секреция хлорид-ионов; нарушение секреции жидкости; повышенная апикальная абсорбция натрия эпителиальными клетками дыхательных путей; закисление и уменьшение высоты жидкости

на апикальной поверхности дыхательных путей; хронический кашель; хроническая легочная инфекция и их комбинации.

[55] В другом варианте осуществления изобретения предложена фармацевтическая композиция для применения для лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанная фармацевтическая композиция увеличивает содержание электролитов в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.

[56] В дополнительном варианте осуществления изобретения предложен способ лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанный способ увеличивает содержание электролитов в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.

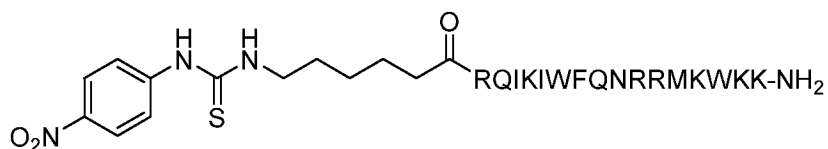
ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

[56] С помощью химии Fmoc удлиняли пептидную цепь на смоле TentaGel R RAM (0,19 ммоль/г) (E Bayer, Angew. Chem. Int. Ed., 1991, 30, стр. 113.) с амидным линкером Ринка в масштабе 0,4 ммоль вручную. Сочетание проводили в две стадии. На первой стадии использовали 3 эквивалента Fmoc-защищенной аминокислоты, 3 эквивалента агента сочетания на основе соли урония O-(7-азабензотриазол-1-ил)-N,N,N',N'-тетраметилурония гексафторфосфата (НАТУ) (LA Carpino, Am. Chem. Soc., 1993, 115, стр. 4379.) и 6 эквивалентов N,N-диизопропилэтиламина (DIPEA) в N,N-диметилформамиде (DMFA) в качестве растворителя при трехчасовом встряхивании. Второе сочетание проводили с 1 эквивалентом аминокислоты, 1 эквивалентом НАТУ и 2 эквивалентами DIPEA. После стадий сочетания смолу промывали 3 раза DMFA, один раз метанолом и 3 раза ДХМ. При этих условиях сочетания усеченных последовательностей не наблюдалось. Стадию снятия защиты проводили с 2% DBU и 2% пиперидином в DMFA в две стадии с продолжительностью реакции 15 и 5 минут.

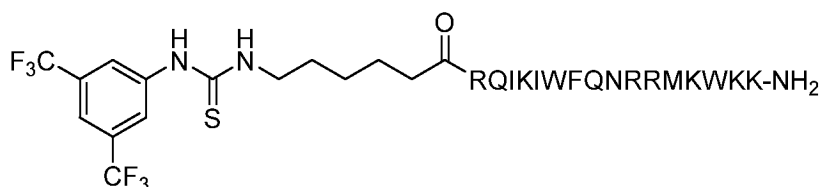
[57] Смолу промывали теми же растворителями, что описаны ранее. После сочетания аминокислот был создан элемент тиомочевины. Свободный N-конец реагировал с определенными изотиоцианатами в щелочных условиях в ДМФА. После завершения построения последовательности и конструкции тиомочевины проводили расщепление с помощью TFA/воды/dl-дитиотреитола (DTT)/TIS при 0 °C в течение 1 часа. Расщепление проводили с TFA/водой/DL-дитиотреитолом (DTT)/TIS (90/5/2,5/2,5) при 0 °C в течение 1 часа. Очистку проводили с помощью обращённо-фазовой ВЭЖХ на колонке Phenomenex Luna C18 100 Å 10 мкм (10 мм x 250 мм).¹¹⁷ Аппарат для ВЭЖХ был изготовлен JASCO, и использовалась следующая система растворителей: 0,1% TFA в воде; 0,1% TFA, 80% ацетонитрила в воде; линейный градиент использовали в течение 60 мин при скорости потока 4,0 мл мин⁻¹, с детектированием при 206 нм. Чистоту фракций определяли методом аналитической ВЭЖХ с использованием системы JASCO HPLC с колонкой Phenomenex Luna C18 100 Å 5 мкм (4,6 мм x 250 мм), чистые фракции объединяли и лиофилизировали. Очищенные пептиды характеризовали масс-спектрометрией.

15 [58] Формула (I):

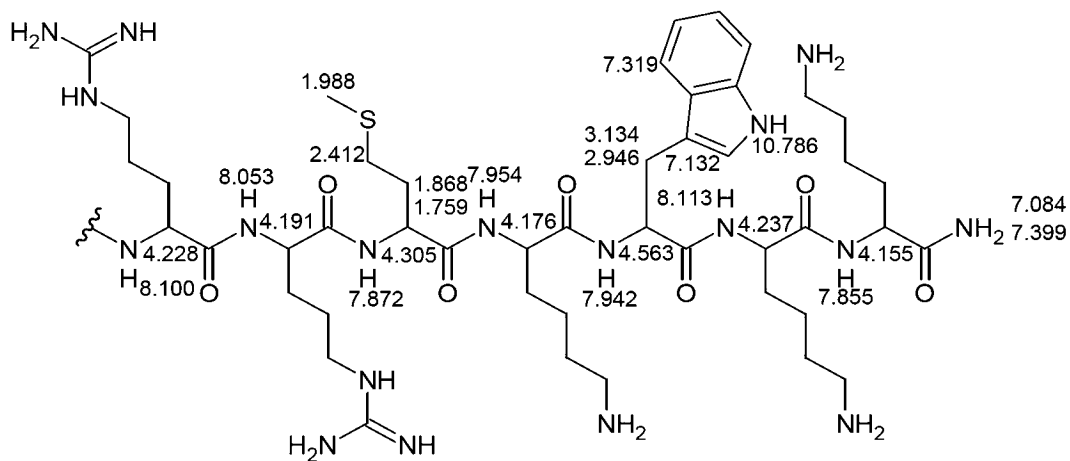
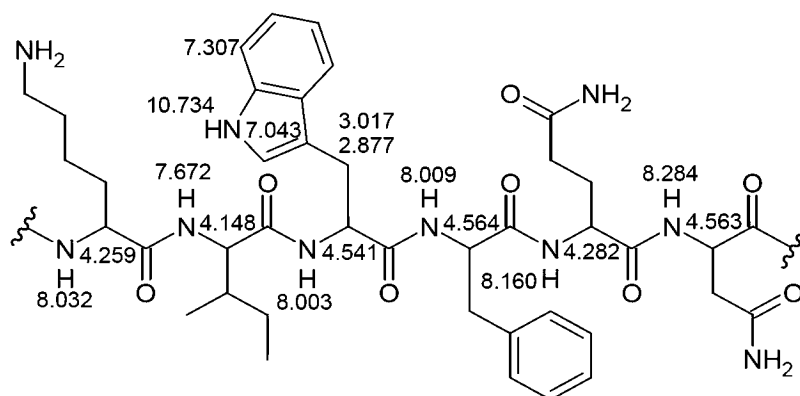
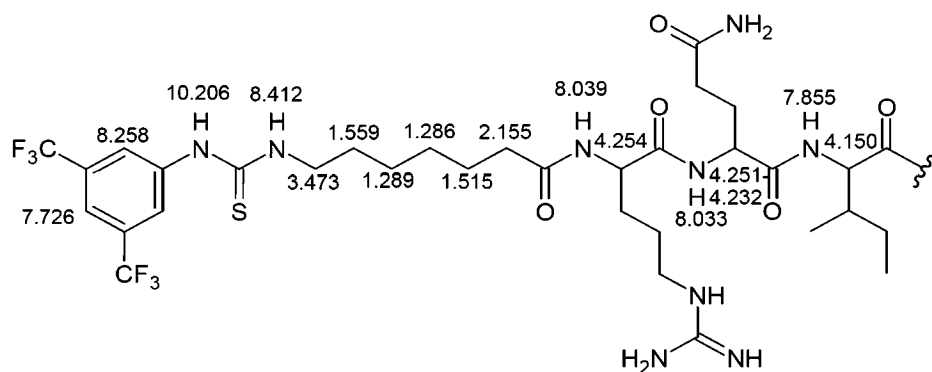


[59] Молекулярная масса (MW) соединения составляет 2537,4 Да; время удерживания составляет 12,8 мин, и его хроматографические свойства являются следующими: градиент: 5->80% 25 мин, элюент А: 0,1% TFA в воде, элюент В: 0,1% TFA, 80% ACN, 20% воды (Колонка: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм, 100А, 250*4,6 мм).

