

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391545** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.07.14

(51) Int. Cl. *A61K 31/7028* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61P 3/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.19

(54) **АНАЛОГИ ИНОЗИТОЛГЕКСАКИСФОСФАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ
ПОЧЕК, СВЯЗАННОГО С КАЛЬЦИФИКАЦИЕЙ**

(31) 20209090.8

(32) 2020.11.20

(33) EP

(86) PCT/EP2021/082374

(87) WO 2022/106657 2022.05.27

(71) Заявитель:

**ВИФОР (ИНТЕРНЕСНЛ) АГ; ЭТХ
ЦЮРИХ (СН)**

(72) Изобретатель:

**Иварссон Маттиас Эммануэль, Леру
Жан-Кристоф, Клетцмейр Анна (СН),
Куро-О Макото, Хаяши Хиросака (JP)**

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединению, представляющему собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении или предупреждении заболевания, связанного с образованием кристаллов соли кальция.

A1

202391545

202391545

A1

АНАЛОГИ ИНОЗИТОЛГЕКСАКИСФОСФАТА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК, СВЯЗАННОГО С КАЛЬЦИФИКАЦИЕЙ

Настоящее изобретение относится к соединениям и композициям для применения в лечении состояний, связанных с кальцификацией тканей, в частности тканей почек, вызванной отложением или воздействием фосфата кальция (CaP) и других осадков кальция.

Предпосылки изобретения

В публикации WO2013045107 (A1) впервые раскрыта концепция применения полиалкилэфирных производных инозитолполифосфата в качестве фармацевтических средств. Первоначально эти соединения разрабатывали как средство, имеющее значительный потенциал для нейтрализации токсина *C. difficile* в просвете толстой кишки, но последующий анализ показал, что соединения очень эффективны для снижения уровня кальцификации при системном применении, как впервые раскрыто в WO2017098047 (A1), US10624909 (B2) и US20200247837 (A1).

В публикации WO2020058321 (A1) раскрыты дополнительные соединения на основе инозитолполифосфатных каркасов с улучшенными фармакологическими свойствами.

Все патентные документы, упомянутые в настоящем описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Целью настоящего изобретения является обеспечение дополнительных преимуществ вариантов применения полиалкилэфирных производных инозитолполифосфата. Данная цель достигаема с помощью объекта независимых пунктов формулы изобретения настоящего описания.

Сущность изобретения

В одном аспекте в настоящем изобретении представлено соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении или предупреждении заболевания,

связанного с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция. В самом широком смысле, заболевание, на которое направлены соединения по настоящему изобретению, представляет собой хроническое заболевание почек, связанное с осаждением соли кальция, в частности с образованием осадков, состоящих из фосфата и/или оксалата кальция.

Конкретные заболевания, для лечения которых может быть целесообразно применение описанных в данном документе соединений, включают почечный фиброз, в частности когда он связан с кальцификацией или воздействием осадков фосфата или оксалата кальция на почечную ткань, воспаление почек, в частности когда оно связано с кальцификацией или воздействием осадков фосфата или оксалата кальция на почечную ткань, нефрит, в частности интерстициальный нефрит, гломерулонефрит, вызванный фосфатом фиброз почки, вызванное фосфатом хроническое заболевание почки, хроническое заболевание почки, связанное с гиперфосфатемией, прогрессирование хронического заболевания почки, фосфатная токсичность, гиперфосфатурия, гиперфосфатемия и/или гипер-FGF23-эмия.

Согласно альтернативному варианту данного аспекта настоящего изобретения соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в лечении или предупреждении заболевания, связанного с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция, причем заболевание выбрано из кальцификации сосудов, заболевания коронарных артерий, жесткости сосудов, кальцификации клапанов, нефрокальциноза, кальциноза кожи, камней в почках и хондрокальциноза.

Один из ключевых выводов, следующих из представленных данных, который авторы настоящего изобретения считают действительно новым, заключается в том, что защитный эффект наблюдался *in vivo* даже при отсутствии явных кальцификатов. Мышиная модель, используемая в примерах, представляет собой модель, в которой в исследуемые промежутки времени в почечных канальцах образуются осадки CaP, но фактически обнаружить кальцификацию почек как таковую с помощью гистологического исследования не представляется возможным (окрашивание по фон Косса отрицательное). Кальцификация все же появляется, если содержать животных дольше или провести нефрэктомия в начале эксперимента для ускорения процесса в условиях, используемых в отсутствие лечения ингибитором. Разумеется, защитный

эффект можно ожидать в случае, когда кальцификаты присутствуют и поддаются измерению (что имеет место в клеточном анализе, использованном в предыдущих примерах).

Термины и определения

Для целей толкования данного описания применяют следующие определения, и, когда это уместно, термины, используемые в единственном числе, также включают множественное число и наоборот. В случае, если какое-либо определение, приведенное ниже, противоречит какому-либо документу, включенному в настоящий документ посредством ссылки, приведенное определение будет иметь преимущественную силу.

Термины «содержащий», «имеющий», «состоящий из» и «включающий» и другие подобные формы, а также их грамматические эквиваленты, используемые в данном документе, предназначены для эквивалентного значения и являются открытыми в том смысле, что элемент или элементы, следующие за любым из этих слов, не предназначены для исчерпывающего перечисления такого элемента или элементов, или ограничены только перечисленным элементом или элементами. Например, изделие, «содержащее» компоненты А, В и С, может состоять из (т. е. содержать только) компоненты А, В и С, или может содержать не только компоненты А, В и С, но и один или более других компонентов. Как таковое, подразумевается и понимается, что «содержит» и подобные ему формы, а также их грамматические эквиваленты, включают раскрытие вариантов осуществления «состоящих по сути из» или «состоящих из».

В случае, когда представлен диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение с точностью до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределами этого диапазона и любое другое указанное или промежуточное значение в этом указанном диапазоне, включено в данное раскрытие, с учетом любого конкретно исключенного предела в указанном диапазоне. В случае, если указанный диапазон включает один или оба из пределов, диапазоны, исключаящие один или оба из диапазонов, включивших пределы, также включены в настоящее изобретение.

Ссылка на «приблизительно» в отношении значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты, которые направлены на это значение или параметр

как таковой. Например, описание со ссылкой на «приблизительно X» включает описание «X».

Используемая в данном документе, в том числе в прилагаемой формуле изобретения, форма единственного числа включает ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное.

Если не определено иное, то все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области (например, в культуре клеток, молекулярной генетике, химии нуклеиновых кислот, способах гибридизации и биохимии). Для молекулярных, генетических и биохимических способов, а также химических способов, применяют стандартные методики (см. в целом, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 4th ed. (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. и Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (2002) 5th Ed, John Wiley & Sons, Inc.) and chemical methods.

В контексте настоящего описания термин *олиго-алкилэфир* относится к олиго-этиленгликолю и его ближайшим родственным соединениям, таким как олиго-пропиленгликоль и олиго-глицерин. Термин «олиго» означает, что присутствует более одного, в частности от 2 до 20, более конкретно от 2 до 12 мономеров (-CH₂-CH₂-O-) в случае олиго-этиленгликоля, (-CH(CH₃)-CH₂-O-) в случае олиго-пропиленгликоля).

В контексте настоящего описания термин *«инозитолполифосфат»* относится к циклогексан-гексолу (инозитол, циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексол), в котором каждый ОН замещен фосфатно-эфирным мотивом, если только ОН не замещен олиго-алкилэфирным мотивом в соответствии с предыдущим определением. В конкретных вариантах осуществления инозитоловый каркас представляет собой мио-инозитол ((1R,2S,3R,4R,5S,6S)-циклогексан-1,2,3,4,5,6-гексол).

Термин *«соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата»* в контексте настоящего описания относится к соединению, содержащему один или более фрагментов, представляющих собой инозитолполифосфат, как определено выше, и по меньшей мере один олигоалкилэфир.

Термин «*кальцификация*» в контексте настоящего описания относится к образованию осадка кальция в пораженной ткани, в частности в ткани почек.

Подробное описание изобретения

Первый аспект настоящего изобретения относится к соединению, представляющему собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемой соли для применения в лечении или предупреждении заболевания, связанного с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция. В самом широком смысле, заболевание представляет собой хроническое заболевание почек, связанное с осаждением соли кальция, в частности с образованием осадков, состоящих из фосфата и/или оксалата кальция.

Не желая ограничиваться теорией, авторы настоящего изобретения пришли к выводу, что патологические механизмы упомянутых в данном документе заболеваний включают, в качестве первого шага, осаждение фосфата кальция, который впоследствии разрастается, прилипает к клеткам (и, возможно, продолжает разрастаться после прилипания к клеткам). Взаимодействие осадков фосфата кальция с клетками почечных канальцев, независимо от того, крупные это осадки или мелкие, вызывает повреждение клеток.

Соединения и композиции, представленные в данном документе, по-видимому, останавливают образование/разрастание новых осадков, а также останавливают прилипание существующих осадков к клеткам, что обеспечивает защитный эффект. Следовательно, наблюдается двойное действие.

Осадки кальция

Химическая композиция осадков кристаллов кальция, связанных с почечными и сердечно-сосудистыми заболеваниями, хорошо изучена (см. Elliot, J Urology 100 (1968), 687-693; Xie et al., Cryst Growth Des. 2015 Jan 7; 15(1): 204–211). В принципе, лечение в соответствии с настоящим изобретением способно предупредить или облегчить любое состояние, при котором отложение фосфата кальция, оксалата и смешанных кристаллов фосфата и оксалата кальция играет определенную роль.

Фосфат кальция встречается в различных кристаллических формах в патологических отложениях в организме человека; к ним относятся гидроксилapatит (гидроксилapatит,

HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, брусит ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$), монетит и различные аморфные соли фосфата кальция.

Оксалат кальция в чистом виде встречается в виде моно- (уэвеллит), ди- (уэдделлит) и три-гидрата, и часто связан с другими отложениями, в основном с фосфатными солями.

Результаты, представленные в примерах, показывают, что любые последствия образования кристаллов соли кальция на клеточном уровне, даже если они связаны с отложениями, предшествующими стадии макроскопически обнаруживаемой кальцификации, могут быть предупреждены с помощью лечения в соответствии с настоящим изобретением, которое описано в настоящем описании.

Заболевания, связанные с осаждением кальция, которые поддаются лечению в соответствии с настоящим изобретением

«Фиброз почек» или «тубулоинтерстициальный фиброз», связанный с образованием кристаллов соли кальция и/или их воздействием на ткани, означает утолщение и рубцевание ткани почки в результате неудачного заживления ран после хронического повреждения, вызванного воздействием фосфата кальция, оксалата кальция или смешанных осадков CaP/CaOx . В ходе этого процесса бесконтрольное отложение фиброзного матрикса приводит к гломерулосклерозу, атрофии канальцев и интерстициальному фиброзу. Пациенты, страдающие данным заболеванием, могут испытывать сильные боли в животе (с кровотечением или кровоизлиянием), отек и изменение цвета одной или обеих ног, и, в конечном итоге, состояние может прогрессировать до хронического заболевания почек.

«Воспаление почек» или «нефрит» определяют как сложная сеть взаимодействий между клетками почечной паренхимы и резидентными иммунными клетками, такими как макрофаги и дендритные клетки, в сочетании с привлечением циркулирующих моноцитов, лимфоцитов и нейтрофилов. После стимуляции эти клетки активируют специализированные структуры, такие как Toll-подобный рецептор и Nod-подобный рецептор (NLR). Обнаруживая потенциально опасные молекулы, эти рецепторы могут привести в действие основные пути врожденного иммунитета, такие как ядерный фактор κB (NF- κB) и NLRP3 инфламмосома, вызывая метаболическое перепрограммирование и изменение фенотипа иммунных и паренхимальных клеток, а также секрецию ряда медиаторов воспаления, которые могут вызвать необратимое

повреждение тканей и функциональную недостаточность. При СКД хроническое воспаление приводит к постепенному снижению скорости клубочковой фильтрации (GFR), что в конечном итоге может привести к почечной недостаточности (конечная стадия заболевания почек, ESRD).

В той степени, в которой воспаление почек / нефрит связаны или вызваны взаимодействием ткани почек с отложениями кальция, ожидается, что лечение в соответствии с настоящим изобретением будет способствовать облегчению или предупреждению этого состояния. Приведенные в данном документе примеры показывают, что отложение/воздействие фосфата кальция приводит к повышению уровня маркеров воспаления и фиброза в почках, поэтому при любом заболевании, которое заключается в воспалении и фиброзе почек, должна быть польза от лечения, которое подавляет образование отложений. Для каждого из таких воспалительных заболеваний могут существовать и другие, даже сопутствующие причины воспаления и фиброза, поскольку оба из этих состояний часто являются многофакторными процессами. Однако ожидается, что устранение одного из факторов, способствующих развитию заболевания, улучшит общую клиническую картину.

«Гломерулонефрит» относится к группе заболеваний, которые характеризуются воспалительными изменениями в клубочковых капиллярах. У пациентов, страдающих этой группой заболеваний, может наблюдаться протеинурия, нарушение функции почек в некоторых случаях в сочетании с задержкой жидкости, гипертонией и отеками. Гломерулонефрит может протекать как первично почечное заболевание, а также указывать на процесс системного заболевания. Если гломерулонефрит связан с образованием кристаллов соли кальция и/или их воздействием на ткани, ожидается, что лечение с помощью описанных в данном документе соединений принесет пользу.

«Интерстициальный нефрит» означает воспаление почечного интерстиция, которое может быть вызвано несбалансированным уровнем кальция. Симптомы включают повышенное выделение мочи, гематурию, изменения психического статуса, припухлости. Ожидается, что при данном состоянии, если оно связано с образованием кристаллов соли кальция и/или их воздействием на ткани, будет польза от лечения соединениями, описанными в данном документе.

«Вызванный фосфатом фиброз почек» может быть связан с диапазоном концентраций кальция и фосфата, что приводит к осаждению в почечных канальцах, см. данные, представленные на фиг. 2: т. е. кальций > 2 или 5 ммоль/л и фосфат > 5 или 7 ммоль/л. Следует отметить, что фосфат может быть повышен в жидкости почечных канальцев (что приводит к его осаждению кальцием) даже при нормальном уровне фосфата в плазме крови (т. е. при отсутствии гиперфосфатемии). Повышенный фосфат в плазме крови является последствием конечной стадии заболевания почек, которая возникает, когда функционирование почек ниже порога, составляющего 20%.

«Вызванное фосфатом хроническое заболевание почек». Вызванное фосфатом СКД может возникнуть даже при нормальном уровне фосфатов в плазме крови (т. е. у пациентов с более ранней стадией СКД). Эталонными значениями могут быть кальций > 2 или 5 ммоль/л и фосфат > 5 или 7 ммоль/л в почечных канальцах.

«Хроническое заболевание почек, связанное с гиперфосфатемией» относится к гиперфосфатемии, возникающей при прогрессирующем СКД, вследствие нарастающей потери GFR. Это приводит к блокированию реабсорбции фосфатов в канальцах и, следовательно, к увеличению задержки фосфатов, другими словами, к снижению клиренса фосфатов, что нарушает гомеостаз фосфатов (Sharon M. Moe, Prim Care. 2008 June ; 35(2): 215–vi.). Применимым эталонным значением для характеристики пациентов, которые, как ожидается, получают пользу от лечения в соответствии с настоящим изобретением, может быть уровень фосфата в плазме крови > 1,46 ммоль/л.

«Прогрессирование хронического заболевания почек» подразумевает пять стадий, начиная с первой стадии (легкое поражение, eGFR 90 или больше) и заканчивая пятой (полная почечная недостаточность, eGFR менее 15). Согласно современным рекомендациям, критический показатель GFR при СКД составляет менее 60 мл/мин на 1,73 м² в течение 3 месяцев.

«Фосфатная токсичность» означает дисрегуляцию выведения и реабсорбции фосфатов почками, нарушающую гомеостаз фосфатов, что может привести к серьезному повреждению тканей почек. (Razzaque, Clin Sci (Lond). 2011 Feb; 120(3): 91–97.) В той степени, в которой это состояние вызывает повреждение тканей, связанное с образованием кристаллов и/или их воздействием на ткани и/или осаждением, которого можно избежать с помощью лечения в соответствии с

настоящим изобретением, такое лечение показано пациенту, страдающему от этого состояния.

«Гиперфосфатурия» или **«фосфатурия»** означает высокий уровень фосфатов в моче. В той степени, в которой это состояние вызывает повреждение тканей, связанное с образованием кристаллов и/или их воздействием на ткани и/или осаждением, которого можно избежать с помощью лечения в соответствии с настоящим изобретением, такое лечение показано пациенту, страдающему от этого состояния.

Под **«гиперфосфатемией»** понимают повышенный ($> 4,5$ мг/дл; $> 1,46$ ммоль/л) уровень фосфатов в крови. В той степени, в которой это состояние вызывает повреждение тканей, связанное с образованием кристаллов и/или их воздействием на ткани и осаждением, которого можно избежать с помощью лечения в соответствии с настоящим изобретением, такое лечение показано пациенту, страдающему от этого состояния.

«Гипер-FGF23-эмия» означает повышенное фракционное выведение фосфатов в сочетании со снижением уровня фосфатов в сыворотке крови из-за повышенного уровня фактора роста фибробластов (FGF)-23.

«Кальцификация сосудов» относится к патологическому отложению минералов в сосудистой системе, часто наблюдаемому у пациентов, страдающих CDK или диабетом. Повышенный уровень кальция и/или фосфатов может быть результатом метаболической дисрегуляции, вызванной диабетом, дислипидемией, окислительным стрессом, уремией и гиперфосфатемией, которые приводят к образованию остеобластоподобных клеток, появлению кальцифицированных отложений и повышению жесткости стенок сосудов.

«Заболевание коронарных артерий» или **«артеросклеротическое заболевание сердца»** означает скопление бляшек в поврежденных внутренних слоях коронарной артерии. Такие факторы, как воспалительные клетки, липопротеины и кальций, прикрепляются к бляшке, что приводит к дальнейшему стенозу. Прогрессирование этого заболевания в конечном итоге может привести к инфаркту миокарда или инсульту.

Под «**жесткостью сосудов**» понимают жесткость артериальной стенки вследствие кальцификации. Жесткость сосудов заключается в снижении эластичности сосудов, что приводит к повышению давления пульсовой волны.

«**Кальцификация клапана**», в частности кальцификация аортального клапана, относится к активной дисрегуляции нормальных гомеостатических процессов и гемодинамических изменений, таких как деградация ЕСМ, фиброз, накопление липидов и неоангиогенез ткани клапана, одновременно с кальцификацией клапана, в частности аортального и митрального клапанов.

«**Нефрокальциноз**» означает отложение солей кальция в почечной паренхиме, особенно в медулле (медулярный нефрокальциноз) или коре (кортикальный нефрокальциноз) почки.

«**Кальциноз кожи**» означает отложение осадков фосфата кальция в коже, особенно на конечностях. Если точка растворимости кальция и фосфата превышена, то происходит осаждение солей кальция и выпадение в виде аморфного гидроксиапатита.

«**Камни в почках**», «**почечные кальцификаты**», «**нефролитиаз**» и «**уролитиаз**» означают отложение минералов в почечной ткани, которое происходит вследствие накопления и, соответственно, перенасыщения мочи (гиперкальциурия).

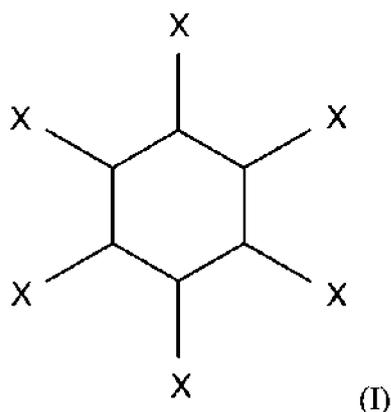
Под «**хондрокальцинозом**» подразумевают накопление фосфата кальция в суставах.

Конкретные состояния, лечение которых, как ожидается, окажется целесообразным, исходя из описанных в данном документе примеров, при введении описанных в данном документе соединений, дополнительно включают стеноз аортального клапана, заболевание периферических артерий и кальцификацию головного мозга.

Данные, приведенные в примере 1, подтверждают практическую пользу соединений, раскрытых в данном документе, как эффективных в уменьшении или подавлении образования кристаллов фосфата кальция, в предупреждении и лечении идиопатического кальциевого нефролитиаза / идиопатических кальциевых камней в почках, в частности состоящих в основном из фосфата кальция, оксалата кальция или их смесей.

Соединения, имеющие один инозитоловый каркас

В определенных вариантах осуществления соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении или предупреждении заболеваний, изложенных выше, описаны общей формулой I, где один, или два, или три X представляют собой олигоэтиленгликоль, а остальные X представляют собой OPO_3^{2-} .



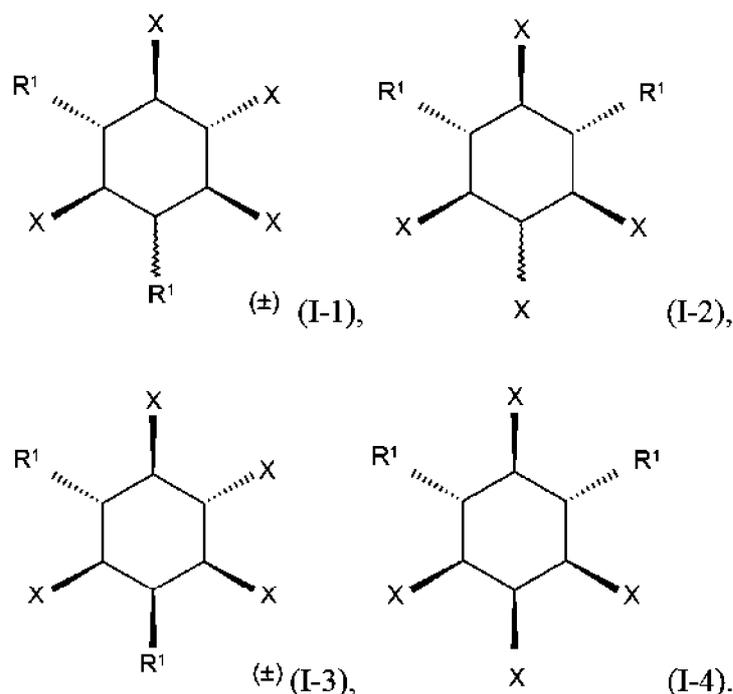
Как показано в приведенных в данном документе примерах, производные моно- и бис-олигоэтиленгликоля с различной длиной цепи обеспечивают подавление образования осадка кальция в клеточном анализе. Инозитоловый каркас может иметь любую стереохимию. Авторы настоящего изобретения предпочтительно работали с *мио*-инозитолом.

При растворении в водной среде при физиологическом pH квалифицированному специалисту очевидно, что упомянутые в данном документе соединения являются анионными и будут сопровождаться катионами. Буферы, применяемые в скринингах, содержат в основном натрий (408 ммоль/л), а также следы калия (0,26 ммоль/л) и магния (4 ммоль/л).

В некоторых конкретных вариантах осуществления два из инозитольных заместителей X, указанных в приведенной выше формуле I, представляют собой олигоэтиленгликоль, а остальные четыре X представляют собой OPO_3^{2-} .

Примеры соединений, которые можно преимущественно применять в лечении в соответствии с настоящим изобретением, включают общие формулы I-1, I-2, I-3 и I-4,

где в каждом случае X представляет собой фосфат, и R¹ представляет собой олиго-этиленгликоль, как указано в настоящем документе:

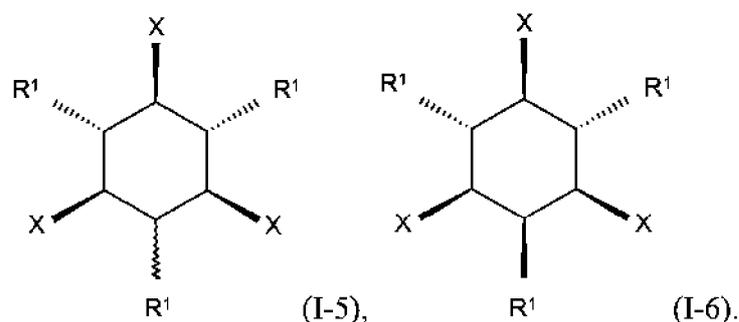


В еще одном конкретном варианте осуществления каркас представляет собой мио-инозитол, а олиго-этиленгликолевые заместители находятся в положениях 4 и 6, при этом остальные заместители представляют собой фосфат. В еще более конкретном варианте осуществления олиго-этиленгликолевые заместители представляют собой O-(CH₂-CH₂O)₂-CH₃.

