



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2019.03.29

(21) Номер заявки
201690762

(22) Дата подачи заявки
2014.10.15

(51) Int. Cl. *A61K 31/519* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(54) {4-[5-(3-ХЛОРФЕНОКСИ)ОКСАЗОЛО[5,4-d]ПИРИМИДИН-2-ИЛ]-2,6-ДИМЕТИЛФЕНОКСИ}УКСУСНАЯ КИСЛОТА ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ ИЛИ ЛЕЧЕНИИ ОСТРОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ ПОЧЕК

(31) 13306417.0

(32) 2013.10.15

(33) EP

(43) 2016.07.29

(86) PCT/EP2014/072078

(87) WO 2015/055694 2015.04.23

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
САНОФИ (FR)

(72) Изобретатель:
Бриан Вероник, Гратцер Забине (FR),
Хюбшле Томас (DE), Жаниак Филип
(FR), Кадерайт Дитер (DE), Паркар
Ашфак (US), Пуарье Брюно (FR),
Шефер Маттиас, Вольфарт Паулус
(DE)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2013079358
OKUSA ET AL: "Targeting sphingosine 1
phosphate receptor type 1 receptors in acute kidney
injury", DRUG DISCOVERY TODAY: DISEASE
MECHANISMS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL,
vol. 4, no. 1, 1 March 2007 (2007-03-01), pages 55-59,
XP022391045, ISSN: 1740-6765, DOI: 10.1016/
J.DDMEC.2007.07.001 the whole document

Y-HH LIEN ET AL: "SIP1-selective agonist,
SEW2871, ameliorates ischemic acute renal failure",
KIDNEY INTERNATIONAL, vol. 69, no. 9, 29
March 2006 (2006-03-29), pages 1601-1608,

XP055092368, ISSN: 0085-2538, DOI: 10.1038/
sj.ki.5000360 abstract page 1604, column 2, paragraph
3

Sanna G. et al: "Distinct SIP receptor
subtypes SIP1 and SIP3 respectively regulate
lymphocyte recirculation and heart rate", The
Journal of Biological Chemistry 19 January
2004 (2004-01-19), XP002718008, Retrieved
from the Internet: URL: <http://www.jbc.org/content/early/2004/01/19/jbc.M311743200.full.pdf> [retrieved
on 2013-12-16] page 2, page 12, paragraph 2 - page 13,
paragraph 2, page 15 - page 16, paragraph 1, page 17,
paragraph 2 - page 18, paragraph 1, page 19, paragraph
1-2

P. J. GONZALEZ-CABRERA ET AL: "SIP1
Receptor Modulation with Cyclical Recovery from
Lymphopenia Ameliorates Mouse Model of Multiple
Sclerosis", MOLECULAR PHARMACOLOGY, vol.
81, no. 2, 26 October 2011 (2011-10-26),
pages 166-174, XP055093574, DOI: 10.1124/
mol.111.076109, abstract, page 167, column 1, page
169, column 1, paragraph 2-3, page 169, column 2,
paragraph 2, page 172 - page 173

GERGELY P ET AL: "The selective
sphingosine 1-phosphate receptor modulator BAF312
redirects lymphocyte distribution and has species-
specific effects on heart rate.", BRITISH JOURNAL
OF PHARMACOLOGY NOV 2012, vol. 167, no.
5, November 2012 (2012-11), pages 1035-1047,
XP002718009, ISSN: 1476-5381 page 1036, column
1, paragraph 1, page 1036, column 2, paragraph 2-4,
page 1040, column 2, paragraph 1 - page 1041, column
2, paragraph 2, page 1044, column 2, paragraph 2, page
1045, column 1, paragraph 3 - page 1045, column 2,
paragraph 1

(57) Настоящее изобретение относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения АКІ (острого повреждения почек). Изобретение также относится к лекарственному средству для предупреждения или лечения АКІ, содержащему {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль, и способу лечения АКІ (острого повреждения почек).

Настоящее изобретение относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли при предупреждении или лечении острого повреждения почек (AKI) и фармацевтической композиции на их основе.

Соединение {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота или ее фармацевтически приемлемая соль и способ их получения описаны в патентной заявке WO 2011/086079. Данное соединение характеризуется аффинностью с рецепторами $\text{SIP}_1/\text{EDG1}$.

Острое повреждение почек (AKI), ранее известное как "острая почечная недостаточность", представляет собой частое и потенциально тяжелое нарушение, которое происходит при ряде условий, с клиническими проявлениями, варьирующими от временного повышения креатинина в сыворотке (SCr) до анурической хронической почечной недостаточности. AKI традиционно описывают как внезапное (в пределах 48 ч) понижение почечной функции, которое измеряют по повышению креатинина в сыворотке. Последние руководства KDIGO ("Заболевания почек: улучшение мировых результатов лечения") установили единую позицию относительно диагностических показателей на основе лабораторных и клинических величин, которые перечислены ниже (Working group of ERBP (European Renal Best Practice), 2012, NDT 27: 4263-4272). AKI определяют и устанавливают его стадию по любому из следующих параметров:

повышение SCr на $\geq 0,3$ мг/дл ($\geq 26,5$ мкмоль/л) в пределах 48 ч;

или повышение SCr в $\geq 1,5$ раза от исходного уровня, которое произошло или предполагается как имевшее место в течение 7 дней до этого;

или объем мочи $< 0,5$ мл/кг/ч в течение 6 ч.

AKI имеет место у примерно 7% всех госпитализированных пациентов (Nash et al., 2002, Am J Kidney Dis 39: 930-936) и до 36-67% пациентов в критическом состоянии в зависимости от применяемого определения. Тяжелое AKI имеет место у 4-25% всех поступающих в отделение интенсивной терапии (ICU), и приблизительно 5% пациентов из ICU с AKI нуждаются в заместительной почечной терапии (Hoste et al. 2006, Crit Care 10: R73, Mehta et al., 2004, Kidney Int 66: 1613-1621; Uchino et al., 2005, Jama 294: 813-818; Uchino et al., 2006, Crit Care Med 34: 1913-1917; Ostermann et al., 2007, Crit Care Med 35: 1837-1843). Наиболее распространенными причинами AKI являются сепсис, радикальная хирургия, гиповолемия и лекарственные препараты. Факторы риска развития AKI включают пожилой возраст (> 75 лет), хроническое заболевание почек (CKD, eGFR, расчетная скорость клубочковой фильтрации < 60 мл/мин/1,73м²), атеросклеротическое заболевание периферических сосудов, сердечная недостаточность, заболевание печени, сахарный диабет и нефротоксические лекарственные препараты.