[60] Формула (II):

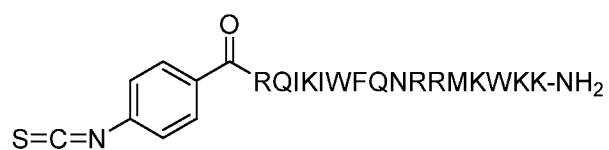


[61] Молекулярная масса (MW) соединения составляет 2628,4 Да; время удерживания составляет 14,9 мин, и его хроматографические свойства являются следующими: градиент: 5->80% 25 мин, элюент А: 0,1% TFA в воде, элюент В: 0,1% TFA, 80% ACN, 20% воды (Колонка: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм, 100А, 250*4,6 мм); типичные волновые числа ИК для групп CF₃: 1132 см⁻¹, 951,6 см⁻¹, 887,2 см⁻¹; HRMS (масс-спектрометрия высокого разрешения): 2628,357 Да; 19F ЯМР (376,5 МГц, ДМСО-d₆, 4 мг/мл 298К) -61,5 ppm



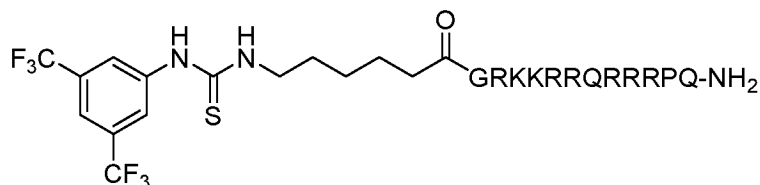
[62] Отнесение сигналов 1H ЯМР, ДМСО-d6, 4 мг/мл 298К

[63] Формула (III):



[64] Молекулярная масса (MW) соединения составляет 2405,3 Да; время удерживания составляет 13,5 мин, и его хроматографические свойства являются следующими: градиент: 5->80% 25 мин, элюент А: 0,1% TFA в воде, элюент В: 0,1% TFA, 80% ACN, 20% воды (Колонка: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм, 100А, 250*4,6 мм); типичные волновые числа ИК для групп N=C=S: 1390 см⁻¹, 1274 см⁻¹, 1042 см⁻¹; для связей N=C: 2095 см⁻¹, HRMS: 2405,279 Да;

[65] Формула (IV):



[66] Молекулярная масса (MW) соединения составляет 2004,4 Да; время удерживания составляет 13,9 мин, и его хроматографические свойства являются следующими: градиент: 5->80% 25 мин, элюент А: 0,1% TFA в воде, элюент В: 0,1% TFA, 80% ACN, 20% воды (Колонка: Phenomenex Luna C18(2) 5 мкм, 100А, 250*4,6 мм).

Пример 2

Действие соединений Формулы (I) – Формулы (III) на судьбу клеток

[67] Для исследования действия соединений согласно изобретению на судьбу клеток использовали набор для обнаружения апоптоза/некроза в соответствии с инструкциями производителя (Abscam, кат. №: ab176750). Вкратце, клетки НЕК-293 инкубировали с различными концентрациями различных СРР в течение 30 мин при 37 °С. Затем клетки промывали 3 раза и инкубировали в 200 мкл буфера для анализа и загружали CytoCalcein 450, Nuclear Green и Ароpxin Deep Red при комнатной температуре на 30–60 мин. После этого клетки промывали и визуализировали. Изображения получали с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM880 с различными каналами и длинами волн в зависимости от каждого красителя: CytoCalcein 450 (возб./исп. = 405/450 нм), Nuclear Green (возб./исп. = 490/520 нм) и Ароpxin Deep Red (возб./исп. = 630/660 нм). Для каждого условия было получено пять изображений, и два независимых исследователя выполнили подсчет общего количества клеток. Результаты визуализированы в % от общего числа клеток (живых/апоптотических/некротических) (фигура 1). Как можно видеть, некротической гибели клеток не наблюдалось. Для соединений Формулы (II) и Формулы (III) наблюдалась ограниченная степень апоптотической гибели клеток при 10 и 100 мкМ соответственно. Однако большинство клеток выжило после обработки. Эти результаты показывают, что

тестируемые соединения не обладают токсичностью *in vitro* даже в более высоких концентрациях.

[68] В качестве контроля использовали пенетратин в концентрациях от 1 до 100 мкМ, который не влиял на повреждение клеток. Напротив, Формула (I) индуцировала апоптоз зависимым от концентрации образом, как показано зеленым сигналом плазматической мембраны, поэтому это соединение не было выбрано для дальнейшего анализа. Формула (II) и Формула (III), с другой стороны, продемонстрировали незначительную токсичность даже при 100 мкМ, и 97,3% клеток были жизнеспособны после инкубации. Это дало основания предположить, что применяемые соединения не повредят эпителиальные клетки легких во время применения, что может ограничить побочные действия.

Примеры 3

Действие Формулы (I) – Формулы (III) на внутриклеточный уровень Cl^- в двухмерно культивируемых клетках НЕК 293 во внеклеточной среде, не содержащей Cl^-

[69] Для оценки биологической активности СРР измеряли изменения внутриклеточного уровня Cl^- путем загрузки клеток НЕК-293 5 мкМ N-(этоксикарбонилметил)-6-метоксихинолиния бромида (MQAE; ThermoFischer; каталожный номер: E3101) на 30 мин в присутствии 0,05% Pluronic F-127. Клетки промывали наружным раствором, не содержащим Cl^- , и обрабатывали различными концентрациями различных СРР при 37 °С со скоростью перфузии 2-3 мл/мин. Изучаемые области (ROI) определяли с помощью программного обеспечения xcellence (Olympus), а изменения Cl^- определяли путем возбуждения клеток источником излучения MT20, оснащенный фильтром возбуждения на 340/11 нм. Длины волн возбуждения и испускания были разделены светоделителем на 400 нм, а испускаемое излучение регистрировалось ПЗС-камерой Hamamatsu ORCA-ER. Было получено одно измерение в секунду. Во время дальнейшего анализа сигналы флуоресценции нормировали к начальной интенсивности флуоресценции (F_1/F_0) и выражали в виде нормированной флуоресценции MQAE (фигура 2). Были рассчитаны максимальные изменения интенсивности флуоресценции (фигура 3). При этом увеличение нормированной интенсивности флуоресценции означает снижение внутриклеточной концентрации Cl^- . N: 4-5 независимых экспериментов/каждое тестируемое условие.

[70] Все протестированные СРР дозозависимо снижали внутриклеточную концентрацию Cl^- (фигура 2-3). При 100 нМ только Формула (I) продемонстрировала умеренный ответ, тогда как при 1 и 10 мкМ все синтетические транспортеры хлорид-ионов снижали

внутриклеточную концентрацию Cl^- . Наивысший ответ был достигнут Формулой (II) и Формулой (III). Контрольный пептид пенетратин не оказывал никакого действия.