В других конкретных вариантах осуществления один из инозитольных заместителей X, представленных в приведенной выше формуле I, представляет собой олиго-этиленгликоль, а остальные пять X представляют собой OPO₃²⁻. В еще одном конкретном варианте осуществления каркас представляет собой мио-инозитол, а олиго-этиленгликолевый заместитель находится в положении 4 или 6, в частности, в положении 6, при этом остальные заместители представляют собой фосфат. В еще более конкретном варианте осуществления олиго-этиленгликолевый заместитель представляет собой O-(CH₂-CH₂O)₂-CH₃.

В других конкретных вариантах осуществления **три** из инозитольных заместителей X, показанных в приведенной выше формуле I, **представляют собой олиго-этиленгликоль**, а остальные **три X представляют собой OPO₃²⁻**. Их примеры

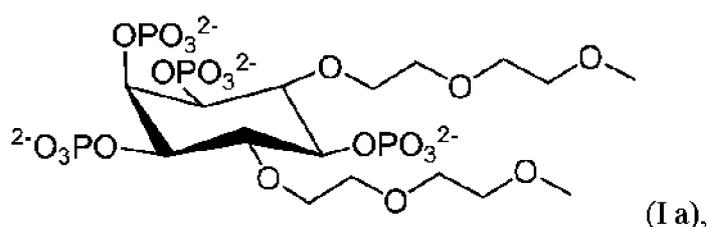
включают общие формулы I-5 и I-6, где в каждом случае X представляет собой фосфат, и R¹ представляет собой олиго-этиленгликоль, как указано в данном документе:

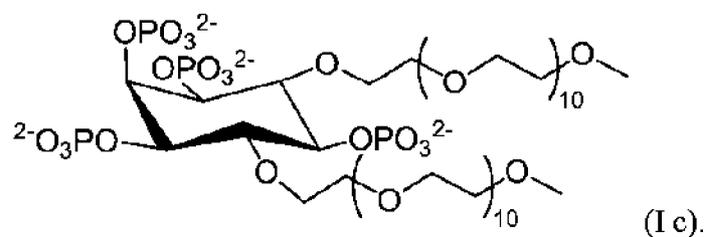
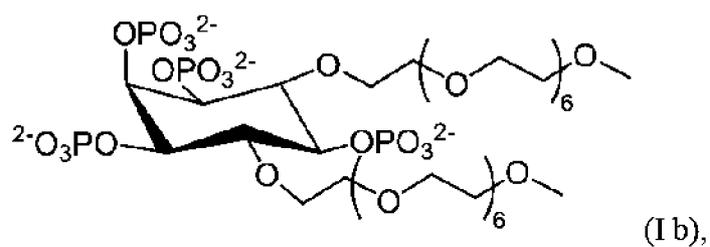


В некоторых вариантах осуществления олиго-этиленгликолевый заместитель (или заместители) соединения, представляющего собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль, предусмотренные для применения в соответствии с настоящим изобретением, описаны формулой $O-(CH_2-CH_2-O)_nCH_3$, причем n выбрано из целого числа от 2 до 20, в частности n составляет от 2 до 12. Различные параметры физиологической активности соединений, фармакологические параметры и аспекты производства будут влиять на то, какое значение n является оптимальным.

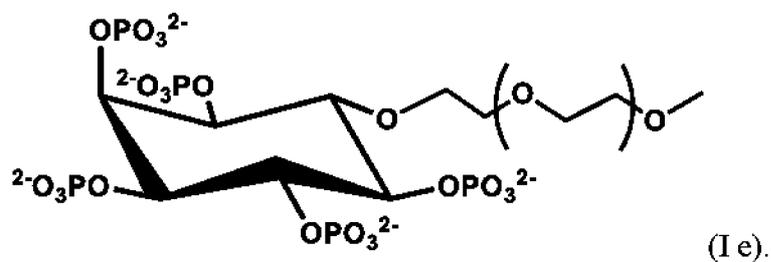
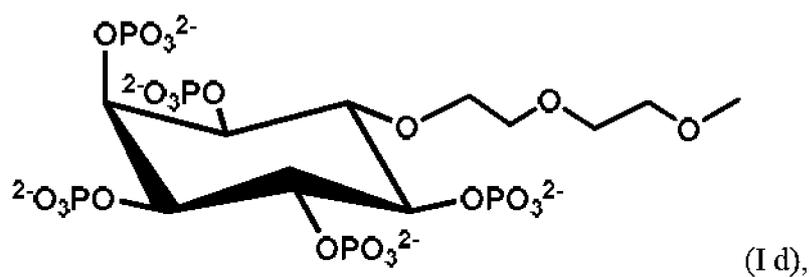
В определенных конкретных вариантах осуществления олиго-этиленгликолевый заместитель (или заместители) соединения, представляющего собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль, предусмотренные для применения в соответствии с настоящим изобретением, описаны формулой $O-(CH_2-CH_2-O)_nCH_3$, где n равняется 2. В таблице 1 примеров показано особое преимущество OEG₂-IP5 и (OEG₂)₂-IP4, оба из которых характеризуются тем, что n равняется 2.

Некоторые конкретные варианты осуществления соединения для применения, которые указаны в настоящем документе, описаны любой из формул:

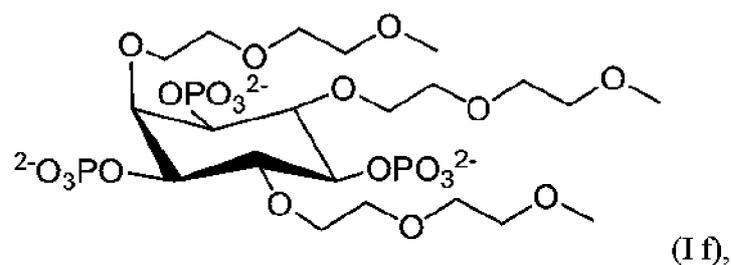


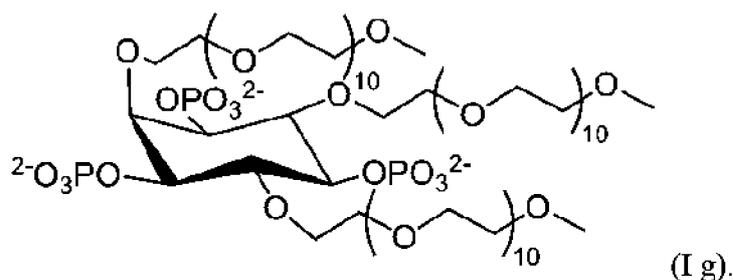


Некоторые конкретные варианты осуществления соединения для применения, которые указаны в настоящем документе, описаны любой из формул:



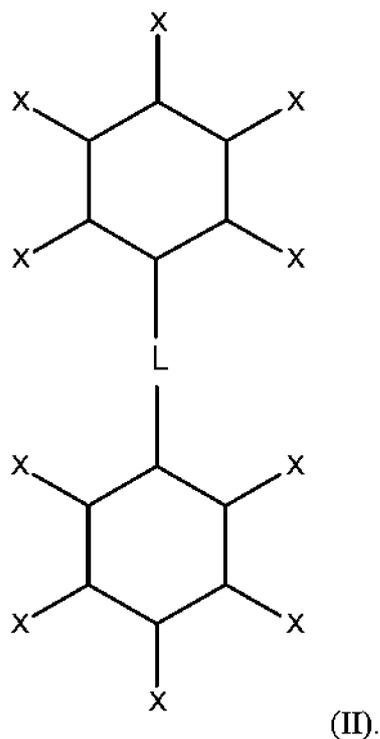
Другие варианты осуществления соединений для применения в соответствии с аспектом настоящего изобретения включают:





Соединения, имеющие более одного инозитолового каркаса

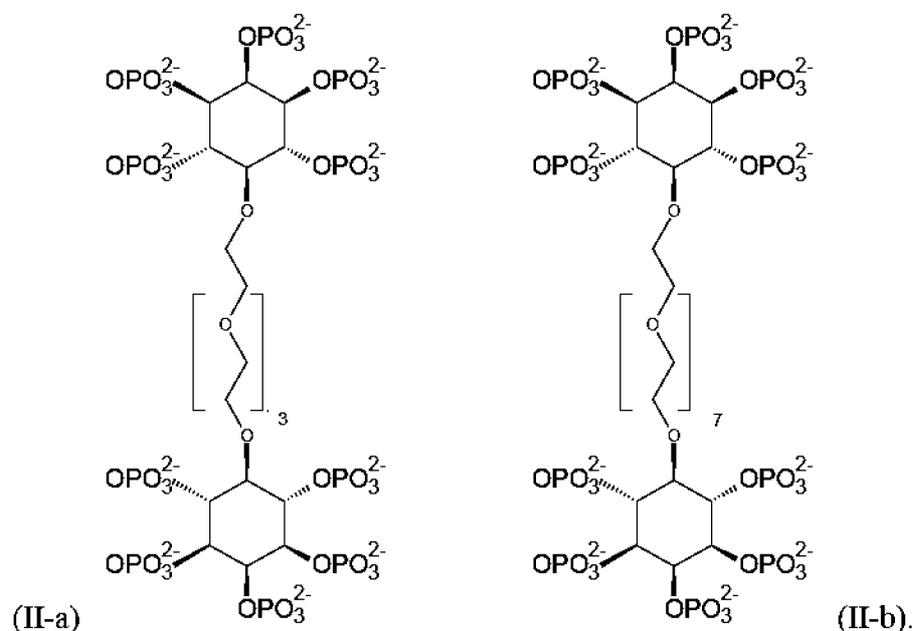
В определенных вариантах осуществления соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении или предупреждении заболеваний, изложенных выше, описана общей формулой II, где каждый X представляет собой OPO_3^{2-} , и L представляет собой $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-$, причем m имеет значение от 5 до 15, в частности от 6 до 12.



В одном конкретном варианте осуществления m равняется 7. В одном конкретном варианте осуществления m равняется 9. В одном конкретном варианте осуществления m равняется 10.

В одном конкретном варианте осуществления m равняется 8.

Некоторые конкретные варианты осуществления соединения для применения, указанного в данном документе, описаны любой из формул II-a (также упоминается как OEG₄-(IP₅)₂ в данном документе) и II-b (также упоминается как OEG₈-(IP₅)₂ в данном документе):



В некоторых конкретных вариантах осуществления биядерное соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, общей формулы II или его фармацевтически приемлемая соль для применения в соответствии с настоящим изобретением характеризуется тем, что оба инозитольных фрагмента представляют собой мио-инозитол.

Любое из соединений олигоалкилэфира инозитолполифосфата или его фармацевтически приемлемая соль предназначены для применения в лечении или предупреждении заболевания, связанного с образованием соли фосфата кальция или другого твердого осадка в организме, в частности в ткани почки.

Введение соединений, имеющих два олиго-этиленгликолевых фрагмента, присоединенных к мио-инозитол-тетраakisфосфатному каркасу (I a), имеет особое преимущество в лечении или предупреждении заболеваний, описанных в данном документе, которые связаны с образованием осадка твердого вещества фосфата кальция, и в предупреждении или лечении смешанных осадков фосфата-оксалата кальция, или осадков, которые в основном содержат оксалат, но происходят из ядер

фосфата кальция, о чем свидетельствуют данные, представленные в примере 1, и как показано на примере разрастания камней оксалата кальция в почках на бляшке Рэндалла на основе фосфата кальция.

Как показано в примерах, бипегилированные соединения, такие как (OEG2)₂-IP4, также оказывают защитное действие в контексте смешанных осадков (CaP+CaOx).

Введение соединений, имеющих два мио-инозитол-пентакисфосфатных каркаса (II), соединенных олиго-этиленгликолевым мостиком, в частности, имеющих восемь повторов $-(O-CH_2-CH_2)$, имеет особое преимущество в лечении или предупреждении заболеваний, описанных в настоящем документе, которые связаны с осаждением твердого вещества оксалата кальция.

Специалисту известно, что любое конкретно упомянутое в настоящем документе лекарственное соединение может присутствовать в виде фармацевтически приемлемой соли указанного лекарственного средства. Фармацевтически приемлемые соли включают ионизированное лекарственное средство и противоположно заряженный противоион. Неограничивающие примеры фармацевтически приемлемых катионных форм солей включают алюминий, бензатин, кальций, этилендиамин, лизин, магний, мегломин, калий, прокаин, натрий, трометамин и цинк.

Способ изготовления и способ лечения согласно настоящему изобретению

В настоящем изобретении также предусмотрено, как дополнительный аспект, применение соединения, представляющего собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемой соли, как подробно указано выше, для применения в способе изготовления лекарственного препарата для лечения или предупреждения заболевания, связанного с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция, в частности, заболевания, выбранного из фиброза почки, в частности, связанного с кальцификацией ткани почки, воспаления почки, в частности, связанного с кальцификацией ткани почки, нефрита, в частности интерстициального нефрита, гломерулонефрита, вызванного фосфатом фиброза почки, вызванного фосфатом хронического заболевания почки, хронического заболевания почки, связанного с гиперфосфатемией, прогрессирования хронического заболевания почки, фосфатной токсичности, гиперфосфатурии, гиперфосфатемии и/или гипер-FGF23-эмии.

Соединения по настоящему изобретению также можно применять в способе изготовления лекарственного препарата для лечения или предупреждения заболевания, связанного с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция, причем заболевание выбрано из кальцификации сосудов, заболевания коронарных артерий, жесткости сосудов, кальцификации клапанов, нефрокальциноза, кальциноза кожи, камней в почках и хондрокальциноза.

Аналогично, в настоящем изобретении представлены способы лечения пациента, у которого диагностировано заболевание, связанное с образованием осадка соли кальция или кристаллов соли кальция, в частности, при заболевании, выбранном из фиброза почки, в частности, связанного с кальцификацией ткани почки, воспаления почки, в частности, когда оно связано с кальцификацией ткани почки, нефрита, в частности интерстициального нефрита, гломерулонефрита, вызванного фосфатом фиброза почки, вызванного фосфатом хронического заболевания почки, хронического заболевания почки, связанного с гиперфосфатемией, прогрессирования хронического заболевания почки, фосфатной токсичности, гиперфосфатурии, гиперфосфатемии и/или гипер-FGF23-эмии. Этот способ предполагает введение пациенту эффективного количества соединения, представляющего собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемой соли, как подробно указано в данном документе.

Фармацевтические композиции и введение

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый носитель. В дополнительных вариантах осуществления композиция содержит по меньшей мере два фармацевтически приемлемых носителя, таких как описанные в данном документе.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения соединение по настоящему изобретению как правило составляют в фармацевтические лекарственные формы для обеспечения легко контролируемой дозы лекарственного средства и предоставления пациенту удобного и легко доступного продукта.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция для применения по настоящему изобретению составлена для введения путем внутривенной или подкожной инъекции.

Режим дозирования соединений по настоящему изобретению будет варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного средства и его способ и путь введения; вид, возраст, пол, состояние здоровья, медицинское состояние и вес пациента; характер и степень выраженности симптомов; вид сопутствующего лечения; частота лечения; путь введения, почечная и печеночная функция пациента и необходимый эффект. В определенных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению можно вводить в одной суточной дозе, или общую суточную дозу можно вводить в разделенных дозах два, три или четыре раза в день.

Фармацевтическая композиция для применения в соответствии с настоящим изобретением может быть подвергнута обычным фармацевтическим процедурам, таким как стерилизация, и/или может содержать обычные инертные разбавители или буферные средства, а также вспомогательные вещества, например консерванты, стабилизаторы, поверхностно-активные вещества, буферы и т. п. Они могут быть получены с помощью стандартных способов, например с помощью обычного смешивания, растворения или лиофилизации. Многие подобные процедуры и способы получения фармацевтических композиций известны в уровне техники, см. например, L. Lachman et al. *The Theory and Practice of Industrial Pharmacy*, 4th Ed, 2013 (ISBN 8123922892).

Настоящее изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами и фигурами, из которых могут быть выведены дополнительные варианты осуществления и преимущества. Эти примеры предназначены для иллюстрации настоящего изобретения, но не для ограничения его объема.

Описание фигур

На фигуре 1 показан обзор разработанной платформы для профилирования кальцификации. (A) Схема рабочего процесса. (B) Обзор выходных данных аналитической линии. Показаны примеры изображений окрашивания по способу яркого поля (колонка 1), CellMask (колонка 2), Hoechst (колонка 4) и кальцеина (колонка 6) и две увеличенные области, представляющие интерес (ROI), клеток RPTEC, обработанных 5/7 мМ Са/Р. Изображения каналов CellMask и Hoechst применяли для сегментации одиночных клеток. Локальные максимумы Hoechst (обозначены темно-

синим цветом, колонка 4) и бинарное изображение CellMask служили затравками и входным изображением, соответственно, для алгоритма построения градиента. Сравнение окончательной сегментации клеток в синем цвете с бинарным изображением CellMask в красном цвете показано в столбце 3. Окончательная сегментация и затравки Hoechst показаны в столбце 5. Бинарные изображения канала кальцеина были получены с помощью адаптивного порогового анализа. Отдельные помеченные области CaP показаны в колонке 7.

На фигуре 2 показано влияние возрастающих концентраций Ca/P на RPTEC *in vitro*. (A) Тепловая карта и иерархическая кластеризация условий обработки Ca/P и выявленных признаков изображения. (B) Изображены отдельные признаки, описывающие клеточные изменения при увеличении концентрации Ca/P. Показано общее количество клеток, количество мертвых клеток, площадь отдельных клеток и плотность отдельных клеток - мера компактности клеток. (C) Изображены отдельные признаки, описывающие изменения в осаждении CaP и характере мембраны при увеличивающихся концентрациях Ca/P. Показаны общая площадь бинарного окрашивания кальцеином, колориметрическая количественная оценка содержания кальция, выделенного из монослоя, максимальная интенсивность флуоресценции кальцеина, метрика индекса структурного сходства (SSIM) и корреляция изображения канала CellMask. (D) Представлены примеры изображений в режиме яркого поля, кальцеина, CellMask и EthD-канала и две увеличенные области, представляющие интерес (ROI), RPTEC, обработанных 2/5 mM Ca/P. Средние масштабированные значения для каждого отдельного эксперимента показаны цветными кругами, за исключением количественного определения общего кальция, использовали абсолютные значения для каждого отдельного эксперимента (N=3). Среднее значение трех отдельных экспериментов и SD показаны серой горизонтальной и вертикальной линией соответственно, проведен односторонний ANOVA с множественным сравнением Даннета между каждой концентрацией и 1/1 mM Ca/P (* p < 0,01).

На фигуре 3 представлен обзор аналогов IP6, исследованных в растворе.

На фигуре 4 показаны ингибирующие свойства (OEG₂)₂-IP4 на Ca/P индуцированных изменениях RPTEC *in vitro*. (A) Тепловая карта и иерархическая кластеризация выявленных признаков на изображении. (B) Изображены отдельные признаки, описывающие клеточные изменения при увеличении концентрации (OEG₂)₂-IP4.

Показано общее количество клеток, количество мертвых клеток, площадь отдельных клеток и плотность отдельных клеток - мера компактности клеток. (C) Изображены отдельные признаки, описывающие изменения в осаждении CaP и паттерне мембраны при увеличении концентрации $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$. Показаны общая площадь бинарного окрашивания кальцеином, колориметрическая количественная оценка содержания кальция, выделенного из монослоя, максимальная интенсивность флуоресценции кальцеина, метрика индекса структурного сходства (SSIM) и корреляция изображения канала CellMask. (D) Показаны примеры изображений в режиме яркого поля, кальцеина, CellMask и EthD-канала и две увеличенные области, представляющие интерес (ROI), RPTEC, обработанных 13 мкМ $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$. Построены средние масштабированные значения для каждого отдельного эксперимента (N=3). Полож. контр. представляет собой обработку 5/7 мМ Ca/P, отриц. контр. представляет собой среду без содержания Ca/P (= 1/1 мМ Ca/P, присутствующего в нормальной клеточной среде). Среднее значение трех отдельных экспериментов и SD показаны серой горизонтальной и вертикальной линией, соответственно, проведен односторонний ANOVA с множественным сравнением Даннета между каждой концентрацией и полож. контр. (* $p < 0,01$).

На фигуре 5 показано, что вызванные Ca/P транскриптомные изменения клеток эпителия почек предусматривают воспалительные пути, белки ECM, процессы клеточной пролиферации и гомеостаза тканей, и их предупреждают с помощью $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$ *in vitro*. A) Тепловая карта и иерархическая кластеризация относительных уровней экспрессии генов, определенных с помощью секвенирования РНК. Приоритетные 2000 дифференциально экспрессированных генов между Ca/P по сравнению с контролем со средой при $p \leq 0,01$ и $\log_2\text{fold}$ изменения $\geq 0,5$, а также соответствующие уровни экспрессии в других группах лечения (красный - относительно повышенная экспрессия, синий - относительно пониженная экспрессия). B) Анализ сверхпредставленности транскриптов генов с повышающей регуляцией в группе Ca/P по сравнению со средней группой. C) Анализ сверхпредставленности транскриптов генов с понижающей регуляцией в группе Ca/P по сравнению со средней группой. Взвешенный набор охвата терминов онтологии генов и их соответствующий балл обогащения для дифференциально экспрессированных генов в группе Ca/P по сравнению со средней группой контроля (все $\text{FDR} \leq 0,05$). D) Нормализованное количество транскриптов генов (FPKM - фрагментов на тысячу оснований модели

экзона на миллион картированных ридов), участвующих в воспалительной реакции, композиции ECM, пролиферации клеток и гомеостазе тканей в различных группах лечения (среднее значение + SD, $N = 3$).

На фигуре 6 показано, что $(OEG_2)_2$ -IP4 уменьшает вызванное высоким содержанием фосфатов повреждение почек *in vivo*. Самцов C57BL/6 помещали либо на обычный рацион, содержащий 0,35% неорганического фосфата (NP), либо на высокофосфатный рацион, содержащий 2,0% неорганического фосфата (HP). Таким мышам подкожно вводили либо $(OEG_2)_2$ -IP4 (100 мг/кг), либо среду-носитель (дистиллированную воду) три раза в неделю, а затем умерщвляли в возрасте 20 недель, чтобы собрать кровь и почки. Показаны относительные уровни mRNA (A) *Spp1*, (B) *Il36a*, (C) *Ngal*, (D) *MMP3* и (E) *Colla1* в гомогенате ткани почек (среднее значение ± SD, $N = 7$, кроме группы носителя HP $N = 6$, двухсторонний ANOVA с множественным сравнением Сидака между $(OEG_2)_2$ -IP4 и контролем с носителем в рамках соответствующей группы рациона, ns - не существенно, * $p < 0,05$). (F) Объемная доля коллагена после окрашивания почек пикро-сириусом красным (среднее значение ± SD, $N = 6$, t-тест между $(OEG_2)_2$ -IP4 и носителем, ** $p < 0,01$).

На фигуре 7 показано подавление осаждения CaP с помощью OEG_2 -IP5, OEG_{11} -IP5, $(OEG_2)_2$ -IP4, $(OEG_{11})_2$ -IP4 и OEG_8 -(IP5)₂. Влияние (A) OEG_2 -IP5, (B) OEG_{11} -IP5, (C) $(OEG_2)_2$ -IP4, (D) $(OEG_{11})_2$ -IP4 и (E) OEG_8 -(IP5)₂ на осаждение CaP в RTF с добавлением 9 mM динатрийфосфата и 8 mM хлорида кальция оценивали с помощью световой микроскопии и автоматизированного анализа изображений при $t = 4$ ч. Количественная оценка общей площади, покрытой осадками CaP к общей площади поля зрения ($N = 3$, среднее значение + SD, нормализовано к контролю).

На фигуре 8 показано подавление агрегации CaP с помощью OEG_2 -IP5, OEG_{11} -IP5, $(OEG_2)_2$ -IP4, $(OEG_{11})_2$ -IP4 и OEG_8 -(IP5)₂. Влияние (A) OEG_2 -IP5, (B) OEG_{11} -IP5, (C) $(OEG_2)_2$ -IP4, (D) $(OEG_{11})_2$ -IP4 и (E) OEG_8 -(IP5)₂ на осаждение CaP в RTF с добавлением 9 mM динатрийфосфата и 8 mM хлорида кальция оценивали с помощью световой микроскопии и автоматизированного анализа изображений при $t = 4$ ч. Количественная оценка среднего размера агрегатов с учетом поля зрения, нормализованного к контр. ($N = 3$, среднее значение + SD, нормализовано к контролю).

На фигуре 9 показано *in vitro* снижение адгезии CaP и предупреждение повреждения клеток аналогами IP6. Монослой RPTEC/TERT 1 при конfluence обрабатывали средой с добавлением 7 mM динатрийфосфата, 5 mM хлорида кальция и соединения и инкубировали в течение 24 ч. Количество отложений CaP и степень повреждения клеток определяли с помощью окрашивания кальцеином и EthD, соответственно. Количественную оценку изображений флуоресценции проводили с помощью программы Matlab. Количественная оценка площади, покрытой отложениями CaP на монослоях RPTEC с обработкой с помощью OEG₂-IP₅, (B) OEG₁₁-IP₅, (C) (OEG₂)₂-IP₄ и (D) OEG₈-(IP₅)₂. (N=3, среднее значение + SD, односторонний ANOVA с множественным сравнением Даннетта, * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001).