Несмотря на совершенствование превентивных стратегий и вспомогательных мер, AKI остается ассоциированным с высокой распространенностью и смертностью, особенно среди поступающих в ICU, где коэффициент смертности среди госпитализированных может превышать 50%. Помимо коэффициента смертности имеют место хронические последствия, которые включают высокий риск развития хронического заболевания почек (CKD) и ускоренное развитие терминальной стадии заболевания почек (ESRD) (Hsu et al., 2009, Clin J Am Soc Nephrol 4: 891-898; Ishani et al., 2009, JASN 20: 223-228; Coca et al., 2009, Am J Kidney Dis 53: 961-973). Распространенность также ассоциирована с повышенными затратами и повышенной продолжительностью госпитализации.

В медицине имеет место явная нереализованная потребность, поскольку не существует одобренной терапии для предупреждения или для лечения AKI, независимо от этиологии. Контроль состояния является преимущественно поддерживающим при помощи заместительной почечной терапии (RRT) в качестве основного компонента ухода за пациентами с тяжелым AKI. Гидратация остается наиболее подходящей предупредительной мерой для контраст-индуцированной нефропатии (CIN).

Сфингозин-1-фосфат (SIP) является липидными медиатором, который связывается с пятью GPCR (связанными с G-белком рецепторами), называемыми SIP_{1-5} (Brinkman et al., 2007, Pharmacol Ther 115: 84-105). Циркулирующий SIP происходит преимущественно от эндотелиальных клеток, тромбоцитов и эритроцитов и, как обнаружено, связывается на высоком уровне с белками в плазме, в том числе ApoM (аполипопротеином M) в HDL (липопротеинах высокой плотности) (Hammad et al., 2012, J Lipids; Karuna et al., 2011, Atherosclerosis 219: 855-863) и альбумином. SIP_1 широко экспрессируется, в том числе в эндотелиальных, иммунных и эпителиальных клетках почек. SIP_1 регулирует многие физиологические функции, в том числе поддержание целостности эндотелиального барьера (перестройки цитоскелета), клеточный рост, выживаемость, дифференцировку, ангиогенез и направленную миграцию иммунных клеток. SIP_1 характеризуется высоким уровнем экспрессии в мозговом слое (Zhu et al., 2011, Am J Physiol Renal Physiol 301: F35-F41), участке почки, где кровоток и обеспечение кислородом ограничены анатомией канальцево-сосудистой системы, которая служит главным образом для концентрирования мочи. Поскольку клетки в этом участке характеризуются высоким потреблением кислорода, мозговой слой особенно восприимчив к гипоксическому поражению. Кортикальное канальцевое поражение является следствием как повреждения мозгового слоя, так и прямого поражения проксимальных клеток почечных канальцев. Уровень SIP_1 повышается после ишемически-реперфузионного повреждения почек (Awad et al., 2006, Am J Physiol Renal Physiol 290: F1516-F1524), и ожидается, что его активация сохранит почечную функцию посредством следующих трех основных механизмов:

поддержание функции эндотелиального барьера; этот барьер поражен при АКІ, что приводит к нарушению проницаемости сосудов и адгезивных свойств;
ограничение апоптоза проксимальных канальцевых эпителиальных клеток;
снижение инфильтрации воспалительных клеток.

Воспаление при АКІ часто является следствием комбинированного повреждения канальцевых эпителиальных клеток и эндотелиального барьера. Роль пути $S1P-S1P_1$ в регуляции целостности эндотелиального барьера была подробно задокументирована (Wang and Dudek, 2009, *Microvasc Res* 77: 39-45; Mc Verry and Garcia, 2005, *Cell signalling* 17: 131-139; Lucke and Levkau, 2010, *Cell Phys Biochem* 26: 87-96). Активация $S1P_1$ улучшает барьерную функцию эндотелия путем активации пути $PLC/Ca^{2+}/FAK/pRac$ (Belvitch and Dudek, 2012, *Microvasc Res* 83: 22-30). Было показано, что $S1P$, ассоциированный с HDL-АпоМ, пролонгирует барьерную функцию эндотелия путем активации eNOS (Wilkerson et al., 2012, *JBC* 287: 44645-44653; Christoffersen et al., 2011, *PNAS* 108: 9613-9618; Argraves et al., 2008, *JBC* 283: 25074-25081). В этой связи низкие уровни HDL в плазме были ассоциированы с риском развития АКІ у пациентов, проходящих сосудистую хирургию (Miller GJ and Miller NE., 1975, *Lancet* 1:16-19; Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, et al., 1986, *JAMA*; 256:2835-2838).

Глобальная или эндотелиально-специфичная делеция $S1P_1$ индуцирует летальность на эмбриональной стадии в связи с сильным кровотечением, поражающим ряд органов (Kono et al., 2004, *JBC* 279: 29367-29373). Идентичные патологии наблюдают у нокаутных мышей с удалением ферментов, ответственных за биосинтез $S1P$ (сфингозинкиназ 1 и 2) (Mizugishi et al., 2005, *Mol Cell Biol* 25: 11113-11121). Аналогичным образом антагонисты $S1P_1$ также увеличивают проницаемость сосудов. Несмотря на экстренные защитные эффекты функциональных антагонистов $S1P_1$ в моделях АКІ (Bajwa et al., 2010, *JASN* 21: 955-965; Awad et al., 2006, *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F1516-F1524), длительное лечение при помощи таких функциональных антагонистов $S1P_1$ существенно ухудшает пропотевание жидкости из сосудов в моделях повреждения легких и нарушает целостность эндотелиального барьера *in vitro* (Shea et al., 2010, *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 662-673). Подобные эндотелиальные патологии также имитируют на мышцах без $S1P_1$ (Camerer et al., 2009, *JCI* 119: 1871-1879).