Примеры 4

5 *Действие Формулы (II) на внутриклеточный уровень Cl^- в трехмерных органоидах поджелудочной железы в присутствии или в отсутствие внеклеточного Cl^-*

[71] Для проверки способности CPP к транспорту Cl^- в трехмерно культивируемых первичных клетках органоиды нагружали MQAE, как описано выше, и погружали в стандартный раствор, забуференный HEPES (фигура 4). Удаление внеклеточного Cl^- из внеклеточного раствора приводило к снижению внутриклеточного Cl^- , скорее всего, из-за оттока Cl^- из цитозоля посредством CFTR. Как и ожидалось, фармакологическое ингибирование CFTR с помощью 100 мкМ CFTRinh172 почти полностью устраняло усиление флуоресценции. Введение формулы (II) индуцировало отток внутриклеточного Cl^- в присутствии и в отсутствие внеклеточного Cl^- , на который не влияла активность CFTR (фигура 5). N: 4-5 независимых экспериментов/каждое тестируемое условие.

15 Примеры 5

Действие Формулы (I) и Формулы (III) на внутриклеточный уровень Cl^- в фрагментах протоков поджелудочной железы с нокадауном CFTR в отсутствие внеклеточного Cl^-

[72] Для проверки биологической активности CPP выделенные фрагменты протоков поджелудочной железы мыши обрабатывали миРНК для модификации экспрессии CFTR. Для контроля трансфекции использовали индикатор (SiGLO Green; Dharmacon; кат. №: D-001630-01-50) и siCFTR (SMARTpool: ON-TARGETplus Cfr siRNA; Dharmacon; кат. №: L-042164-00-0005). Фрагменты протоков хранили в культуральном растворе и трансфицировали с помощью Lipofectamine 2000 дуплексами миРНК через 12 ч (20-40 нМ/лунку) в 6-луночных планшетах в бессывороточной среде в соответствии с протоколом производителя. Среду заменяли на полную питательную среду, содержащую сыворотку, через 6 часов после добавления дуплексов к клеткам. Фрагменты протоков собирали или использовали для измерений через 48 часов (фигура 6).

[73] Как Формула (I), так и Формула (II) индуцировали отток Cl^- во внеклеточную среду, не содержащую Cl^- , в клетках siGlo и siCFTR, что дополнительно указывает на то, что протестированные синтетические транспортеры хлорид-ионов осуществляют транспорт Cl^- через плазматическую мембрану. N: 4-5 независимых экспериментов/каждое тестируемое условие.

Пример 6*Действие Формулы (II) на тяжесть фиброза легких у мышей с нокаутом cfr*

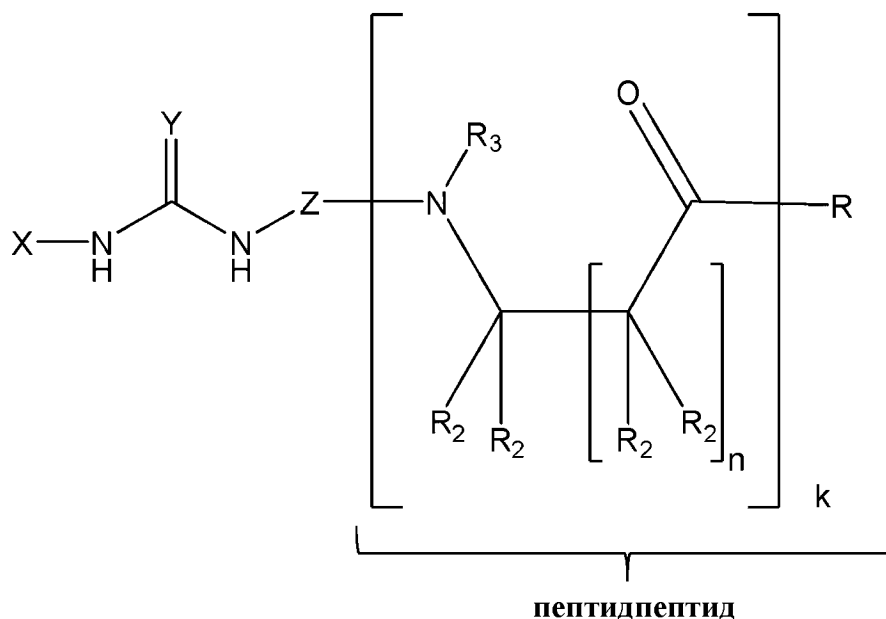
Для оценки действия введенной *in vivo* Формулы (II) на параметры гистологии легких в этом примере использовали мышей Cfr^{tm1Unc}Tg(FABPCFTR)1Jaw/J (Jackson Laboratory, материал №: 002364). Битрансгенные мыши FABP-hCFTR-CFTR несут трансген FABP-hCFTR [крысиный белок 2, связывающий жирные кислоты, кишечный промотор, управляющей экспрессией гена регулятора трансмембранной проводимости человека при муковисцидозе (АТФ-связывающая кассета, подсемейство С, член 7)] и направленная нокаутирующая мутация гена-гомолога регулятора трансмембранной проводимости при муковисцидозе (Cfr). Мыши, использованные в этом исследовании, были в возрасте 8-12 недель и весили 20-25 граммов в случае животных дикого типа (WT) и 15-17 граммов в случае животных с нокаутом CFTR, соотношение полов составляло 1:1 для всех групп. Эксперименты проводились с соблюдением рекомендаций NIH (Национальные институты здравоохранения) и директивы ЕС 2010/63/EU по защите животных, используемых в научных целях. Исследование было санкционировано Национальным научным этическим комитетом в области экспериментов на животных по лицензии № XXI./1540/2020. Формулу (II) растворяли в физиологическом растворе в концентрации 10 мкМ. Получившим лечение мышам вводили 400 мкл Формулы (II), растворенной в физиологическом растворе, в течение 5 минут в ингаляторе при непрерывном потоке кислорода (2 л/мин). Контрольные животные получали физиологический раствор в качестве носителя. Мыши были разделены на 4 группы лечения следующим образом: контроль дикого типа (группа 1), контроль с нокаутом CFTR (группа 2), получившие лечение животные дикого типа (группа 3), получившие лечение животные с нокаутом CFTR (группа 4). Лечение проводили ежедневно в течение 4 недель. По окончании экспериментов мышам вводили летальную анестезию и удаляли легкие. Легкие фиксировали для гистологии и окрашивали трихромом для оценки плотности легочной паренхимы и фиброза легких. Срезы оцифровывали и фиброз оценивали следующим образом. Снимки с разрешением 1388×1038 были сделаны с объективами с 10-кратным и 40-кратным увеличением камерой Zeiss ICc3. Коррекция (изображений, сделанных объективом с 40-кратным увеличением) на фоновое освещение была выполнена с помощью пакета программного обеспечения FIJI ImageJ (v2.1.0/1.53e, Java 1.8.0_172 64 бит), как описано ранее (https://imagejdocu.list.lu/howto/working/how_to_correct_background_illumination_in_brightfield_microscopy). Анализ анилинового синего компонента трихромного окрашивания фиброза по Массону был выполнен с помощью Leica Aperio Image Scope (12.4.3.5008) со встроенным макро Positive Pixel Count v9 с пороговым пределом оттенка, установленным

на 0,607, с шириной оттенка 0,12 (пороговые пределы 130-130,130-230). Положительные пиксели считали фиброзом, отрицательные – тканью. Анализ пропорции воздух/ткань был выполнен с помощью Leica Aperio Image Scope (12.4.3.5008) со встроенным макро Positive Pixel Count v9 без ограничения оттенка (0-175;175-255). Из анализа исключали участки
5 бронхов и кровеносных сосудов.