На фигуре 10 показаны примеры изображений RPTEC, обработанных 5/7 mM Ca/P и увеличивающимися концентрациями (OEG₂)₂-IP₄. Показаны изображения канала яркого поля, кальцеина, CellMask™ и EthD и две увеличенные области, представляющие интерес (ROI) (колонка 1-4). Сегментация клеток показана с наложением на изображение канала Hoechst (синий) (колонка 4). Полож. контр. представляет собой обработку 5/7 mM Ca/P, отриц. контр. представляет собой среду без содержания Ca/P (= 1/1 mM Ca/P, присутствующего в нормальной клеточной среде).

В таб. 1 показан обзор эффективности исследованных соединений для подавления осаждения CaP в RTF. Обзорная таблица, показывающая минимальную концентрацию соединения (фиг. 3 для химических структур), необходимую для достижения полного подавления осаждения CaP (общая площадь, покрытая кристаллами < 10% от общей площади контроля); и минимальную концентрацию, необходимую для предупреждения агрегации кристаллов CaP в скрининговом анализе CaP (размер агрегата CaP < 50% от размера агрегата контроля) (N=3).

В таб. 2 показаны уровни фосфата и кальция в сыворотке крови и моче, измеренные в различных группах мышей (среднее ± SD).

Примеры

Материалы и способы

Материалы

Аналоги IP6 синтезированы на заказ компанией Chimete Srl (Торгона, Италия). Масс- и ¹H-ЯМР-спектры были взяты поставщиком для подтверждения структуры, и соединения применяли в том виде, в котором они были предоставлены. Додеканатриевую соль фитиновой кислоты приобретали у компании Biosynth AG (Тал, Швейцария). IP5 и гексакалиевую соль IS6 приобретали у компании Santa Cruz Biotechnology (Даллас, штат Техас, США). IC6 приобретали у компании Fluorochem (Хадфилд, Великобритания). Набор для колориметрического анализа кальция (МАК022), бис-трис, оксалат натрия (NaOx), EthD, Hoechst 33342, гексагидрат хлорида магния, двухосновный фосфат натрия и кальцеин приобретали у Sigma-Aldrich (Сент-Луис, штат Миссури, США). Хлорид натрия, сульфат натрия безводный и дигидрат хлорида кальция (CaCl₂) приобретали у компании Merck (Кенилворт, штат Нью-Джерси, США). Моногидрат оксалата кальция (CaOx) приобретали у компании abcr (Карлсруэ, Германия). 8-луночные предметные стекла (80 827) приобретали у компании ibidi (Мартинсрид, Германия). CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain, стандартные планшеты для клеточных культур и реагенты приобретали у Thermo Fisher Scientific (Рочестер, штат Нью-Йорк, США) и TPP (Трасадинген, Швейцария). Клетки RPTEC/TERT1, базальная среда ProxUp и добавки приобретали у компании Evercyte (Вена, Австрия). Набор RNeasy приобретали у компании Qiagen (Хильден, Германия), а набор TrueSeq RNA приобретали у компании Illumina (Сан-Диего, штат Калифорния, США). RNAiso Plus получали от компании TaKaRa (Кусацу, Япония). Мастер-микс ReverTra Ace qPCR RT с соединением, способствующим удалению gDNA, и мастер-микс SYBR Green PCR приобретали у компании Toyobo (Осака, Япония).

Скрининг в растворе

Искусственная жидкость почечных канальцев (RTF) с конечной композицией 0,05 мМ оксалата, 0,005 мМ сульфата, 408 мМ натрия, 424 мМ хлорида, 0,26 мМ калия, 4 мМ магния и 0,2 мМ цитрата в двойной дистиллированной воде получали согласно литературным данным (Fasano, J. M. et al., *Kidney Int.* 59, 169-178. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.00477.x, 2001). Раствор фильтровали с помощью шприцевого фильтра 0,45

мкМ. Двадцать мМ бис-трис буфера добавляли в протокол для обеспечения стабильности рН на протяжении всех экспериментов, и рН был установлен на 7,2. Искусственную RTF хранили при комнатной температуре до четырех месяцев. Исходные растворы 0,25 М фосфата и 1 М кальция получали в дважды дистиллированной воде и хранили отдельно при -20°C.

Разведения фосфата двадцати-кратной конечной концентрации, кальция 20-кратной конечной концентрации и соединения 10-кратной конечной концентрации получали в RTF. Смесь для анализа, состоящая из 80% RTF, 10% разведения соединения, 5% разведения фосфата и 5% разведения кальция, получали в пробирках Эпндорф приведенным ниже образом. RTF (320 мкл) смешивали с 20 мкл разведения фосфата (конечная концентрация 9 мМ), 40 мкл разведения соединения и 20 мкл разведения кальция (конечная концентрация 8 мМ). Смесь для анализа вихревым способом перемешивали после добавления каждого компонента, и 380 мкл смеси немедленно добавляли в 8-луночные лунки со стеклянным дном и инкубировали в течение 4 ч. при комнатной температуре. Осаждение CaP оценивали с помощью микроскопа Leica DM 6000B (Leica Microsystems, Ветцлар, Германия) в режиме яркого поля. Для количественной оценки 3 лунки/условие с 3-4 изображениями на лунку получали с помощью объектива 40x. Определяли общую площадь, покрытую отложениями CaP в процентах от поля зрения и средний размер агрегатов CaP.

Культура клеток

Клетки проксимальных канальцев человека RPTEC/TERT 1 (RPTEC) культивировали в колбах для культуры ткани T75 с применением базальной среды ProxUp, смешанной с добавками ProxUp, при 37°C и 5% CO₂ в соответствии с рекомендациями производителя. Клетки применяли до пассажа 30 и регулярно проверяли в отношении наличия инфекции Mycoplasma. Для экспериментов RPTEC культивировали в 24-луночных планшетах при плотности посева 150000 клеток/см². Оценку жизнеспособности клеток и подсчет клеток перед посевом проводили с помощью автоматического счетчика клеток (BioRad TC 20, Геркулес, штат Калифорния, США).

Анализ изображений

Через $t = 48$ ч. после посева, RPTEC обрабатывали базальной средой ProxUp с добавлением, во-первых, различных концентраций фосфата (конечная концентрация от

1 до 7 мМ) и, во-вторых, кальция (конечная концентрация от 1 до 7 мМ), который непосредственно добавляли в каждую лунку.

Для сравнения выбранных аналогов IP6, базальную среду ProxUp получали с выбранным ингибитором и добавляли в каждую лунку. Затем осаждение CaP индуцировали прямым добавлением, во-первых, фосфата и, во-вторых, кальция. Были использованы конечные концентрации 7 мМ фосфата и 5 мМ кальция. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C и 5% CO₂. Среду с примесями удаляли, а клетки дважды промывали с помощью PBS перед окрашиванием.

Для оценки вызванной CaP кристаллизации CaOx после 24 ч инкубации удаляли среду с Ca/P, а клетки дважды промывали с помощью PBS. Затем в каждую лунку добавляли среду, содержащую 1,2 мМ оксалата и соединение. После 4 ч инкубации при 37°C и 5% CO₂ обработку удаляли, а клетки перед окрашиванием однократно промывали с помощью PBS.

Для окрашивания базальную среду ProxUp смешивали с кальцеином (конечная концентрация 500 нМ), EthD (конечная концентрация 6 мкМ), красителем CellMask (5 мкг/мкл) и Hoechst 33342. Окрашивающую смесь добавляли в RPTEC, и клетки инкубировали в течение 30 мин в темноте при 37°C и 5% CO₂. Окрашивающий раствор удаляли, клетки промывали с помощью PBS один раз и добавляли базальную среду ProxUp. После окрашивания клетки сразу же подвергали визуализации. Изображения получали с помощью эпифлуоресцентной микроскопии при 37°C, с применением микроскопа Leica CTR6000. Для количественной оценки готовили 3 лунки/условие и делали 3 снимка на лунку. Для предварительных экспериментов по адгезии изображения делали с помощью 10-кратного объектива, для анализа визуализации изображения делали с помощью 20-кратного объектива.

Колориметрическое количественное определение кальция

Для колориметрического количественного определения содержания кальция в монослоях клеток после обработки Ca/P применяли ранее описанный протокол. Вкратце, после 24 ч инкубации Ca/P монослои клеток окрашивали и подвергали визуализации, как описано выше. Затем клетки промывали 1 раз с помощью PBS перед ночной инкубацией с 250 мкл 0,1 М HCl при 4°C для декальцификации монослоев клеток. Раствор HCl собирали, центрифугировали при 10000 x g, 4°C в течение 4 мин и

определяли содержание кальция с помощью набора Calcium Colorimetric Assay (МАК022).

Анализ изображений клеток

Многоканальные изображения сохраняли как изображения отдельных каналов в 8-битном формате tiff. Для анализа изображения канала Hoechst были пороговыми с применением треугольного порога. Соприкасающиеся ядра бинарного изображения далее сегментировали с помощью алгоритма построения градиента с использованием преобразования расстояния бинарного изображения в качестве входных данных и локальных максимумов в качестве затравок.

На изображениях канала EthD наблюдали высокий уровень фонового шума, возможно, в результате просачивания флуоресценции красителя CellMask. Таким образом, было установлено, что применение в качестве порога 99-процентного значения всех значений интенсивности для каждого изображения приводит к хорошему обнаружению пикселей переднего плана. Фиксированный минимальный порог был установлен на уровне 60. Для сегментации соприкасающихся объектов была проведена сегментация с использованием градиента, аналогичная каналу Hoechst. Для изображений канала кальцеина адаптивное пороговое усиление по треугольнику позволило добиться хорошего обнаружения отложений CaP, что было подтверждено визуальным сравнением с изображениями канала в ярком поле. Для составных экспериментов дополнительный верхний порог устанавливали на минимальный порог изображений полож. контр. для соответствующего эксперимента. Таким образом, удалось избежать чрезмерной нечувствительности порога на изображениях с большим количеством отложений CaP. Сумму пикселей переднего плана бинарного изображения использовали для расчета общей площади отложений CaP. Для маркировки соприкасающихся областей переднего плана использовали алгоритм skimage label.

Для сегментации изображений на отдельные клетки изображение канала CellMask сначала бинаризовали с помощью адаптивного порогового усиления, используя размер 35 блока, после чего проводили медианную фильтрацию. Для уменьшения контуров выполняли бинарную эрозию. Для сегментации всего изображения на отдельные клетки использовали версию алгоритма для построения градиента. Для этого в качестве входного изображения использовали преобразование расстояния бинарного

изображения эрозии, а затравки устанавливали на локальные максимумы изображения канала Hoeschst. Хотя этот протокол позволил приблизительно оценить морфологию отдельных клеток, для получения более точных результатов необходимо дальнейшее совершенствование как аналитической, так и экспериментальной процедуры окрашивания.

Кроме того, выполняли извлечение текстурных признаков на изображении каналов кальцеина и CellMask. Матрицы соответствия серого уровня рассчитывали с использованием смещения в 5 пикселей и угла в 90° . В данном случае применение больших смещений может улучшить обнаружение изменений в крупномасштабных признаках, например в местах кластеризации CaP. Текстуальные свойства извлеченных матриц предусматривали контраст, разнородность, энергию, ASM, однородность и корреляцию. Перекрытие между изображениями каналов кальцеина и CellMask измеряли путем вычисления матрицы индекса структурного сходства (SSIM).

Извлеченные признаки включали как признаки отдельных клеток или отдельных кальцеиновых пятен, так и признаки всего изображения. Признаки целостного изображения предусматривали общее количество клеток на основе изображения Hoeschst, общее количество мертвых клеток на основе изображения канала ethd, SSIM, текстурные признаки изображений канала кальцеина и CellMask, а также максимум, минимум, среднее значение и стандартное отклонение, общую площадь и количество кластеров интенсивности кальцеина. Признаки одиночных клеток, одиночных ядер и одиночных кальцеиновых пятен предусматривали форму и, только для кальцеина и клеток, свойства интенсивности, и их обобщали до медианных значений для каждого изображения. Свойства предусматривали медианную площадь, протяженность, эксцентриситет, периметр, плотность, длину главной и малой оси, а также максимальную, минимальную и среднюю интенсивность на клетку или CaP-патч. Признаки масштабировали в диапазоне от 0 до 1 с помощью MinMaxScaler из пакета предварительной обработки sklearn. Среднее значение каждого признака на изображении по 9 изображениям (3 лунки * 3 изображения/лунка для каждого условия) для каждого условия рассчитывали для каждого эксперимента, и использовали три независимых эксперимента для окончательного анализа. Анализ проводили в Python 3 с использованием пакетов numpy, pandas, skimage, sklearn и seaborn.

Секвенирование РНК

Клетки культивировали, как описано в анализе визуализации, и обрабатывали контрольной средой (базальная среда ProxUp, содержащая 1/1 мМ Са/Р), 5/7 мМ Са/Р, 5/7 мМ Са/Р в среде, содержащей 50 мкМ (OEG₂)₂-IP₄ или 50 мкМ (OEG₂)₂-IP₄ в среде в течение 24 ч. Общую РНК выделяли с помощью набора RNeasy (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Для каждой группы образцов подготавливали 3 лунки, из которых выделяли общую РНК. mRNA очищали и готовили библиотеку РНКсеквенирования с помощью набора TrueSeq RNA (Illumina). Секвенирование проводили на приборе Novaseq 6000 (Illumina). Считывания выравнивали по эталонному геному человека GRCh38.p10 с помощью инструмента STAR (<https://github.com/alexdobin/STAR>) и количественно оценивали транскрипты с помощью программы Kallisto (42). Для определения модели генов использовали Ensembl release 91. Для тепловой карты и иерархической кластеризации значительно отличающихся генов ($p \leq 0,01$, ратное \log_2 изменение $\geq 0,5$) рассчитывали кратные \log_2 изменения по сравнению со средним значением всех образцов, и кратные \log_2 изменения > 4 были установлены на 4. Тепловая карта была построена с помощью программного обеспечения R. Анализ сверхпредставленности проводили на Webgestalt.org (вер. 2019) (43), используя дифференциально экспрессированные гены с $p \leq 0,01$, кратное \log_2 изменение $\geq 0,5$. Дифференциально экспрессированные гены сравнивали с онтологией генов - функциональной базой данных биологических процессов, а в качестве эталонного набора использовали геном человека - кодирование белков. Было построено взвешенное покрытие множества из 30 лучших обогащенных категорий. Для сравнения уровней экспрессии выбранных генов использовали фрагменты на килобазу модели экзона на миллион картированных ридов (FPKM). Было выполнено три независимых эксперимента. Исходные данные секвенирования РНК доступны в базе данных нуклеотидных последовательностей EMBL (ENA) под номером доступа PRJEB38397.

Исследования на животных

Самцов мышей C57BL/6 (возраст 12 недель) помещали либо на обычный рацион, содержащий 0,35% неорганического фосфата, либо на высокофосфатный рацион, содержащий 2,0% неорганического фосфата. Таким мышам подкожно вводили либо (OEG₂)₂-IP₄ (100 мг/кг), либо среду-носитель (дистиллированную воду) три раза в

неделю, а затем умерщвляли в возрасте 20 недель, чтобы собрать кровь и почки. Некоторых мышей индивидуально переводили в метаболические клетки для сбора мочи в течение 3 дней до умерщвления. Уровень FGF23 в сыворотке крови измеряли с помощью интактного FGF23 ELISA (Kinos) в соответствии с протоколами производителей. Уровень фосфатов в сыворотке и моче измеряли с помощью слайдов Fuji Dri-Chem и анализатора (Dri-Chem NX500V, Fuji, Токио, Япония). Замороженные почки мыши гомогенизировали с помощью RNAiso Plus (Takara, Осака, Япония). Лизаты экстрагировали хлороформом. РНК в водной фазе осаждали изопропанолом, промывали 75% этанолом и растворяли в воде, свободной от РНКазы. Обратную транскрипцию РНК (0,4 мкг) проводили с применением ReverTra Ace qPCR RT Master Mix с gDNA Remover (Toyoba, FSQ-301, Осака, Япония) в соответствии с протоколом производителя. Количественные реакции RT-PCR проводили с применением 20 нг cDNA, инкубированных с 410 нМ каждого праймера и 6 мкл мастер-смеси SYBR Green PCR (Toyoba, Осака, Япония THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix QPS-201) в общем объеме 12 мкл. Реакцию ПЦР (95°C в течение 1 минуты с последующими 45 циклами 95°C в течение 10 с, 60°C в течение 40 с) проводили на системе Roche LC480 (Базель, Швейцария). Относительные уровни mRNA рассчитывали способом сравнительного порогового цикла с использованием циклофилина в качестве внутреннего контроля. Последовательности праймеров можно найти в таблице 6. Почки, не использованные для выделения РНК, фиксировали в 10% формалине, обрабатывали для получения стандартных парафиновых срезов и окрашивали пикро-сириусом красным для выявления коллагена в виде красных волокон. Объемную долю коллагена (отношение площади, позитивной в отношении сириуса красного, к общей площади) определяли количественно с помощью программы анализа изображений (IMAGE PRO 9.32, Medica Cybernetics, Роквилль, штат Мэриленд, США), как описано ранее (Hirano, Y. Kurosui et al., *FEBS Open Bio.* 10, 894-903. DOI:10.1002/2211-5463.1284, 2020). Кору головного мозга и кортико-медулярное соединение оценивали отдельно. Все эксперименты на животных были одобрены институциональным комитетом по уходу и использованию животных Медицинского университета Джичи.

Анализ данных

Все изображения анализировали и строили графики с помощью Python 3, за исключением экспериментов по предварительному скринингу в растворе, а

предварительные данные по адгезии клеток анализировали с помощью Matlab и строили графики с помощью GraphPad Prism (GraphPad, Ла-Хойя, штат Калифорния, США). Данные секвенирования РНК анализировали, как описано в вышеуказанном разделе, и составляли графики с применением программного обеспечения R и GraphPad Prism. Данные по животным анализировали в программе GraphPad Prism.

Результаты

Пример 1. Профилирование процессов кальцификации на основе изображений

Для быстрого профилирования молекул в отношении их влияния на различные процессы кальцификации почек авторы настоящего изобретения разработали клеточный анализ, позволяющий отслеживать отложение CaP, а также связанные с ним клеточные изменения. Поэтому авторы настоящего изобретения применяли монослои клеток проксимальных канальцев почек (RPTEC), окрашенных различными красителями, для количественной оценки кальцификации и изменений морфологии клеток (фиг. 1). Клетки, выращенные в монослое, подвергали воздействию различных ионных условий, существующих в почечных канальцах, например повышенного содержания кальция и/или фосфата, чтобы вызвать кристаллизацию CaP и прикрепление клеток (фиг. 1A). Отложения CaP обнаруживали с помощью окрашивания кальцеином (фиг. 1B). Кальцеин был ранее предложен в качестве техники окрашивания кальцием фиксированных или нефиксированных образцов клеток. Флуоресцентный краситель связывается с кальцием, и его визуализируют с помощью флуоресцентной микроскопии. Далее авторы настоящего изобретения исследовали индукцию вызванной CaP кристаллизации CaOx, которая характерна для идиопатического образования камней в почках. Было замечено, что, сначала вызывая осаждение CaP, а затем добавляя оксалат высокой концентрации, можно обнаружить кристаллизацию CaOx на отложениях CaP. Кристаллы CaOx демонстрировали сильный контраст и типичную двойную структуру.

Клеточные изменения визуализировали путем окрашивания мембраны красителем CellMask. Hoechst применяли как ядерный краситель для облегчения сегментации отдельных клеток, а этидий-гомодимер 1 (EthD) облегчал окрашивание клеток с поврежденной плазматической мембраной (фиг. 1B). Далее извлекали текстурные признаки как CellMask, так и кальцеинового канала, которые указывали на характер

осаждения СаР (т. е. крупные и высокоинтенсивные кластеры СаР против более диффузных и равномерно распределенных СаР по клеточному монослою) (фиг. 1В).

Пример 2. Вызванные СаР изменения на клетках эпителия почек

Сначала авторы настоящего изобретения исследовали влияние увеличения концентрации кальция и фосфата на осаждение СаР в клетках и последующие клеточные изменения. Извлекаемые признаки включали форму отдельных клеток и параметры интенсивности флуоресценции, текстурные признаки изображений CellMask и кальцеина, а также признаки формы и интенсивности отложений СаР. Иерархическая кластеризация экспериментальных условий и характеристик показала четкую тенденцию зависимости от дозы (фиг. 2А). Низкие концентрации кальция и фосфата, как, например, в клеточной среде без добавок (1/1 мМ Са/Р) и с низким содержанием добавок (2/2 мМ Са/Р), не вызывали клеточных изменений, в то время как более высокие уровни приводили к прерывистым (2/5 мМ) и резким изменениям (5/7 и 7/7 мМ) (фиг. 2В). Клеточные изменения, связанные с уровнем Са/Р, становились более очевидными при рассмотрении отдельных параметров. Увеличение Са/Р привело к потере плотности расположения клеток, характерной для эпителия почек, что связано с увеличением площади отдельных клеток и уменьшением плотности отдельных клеток, что является мерой компактности. Таким образом, эти данные свидетельствовали об утрате эпителиальными клетками типичной круглой формы в сторону более неправильной формы (фиг. 2В). Эти эффекты сопровождалось уменьшением общего количества клеток/поля зрения. Кроме того, при увеличении уровня Са/Р было обнаружено увеличение количества клеток с поврежденной плазматической мембраной (фиг. 2В). Эти результаты согласуются с литературными данными, которые свидетельствуют о потере эпителиального фенотипа и повреждении клеток при стимуляции СаР или СаОх.

Уровни отложения СаР измеряли, во-первых, путем адаптивного порогового анализа изображения кальцеина, а во-вторых, количественной оценкой общей площади, покрытой в поле зрения. Используя этот подход, авторы настоящего изобретения обнаружили увеличение покрытия клеточного монослоя СаР при более высоких концентрациях Са/Р (фиг. 2С). Эти результаты были качественно подтверждены сравнением с изображениями в ярком поле, на которых СаР виден как объект с гранулированной текстурой, или, в случае больших отложений, как темные пятна

(фиг. 2D). Количественное определение осаждения CaP с помощью кальцеина было подтверждено с помощью колориметрического количественного определения кальция, который извлекали из клеточного монослоя путем обработки кислотой (фиг. 2C) (Schantl, A. E. et al., *Nat. Commun.* 11, 721. DOI: 10.1038/s41467-019-14091-4, 2020). Интересно, что хотя обработка 2/5 мМ Ca/P не привела к значительному увеличению площади отложений CaP, отложения имели высокую интенсивность кальцеина (фиг. 2C, D). Таким образом, авторы настоящего изобретения предположили, что вместо равномерного распределения по монослою, при более низких концентрациях CaP имеет тенденцию накапливаться в местах с повышенной аффинностью CaP, таких как дедифференцирующиеся или поврежденные клетки с повышенной поверхностной экспрессией гликопротеинов со свойствами связывания кальция. Эти результаты были подтверждены высокой метрикой индекса структурного сходства (SSIM) изображения кальцеина и канала CellMask, указывающей на перекрытие областей отложения CaP с окрашиванием мембраны, при стимуляции со средним и высоким уровнем Ca/P (фиг. 2C). В перекрывающихся областях наблюдали высокую интенсивность окрашивания мембраны, что могло указывать на скопления клеточных остатков поврежденных и отделившихся клеток. Кроме того, характеристика корреляционной текстуры изображения канала CellMask, отражающая согласованность изображения, показала рост между 1/1 и 2/5 мМ Ca/P пиков, прежде чем снова произошел спад при $\geq 5/7$ мМ Ca/P (фиг. 2C). Наибольшее значение, наблюдаемое для промежуточной концентрации Ca/P, может быть связано с потерей структуры клеток, когда Ca/P присутствует, но не образуются крупные кластеры CaP. При высоких концентрациях участки CaP снова вызвали снижение корреляционного признака из-за того, что кластеры CaP-мембран давали высокую интенсивность окрашивания. Для дальнейшего тестирования ингибиторов применяли концентрации 5/7 мМ Ca/P, которые находятся в пределах физиологического диапазона в петле Генле, предполагаемом основном месте кристаллизации CaP.