У пациентов и в моделях АКІ цитокины по типу $TNF-\alpha$ высвобождаются из эндотелиальных клеток и активируют выработку молекул адгезии, таких как ICAM-1, VCAM-1 и P/E-селектины, которые способствуют инфильтрации воспалительных клеток в тубуло-интерстициальной паренхиматозной ткани (Bonventre et al., 2003, *JASN* 14: 2199-2210; Singbartl et al., 2000, *Crit Care Med* 28: 2507-2514; Sadik et al., 2012, *Mol Cell Biochem* 359: 73-81). Более того, в культивированных человеческих эндотелиальных клетках некоторые из таких эндотелиальных молекул адгезии активируются после гипоксии/реоксигенации (Lutz et al., 2008, *J Mol Med* 86: 1329-1339). Активация $S1P_1$ подавляет выработку таких молекул адгезии и, таким образом, уменьшает инфильтрацию воспалительных клеток (Lien et al., 2006, *Kidney Int* .69: 1601-1608). Основная роль $S1P$ в сохранении эндотелиальной функции при остром повреждении почек была продемонстрирована при помощи условного удаления эндотелиального рецептора $S1P_1$ у мышей (Ham A., 2013, *Kidney Int*, Sept).

Стимулирование $S1P_1$ активирует эндотелиальную синтазу оксида азота (eNOS) путем фосфорилирования Akt, которая является ключевым ферментом, регулирующим локальное расширение сосудов посредством выработки NO (Morales-Ruiz et al., 2001, *JBC* 276: 19672-19677; Igarashi et al., 2000, *JBC* 275: 32363-32370; Igarashi et al., 2008, *BBA* 1781: 489-495). Таким образом, $S1P$ индуцирует расширение сосудов в эндотелии и NO-зависимый характер действия (Roviezzo et al., 2006, *FASEB J* 20: 340). NO оказывает защитный эффект на функцию почек в животных моделях I/R-индуцированного АКІ (Garcia-Criado et al., 1998, *Transplantation* 66: 982-990). У крыс ингибирование eNOS уменьшает почечный кровоток на 35% со связанными понижениями GFR и повышенным почечным сосудистым сопротивлением (Cao et al., 2010, *Am J Physiol Renal Physiol* 299: F1056-F1064). $S1P$ считается одним из наиболее эффективных активаторов эндотелиального оксида азота, который известен как улучшающий локальный кровоток, но также как ограничивающий активацию тромбоцитов и сосудистый застой, в частности в уязвимой кортикомедуллярной зоне. Этот механизм может быть важным для сохранения функции почек при АКІ. Важно отметить, что уменьшенная биологическая доступность оксида азота ассоциирована с АКІ у пациентов с сердечно-легочным шунтированием (CPB) и у пациентов с сепсисом (Lema et al., 2009, *J Cardio Thorac Vasc Anesth* 23: 188-194; Sadik et al., 2012, *Mol Cell Biochem* 359: 73-81). Интересно то, что полиморфизм 786C в промоторе eNOS человека демонстрирует уменьшенную транскрипционную активность и ассоциирован с дисфункцией почек у пациентов, подвергающихся кардиохирургии, связанной с сердечно-легочным шунтированием (Popov et al., 2009, *Eur J Cardio-Thorac Surgery* 36: 651-656; Nakayama et al., 1999, *Circulation* 99: 2864-2870). Частота полиморфизма составляет около 50% и может быть представлена у значительной субпопуляции, которая не только в большей степени подвержена риску развития АКІ, а также более чувствительна к лечению, которое восстанавливает уровни локального NO, например через активацию $S1P_1$.

Более того, активация $S1P_1$ непосредственно ограничивает апоптоз проксимальных канальцевых эпителиальных клеток посредством активации путей выживания с участием pERK и pAkt. Специфическое удаление $S1P_1$ в проксимальных канальцевых эпителиальных клетках ослабляет дисфункцию почек

после ишемически-реперфузионного повреждения (Bajwa et al., 2010, JASN 21: 955-965), а также некроз канальцев, что подчеркивает характер эндогенного S1P как амортизирующего тяжесть реперфузионного повреждения. Эти данные подчеркивают важность защитной роли системы S1P-S1P₁ при AKI, как по эндотелиальному, так и эпителиальному направлениям.

S1P ответственен за выход лимфоцитов из лимфоузла в кровь посредством активации S1P₁. Эта активация S1P₁ вызывает интернализацию рецепторов с последующей рециркуляцией рецептора обратно на поверхность клетки, обеспечивая реактивацию. Тем не менее полагают, что функциональные антагонисты или антагонисты S1P₁ вызывают развитие лимфопении в результате либо ингибирования рециркуляции интернализированных рецепторов S1P₁ обратно на поверхность клетки, либо блокировки активации S1P₁, и в результате вызывают значительные и длительные снижения уровня S1P₁ на поверхности клеток. Вследствие этого последние средства демонстрируют большое и длительное снижение уровней лимфоцитов в крови, наблюдаемое в доклинических и клинических испытаниях.

В нескольких сообщениях указано, что в остром повреждении почек принимают участие Т лимфоциты. Наблюдение, что повреждение уменьшается при снижении уровня Т клеток и восстанавливается при адоптивном переносе CD4⁺ Т клеток, свидетельствует о том, что оно зависит от CD4⁺ Т клеток (Burne et al., 2001, J. Clin Invest 108: 1283-1290; Ysebaert et al., 2004, Kidney Int 66: 491-496). Поэтому неудивительно, что функциональные антагонисты S1P₁, в том числе финголимод и SEW2871, оказывают защитный эффект в моделях острого повреждения почек в лимфопенических дозах (Lien et al., 2006, Kidney Int 69: 1601-1608).