Мониторинг массы тела животных показал, что животные сохранили свою исходную массу тела во всех группах (фигура 7.A). Введение *in vivo* Формулы (II) значительно снижало плотность легочной паренхимы у мышей с нокаутом CFTR ($35,2 \pm 5,2\%$ против $26,4 \pm 2,2\%$), а также фиброз легких ($26,7 \pm 2,4\%$ против $22,4 \pm 1,6\%$) (фигура 7. В-С), по сравнению с
10 контрольной группой. Во время лечения нежелательных явлений не наблюдалось. Клинических проявлений токсичности у получавших лечение животных не наблюдалось.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение Формулы (X):



5 или фармацевтически приемлемые стереоизомеры, энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры, пролекарства или их комбинации, где

$$n = 0-10$$

$$k = 1-200$$

10 X = H, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, циклоалкильные и ацильные группы, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами

$$Y = O, S, NH, CH_2, N-OR,$$

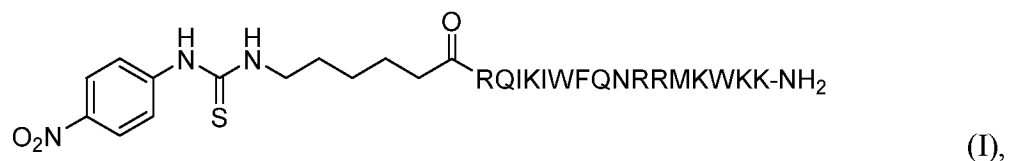
15 Z = C1-10 алкил или циклоалкил, арил, защитная группа, C1-10 ацил, биотин, флуоресцентный и радиоактивный индикатор, алкильные, циклоалкильные и ацильные группы, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами

$$R = H, OH, O-алкил, NH, N-алкил, SH, S-алкил, алкил, алкенил, алкинил, NH-NH_2,$$

20 R₂ = H, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, и образующие кольцевую систему, и гликозилированные, и

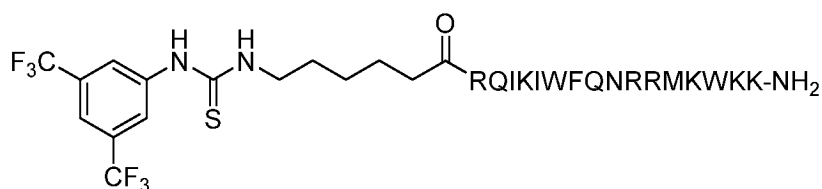
R3 = H, C1-10 алкил или циклоалкил, арил, в идеале замещенные N, O, S, P, Se, Si, As, галогенидами, в идеале могут образовывать кольцевую систему и могут быть гликозилированы, и стереоизомеры, включая энантиомеры, диастереомеры, рацемические смеси, смеси энантиомеров или их комбинации, а также их полиморфы, таутомеры, сольваты, соли, сложные эфиры и пролекарства.

- 5
2. Соединение по п. 1, где указанный пептидный домен содержит один или более положительно заряженных остатков.
3. Соединение по п. 1 или п. 2, где указанный пептидный домен содержит боковые цепи аргинина или лизина.
- 10
4. Соединение по любому из пп. 1-3, где указанный пептидный домен содержит один или более проникающих через клеточную мембрану доменов (СРР), таких как катионные, амфипатические, гидрофобные или амфифильные СРР, выбранные из группы, состоящей из SP, pVEC, полиаргинина (аргининовый участок), транспортана, ТАТ и пенетратина, или их вариантов, обладающих по меньшей мере 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% или 95% идентичностью любой из SEQ ID NO: 16, 17, 18, 19, 24 или 25 и обладающих активностью проникновения в клетку, предпочтительно выбранные из: остатка 48-20
- 60 ТАТ или пенетратина или их вариантов.
5. Соединение по любому из пп. 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (I):



необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2537,4 дальтон.

6. Соединение по п. 5, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.
- 25
7. Соединение по любому из пп. 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (II):

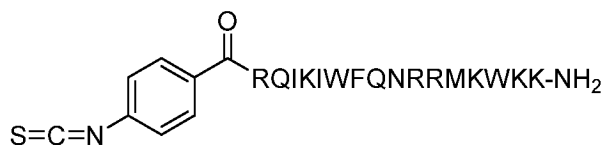


(II),

необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2628,4 дальтон.

8. Соединение по п. 7, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

9. Соединение по любому из пп. 1-4, где указанное соединение имеет Формулу (III):

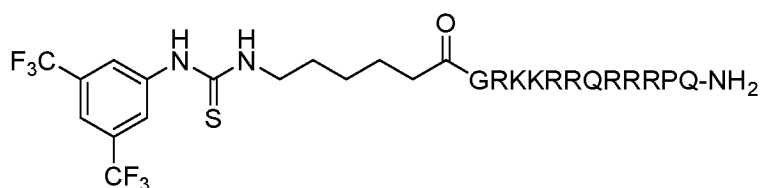


(III),

необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2405,3 дальтон.

10. Соединение по п. 9, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

11. Соединение по п. 1, где указанное соединение имеет формулу (IV):



(IV),

необязательно где молекулярная масса (MW) соединения составляет 2004,4 дальтон.

12. Соединение по п. 11, где указанное соединение выбрано из фармацевтически приемлемых стереоизомеров, энантиомеров, диастереомеров, рацемических смесей, полиморфов, таутомеров, сольватов, солей, сложных эфиров, пролекарств или их комбинаций.

13. Соединение по любому из пп. 1-12, где указанное соединение не индуцирует апоптоз или некроз в диапазоне концентраций от 100 нМ до 100 мкМ.

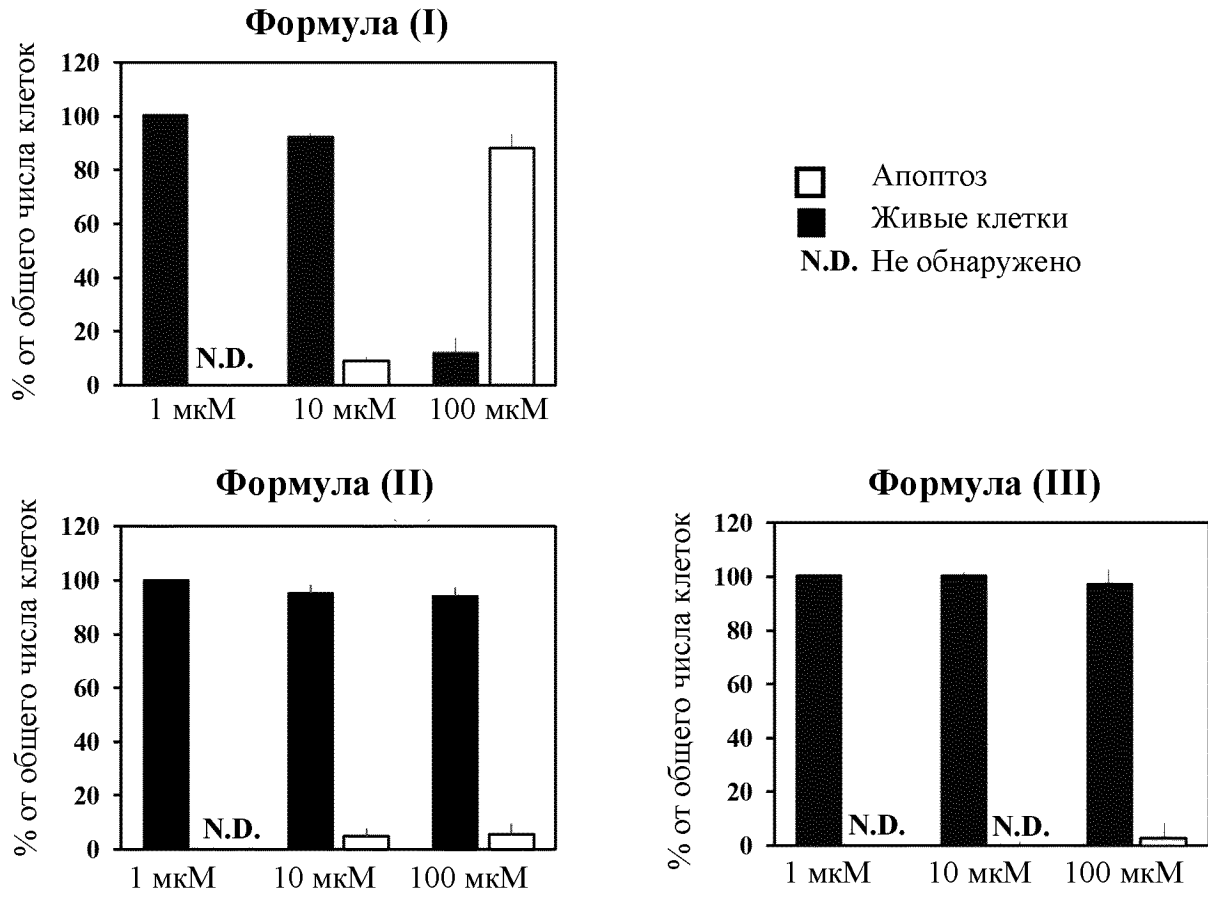
14. Соединение по любому из пп. 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к клеткам НЕК-293 в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
- 5 15. Соединение, указанное в любом из пунктов 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к трехмерным органоидам поджелудочной железы в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
- 10 16. Соединение по любому из пп. 1-12, где указанное соединение снижает внутриклеточную концентрацию хлорид-ионов при применении к фрагментам протоков поджелудочной железы в отсутствие CFTR в концентрации от 100 нМ до 10 мкМ, необязательно дозозависимым образом.
17. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-12 и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество или носитель.
- 15 18. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из пп. 1-12, где указанная фармацевтическая композиция выполнена с возможностью введения, выбранного из группы, состоящей из перорального, легочного, ректального введения, введения в толстую кишку, парентерального, интрацестерального, интравагинального, внутрибрюшинного, глазного, ушного, буккального, назального и местного введения; и/или выполнена в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из жидких дисперсий, гелей, аэрозолей, мазей, кремов, лиофилизированных препаратов, таблеток, капсул; и/или представлена в виде лекарственной формы, выбранной из группы, состоящей из препаратов с контролируемым высвобождением, быстро плавящихся препаратов, препаратов с замедленным высвобождением, препаратов с пролонгированным высвобождением, препаратов с пульсирующим высвобождением и смешанных препаратов с немедленным высвобождением и контролируемым высвобождением; и/или представлена в виде препарата для клизмы, ионофоретического средства, покрытия имплантируемого медицинского устройства; или их комбинации.
- 20 25 30 19. Фармацевтическая композиция по п. 17 или п. 18 для применения для производства лекарственного средства.
20. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-19 для применения для лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с

муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанная фармацевтическая композиция увеличивает содержание электролитов в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.

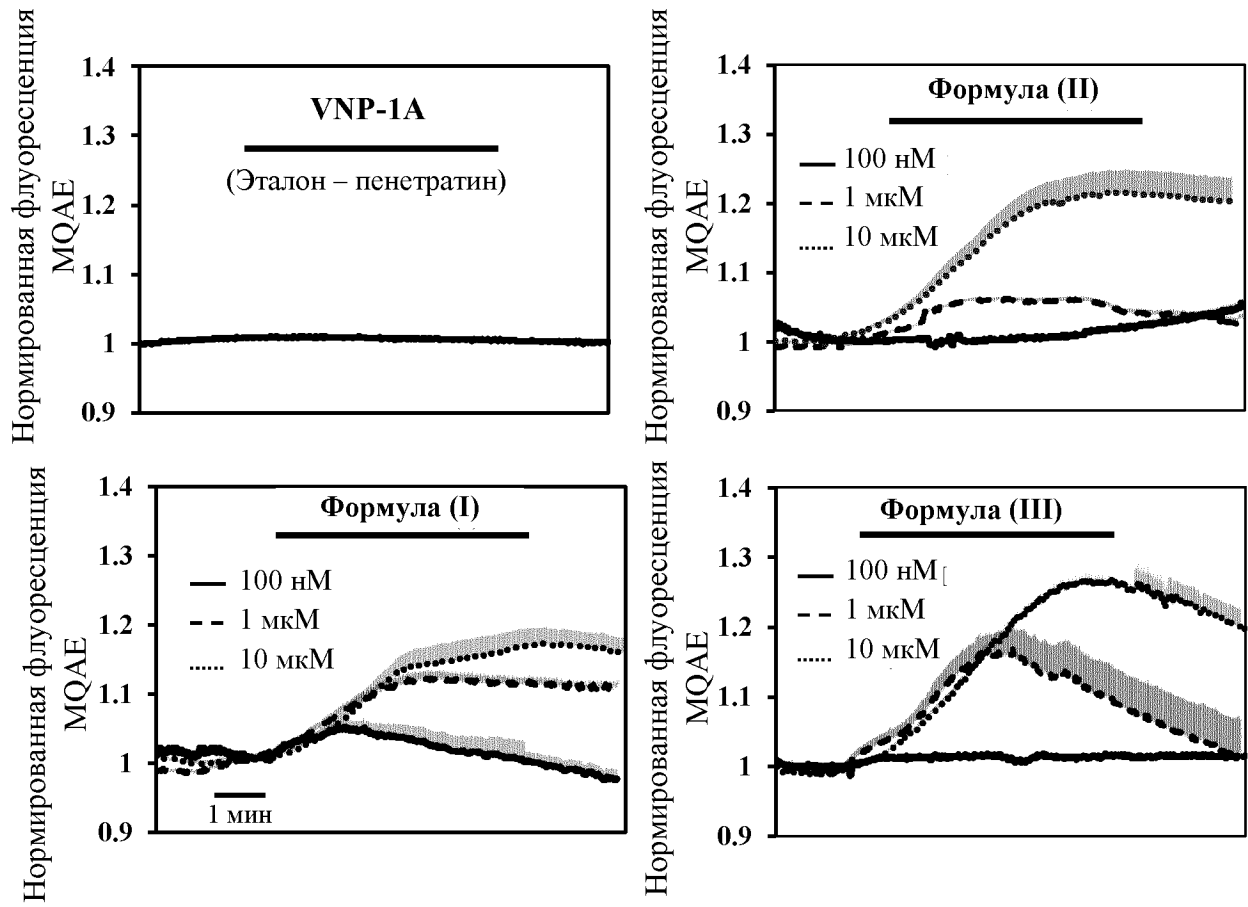
- 5
21. Соединение по любому из пп. 1-12 или композиция по любому из пп. 17-20 для применения в терапии.
22. Соединение по любому из пп. 1-12 или композиция по любому из пп. 17-20 для применения для лечения CFTR-опосредованных заболеваний, выбранных из муковисцидоза, астмы, ХОБЛ, вызванной курением, хронического бронхита, риносинусита, запора, панкреатита, недостаточности поджелудочной железы, мужского бесплодия, вызванного врожденным двусторонним отсутствием семявыносящего протока (CBAVD), заболевания легких легкой степени тяжести, идиопатического панкреатита, аллергического бронхолегочного аспергиллеза (АБЛА), болезни печени, наследственной эмфиземы, мукополисахаридоза, хлоридных каналопатий, таких как врожденная миотония (формы Томсена и Беккера), синдрома Барттера III типа, болезни Дента, гиперэксплексии, эпилепсии.
- 10
- 15
23. Способ лечения, уменьшения, подавления или контроля вязкой мокроты или слизи, связанных с муковисцидозом, у субъекта-человека, где указанный способ включает введение соединения по любому из пп. 1-12 или композиции по любому из пп. 17-20, где указанный способ увеличивает содержание электролитов в указанной вязкой слизи или мокроте, таких как хлорид, необязательно, где указанную фармацевтическую композицию вводят в легкие указанного субъекта-человека путем легочной или аэрозольной доставки в виде раствора или суспензии в жидком носителе или в виде сухого порошка.
- 20
- 25
24. Способ лечения, уменьшения, подавления или контроля по меньшей мере одного признака или симптома муковисцидоза у субъекта, где указанный способ включает введение терапевтически эффективного количества одного или более соединений по любому из пп. 1-12 или композиции по любому из пп. 17-20 субъекту-человеку, необязательно в комбинации с одним или более терапевтическими агентами, где указанный признак или симптом связан с дыхательными путями или дыхательной системой и включает один или более из следующих: накопление аномально вязкой слизи; повышенное общее содержание муцина; повышенная концентрация
- 30

5 медиатора аллергического воспаления; сниженная клеточная секреция хлорид-ионов; нарушение секреции жидкости; повышенная апикальная абсорбция натрия эпителиальными клетками дыхательных путей; закисление и уменьшение высоты жидкости на апикальной поверхности дыхательных путей; хронический кашель; хроническая легочная инфекция и их комбинации.