Пример 3. Предварительный отбор аналогов IP6 в качестве ингибиторов почечного CaP в растворе

На первой стадии влияние выбранных аналогов IP6 (фиг. 3) на осаждение и рост CaP оценивали *in vitro* с применением искусственной жидкости почечных канальцев (RTF) (таблица 1). В предыдущем исследовании авторы настоящего изобретения изучали

образование частиц белка СаР в сыворотке крови. Однако важное отличие от сердечно-сосудистой кальцификации заключается в чрезвычайно низком содержании белка в жидкости почечных канальцев по сравнению с высоким содержанием белков в крови, которые могут стабилизировать аморфные частицы. Для оценки эффективности были выбраны две точки отсечения. Во-первых, полное подавление определяли как уменьшение количества обнаруженных осадков СаР на >90% по сравнению с контрольным образцом без соединения. Во-вторых, подавление агрегации СаР определяли как уменьшение среднего размера агрегатов на >50% по сравнению с контролем.

Интересно, что IP6, и в меньшей степени *мио*-инозитола пентакисфосфат (IP5), способствовали осаждению СаР при 10 и 30 мкМ, соответственно. Осаждение СаР, вероятно, ускорялось за счет образования IP6-кальциевых агрегатов, что авторы настоящего изобретения подтвердили с помощью среды без фосфата. Замена фосфатных групп на олигоэтиленгликолевые (OEG) цепи, как в случае OEG₂-IP5, привела к подавлению осаждения и агрегации СаР при 30 и 1 мкМ, соответственно (таблица 1, фиг. 8А и 9А). Сравнение OEG₂-IP5 и OEG₁₁-IP5 показало, что увеличение длины цепи OEG с 2 до 11 повторяющихся звеньев улучшило ингибирующие свойства молекулы, снизив ее концентрацию подавления агрегации с 1 мкМ до 300 нМ (таблица 1, фиг. 8В и 9В). Однако дальнейшее замещение фосфата на OEG ((OEG₂)₂-IP4 против OEG₂-IP5) не привело к дальнейшему увеличению ингибирующей активности (таблица 1, фиг. 8С и 9С). Замена фосфатных групп на менее заряженные сульфатные и карбоксильные группы, например *мио*-инозитола гексасульфат (IS6) и циклогексангексакарбоновая кислота (IC6), привела к потере стимулирующего эффекта. Эти соединения проявляли лишь слабое ингибирующее действие в отношении кристаллизации СаР (таблица 1).

Двухвалентные молекулы IP5, которые в предыдущем исследовании были идентифицированы как мощные ингибиторы кристаллизации СаОх в почках, выявили еще одну интересную тенденцию. Влияние на кристаллизацию зависело от длины линкера между молекулами IP5. OEG₄-(IP5)₂, имеющий 4 звена EG в линкере, способствовал осаждению СаР, в то время как OEG₈-(IP5)₂, имеющий 8 повторяющихся звеньев EG, оказывал ингибирующее действие. Полное подавление наблюдали при 30 мкМ, а 50% подавление агрегации было получено при 1 мкМ (таблица 1, фиг. 8Е, 9Е).

Вместе эти результаты свидетельствуют о том, что подавление CaP аналогами IP6 в среде, полностью лишенной белка, сильно зависит от заряда и стабилизирующих свойств молекул.

Пример 4. OEG₂)₂-IP₄ предупреждает отложение CaP и изменения клеток in vitro

На следующей стадии авторы настоящего изобретения сравнивали OEG₂-IP₅, OEG₁₁-IP₅, (OEG₂)₂-IP₄ и OEG₈-(IP₅)₂ в отношении их эффективности для предупреждения адгезии CaP (фиг. 9). Перед добавлением фосфата и кальция в среду для клеток добавляли соединение. В данном случае эффективность всех соединений находилась в одинаковом диапазоне, достигая полного подавления адгезии CaP при 50 мкМ. Интересно, что (OEG₂)₂-IP₄ показал наилучшие результаты, резко снизив степень адгезии CaP до 12,5 мкМ, что вместе с его заявленным благоприятным фармакокинетическим профилем (Schantl, A. E. et al., *Nat. Commun.* 11, 721. DOI: 10.1038/s41467-019-14091-4, 2020) побудило авторов настоящего изобретения дополнительно охарактеризовать это соединение.

Обработка клеток 6-50 мкМ (OEG₂)₂-IP₄ привела к зависимому от дозы изменению профиля признаков изображения от положительного контроля (контр.) (+5/7 мМ Ca/P) к отрицательному контр. (+1/1 мМ Ca/P) (фиг. 4A). (OEG₂)₂-IP₄ зависимым от дозы образом снижал количество мертвых клеток и площадь одиночных клеток по сравнению с положительным контр., а также увеличивал плотность одиночных клеток и общее количество клеток/поле зрения (фиг. 4B). Таким образом, эти данные свидетельствуют об изменении в сторону фенотипа отрицательного контр. при применении (OEG₂)₂-IP₄.

Добавление в среду для клеток 6 и 13 мкМ (OEG₂)₂-IP₄ приводило к уменьшению общей площади CaP по сравнению с положительным контр. Однако он по-прежнему демонстрировал высокую интенсивность окрашивания кальцеином (фиг. 4C). Эти результаты показывают, что при положительном контр. CaP равномерно распределяется по монослою, тогда как при частичном подавлении CaP образуются крупные локализованные кластеры с высоким содержанием кальция (фиг. 4C, D, фиг. 10). Авторы настоящего изобретения предполагают, что, как и в случае с промежуточными концентрациями Ca/P в эксперименте в диапазоне концентраций, это отражает общее подавление адгезии CaP, за исключением областей с высокой

аффинностью клеток к СаР. На этих участках наблюдается высокое накопление СаР. Как и в экспериментах по повышению концентрации Са/Р, эти эффекты могут быть дополнительно подтверждены с помощью SSIM изображений канала кальцеина и CellMask. Высокий SSIM указывал на то, что области с высокой интенсивностью окрашивания мембран перекрываются с областями с высоким содержанием кальция (фиг. 4С). Кроме того, авторы настоящего изобретения наблюдали перекрытие таких областей с поврежденными клетками, о чем свидетельствовало окрашивание EthD (фиг. 4В). Следовательно, в таких местах могут быть локализованные участки клеточного повреждения и регенерирующий/пролиферирующий эпителий с поверхностной экспрессией белков, связывающих кристаллы, что и вызывает высокое накопление СаР. Увеличение концентрации $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$ с 6 до 13 мкМ сначала увеличило метрику корреляции окрашивания CellMask до уровней выше положительного контр., что потенциально может быть приписано потере контуров клеток с отсутствием или ограниченным присутствием кластеров СаР-мембран, до снижения до уровней отрицательного контр., где клетки демонстрируют круглые клеточные контуры.

Затем авторы настоящего изобретения исследовали влияние соединения на вызванную СаР кристаллизацию СаОх. Несмотря на то, что соединение показало ограниченную эффективность в отношении кристаллизации СаОх в растворе в предыдущем исследовании (Kletzmayr, A. et al., *Adv. Sci.* 7, 1903337. DOI: 10.1002/advs.201903337, 2020), в вызванной СаР модели, авторы настоящего изобретения наблюдали зависимое от дозы изменение. А именно, $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$ может сначала обратить кристаллизацию СаОх из моногидрата оксалата кальция (COM), преобладающей наиболее стабильной формы, в дигидрат оксалата кальция (COD), в соответствии с предыдущим сообщением авторов настоящего изобретения о поэтапном подавлении СаОх (Kletzmayr, A. et al., *Adv. Sci.* 7, 1903337. DOI: 10.1002/advs.201903337, 2020). Во-вторых, при дальнейшем увеличении концентрации до 100 мкМ COD почти полностью устраняли. Следовательно, $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$ уменьшал вызванную СаР кристаллизацию СаОх, что может быть вызвано покрытием и экранированием отложений СаР соединением.

В целом, $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP}_4$ может предупреждать как адгезию СаР к монослою клеток, так и ассоциированные с ней клеточные изменения. Соединение сначала ограничивает адгезию СаР и повреждение клеток локализованными участками адгезии, где

формируются кластеры CaP-мембран, а затем полностью предупреждает осаждение CaP и повреждение клеток при более высоких концентрациях.

Пример 5. Вызванные Ca/P транскриптомные изменения отражают процессы кальцификации сосудов in vitro, и их предупреждают посредством (OEG₂)₂-IP4

Для дальнейшего понимания клеточного ответа на CaP и интерпретации связанных с ним изменений клеточной морфологии, наблюдаемых при визуализации, авторы настоящего изобретения провели эксперимент по секвенированию РНК. Клетки культивировали, как в анализе визуализации, и обрабатывали средой с добавлением Ca/P (положительный контр.), средой с добавлением Ca/P, предварительно смешанной с 50 мкМ (OEG₂)₂-IP4, только средой (отрицательный контр.) или только (OEG₂)₂-IP4. Иерархическая кластеризация дифференциально экспрессированных генов между положительным и отрицательным контр. показала резкое изменение профиля экспрессии генов при обработке Ca/P, которое предупреждали посредством добавления (OEG₂)₂-IP4 (фиг. 5A). В образцах с положительным контр. по сравнению с отрицательным контр. было обнаружено 2818 дифференциально экспрессированных генов с кратностью изменения $\geq 1,5$ и $p \leq 0,05$, аналогично образцам Ca/P + (OEG₂)₂-IP4 и (OEG₂)₂-IP4 по сравнению с образцами с положительным контр. (2437 и 2935 дифференциально экспрессированных генов, соответственно). Напротив, крайне ограниченное число дифференциально экспрессированных генов было обнаружено между Ca/P + (OEG₂)₂-IP4 по сравнению с отрицательным контр. и по сравнению с только (OEG₂)₂-IP4 (76 и 77, соответственно). Таким образом, было подтверждено резкое изменение, вызванное обработкой Ca/P, и его предупреждение посредством (OEG₂)₂-IP4.

Анализ сверхпредставленности генов с повышающей регуляцией в положительных по сравнению с отрицательными образцами контр. выявил обогащение клеточного цикла, клеточного деления и связанных с ними процессов (метаболические процессы ДНК, биогенез рибосом, организация хромосом), а также процессов клеточного стрессового ответа (фиг. 5B). Гены с понижающей регуляцией были связаны со структурными процессами и процессами развития (фиг. 5C).

Далее авторы настоящего изобретения рассмотрели уровни экспрессии отдельных генов, сосредоточившись на четырех группах генов, а именно: пути воспалительной

реакции, белки внеклеточного матрикса (ECM), процессы клеточного цикла и пролиферации, а также гены, участвующие в гомеостазе тканей. Обработка клеток с помощью Ca/P индуцировала пути воспалительного ответа, как сообщалось ранее для кристаллов CaOx (Kletzmayr, A. et al., *Adv. Sci.* 7, 1903337. DOI: 10.1002/advs.201903337, 2020). Гены с повышающей регуляцией включали гены интерлейкина-6 (IL6) и интерлейкина-32 (IL32), компонента C3 (C3), лигандов хемокинов с мотивом C-X-C (например, CXCL5) и гены сигнального пути TNF, такие как TNF альфа индуцированный белок 3 (TNFAIP3) (фиг. 5D). Далее исследовали гены внеклеточного матрикса и клеточной поверхности. Предполагаемые белки, связывающие кристаллы кальция, такие как гликопротеины клеточной поверхности остеопонтин (SPP1) или CD55, были подвергнуты повышающей регуляции при добавлении Ca/P. Напротив, представители семейства коллагена IV (COL4A3, COL4A4, COL4A5) подверглись понижающей регуляции. Коллаген IV представляет собой основной белковый компонент базальной мембраны канальцев. Таким образом, эти данные свидетельствуют о сильных изменениях базальной мембраны, которые могут способствовать кальцификации базальной мембраны, наблюдаемой у пациентов с камнеподобными образованиями в почках.

Анализ сверхпредставленности выявил резкое нарушение регуляции процессов клеточного цикла и деления. Повышение уровня *mys*, пропролиферативного гена, и циклина D1 (CCND1), регулирующего клеточный цикл на стадии перехода G1/S, может указывать на то, что клетки эпителия почек переходят в пролиферативное состояние при стимуляции Ca/P. Это предположение подтверждается одновременным повышением уровня TP53, регулятора распознавания и восстановления повреждений ДНК в точке регуляции G1/S.

Кроме того, нарушение регуляции генов, участвующих в процессах развития и тканевом гомеостазе, свидетельствует об изменениях в клеточной дифференциации при стимуляции с помощью Ca/P. Экспрессия е-кадгерина (CDH1), маркера клеток эпителия, снижалась при обработке с помощью Ca/P, что указывает на потерю эпителиального фенотипа. Сообщалось, что сигнальный путь *wnt* способствует остеогенной трансдифференцировке сосудистых клеток и кальцификации сосудов путем прямой модуляции экспрессии гена *Runx2*. При стимуляции с помощью Ca/P клеток эпителия почек нарушалась регуляция экспрессии нескольких генов

сигнального пути Wnt, в том числе представителя семейства Wnt 7A (WNT7A), склеростин-содержащего домена 1 (SOSTDC1) и ингибитора сигнального пути WNT диккопфа 1 (DKK1). Кроме того, экспрессия Runx2 повышалась при обработке с помощью Ca/P.

Таким образом, секвенирование РНК позволило предположить резкие клеточные изменения при стимуляции с помощью Ca/P, включая потерю эпителиального фенотипа в сторону более пролиферативного состояния и изменение клеточной дифференцировки, сходное с процессами кальцификации сосудов. (OEG₂)₂-IP4 может в значительной степени предупреждать вызванные Ca/P изменения, вероятно, вследствие уменьшения степени взаимодействия клеток с кристаллами.

Пример 6. (OEG₂)₂-IP4 уменьшает вызванное высоким содержанием фосфатов повреждение почек in vivo

Эффективность (OEG₂)₂-IP4 дополнительно исследовали на мышинной модели повреждения почек, вызванного высоким содержанием фосфатов. На основании ранее выполненного определения характеристик фармакокинетики (OEG₂)₂-IP4 у крыс, у мышей после подкожного введения 100 мг/кг ожидается концентрация в плазме крови, составляющая ориентировочно 80 мкМ через 30 мин. Рацион с высоким содержанием фосфатов вызывает экспрессию FGF23 по сравнению с рационом с нормальным содержанием фосфатов, что, в свою очередь, усиливает выведение фосфатов почками для поддержания их уровня в сыворотке крови в пределах нормы. Предполагается, что этот механизм обратной связи также способствует повышению уровня фосфатов в почках на ранней стадии СКД. Рацион с фосфатами вызывал увеличение экскреции фосфатов с мочой от 1,9 до 35,6 мг/день, без существенной разницы между носителем и группой лечения (Таблица 2). Кроме того, в конце периода лечения не наблюдали существенной разницы между средой-носителем и группой лечения в отношении уровня фосфата в сыворотке крови, CaP или уровня кальция в моче (таблица 2). У мышей на рационе с высоким содержанием фосфатов наблюдали повышение маркеров повреждения почек, таких как увеличение Spp1, Il-36a и Ngal (фиг. 6A-C). Кроме того, повышенный уровень экспрессии маркеров фиброза, таких как матриксная металлопептидаза-3 (MMP) и коллаген 1α1 (Coll1α1), был обнаружен в группе контроля с высоким содержанием фосфатов по сравнению с группой контроля со средой-носителем при нормальном содержании фосфатов. Одновременное лечение с помощью

100 мг/кг $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$ 3 раза/неделю подкожно значительно снижало маркеры повреждения почек и фиброза по сравнению с контрольной группой со средой-носителем в группе рациона с высоким содержанием фосфатов (фиг. 6A-E). Кроме того, $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$ значительно уменьшает степень фиброза, о чем свидетельствует снижение объемной доли коллагена после окрашивания почек красным Пикро-Сириусом (фиг. 6F). Таким образом, предварительные результаты, полученные авторами настоящего изобретения, свидетельствуют о благоприятном воздействии $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$ на вызванное фосфатами повреждение почек *in vivo*.

Обсуждение

Почечные каналцы подвергаются воздействию широкого спектра метаболитов в высоких концентрациях, что иногда вызывает осаждение последних и повреждение клеток. Осаждение кальция в виде CaP и CaOx вызывает особое беспокойство ввиду связанной с этим кальцификации почек, повреждения тканей и потенциально ускоренного прогрессирования СКД. В связи с широким разнообразием нефротоксических воздействий окружающей среды, авторы настоящего изобретения сначала стремились создать простой инструмент профилирования на основе изображений *in vitro*, который позволил бы быстро исследовать множество почечных повреждений, сосредоточившись на условиях кальцификации и возможных ингибирующих молекулах.

Предложенная платформа профилирования кальцификации на основе изображений позволяет просто и быстро изменять условия кальцификации, т. е. ионные условия, вызывающие образование различных типов кристаллов кальция. Авторы настоящего изобретения внедрили автоматизированную систему анализа, количественно оценивая как изменения отдельных клеток, так и осаждение CaP путем флуоресцентного окрашивания кальцеином. Преимущества применения подхода профилирования на основе изображений по сравнению, например, с секвенированием РНК объемных клеток, заключаются в возможности выявления локализованных изменений и высокой пропускной способности.

Авторы настоящего изобретения продемонстрировали постепенное изменение профиля признаков монослоев клеток эпителия почек при увеличении концентрации Ca/P в среде для культивирования. Наблюдали потерю четко выраженного

бульжничкоподобного эпителиального фенотипа в сторону увеличения формы клеток. В соответствии с этим, секвенирование РНК подтвердило потерю эпителиального маркера е-кадгерина и более пролиферативное состояние клеток, стимулированных Са/Р. Эти результаты согласуются с данными литературы о том, что при взаимодействии клеток с кристаллами происходят процессы дедифференцировки и повреждения клеток. Изменения сигнальных путей, сходные с патологическими изменениями, вовлеченными в кальцификацию сосудов, позволили предположить возможную трансдифференцировку эпителиальных клеток в сторону остеобластоподобного фенотипа. Интересно, что авторы настоящего изобретения также наблюдали изменения в паттернах осаждения СаР. При снижении нагрузки Са/Р осаждение и/или адгезия СаР происходили в местах повреждения клеток и сильного окрашивания мембраны. В этих местах накапливался СаР, вызывая дальнейшее повреждение, отслоение клеток и образование скоплений СаР-мембран.

Предыдущие исследования поддерживают идею о предпочтительном прикреплении СаР к специфическим кристаллосвязывающим белкам, которые могут экспрессироваться в основном на дедифференцированных или регенерирующих клетках эпителия почек. Секвенирование РНК подтвердило повышенную экспрессию кристаллосвязывающих белков клеточной поверхности и ЕСМ, как, например, остеооптина. Усиленная пролиферация стимулированных посредством Са/Р клеток может способствовать неконтролируемому многослойному росту и последующему отслоению клеток, что может объяснить изменения в окрашивании клеточных мембран и способствовать образованию скоплений СаР.

Кроме того, представители семейства коллагена IV, основные компоненты базальной мембраны почечных канальцев, подвергались понижающей регуляции при стимуляции Са/Р. Кальцификация базальной мембраны считается первой стадией образования бляшек СаР у пациентов с камнями в почках, однако до сих пор процесс начальной кальцификации остается неясным. Таким образом, снижение уровня коллагена IV может дать первое представление об образовании бляшек СаР и предполагает возможность применения платформы кальцификации для имитации патофизиологических процессов. Потребуется дальнейшие исследования, чтобы выяснить, образуются ли начальные места прикрепления под воздействием нагрузки СаР, или определенная степень повреждения клеток предшествует и затем усиливается

в результате связывания СаР. Результаты свидетельствуют о существовании активного клеточного участия в процессе кальцификации почек, что поддерживает профилирование широкого спектра молекул, которые могут действовать на нескольких стадиях этого процесса.

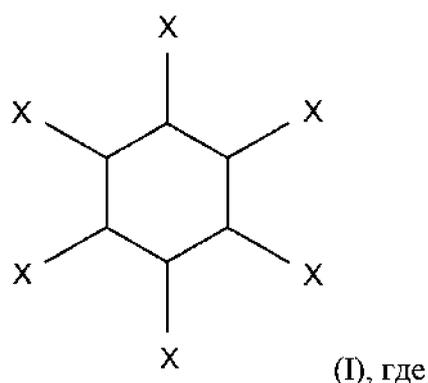
На следующей стадии авторы настоящего изобретения исследовали эффективность библиотеки аналогов IP6 в отношении влияния на осаждение СаР в почках в растворе и клеточную адгезию *in vitro*. Выбранное ведущее соединение $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$ дозозависимым образом изменяло профиль характеристик клеток в сторону отрицательного контр. профиля, ингибируя единичные изменения клеток, а также осаждение СаР. Защитное действие соединения на индуцированные высоким содержанием СаР клеточные изменения было подтверждено секвенированием РНК. Такое влияние может быть результатом как подавление роста уровня СаР, так и адгезии СаР. Важно отметить, что защитный эффект соединения проявился в эффективности на мышинной модели повреждения почек, вызванного высоким содержанием фосфатов. Таким образом, авторы настоящего изобретения считают, что, ингибируя осаждение СаР и взаимодействие СаР с клетками, $(\text{OEG}_2)_2\text{-IP4}$ способен предупреждать повреждение почек, ускоренное СаР. Кроме того, соединение обеспечивало снижение степени вызванной СаР кристаллизации СаОх на монослое клеток *in vitro*. Эти результаты позволяют предположить потенциальную терапевтическую пользу молекулы при СаР-инициированных заболеваниях почек.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в лечении или предупреждении заболевания, связанного с образованием кристаллов соли кальция и/или их воздействием на ткани, где заболевание выбрано из:

- фиброза почки, в частности связанного с кальцификацией ткани почки,
- воспаления почки, в частности связанного с кальцификацией ткани почки,
- нефрита,
- интерстициального нефрита,
- гломерулонефрита,
- вызванного фосфатом фиброза почки,
- вызванного фосфатом хронического заболевания почки,
- хронического заболевания почки, связанного с гиперфосфатемией,
- прогрессирования хронического заболевания почек,
- фосфатной токсичности,
- гиперфосфатурии,
- гиперфосфатемии и/или
- гипер-FGF23-эмии.

2. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 1, где соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, описано общей формулой I,



- **один, или два, или три X** представляют собой олигоэтиленгликоль, а **остальные X** представляют собой OPO_3^{2-} .

3. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в соответствии с п. 2, где **два X** представляют собой олиго-этиленгликоль, и остальные четыре X представляют собой OPO_3^{2-} .

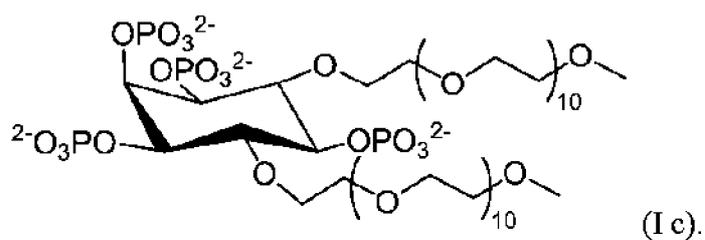
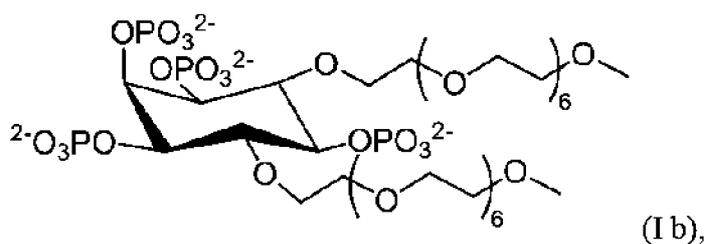
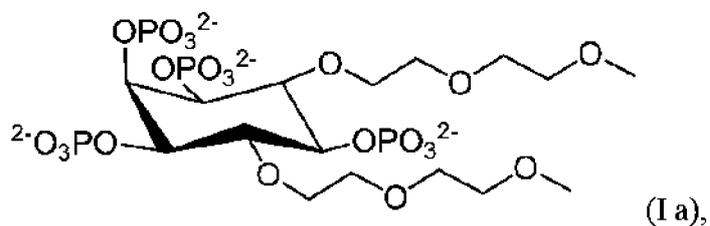
4. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в соответствии с п. 2, где **три X** представляют собой олиго-этиленгликоль, и остальные три X представляют собой OPO_3^{2-} .

5. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения в соответствии с п. 2, где **один X** представляет собой олигоэтиленгликоль, и остальные пять X представляют собой OPO_3^{2-} .

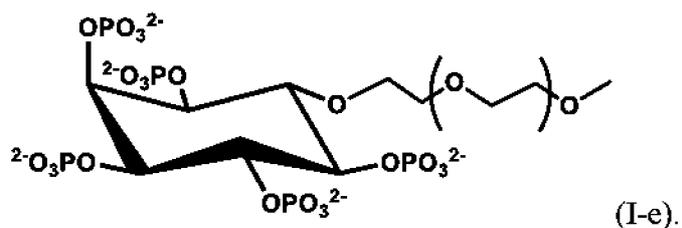
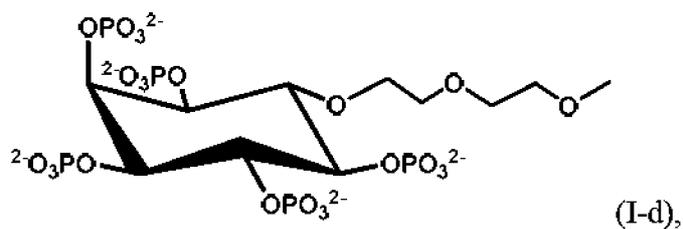
6. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из пп. 2-5, где олигоэтиленгликоль описан формулой $\text{O}-(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})_n\text{CH}_3$, причем **n** выбран из целого числа от **2 до 20**, в частности n составляет от 2 до 12.

7. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 6, где **n** **равняется 2**.

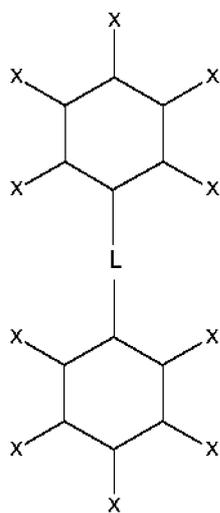
8. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 3, где соединение описано любой из формул:



9. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 5, где соединение описано любой из формул:



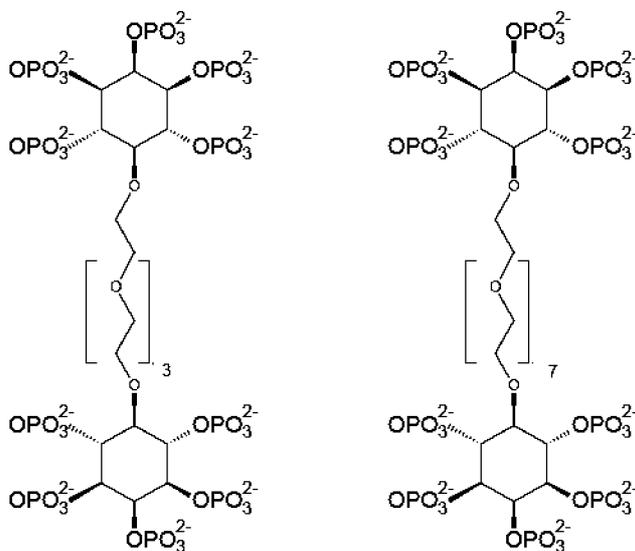
10. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 1, где соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, описано общей формулой II,



(II), где

каждый X представляет собой OPO_3^{2-} , и L представляет собой $-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_m-\text{O}-$, причем m имеет значение от 5 до 15, в частности m имеет значение от 6 до 12, более конкретно m имеет значение от 7 до 10, еще более конкретно m равняется 8.

11. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по п. 3, где соединение описано любой из формул:



12. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения

- по любому из предыдущих пп. 1-7, где инозитольный фрагмент представляет собой *мио*-инозитол

или

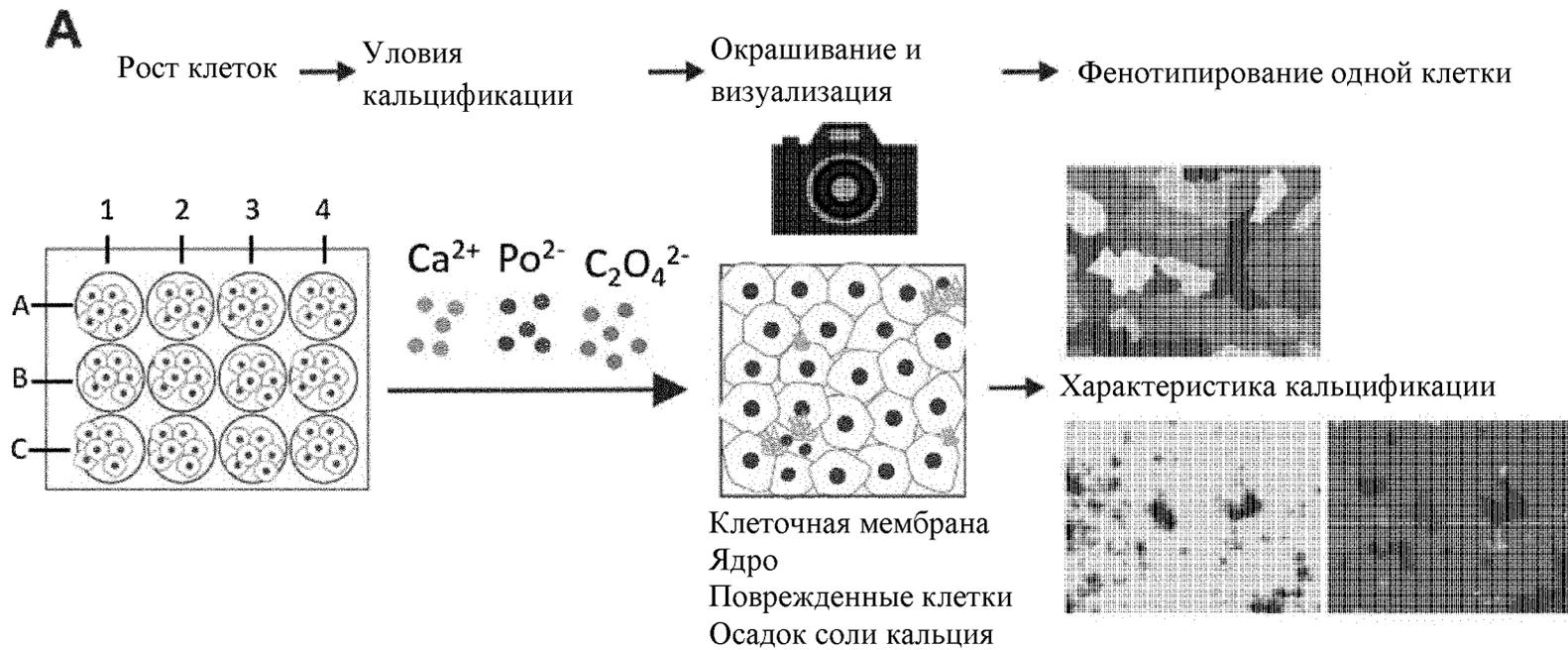
- по п. 10, где оба инозитольных фрагмента представляют собой *мио*-инозитол.

13. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из предыдущих пп. 1-12, где связанное заболевание представляет собой заболевание, связанное с образованием соли или осадка фосфата кальция.

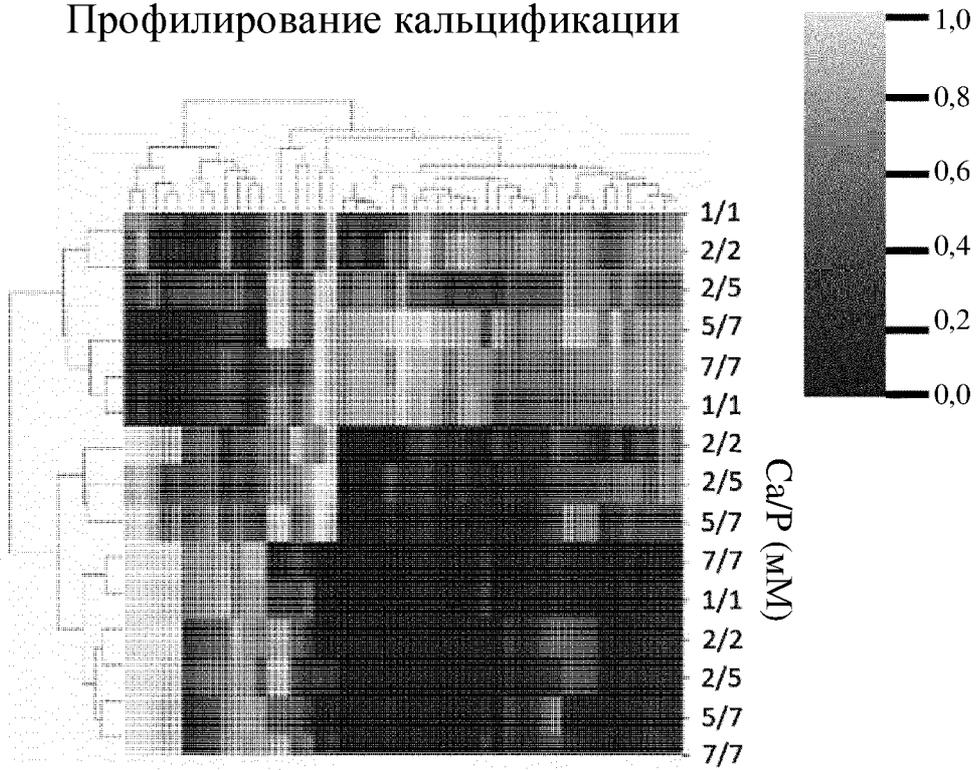
14. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из предыдущих пп. 1-12, где связанное заболевание представляет собой заболевание, связанное с образованием соли или осадка оксалата кальция.

15. Соединение, представляющее собой олигоалкиловый эфир инозитолполифосфата, или его фармацевтически приемлемая соль для применения по любому из предыдущих пп. 1-12, где связанное заболевание представляет собой заболевание, связанное с образованием смешанного осадка оксалата и фосфата кальция.

Фигура 1

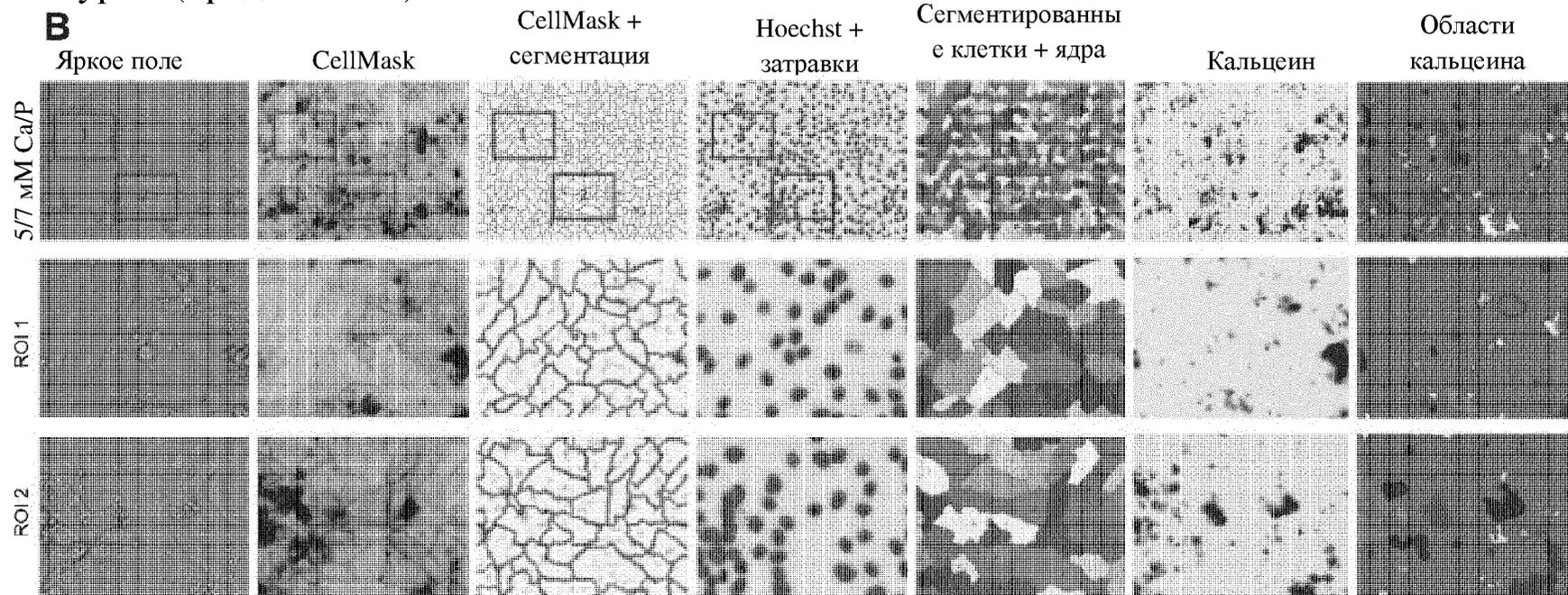


Профилирование кальцификации

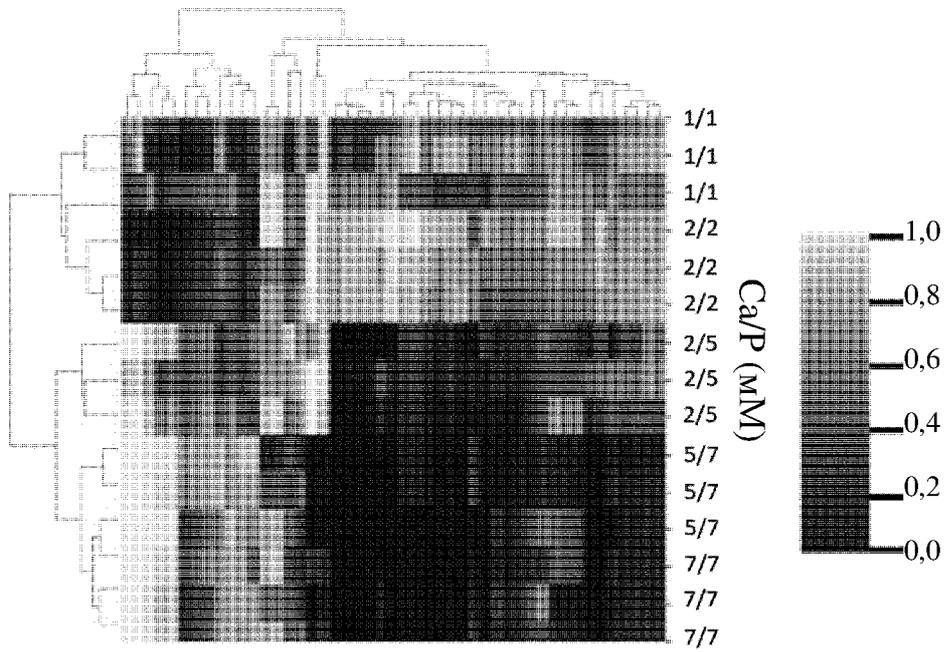


Фигура 1А (продолжение)

Фигура 1 (продолжение)

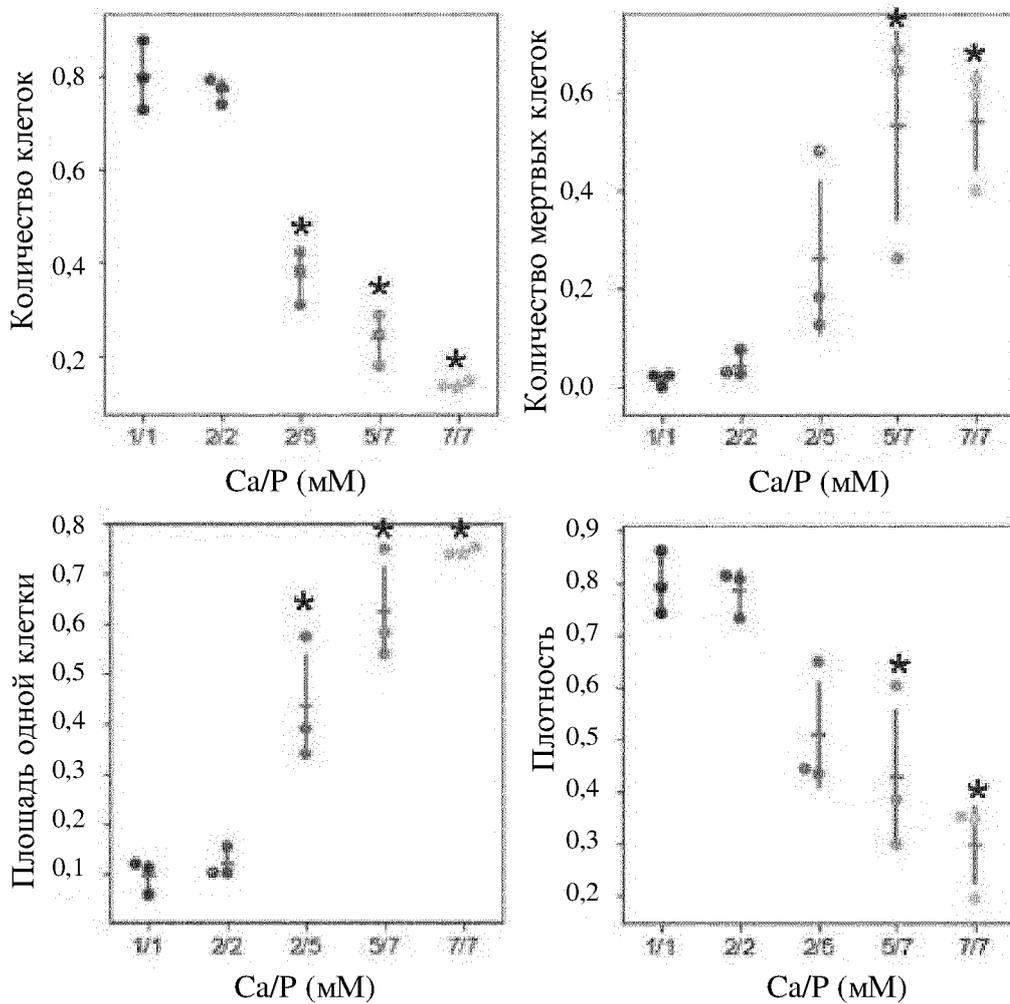


A



Фигура 2

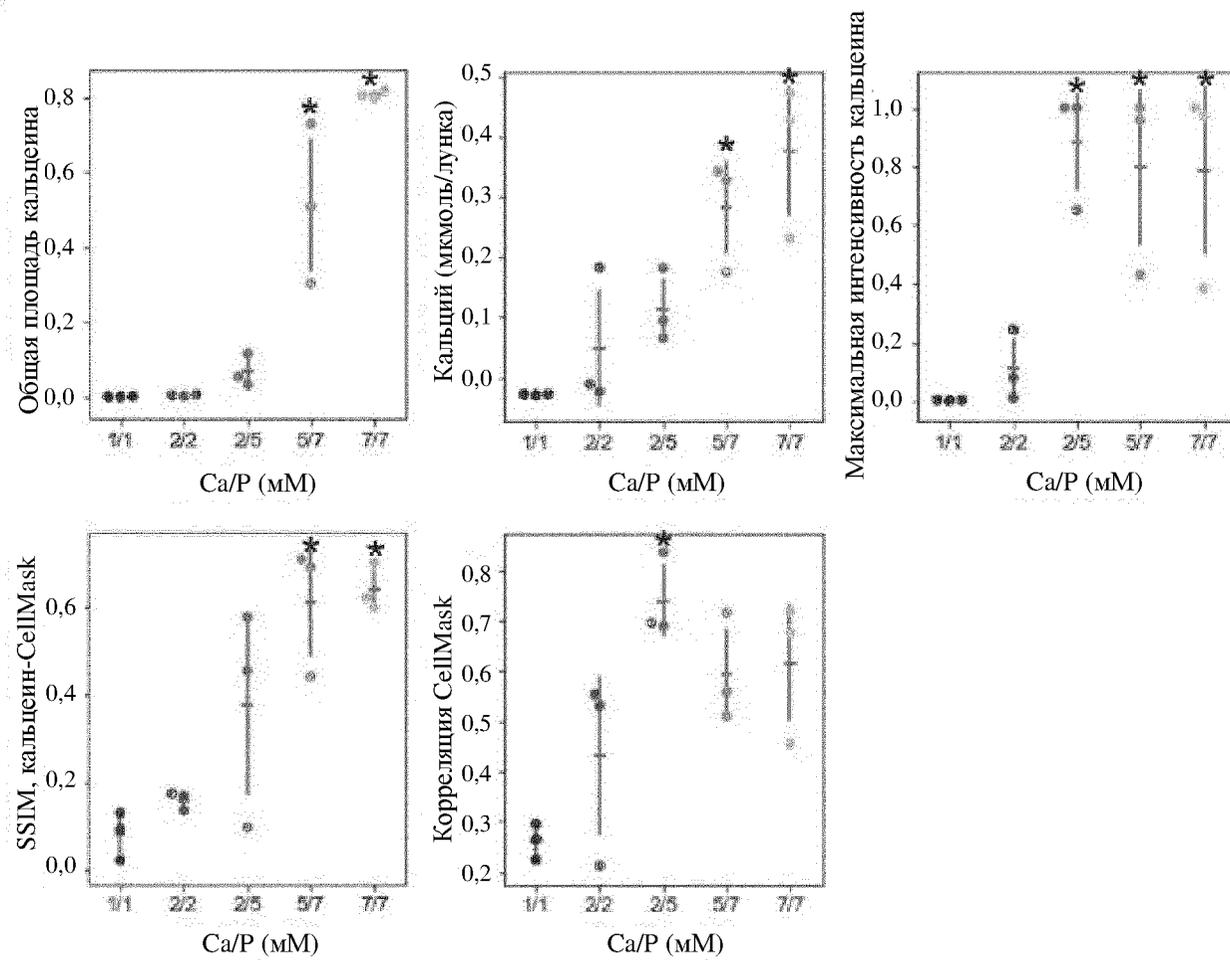
B



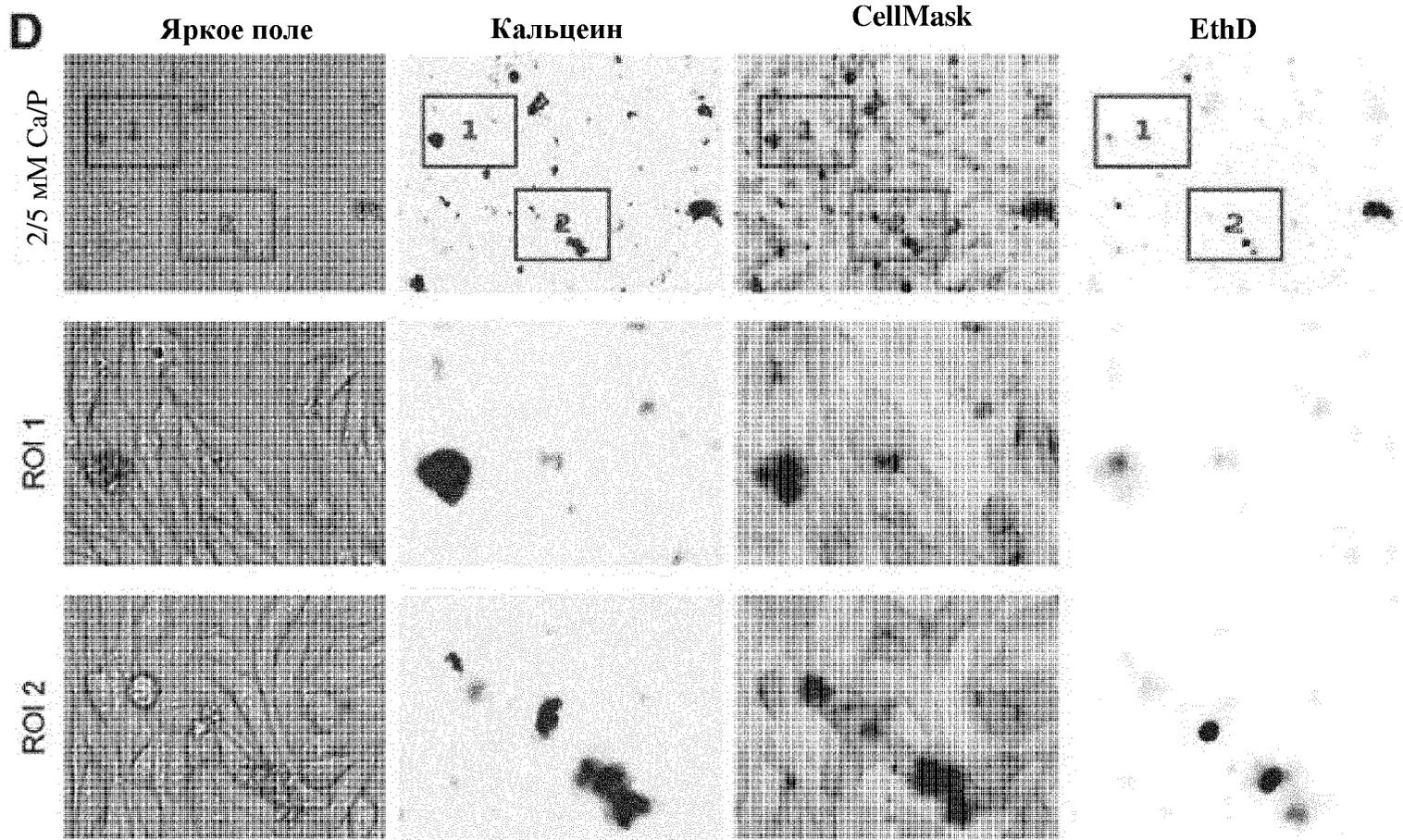
Фигура 2 (продолжение)