Тем не менее, лимфопения является предрасполагающим фактором развития оппортунистических инфекций, в частности у очень чувствительных, ослабленных пациентов, таких как пациенты, подверженные высокому риску AKI (пожилой возраст, заболевания сердца, диабет и хроническое заболевание почек). Вследствие этого существует необходимость в селективном агонисте S1P₁, который индуцирует развитие ограниченной лимфопении или, в лучшем случае, не индуцирует развитие лимфопении и обладает терапевтической пользой при лечении AKI. К удивлению, соединение {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота отличается от других модуляторов S1P₁ тем, что оно оказывает защитный эффект от AKI у млекопитающих в дозах, которые являются не вызывающими развитие лимфопении. Полагают, что это свойство {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты можно отнести к ее специфическому агонизму на рецепторе S1P₁ с минимальными функциональным антагонизмом или десенсибилизирующими эффектами. Это может быть значительным преимуществом в отношении клинической безопасности для применения {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты при лечении AKI.

Краткое описание настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения AKI (острого повреждения почек).

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли, где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота не индуцирует развитие лимфопении при введении защитной от AKI дозы и индуцирует развитие ограниченной лимфопении при введении более высокой дозы.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли в качестве не вызывающего развитие лимфопении средства при предупреждении или лечении AKI.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения AKI без лимфопенического эффекта при введении защитной от AKI дозы.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли, которое описано выше, где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота оказывает защитный эффект от AKI при введении не вызывающей развитие лимфопении дозы.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения AKI (острого повреждения почек), где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота является селективным агонистом S1P₁, который не индуцирует десенсибилизацию рецепторов.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазол[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения AKI (острого повреждения почек), где {4-[5-(3-хлорфенокси)-

оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота является селективным агонистом $S1P_1$, не вызывающим развитие лимфопении при защитных от АКІ дозах.

Настоящее изобретение также относится к применению {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли без лимфопенического эффекта при предупреждении или лечении АКІ.

Настоящее изобретение также относится к лекарственному средству, содержащему в качестве активного ингредиента {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль.

Настоящее изобретение также относится к применению фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемый наполнитель, для применения при предупреждении или лечении АКІ.

Настоящее изобретение также относится к изделию, содержащему упаковочный материал;

фармацевтическую композицию, содержащую {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль в качестве активного ингредиента и фармацевтически приемлемый наполнитель;

этикетку или листок-вкладыш, помещенные в упаковочный материал, на которых указано, что пациента можно лечить от АКІ при помощи данной фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения АКІ у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения АКІ у нуждающегося в этом пациента, предусматривающему введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли, где лечение является профилактическим.

Настоящее изобретение также относится к изделию, где на этикетке или листке-вкладыше, помещенных в упаковочный материал, указано, что пациента можно лечить от АКІ при помощи упомянутой выше фармацевтической композиции без лимфопенического эффекта.

Настоящее изобретение также относится к изделию, где на этикетке или листке-вкладыше, помещенных в упаковочный материал, указано, что пациента можно лечить от АКІ при помощи упомянутой выше фармацевтической композиции без лимфопенического эффекта, где лечение является профилактическим.

Определения

Для удобства и для облегчения прочтения соединение {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота было переименовано в "соединение А" в разделах настоящей заявки и на фигурах.

Для целей настоящего изобретения следующие слова следует понимать так, как описано ниже.

Селективный агонист $S1P_1$ представляет собой соединение, которое является более активным на $S1P_1$ по сравнению с другими 4 рецепторами $S1P$, $S1P_{2-5}$. В дополнение к этому, соединение должно обладать минимальной активностью или вовсе не обладать активностью в широком спектре анализов с рецепторами, ферментами и ионными каналами.

Лимфопения представляет собой состояние с аномальным падением уровня лимфоцитов в крови, лейкоцитов с важными функциями в иммунной системе. У взрослых уровень лимфоцитов ниже 1500 клеток/мкл является диагностическим (подтверждением состояния), а у детей диагностическим является уровень лимфоцитов ниже 3000 клеток/мкл.

Лимфопения, опосредованная активацией $S1P_1$, относится к лимфопеническому состоянию, вызванному при помощи модулятора $S1P_1$. Поскольку $S1P$ ответственен за $S1P_1$ -опосредованный выход лимфоцитов из лимфоузла в кровь, полагают, что более поздние средства вызывают развитие лимфопении в результате либо ингибирования рециркуляции интернализированных рецепторов $S1P_1$ обратно на поверхность клеток, либо блокировки активации $S1P_1$.

Ограниченная лимфопения представляет собой временное снижение уровня лимфоцитов в крови (абсолютного содержания лимфоцитов, выходящего за пределы нормального диапазона до лечения). Временный относится ко временному изменению уровня лимфоцитов, который возвращается к нормальному диапазону в пределах 24 или 48 ч.

Понятия "не вызывающий развитие лимфопении" или "отсутствие лимфопении" относятся к отсутствию временного или длительного снижения уровня лимфоцитов в крови (абсолютного содержания лимфоцитов, выходящего за пределы нормального диапазона до лечения). Временный относится ко временному изменению уровня лимфоцитов, который возвращается к нормальному диапазону в пределах 24 ч, тогда как длительный относится к снижению, которое сохраняется дольше 24 ч.

Защитная от АКІ доза - доза {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-

диметилфенокси}уксусной кислоты, которая обеспечивает значительное снижение уровня креатинина в плазме, составляющее по меньшей мере 30%.

Применяемое в настоящем документе понятие "терапевтически эффективное количество" означает количество фармацевтического соединения, такого как {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота, которое оказывает влияние на АКІ.

Термин "пациент" означает пациента-человека.

Профилактический - тот, который служит для предупреждения или защиты от нежелательного эффекта и направлен на предупреждение проявления медицинского состояния, особенно заболевания.

Первым вариантом осуществления является {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота или ее фармацевтически приемлемая соль для применения при предупреждении или лечении АКІ, где {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота является не вызывающей развитие лимфопении при защитных от АКІ дозах.

Вторым вариантом осуществления является {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота или ее фармацевтически приемлемая соль для применения при предупреждении или лечении АКІ, где защитные эффекты опосредованы активацией S1P₁ без индуцирования развития лимфопении.