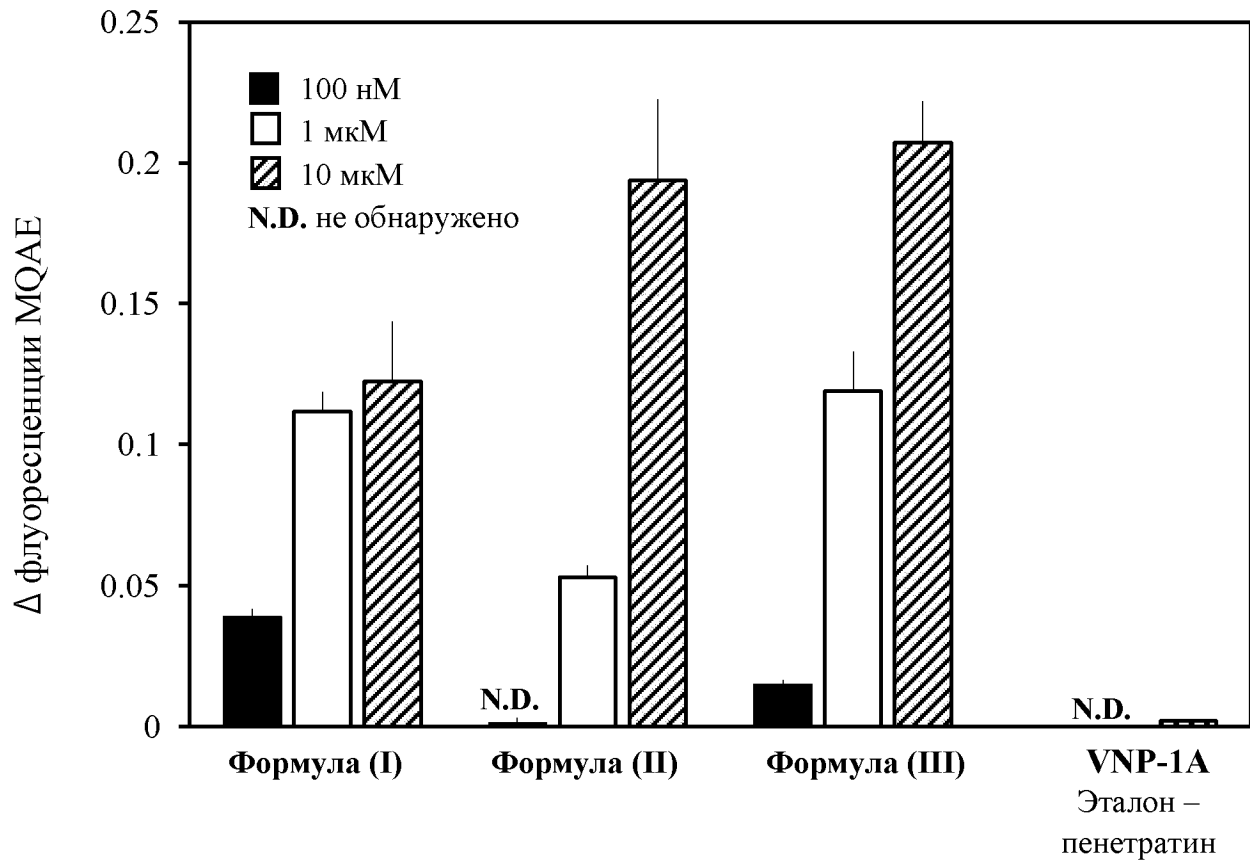
25. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 17-20 или способ по любому из пп. 23-24, где указанное соединение предпочтительно выбрано из Формулы (I), (II), (III) и (IV).