Фигура 2 (продолжение)

С

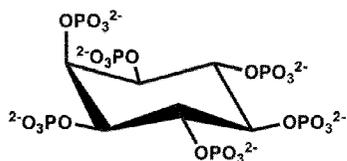


Фигура 2 (продолжение)

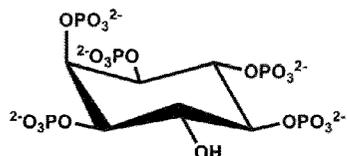


Фигура 3

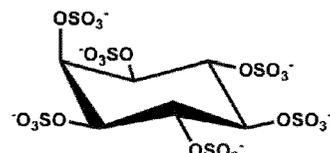
Исходные соединения IP6 и IP5



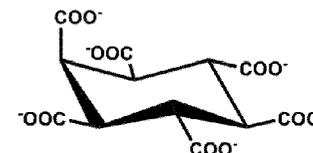
IP6



IP5

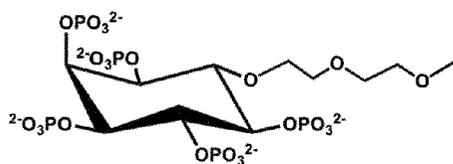


IS6

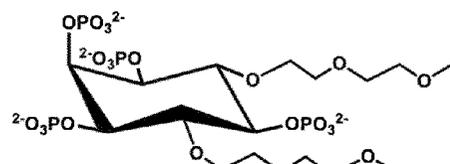


IC6

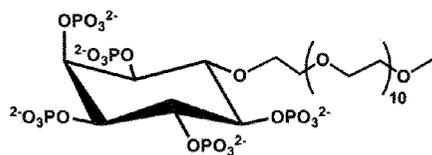
ПЭГелированные аналоги IP6



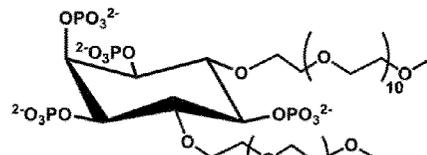
OEG₂-IP5



(OEG₂)₂-IP4

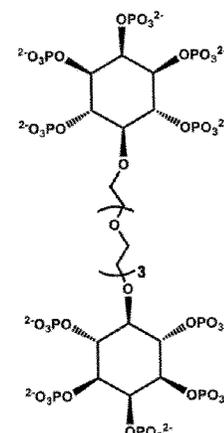


OEG₁₁-IP5

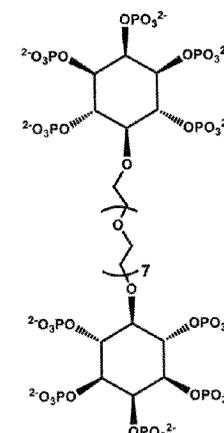


(OEG₁₁)₂-IP4

Двухвалентные аналоги IP5

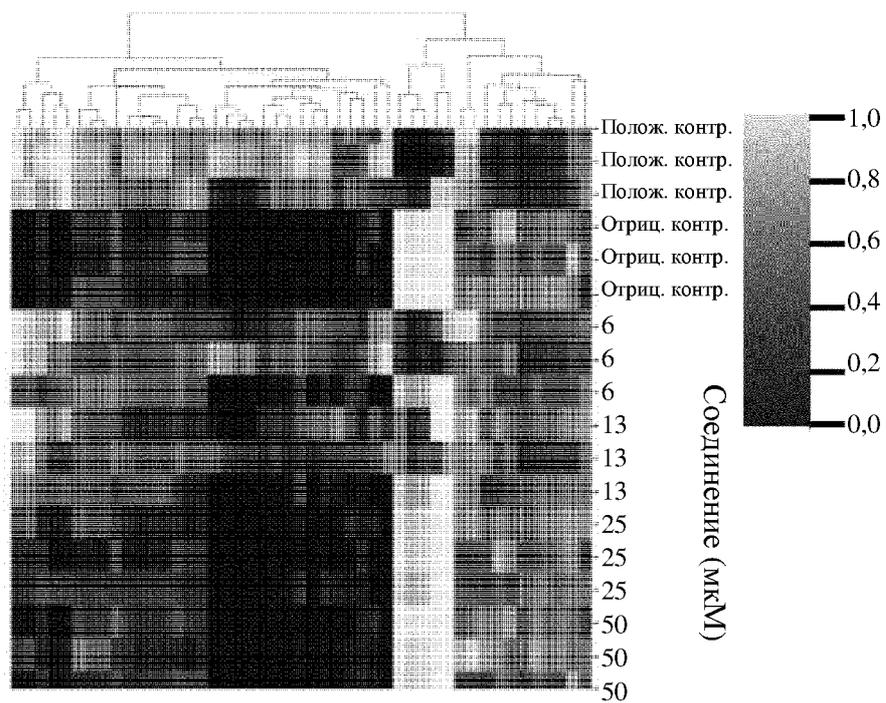


OEG₄-(IP5)₂



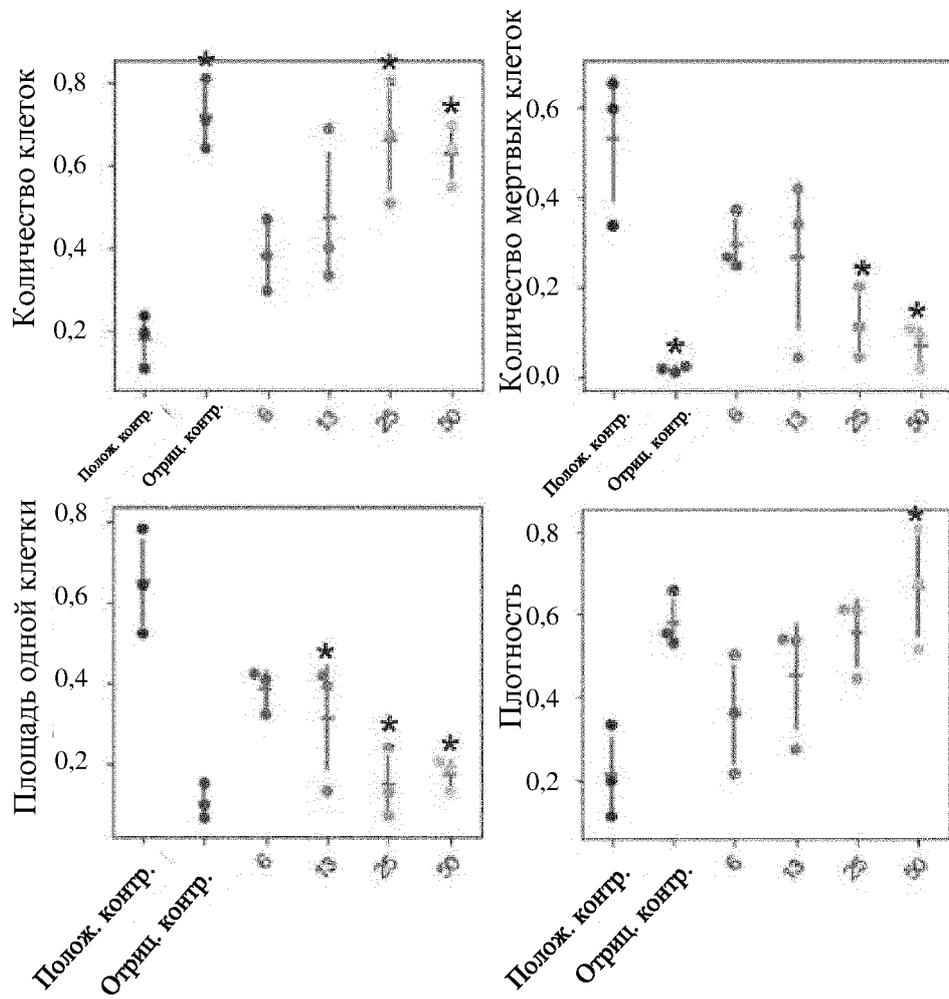
OEG₈-(IP5)₂

A



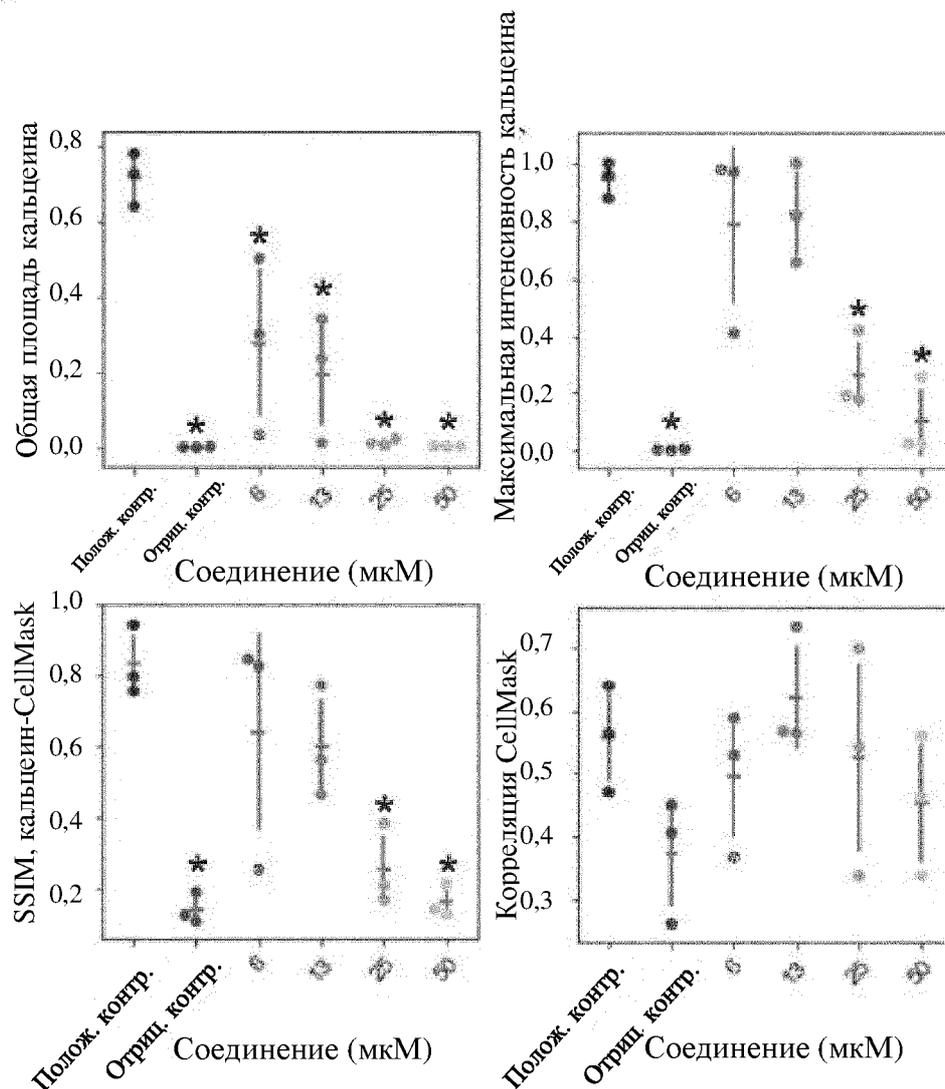
Фигура 4

B



Фигура 4 (продолжение)

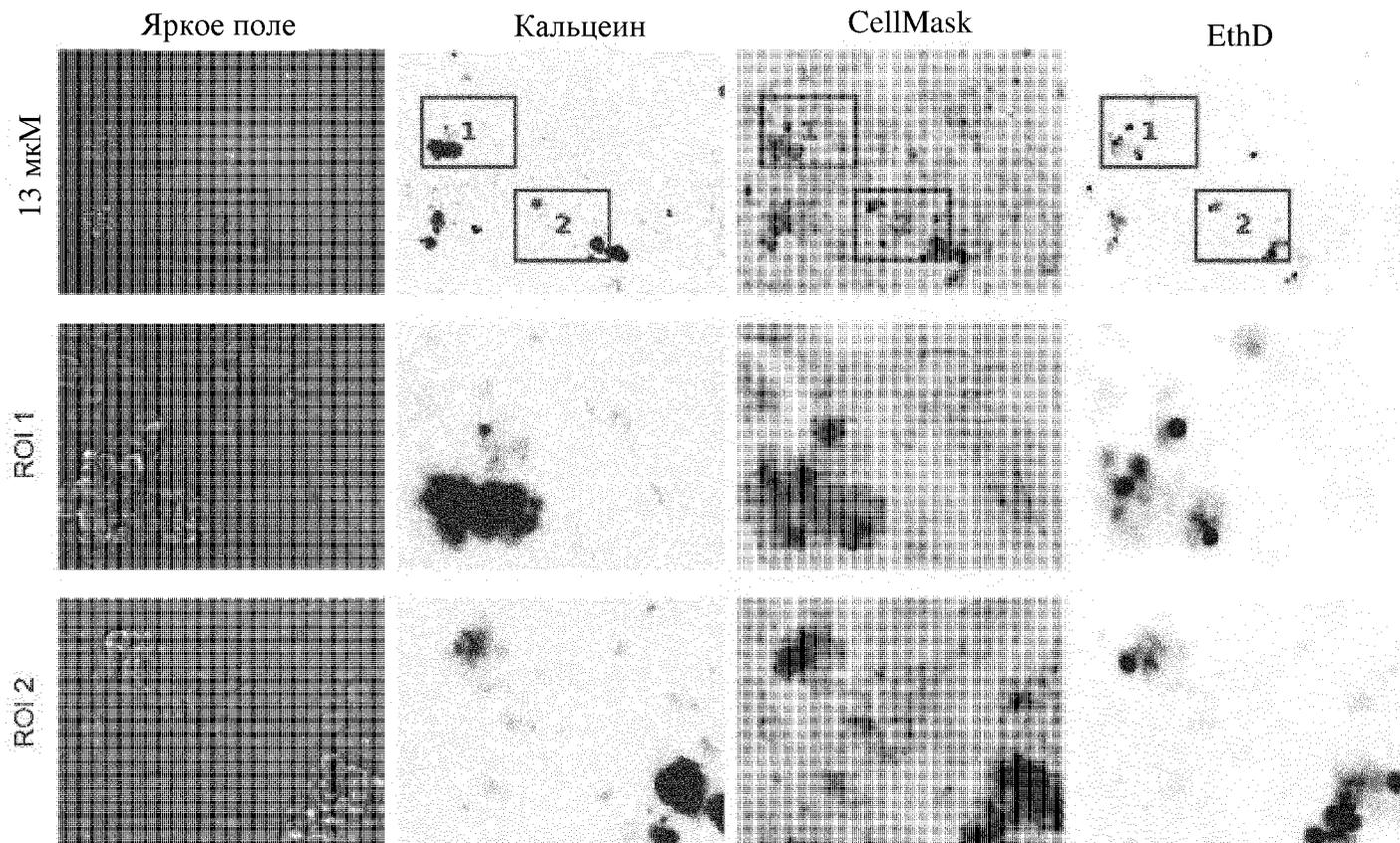
C



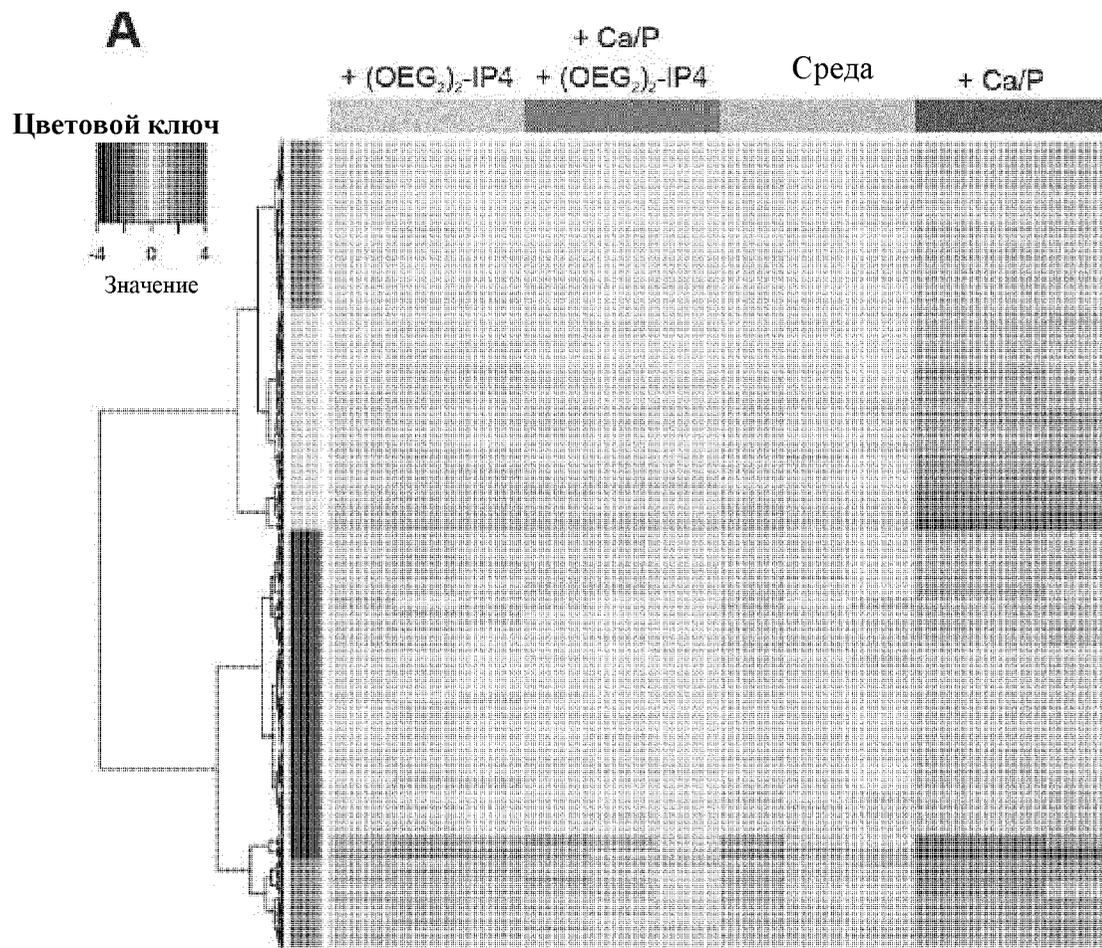
Фигура 4 (продолжение)

Фигура 4 (продолжение)

D

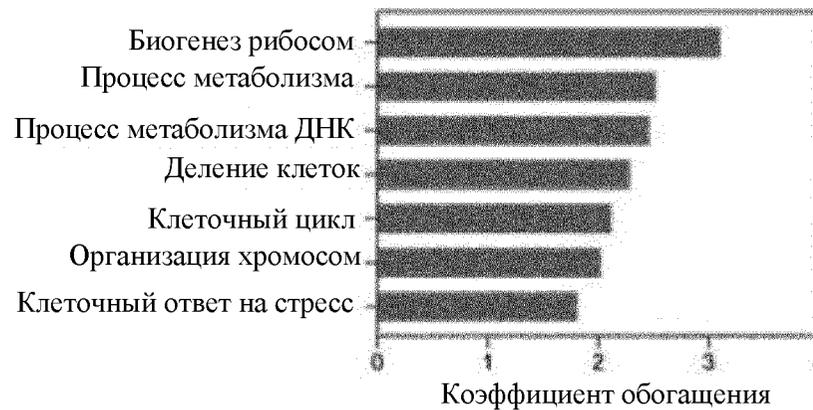


Фигура 5

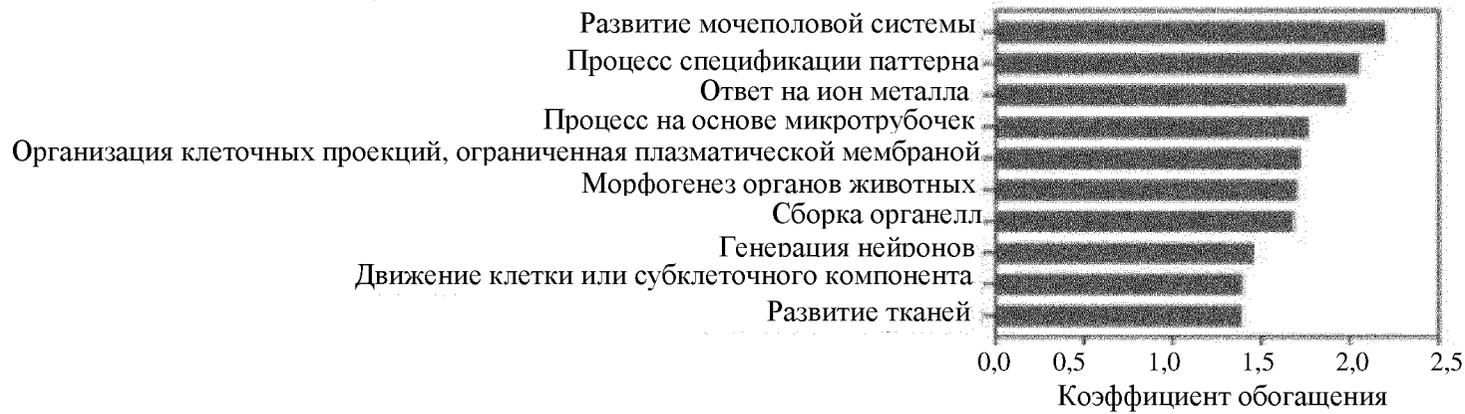


Фигура 5 (продолжение)

В

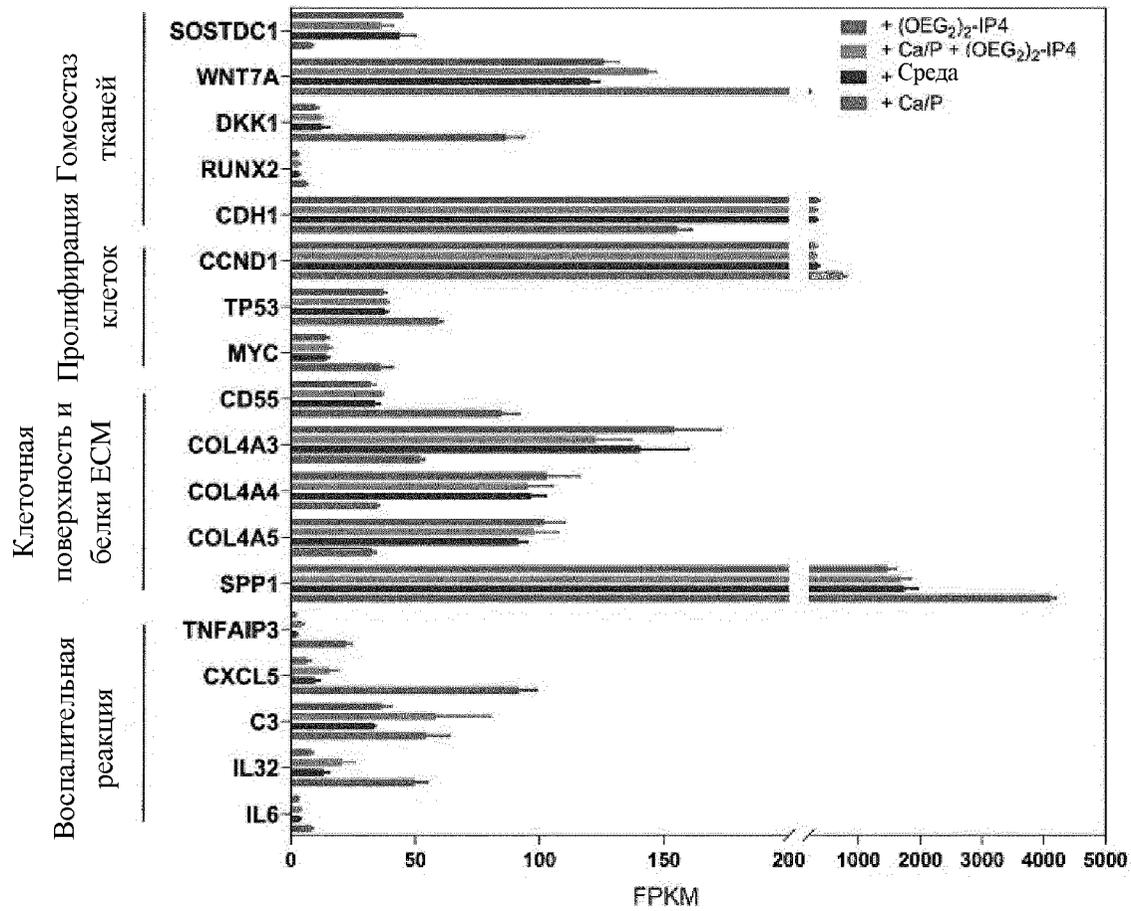


С

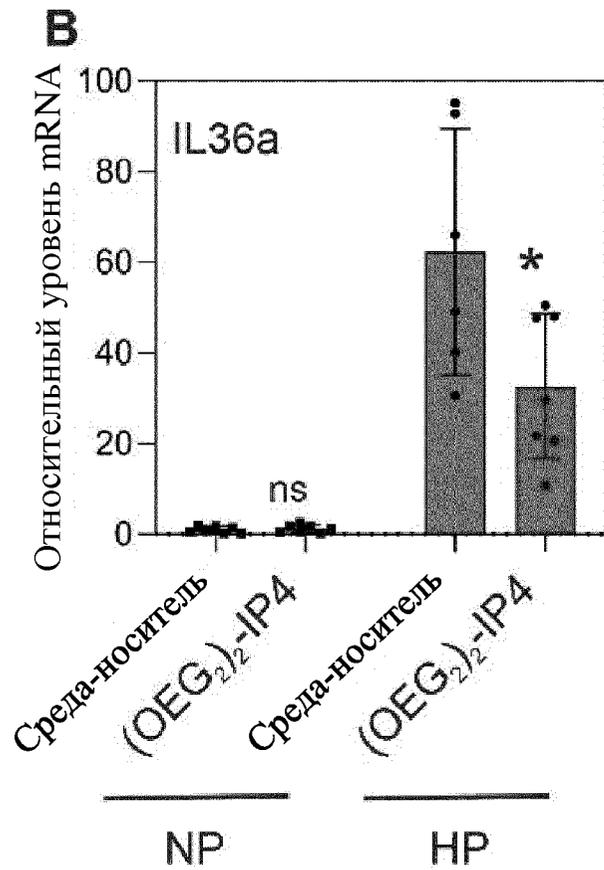
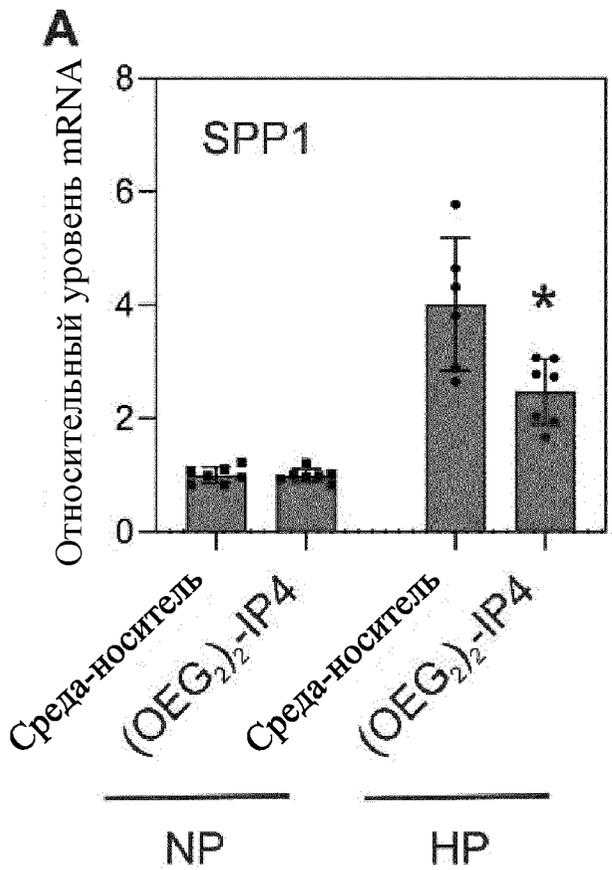