Другой вариант осуществления представляет собой изделие, которое описано выше, где на этикетке или листке-вкладыше, помещенных в упаковочный материал, указано, что пациентов, получающих лечение при помощи упомянутой выше фармацевтической композиции, можно лечить от АКІ без индукции развития лимфопении.

Сокращения.

AKI - острое повреждение почек.

ApoM - аполипопротеин М.

CIN - контраст-индуцированная нефропатия.

CKD - хроническое заболевание почек.

DMSO - диметилсульфоксид.

ERBP - европейские стандарты по надлежащей практике лечения почек (European Renal Best Practice).

eGFR - расчетная скорость клубочковой фильтрации.

eNOS - эндотелиальная синтаза оксида азота.

ESRD - терминальная стадия заболевания почек.

FlipR - спектрофотометр для чтения планшетов для визуализации флуоресценции.

GPCRs - связанные с G-белком рецепторы.

HDL - липопротеины высокой плотности.

HDMEC - клетки микрососудистого эндотелия кожи человека.

HSC - звездчатые клетки печени.

ICU - отделение интенсивной терапии.

I/R - ишемия/реперфузия.

KDIGO - "Заболевания почек: улучшение мировых результатов лечения".

PBS - фосфатный буферный раствор.

RRT - заместительная почечная терапия.

S1P - сфингозин-1-фосфат.

S1P₁ - сфингозин-1-фосфат 1.

SCr - сывороточный креатинин.

s.e.m - стандартная ошибка среднего.

Примеры.

Приведенные далее примеры дополнительно иллюстрируют настоящее изобретение и не предназначены для ограничения настоящего изобретения. Для удобства и для облегчения прочтения соединение {4-[5-(3-хлорфенокси)-оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота было переименовано в "соединение А" на фигурах и в разделе "Результаты".

Были проведены статистические анализы и расчет р-значений, и на фигурах их обозначали символами либо "*", либо "#" в зависимости от экспериментальных условий.

Фиг. 1 - эффект однократного или повторяемого введения соединения А и/или BAF-312 в крысиной модели ишемии-реперфузии (I/R). Крыс линии Fischer подвергали мнимой операции или 25 мин билатеральной обтурации почечной артерии и измеряли уровень креатинина в плазме после 24 ч реперфузии. Фиг. 1-А - соединение А оценивали в количестве 0,3, 1 и 3 мг/кг п.о., которое давали за 1 ч до обтурации. Фиг. 1-В - BAF-312 оценивали в количестве 3, 10 и 30 мг/кг п.о., которое давали за 1 ч до обтурации. Контрольной группе без соединения давали носитель за 1 ч до обтурации. *** p<0,001 - группа с I/R, обработанная носителем, в сравнении с группой мнимой операции. # p<0,05; ## p<0,01 - группа обработанных соединением в сравнении с группой носителя. Столбцы представляют собой среднее +/- s.e.m. Фиг.

1-С - образцы почек собирали для оценки эффекта от соединения А на содержание кортикального альбумина после I/R-повреждения у крыс. Альбумин измеряли посредством вестерн-блоттинга в кортикальной области иллюстративных почек от подвергнутых мнимой операции крыс, крыс с I/R, обработанных носителем, или крыс с I/R, обработанных соединением А (3 мг/кг п.о.). Фиг. 1-D - соединение А (3 мг/кг п.о.) или носитель вводили два раза в день в течение 5 дней. Последнее введение производили за 1 ч до обтурации. ** $p < 0,01$ - группа с I/R, обработанная носителем, в сравнении с группой мнимой операции. ### $p < 0,001$ - группа обработанных соединением А в сравнении с группой носителя. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 2 - эффект от соединения А на индуцированное рабдомиолизом повреждение от АКІ у мышей. Соединение А (0,3, 1, 3 и 10 мг/кг) или носитель вводили перорально за 1 ч до внутримышечной инъекции (в задние конечности) глицерина (50% в PBS объем/объем) в количестве 8 мл/кг самцам мышей CD1. Группа мнимой операции получала соответствующий объем PBS. Уровень креатинина в плазме оценивали 24 ч спустя. ** $p < 0,01$ - группа глицерина-носителя в сравнении с группой мнимой операции. # $p < 0,05$ - группа обработанных соединением А в сравнении с группой, обработанной носителем. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 3 - лимфоциты периферической крови у крыс линии Fischer после однократного введения (фиг. 3-A) или у крыс линии Sprague-Dawley после (фиг. 3-B) однократного введения или (фиг. 3-C) повторяемого введения. Соединение А вводили перорально в количестве либо 1, 3, 10 и 30 мг/кг крысам линии Fischer, либо 3 мг/кг крысам линии Sprague-Dawley. BAF-312 давали перорально в количестве либо 1 и 10 мг/кг крысам линии Fischer, либо 3 мг/кг крысам линии Sprague-Dawley ($n=8$). При протоколе повторяемого введения соединения вводили на протяжении 5 дней дважды в день. Лимфоциты крови представляли либо в виде площади под кривой (AUC) (фиг. 3-A), либо в виде процента от общего количества лейкоцитов в каждый момент времени (фиг. 3-B/C) и представляли как среднее $\pm$ s.e.m. ** $p < 0,01$ в сравнении с исходным уровнем.

Фиг. 3-D - взаимосвязь между защитой от АКІ и лимфопенией у крыс линии Fischer. Отмечены столбцы, которые указывают на отсутствие лимфопении и полную защиту от АКІ для соединения А в количестве 3 мг/кг, в то время как BAF-312 был лимфопеническим и демонстрировал частичную защиту от АКІ.

Фиг. 4 - лимфоциты периферической крови у мышей C57B16/J.

Соединение А вводили в количестве 1, 3, 10 и 30 мг/кг п.о. ($n=8$). Количество лимфоцитов крови в каждый момент времени выражено как процент от общего количества лейкоцитов и представлено как среднее $\pm$ s.e.m. *** $p < 0,001$ в сравнении с исходным уровнем.