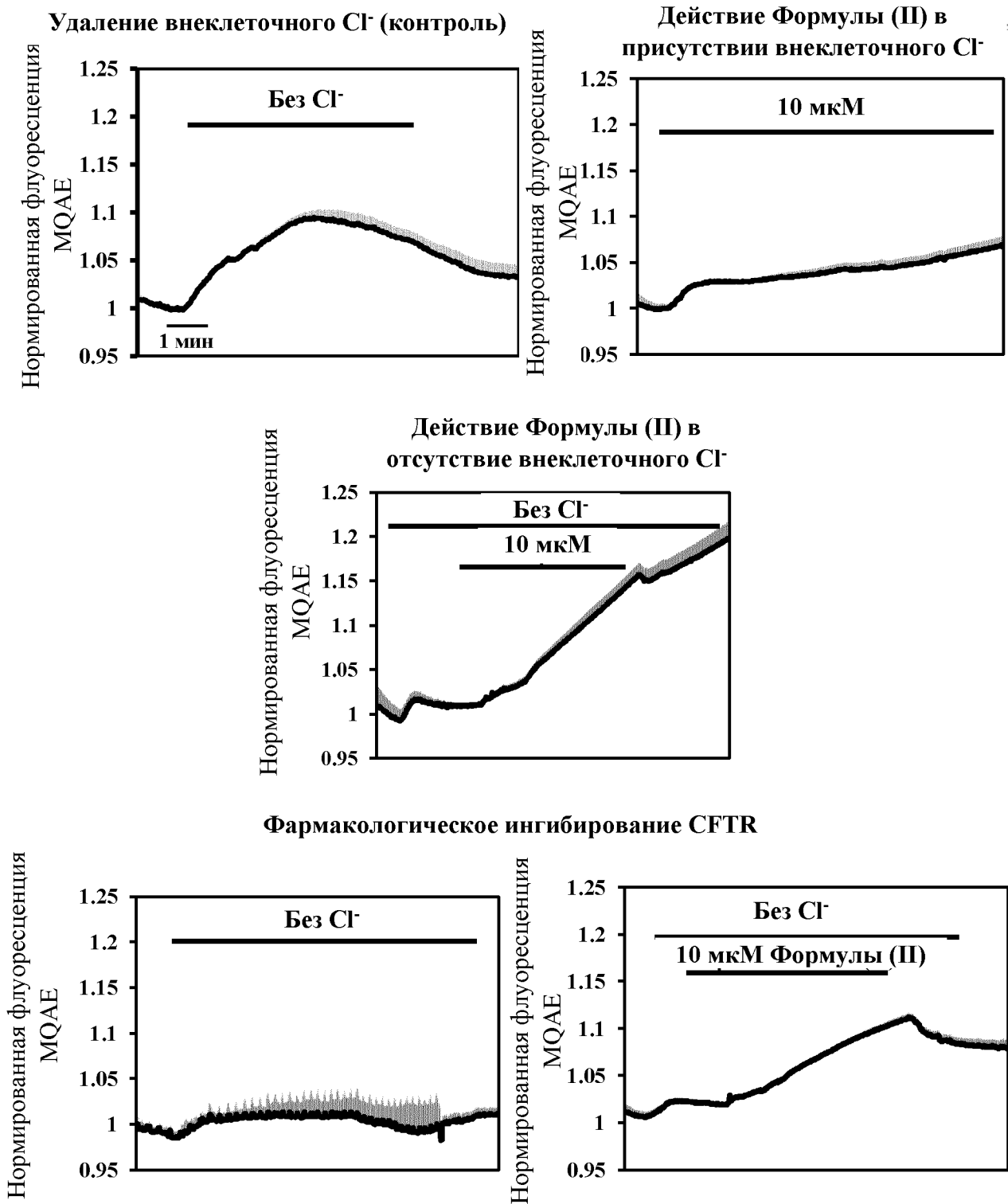
Фиг. 1



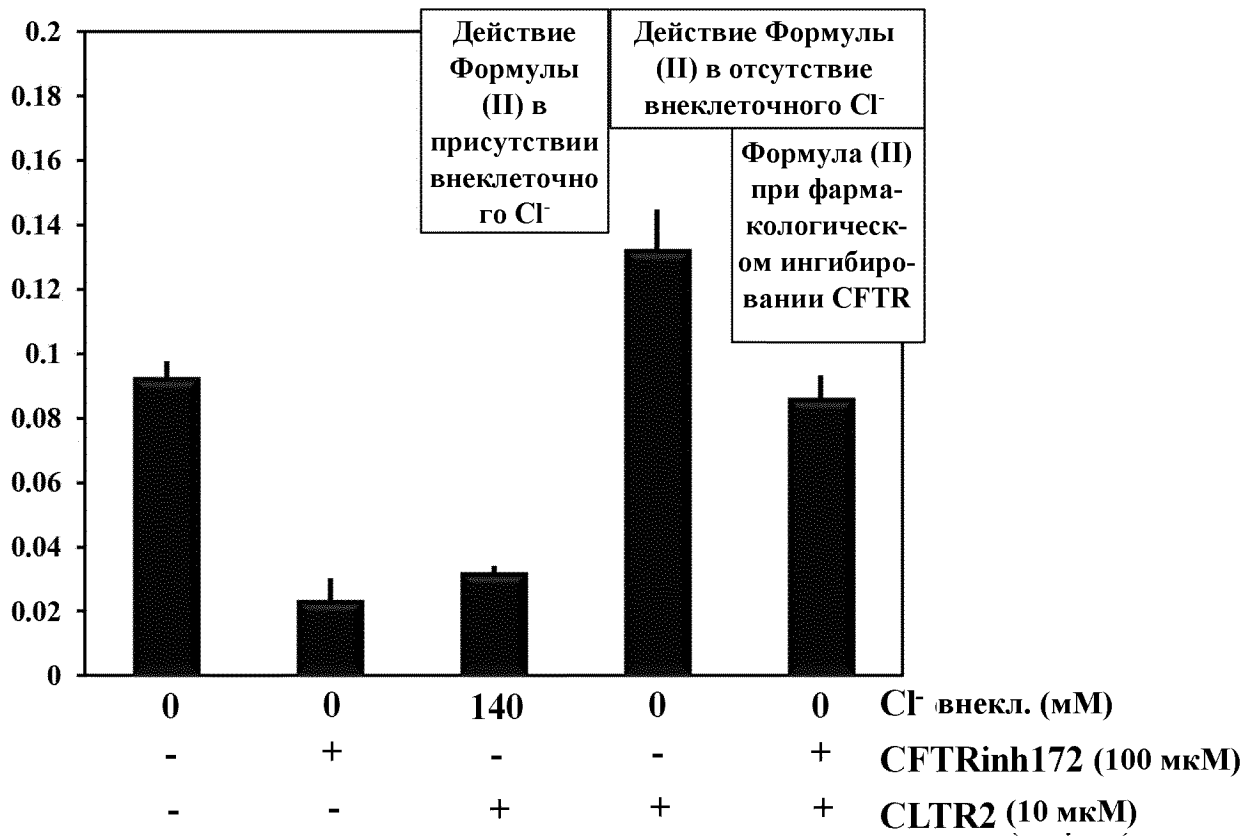
Фиг. 2



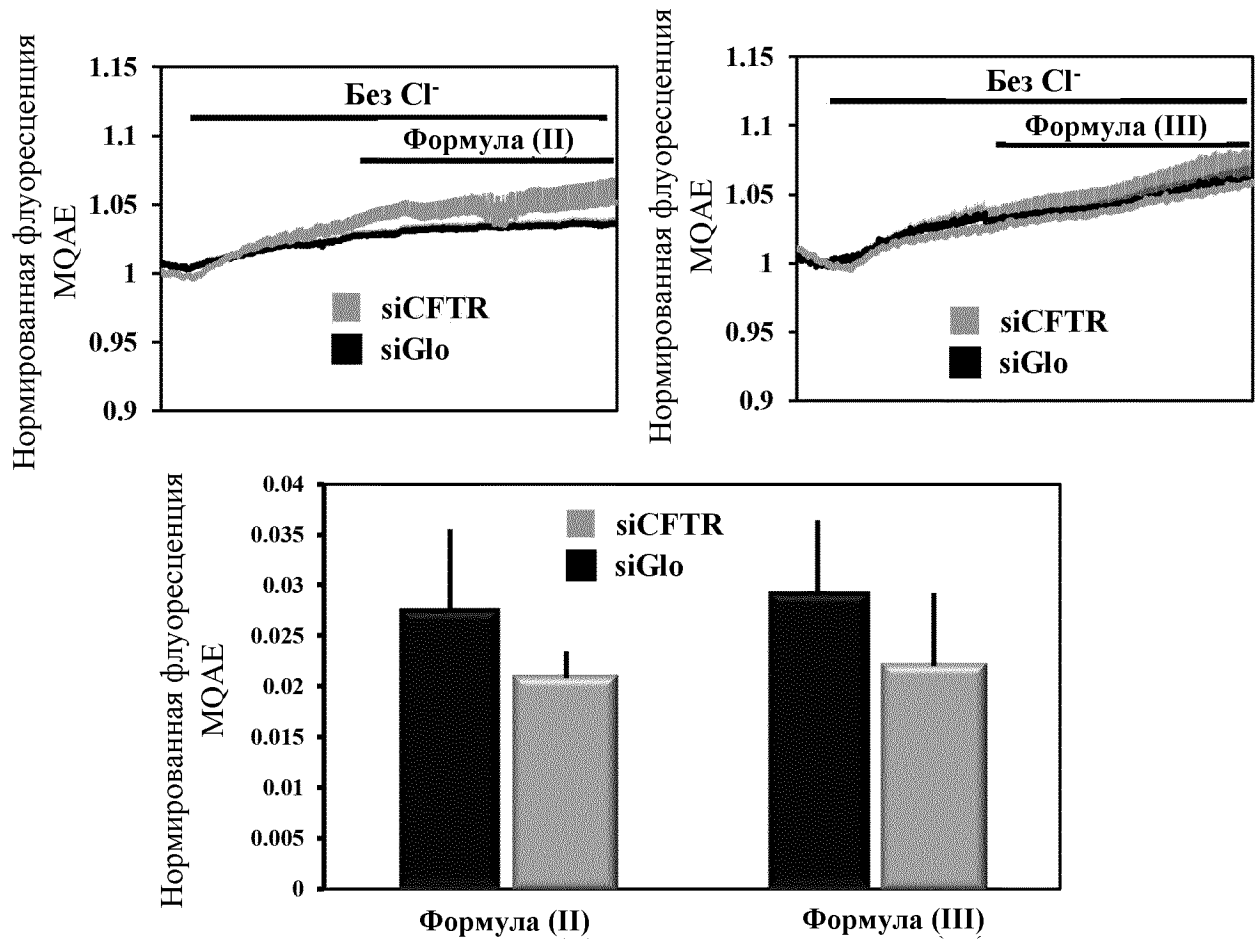
Фиг. 3



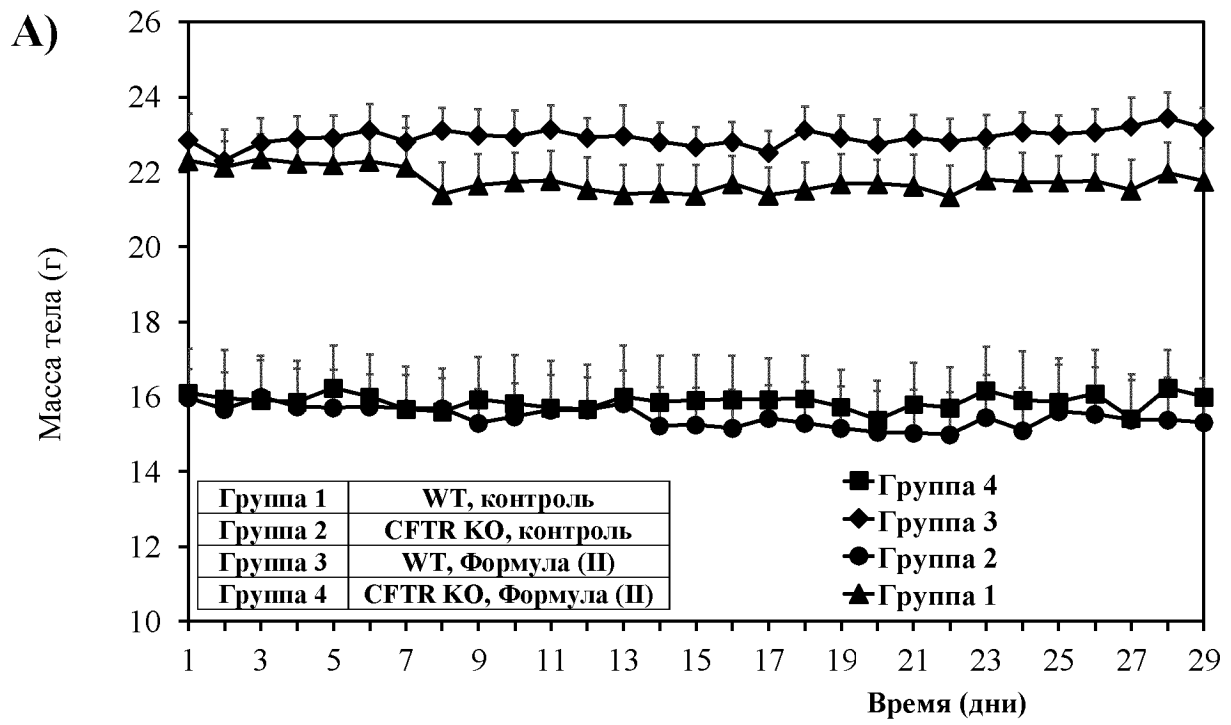
Фиг. 4



Фиг. 5



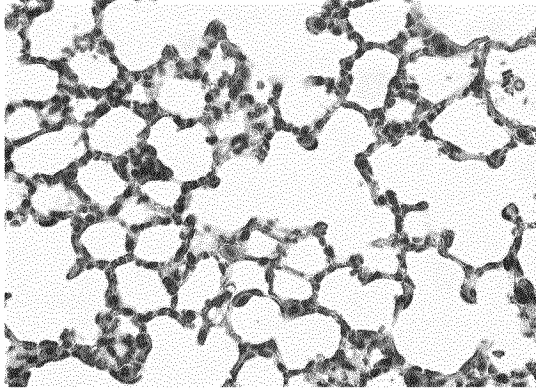