Фигура 5 (продолжение)

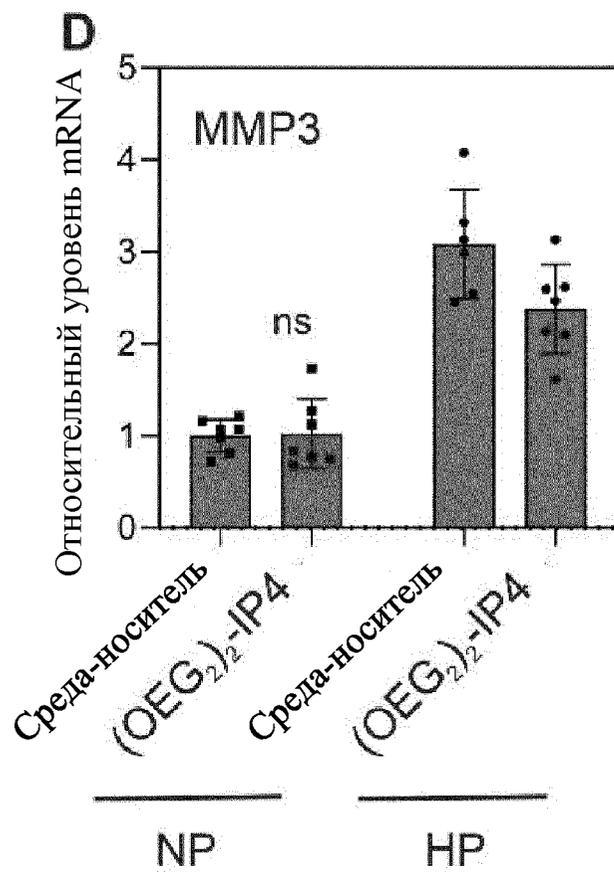
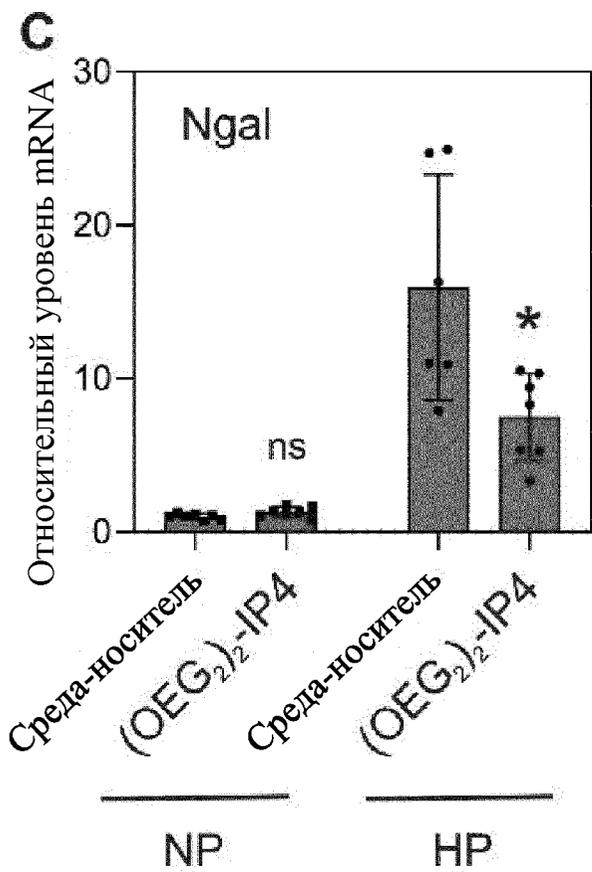
D



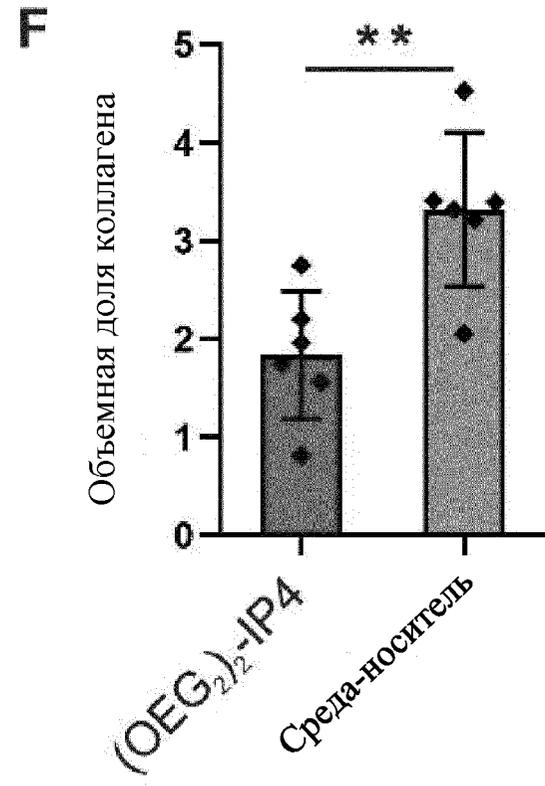
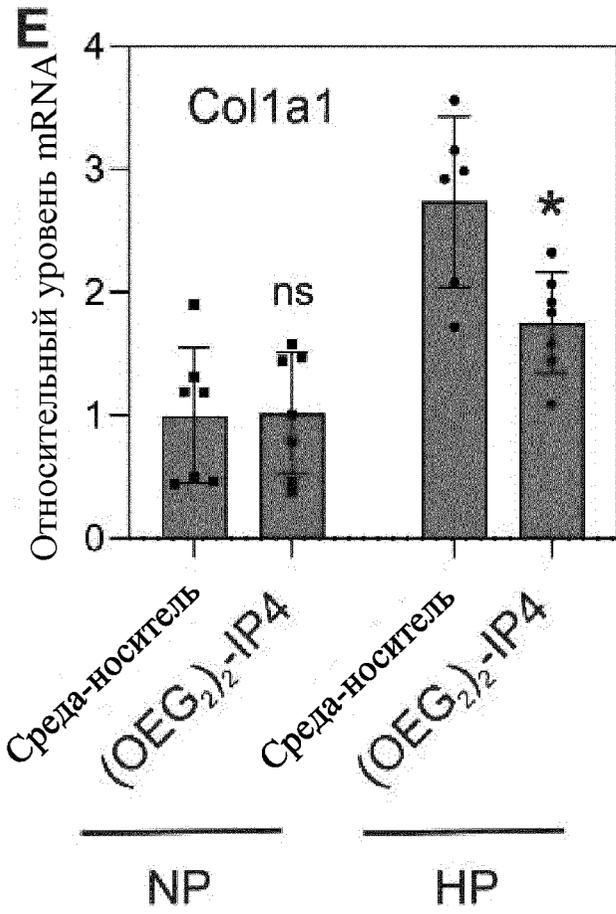
Фигура 6



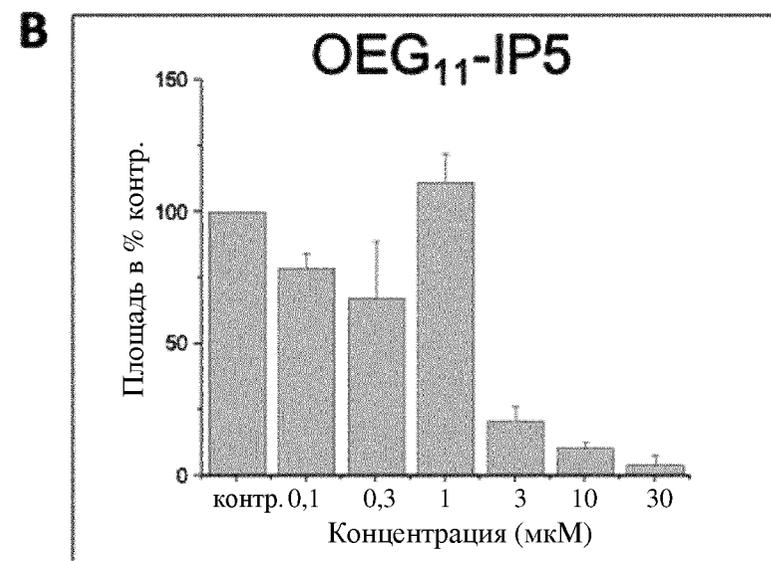
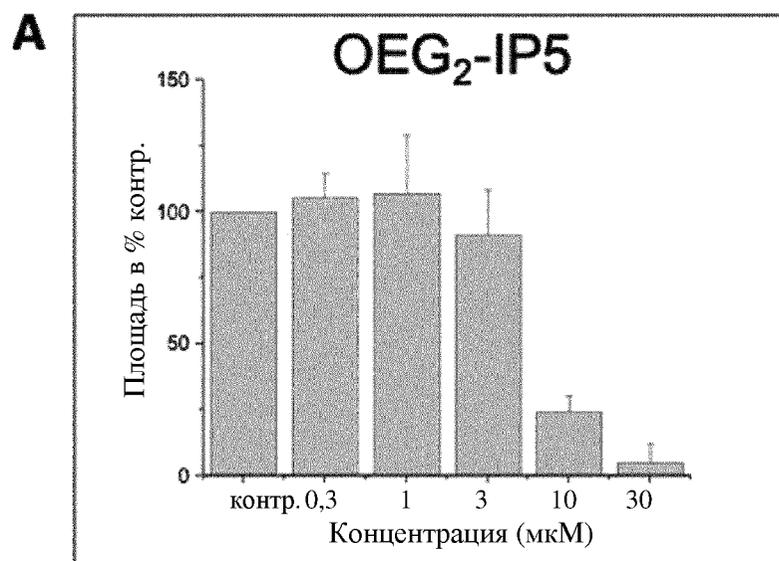
Фигура 6 (продолжение)



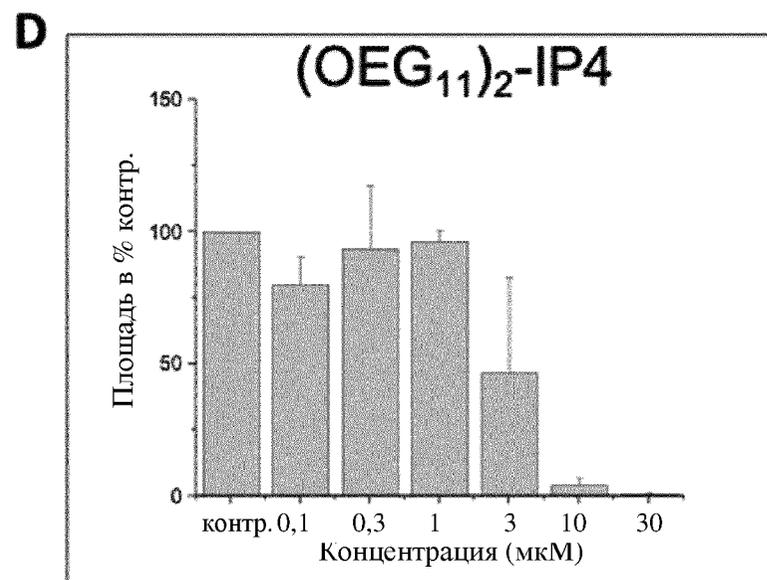
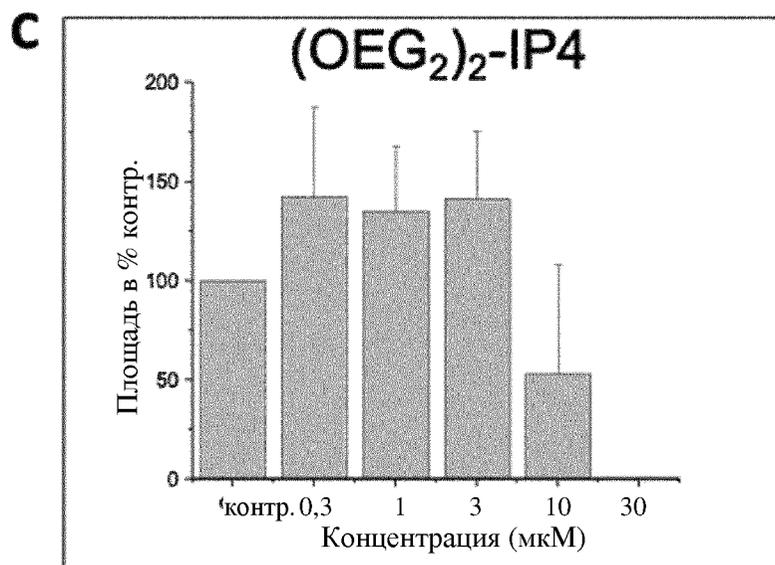
Фигура 6 (продолжение)



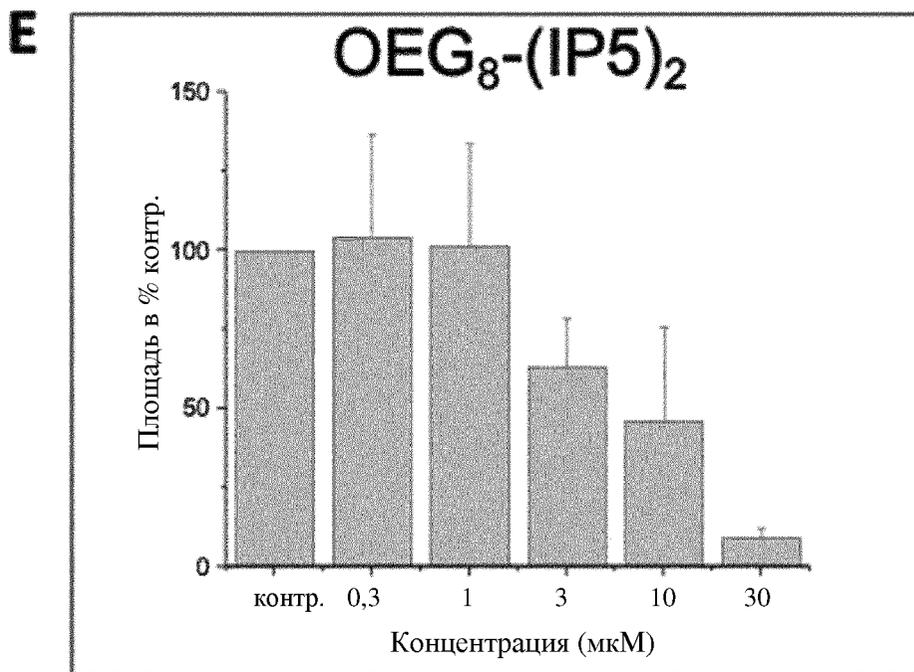
Фигура 7



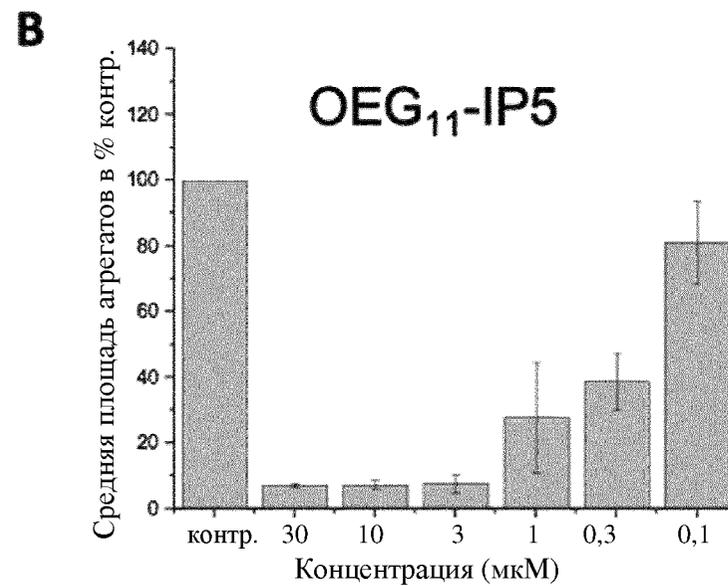
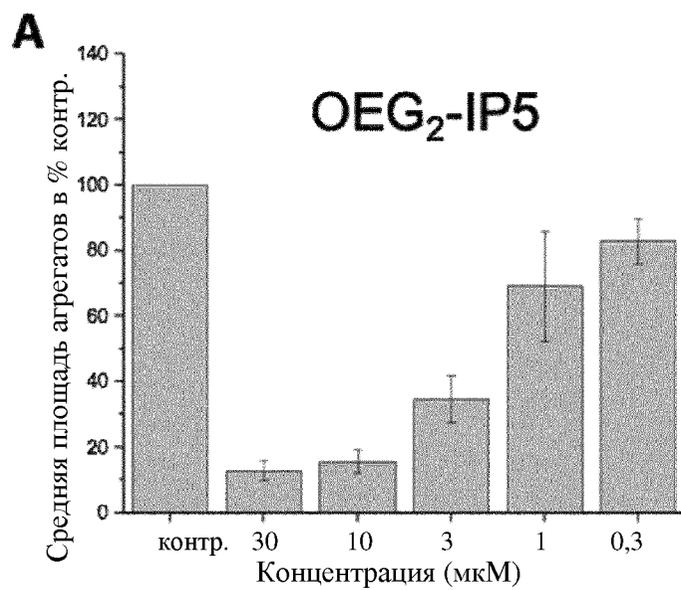
Фигура 7 (продолжение)



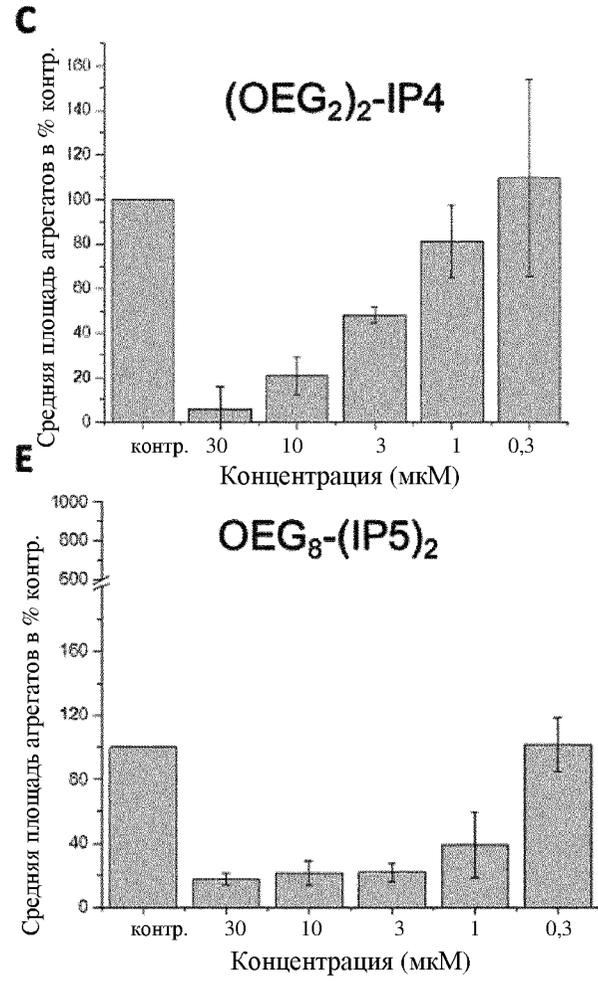
Фигура 7 (продолжение)