Фиг. 5 - лимфоциты периферической крови у собак породы бигль. Получали исходные количества лимфоцитов, а затем собакам вводили однократную пероральную дозу соединения А в количестве 3, 10 и 30 мг/кг ($n=8$) или BAF-312 в количестве 10 мг/кг ($n=4$). За животными наблюдали на протяжении 7 дней (фиг. 5-A), а в случае BAF-312 на протяжении периода до 66 дней (фиг. 5-B). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с исходным уровнем. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m. Следует отметить, что соединение А не индуцировало никакой значительной лимфопении в любой из моментов времени при измерениях для дозы 3 мг/кг.

Фиг. 6 - пропотевание жидкости из сосудов легких у здоровых мышей C57B16/J и крыс линии Fischer. Мышей обрабатывали на протяжении 7 дней при помощи соединения А (3 и 10 мг/кг п.о. дважды в день), BAF-312 (1 и 3 мг/кг п.о. дважды в день) и финголимода (0,1 и 1 мг/кг п.о. дважды в день), $n=5-8$. Фиг. 6-A - проницаемость сосудов оценивали по просачиванию красителя Evans синий. Фиг. 6-B - масса легкого. Крыс обрабатывали на протяжении 7 дней при помощи соединения А (1, 3, 10, 30 и 100 мг/кг п.о. дважды в день) и BAF-312 (0,03, 0,1, 0,3, 3 и 30 мг/кг п.о. дважды в день). Фиг. 6-C - проницаемость сосудов оценивали по просачиванию красителя Evans синий. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем (без соединения) для мышей или носителем (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80, 0,5% в воде) для крыс. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 7 - десенсибилизация рецептора $5P_1$ на клетках микрососудистого эндотелия кожи человека (HDMEC) при помощи анализа сопротивления. HDMEC 1-й раз стимулировали на протяжении 1 ч при помощи либо $5P_1$ (1 мкМ), либо финголимода (100 нМ), либо соединения А (1 мкМ) с последующим 30 мин периодом вымывания. Эффект 1-го стимулирования на десенсибилизацию рецептора оценивали при помощи 2-го стимулирования $5P_1$ (3 концентрации) и измерения полученного в итоге сопротивления ($n=3$ эксперимента). Все концентрации 1-го стимулирования составляли $>EC_{90}$. Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 8 - десенсибилизация рецептора $5P_1$ на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC) при помощи анализа сопротивления. HUVEC 1-й раз стимулировали на протяжении 1 ч при помощи либо $5P_1$ (1 мкМ), соединения А (1 мкМ), финголимода (100 нМ) либо SEW2871 (1 мкМ) с последующим 30 мин периодом вымывания. Эффект 1-го стимулирования на десенсибилизацию рецептора оценивали при помощи 2-го стимулирования $5P_1$ (4 концентрации) и измерения полученного в итоге сопротивления ($n=3$ эксперимента). Все концентрации 1-го стимулирования составляли $>EC_{90}$. Столбцы

представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 9 - десенситизация рецептора S1P₁ на клетках CHO, сверхэкспрессирующих S1P₁ (гибридный G-белок), при помощи анализа с FlipR. Фиг. 9-A - протокол предусматривал пятиминутное 1-е стимулирование при помощи S1P (100 нМ), соединения A, финголимода, BAF-312, понесимода в указанных концентрациях. Все концентрации 1-го стимулирования выбирали так, чтобы они составляли $>EC_{50}$. После различных периодов вымывания десенситизацию рецептора оценивали путем 2-го стимулирования при помощи S1P (100 нМ). Фиг. 9-B - индуцированную S1P реакцию FlipR, выраженную как процент основной реакции, отображали для каждого соединения с различными периодами вымывания (от 15 до 60 мин, n=4 эксперимента). Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 10 - десенситизация рецептора S1P₁ в звездчатых клетках печени человека (HSC) при помощи анализа с FlipR. Фиг. 10-A - протокол предусматривал 1-е стимулирование при помощи соединения A (10 мкМ) или BAF-312 (300 нМ). Все концентрации 1-го стимулирования выбирали так, чтобы они составляли $>EC_{50}$. После периодов вымывания либо в 1 ч, либо в 3 ч десенситизацию рецептора оценивали при помощи 2-го стимулирования таким же соединением. Фиг. 10-B - индуцированную соединением A или BAF-312 реакцию FlipR, выраженную в виде единиц флуоресценции, отображали для каждого соединения с различными периодами вымывания (n=3 эксперимента). Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Фиг. 11 - динамика S1P в плазме после I/R-повреждения у мышей C57B16/J. Уровни S1P в плазме (набор Elisa от Echelon) оценивали после мнимой операции или после 22 мин билатеральной обтурации почечной артерии с последующей реперфузией. Контрольную группу (CTRL) не подвергали оперативному вмешательству. ### $p < 0,001$ в сравнении с группой мнимой операции (сочетаемые по времени). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ в сравнении с контролем (CTRL). Столбцы представляют собой среднее $\pm$ s.e.m.

Способы

Материалы.

Финголимод и SEW2871 являются коммерчески доступными. BAF-312 и понесимод синтезировали в соответствии с опубликованными способами в WO 04/103306 для BAF-312, WO 05/054215 для понесимода.

Соединение A синтезировали в соответствии со способами, описанными в патентном документе WO 2011/086079.

Все исследования *in vivo* осуществляли в соответствии со стандартами европейского сообщества по уходу и применению лабораторных животных и одобрением комитетом по уходу и применению животных Sanofi Research & Development.

Статистические анализы.

Исходя из нормальности распределения и однородности дисперсии (критерий Левена) использовали критерий Стьюдента или критерий Уилкоксона для сравнения группы мнимой операции/контрольной группы с обрабатываемой носителем группой с целью определения различий оцениваемого параметра. Затем осуществляли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) или двухфакторный ANOVA при помощи программного обеспечения Everst@t V6 для сравнения группы, обработанной носителем, с группой(группами), обработанной(ыми) соединением. При необходимости за данным первичным анализом следовал апостериорный тест Даннетта. В случае неоднородности дисперсии применяли критерий Крускала-Уоллиса. Различия между группами считали значимыми, если $p < 0,05$.

1. Безопасность для сердечно-сосудистой функции.

а) Анализ hERG.