Фиг. 6



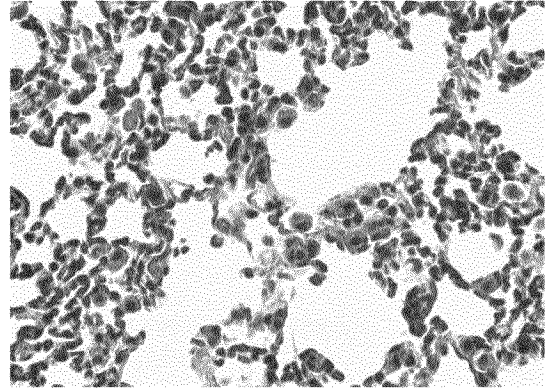
Фиг. 7

В)

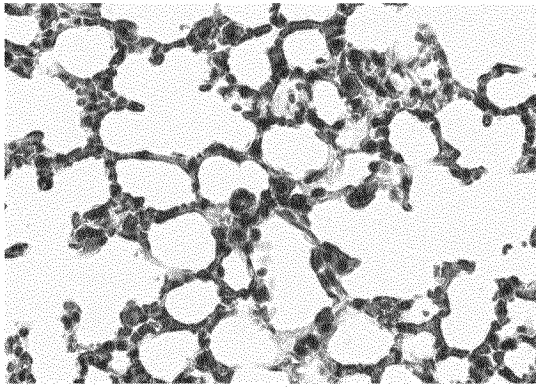
Группа 1



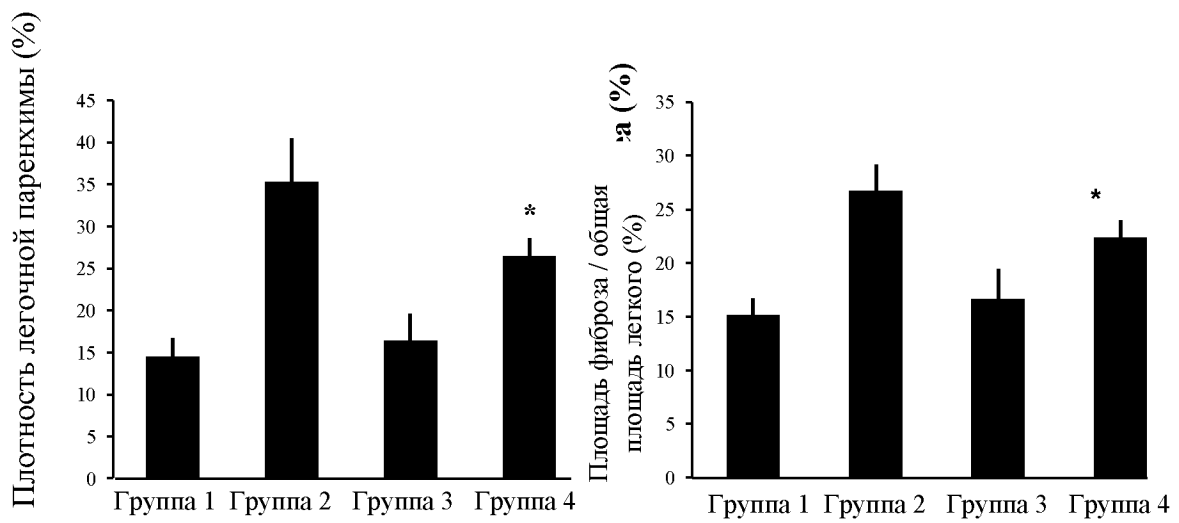
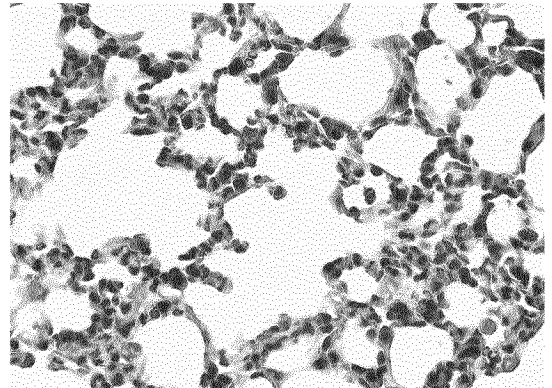
Группа 2



Группа 3



Группа 4



Фиг. 7