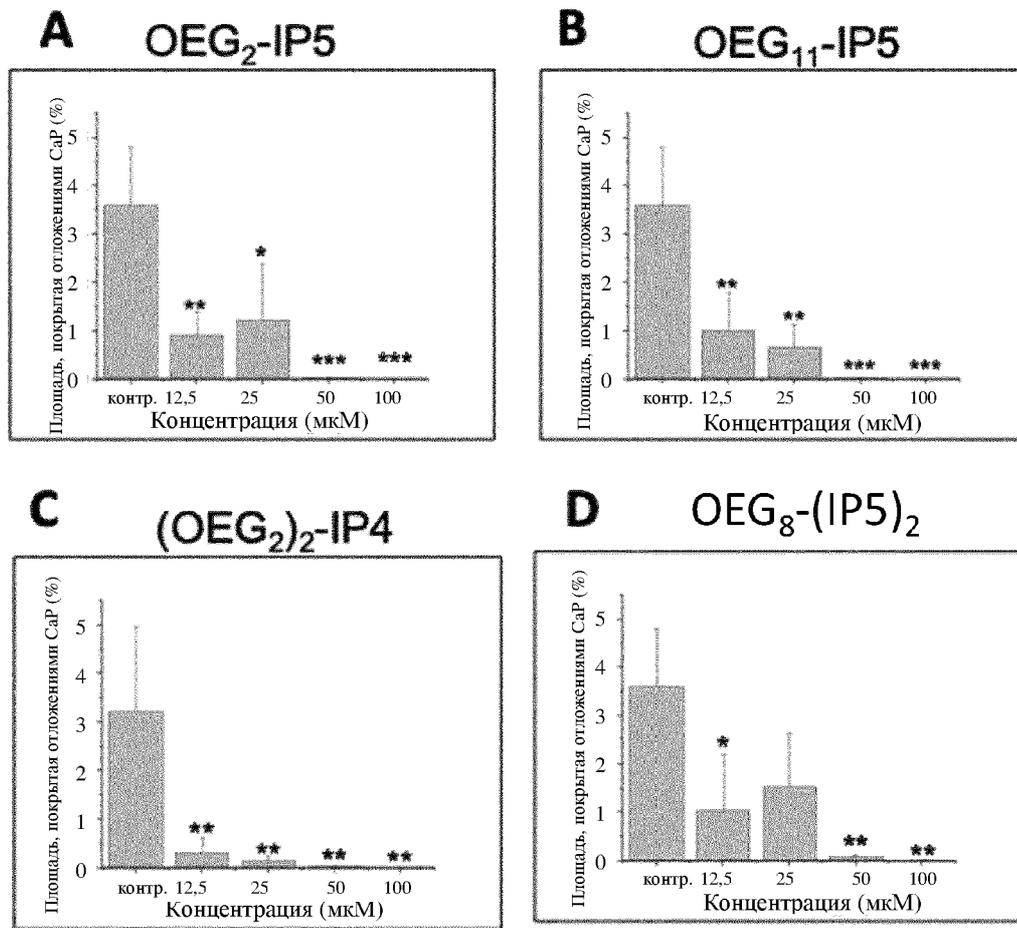


Фигура 8



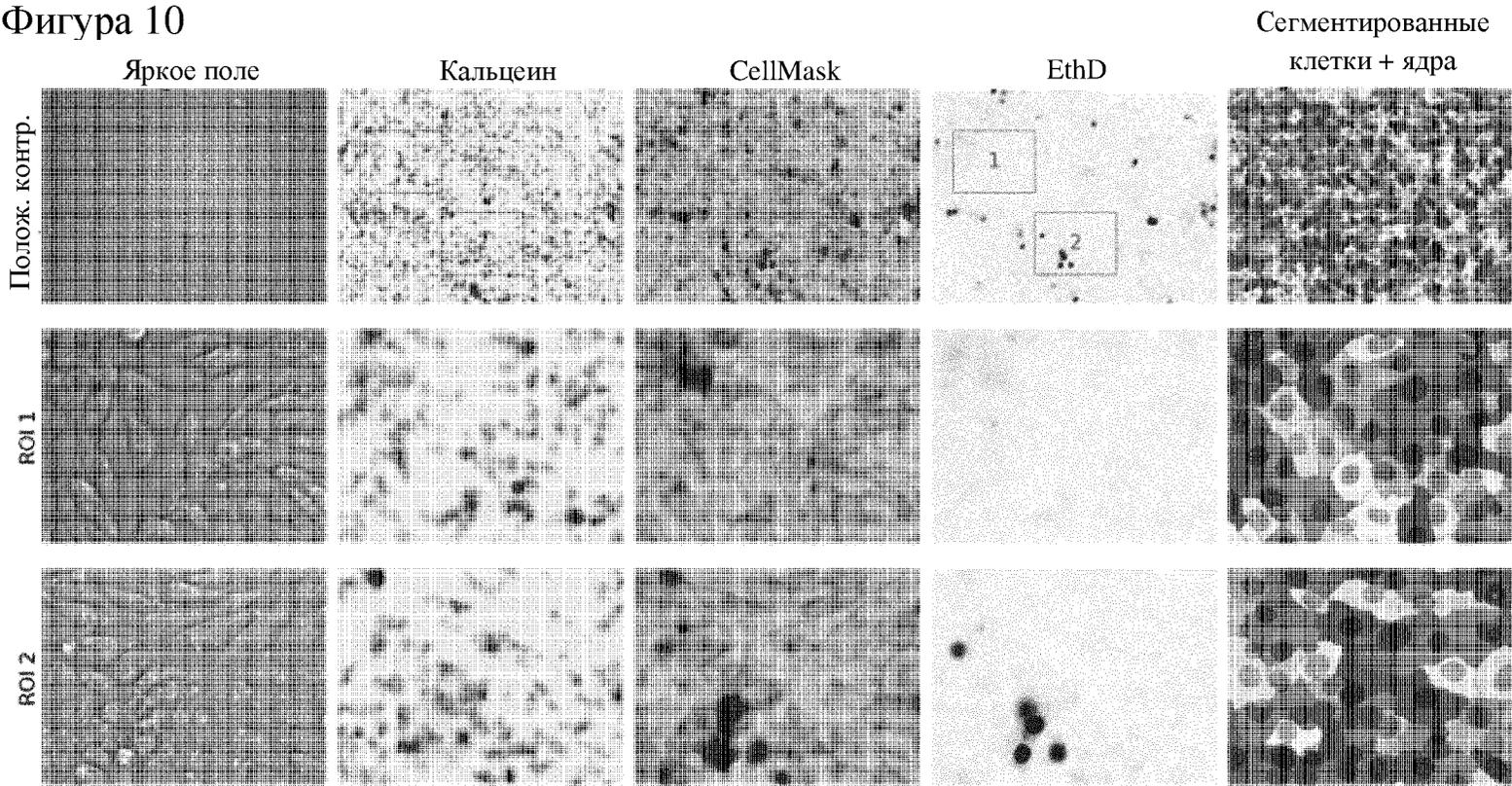
Фигура 8 (продолжение)



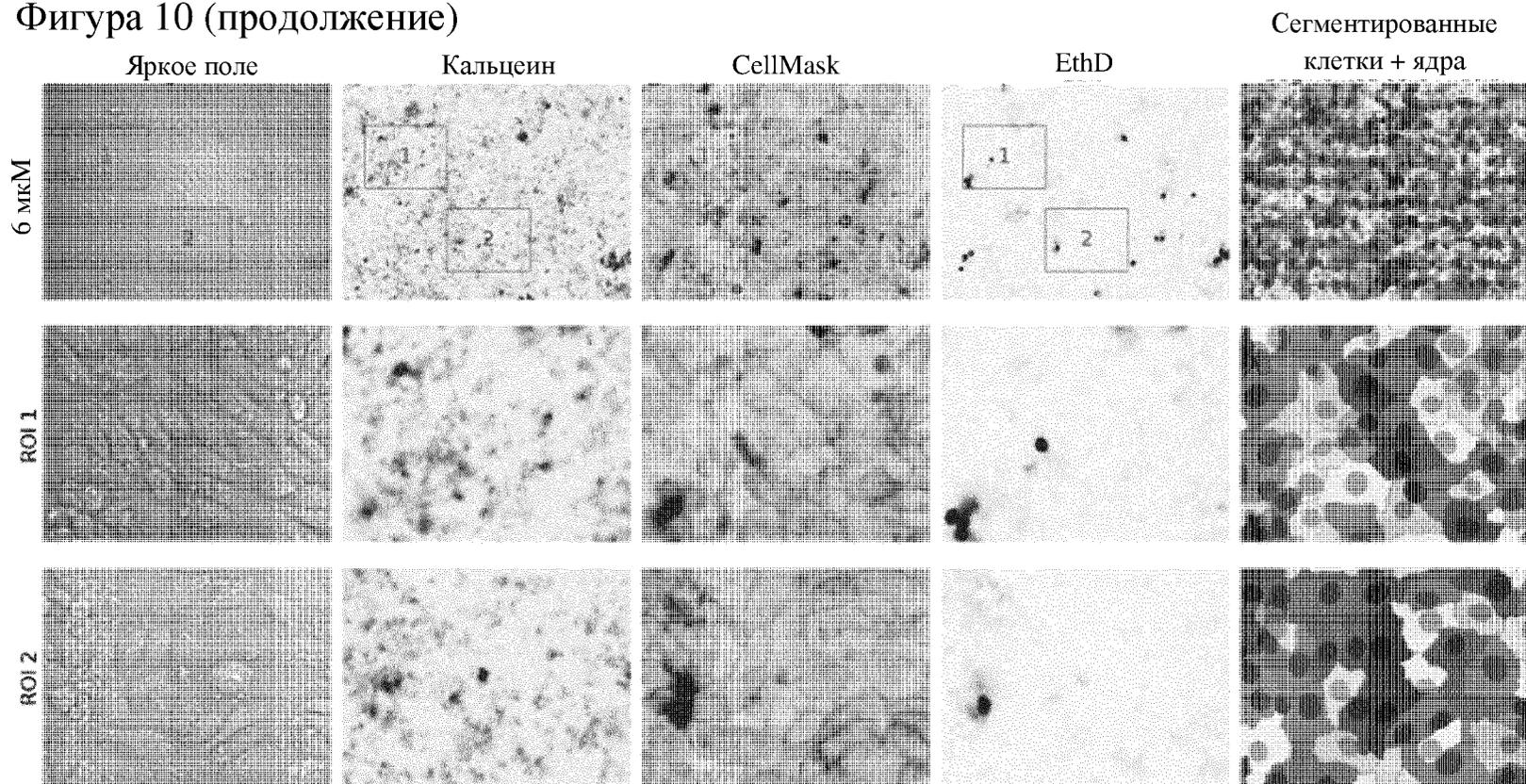


Фигура 9

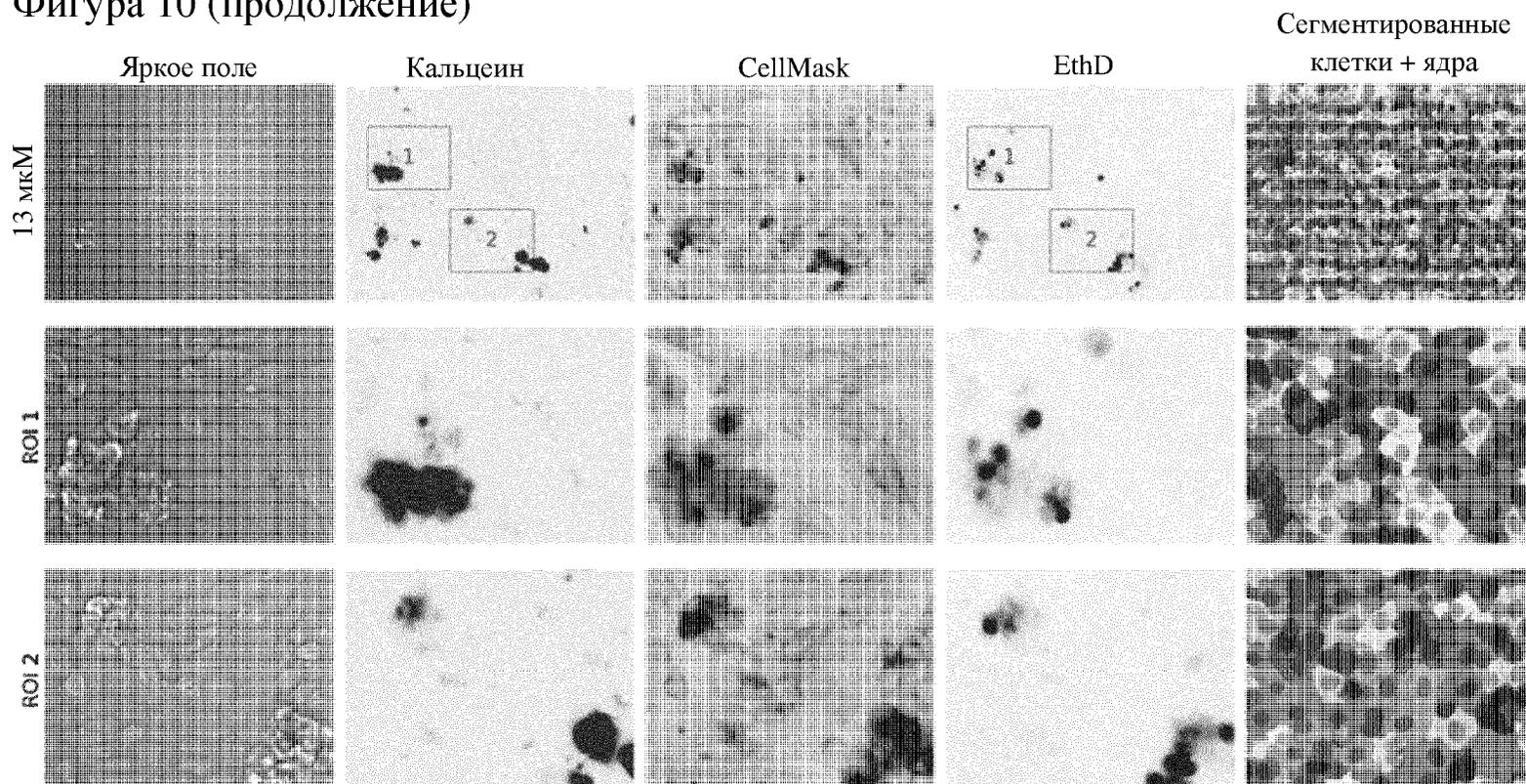
Фигура 10



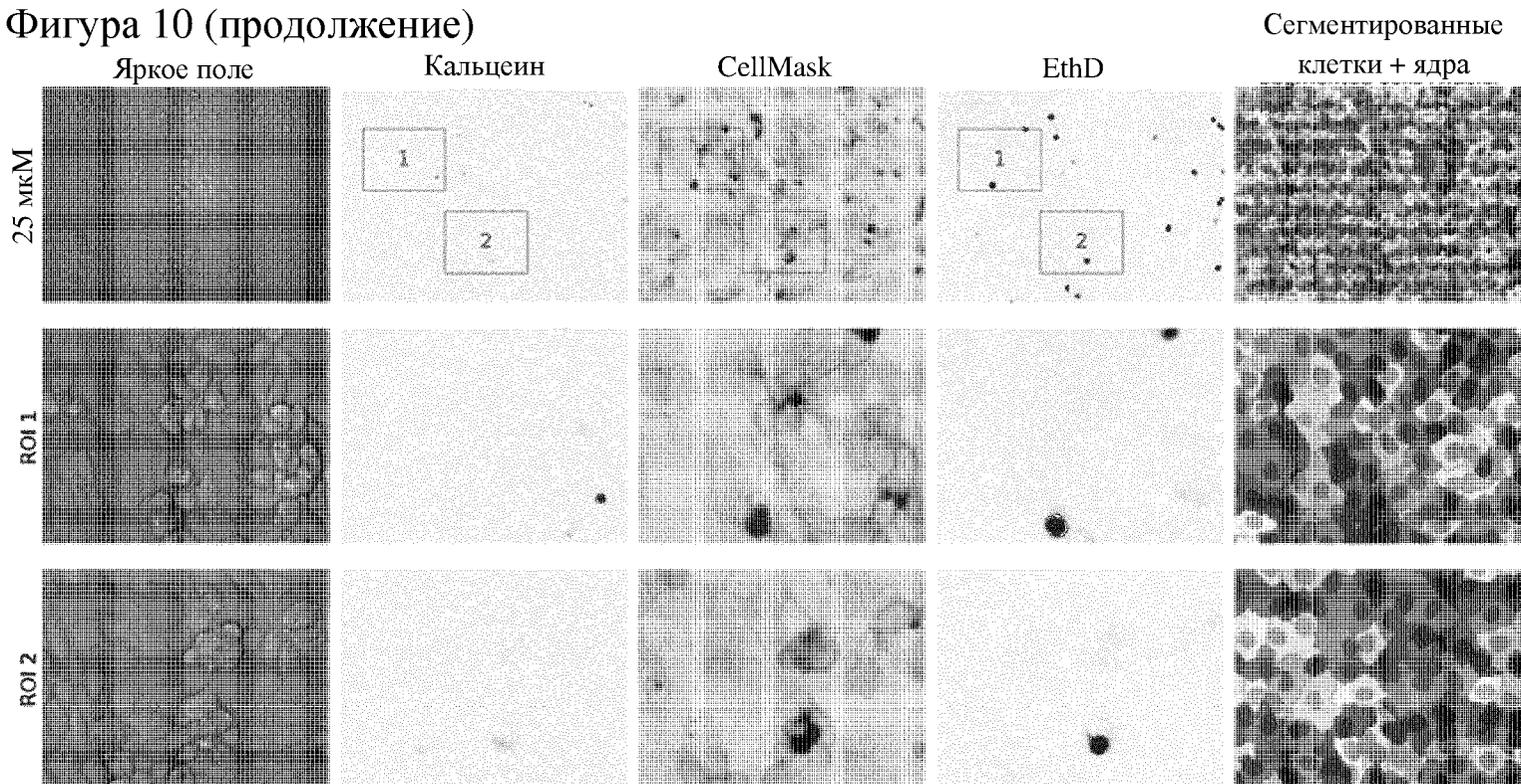
Фигура 10 (продолжение)



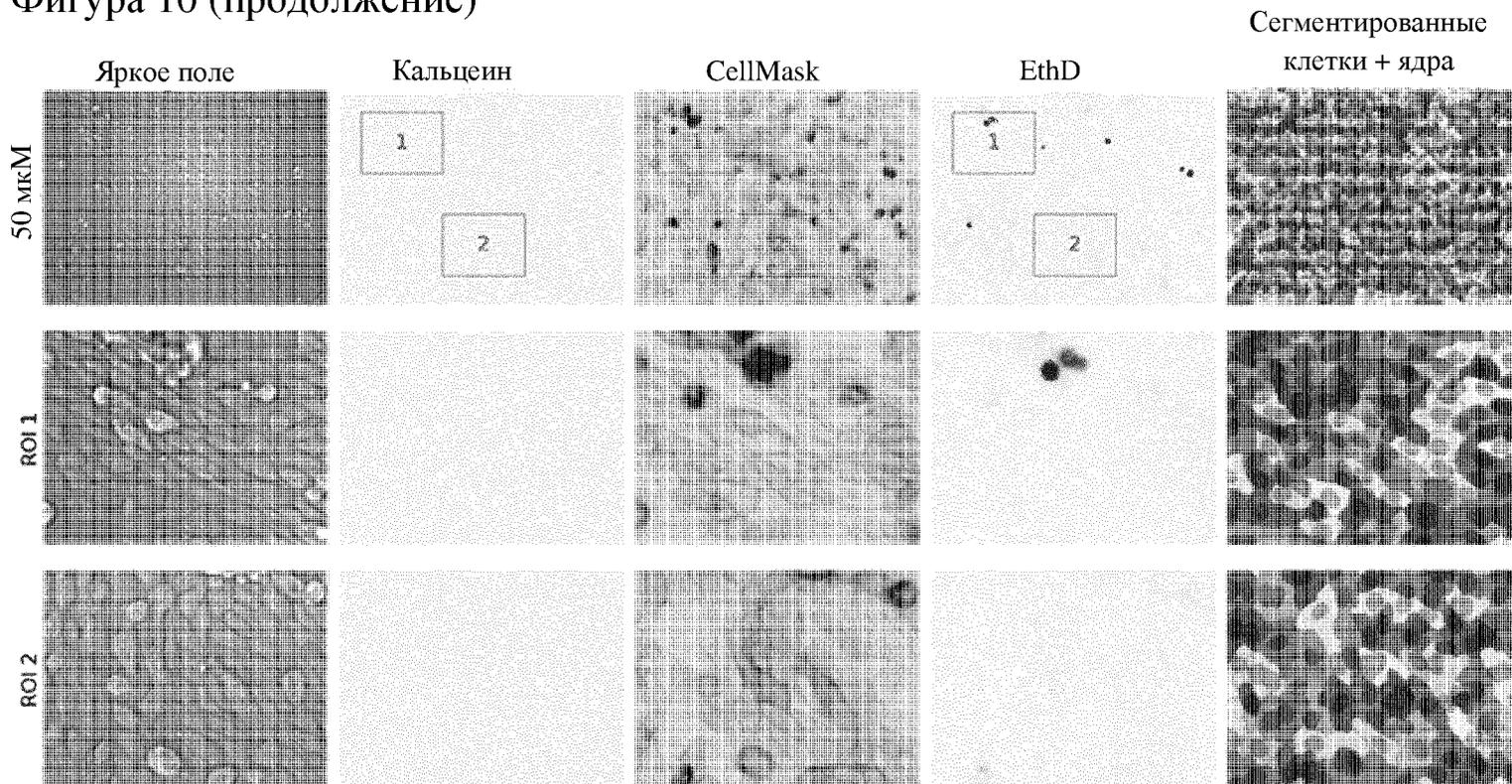
Фигура 10 (продолжение)



Фигура 10 (продолжение)



Фигура 10 (продолжение)



Фигура 10 (продолжение)

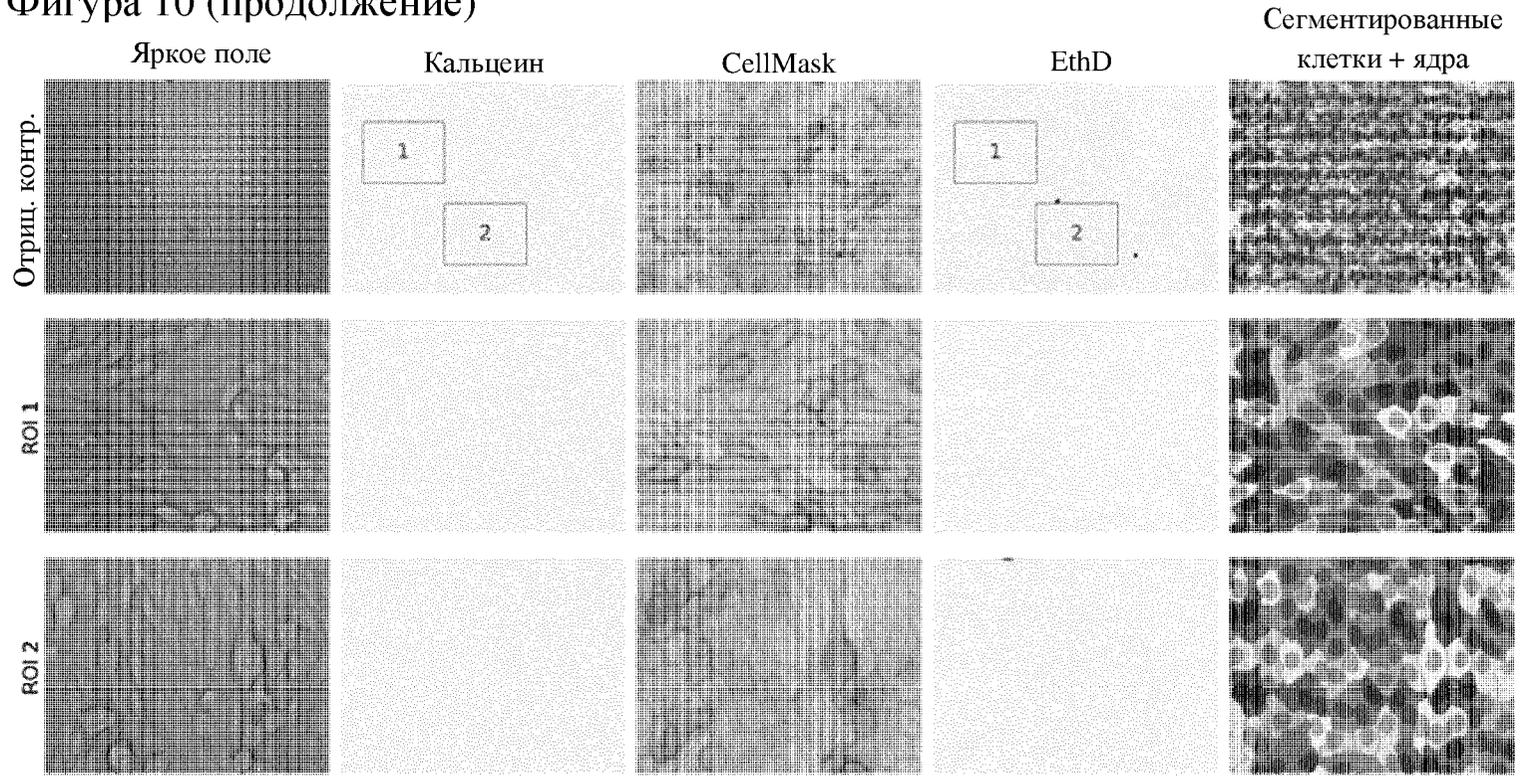


Таблица 1 (фигура 11)

Соединение	Полное подавление (мкМ) Площадь, покрытая CaP < 10% контр.	Подавление агрегации CaP (мкМ) Размер агрегата < 50% контр.
Содействие осаждению CaP		
IP6	-	-
IP5	-	-
OEG ₄ -(IP5) ₂	-	-
Подавление отсутствует		
IS6	-	-
Подавление		
IC6	> 100	100
OEG ₂ -IP5	30	3
OEG ₁₁ -IP5	10	0,3
(OEG ₂) ₂ -IP4	30	3
(OEG ₁₁) ₂ -IP4	10	1
OEG ₈ -(IP5) ₂	30	1

Таблица 2 (фигура 12)

	Уровень фосфата в моче (мг/день)	Уровень фосфата в сыворотке крови (мг/дл)	Уровень кальция в моче (мг/день)	Уровень кальция в сыворотке крови (мг/дл)
NP + среда- носитель	1,87 ± 0,40	6,92 ± 1,06	0,34 ± 0,27	8,6 ± 0,44
NP + (OEG₂)₂-IP4	1,42 ± 0,27	8,68 ± 1,15	0,38 ± 0,19	8,95 ± 0,56
HP + среда- носитель	35,58 ± 3,79	8,55 ± 1,67	0,08 ± 0,01	8,08 ± 0,25
NP + (OEG₂)₂-IP4	32,22 ± 6,59	9,07 ± 1,71	0,11 ± 0,02	8,77 ± 0,41