Рекомбинантную линию клеток CHO (яичник китайского хомячка), экспрессирующую ERG (ген специфических калиевых каналов сердца человека) калиевого канала человека (номер по каталогу Cyto-тех: CYL3002), культивировали в соответствии с приведенным далее протоколом. В случае необходимости культуру восстанавливали из замороженных аликвот. Аликвоты замороженных клеток (1 мл) быстро нагревали до 37 °C и сперва пересевали на матрас в 75 см² (Corning). Затем объем доводили до 10 мл при помощи α -минимально обогащенной среды (Gibco 32571-028), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Среду обновляли спустя 24 ч и добавляли 1% генетицина (G418, Gibco 10131) для предупреждения клеточной дифференцировки. Спустя два или три дня клетки высевали в количестве $1,5 \times 10^6$ клеток на матрас T25. Матрасы помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 37 °C на 1 ч, после чего их помещали в инкубатор с 5% CO₂ при 28 °C на 2 дня. Процедуру для выделения клеток осуществляли после 2 дней инкубирования при 28 °C. Клетки собирали при помощи Accumax (Sigma; 1:4) или версена (Gibco) и помещали во внеклеточную среду.

На клетки выливали внеклеточный раствор PATCH (NaCl, 138 mM; KCl, 4 mM; CaCl₂, 1,8 mM; MgCl₂, 1 mM; глюкоза, 5,6 mM, HEPES, 10 mM). Доводили pH до 7,3 при помощи NaOH. Осмолярность доводили до 285 мосмоль. Внутренний раствор готовили следующим образом: KCl, 60 mM; KF, 70 mM; NaCl, 15 mM; HEPES, 5 mM; EGTA(K), 5 mM; pH доводили до 7,25 при помощи KOH. Осмолярность доводили до 290 мосмоль.

Ток hERG активировали в ответ на скачки напряжения (2 с) от исходного потенциала -80 мВ до тестового потенциала +20 мВ с последующей реполяризацией до -100 мВ. Скачки напряжения применяли с 20-секундными интервалами. Ток hERG измеряли как следовой дезактивирующий ток при -100 мВ. После 3-минутного периода измерений на исходном уровне измеряли эффекты соединения А через 4-6 мин после замены раствора. В конце каждого эксперимента вливание специфического блокатора для hERG, т.е. респеридона (который характеризуется IC_{50} приблизительно 0,7 мкМ), в концентрации 10 мкМ позволяло измерять 100% ингибирование hERG.

Токи анализировали при помощи базы данных и аналитического программного обеспечения DataXpress 1.0 (Axon Instruments/Molecular Devices). Линейный подсчет токов экстраполировали из периода измерения на исходном уровне, а процент ингибирования тока hERG после эффекта от лекарственного средства рассчитывали следующим образом:

процент ингибирования тока hERG (%) = $100 - [(I - I_{\text{респеридон}}) / (I_{\text{исходный уровень}} - I_{\text{респеридон}})] \times 100$,

где "I" представляло собой ток, измеренный после эффекта от лекарственного средства, "I-респеридон" представляло собой ток, измеренный после эффекта от специфического блокатора для hERG, и "Исходный уровень" представляло собой ток, измеренный до вливания лекарственного средства.

б) Анализ волокон Пуркинье кролика.

Эффекты соединения А на параметры мембранного потенциала покоя и потенциала действия, записанные от выделенных волокон Пуркинье кролика (самец, новозеландские кролики, от 1,3 до 1,5 кг, возрастом 9-12 недель), оценивали с помощью микроэлектродной методики. Измеряли следующие параметры: потенциал покоя (RP в мВ), амплитуду потенциала действия (APA в мВ), максимальную скорость роста потенциала действия ($V_{\text{макс}}$ в В/с), продолжительность потенциала действия при 50 и 90% реполяризации (APD₅₀ и APD₉₀ в мс). На волокна выливали кислородсодержащий физиологический раствор, содержащий (в ммоль/л): NaCl, 120; KCl, 4; MgCl₂, 1; NaH₂PO₄, 1,8; NaHCO₃, 25; глюкоза, 11; CaCl₂, 1,8; pH=7,4 при 36±1°C. Соединение А сначала растворяли в DMSO с получением маточного раствора с концентрацией 12 ммоль/л. Этот раствор дополнительно разводили в DMSO и затем вносили в физиологический раствор с получением соответствующих номинальных концентраций 0,3, 1, 3, 10 и 30 мкмоль/л (т.е. соответственно 0,1, 0,5, 1,4, 4,5 и 13,6 мкг/мл активного ингредиента). Итоговая концентрация DMSO в тестируемом составе сохранялась постоянной на уровне 0,25% (объем/объем) в физиологическом растворе. На волокна Пуркинье (n=4) сначала выливали физиологический раствор. После 30-минутного контрольного периода тестируемое соединение оценивали при последовательно применяемых повышающихся концентрациях каждые 30 мин. Для каждой тестируемой концентрации волокна стимулировали с основной частотой 1 импульс/с (1 Гц). В дополнение к этому частоту стимулирования снижали от 1 импульса/с (1 Гц) до 1 импульса каждые 4 с (0,25 Гц) на 3 мин, повышали снова до 1 импульса/с на 1 мин и в итоге повышали до 3 импульсов/с (3 Гц) на дополнительные 2 мин (между 19-й и 25-й минутами), как описано ниже.

ВРЕМЯ (мин.)	19	3	1	2	5	19	3	1	2	5	19
Частота стимулирования (Гц)				3					3		
	1		1		1	1		1		1	1
		0,25					0,25				
	Контрольный период (30 мин.)					Соединение, 1 ^я концентрация (30 мин.)					2 ^я Конц (30 мин.)

Низкую частоту стимуляции применяли для содействия возникновению аномальных электрических явлений в течение фазы реполяризации потенциала действия и для содействия развитию ранних постдеполяризаций (EAD). Высокую частоту стимуляции применяли для оценки зависимой от применения блокады натриевых каналов. После наивысшей концентрации снова выливали физиологический раствор для оценки обратимости эффекта от лекарственного средства (вымывание).

с) Телеметрические исследования на собаках.

Целью этого исследования была оценка потенциального эффекта соединения А на сердечно-сосудистую функцию (давление крови, скорость сердцебиения и ECG) у бодрствующих собак с измеряемыми телеметрическими данными на протяжении 24-часового периода после введения дозы.

Бодрствующие собаки в условиях свободного поведения (Marshall Farms, n=4, 2 кобеля и 2 суки с массой тела от 6,9 до 10,8 кг и возрастом от 44 до 64 месяцев) получали пероральную или внутривенную дозу продукта, выступающего в роли отрицательного контроля, (т.е. водный раствор 0,5% (масса/масса) гидроксипропилцеллюлозы/0,6% (масса/масса) полисорбата 80 пероральным путем или водный раствор 20% каптизола, pH от 7,5 до 8, с последующим получением соединения А в количестве 30 и 100 мг/кг пероральным путем как суспензии в группе продукта, вступающего в роли отрицательного контроля, или 10 и 30 мг/кг внутривенным путем как раствор в группе продукта, выступающего в роли отрицательного контроля, в соответствии со схемой исследования с повышающейся дозой по меньшей мере с 4-дневным периодом вымывания между каждым введением (5 мл/кг пероральным путем или на протяжении 30 мин вливания в яремную вену). Давление артериальной крови и II отведение ECG (датчики от Data Science,

США) непрерывно записывали на каждый день обработки от приблизительно 2 ч до введения дозы и до 24 ч после введения дозы. Анализировали следующие параметры в нескольких моментах времени: артериальное кровяное давление (систолическое, диастолическое и среднее), частоту сердцебиения, электрокардиографические параметры RR, PQ (=PR), продолжительность интервала QT и продолжительность комплекса QRS, а также температуру тела. Интервал QT корректировали по различиям частоты сердцебиения в соответствии как с формулой Фридерика, так и с формулой ван де Ватера. Полный сигнал ECG непрерывно проверяли на любые нарушения ритма и морфологию формы колебаний сигнала, начиная от 30 мин и до 6 ч после введения дозы. В каждый день обработки проводили клинические наблюдения. Просматривали видеозаписи для выявления потенциальных крупных изменений поведения и потенциального влияния на сердечнососудистые параметры. После введения дозы моменты времени для анализа были следующими: 0,5, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 16 и 24 ч.

2. Выявление отличий в отношении целостности эндотелиального барьера.

а) Исследование пропотевания жидкости из сосудов легкого у мыши.

Самцов мышей C57B16/J (n=5-8, 25-30 г) (Charles River Laboratory, Франция) обрабатывали перорально два раза в день на протяжении 7 дней при помощи соединения А в количестве 3 и 10 мг/кг, BAF-312 в количестве 1 и 3 мг/кг, финголимода в количестве 0,1 и 1 мг/кг или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 10 мл/кг. Число мышей, включенных в каждую группу, составляло от 5 до 8. Спустя 7 дней мышам подвергали анестезии при помощи внутрибрюшинной инъекции смеси кетамина (100 мг/кг) и ксилазина (10 мг/кг). Краситель Evans синий вводили внутривенной инъекцией в яремную вену в количестве 15 мг/кг в 1 мл/кг. Десять минут спустя физиологическую сыворотку вводили инъекцией в левый желудочек для промывания организма от остаточного красителя Evans синего. Ткань легких собирали и взвешивали, а затем погружали в чистый раствор формамида на 24 ч для извлечения красителя Evans синего из ткани и, таким образом, оценки проницаемости сосудов. Концентрацию красителя Evans синего оценивали при 630 нМ с помощью стандартной кривой и нормализовали по массе легкого. Результаты выражали как средние $\pm$ s.e.m.

б) Исследование пропотевания жидкости из сосудов легкого у крысы.

Самцов крыс линии Fischer (n=4-8, 280-350 г) (Charles River Laboratory, Франция) обрабатывали перорально два раза в день на протяжении 7 дней при помощи соединения А (1, 3, 10, 30 и 100 мг/кг), BAF-312 (0,03, 0,1, 0,3, 3 и 30 мг/кг) или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 2 мл/кг. Спустя 7 дней крыс подвергали анестезии при помощи внутрибрюшинной инъекции пентобарбитала (50 мг/кг). Краситель Evans синий вводили внутривенной инъекцией в ретро-орбитальный синус в количестве 30 мг/кг в 1 мл/кг. Через пятнадцать минут физиологическую сыворотку вводили инъекцией в левый желудочек для промывания организма от остаточного количества внутрисосудистого красителя Evans синего. Ткань легкого собирали и взвешивали, а затем погружали в чистый раствор формамида (4 мл/г массы ткани) на 24 ч для извлечения красителя Evans синего из ткани и, таким образом, оценки проницаемости сосудов. Концентрацию красителя Evans синего оценивали при 630 нМ с помощью стандартной кривой. Результаты выражали как средние $\pm$ s.e.m.

3. Выявление отличий в отношении лимфопенической активности.

а) Исследования лимфопении у крыс.

Самцы крыс линии Sprague-Dawley (n=8, от 250 до 350 г) (Charles River Laboratory, Франция) получали пероральное введение соединения А, BAF-312 в количестве 3 мг/кг или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 2 мл/кг. Применяли два протокола: однократное или повторяемое введение дважды в день в течение 5 последовательных дней. Кровь собирали через 2, 6 и 24 ч после введения соединения (последнее введение по протоколу с повторениями) для гематологического анализа с целью определения содержания лимфоцитов в цельной крови. Результаты выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

Самцы крыс линии Fischer (n=8, от 250 до 350 г) (Charles River Laboratory, Франция) получали пероральное введение соединения А (1, 3, 10 и 30 мг/кг), BAF-312 (1 и 10 мг/кг) или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 2 мл/кг. Кровь собирали через 2, 6 и 24 ч после введения соединения для гематологического анализа с целью определения содержания лимфоцитов в цельной крови. Результаты выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

б) Исследование лимфопении у мышей.

Самцы мышей C57B16/J (n=8, от 25 до 30 г) (Charles River Laboratory, Франция) получали однократное пероральное введение соединения А в количестве 1, 3, 10 и 30 мг/кг или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 10 мл/кг. Кровь собирали через 2, 6 и 24 ч после введения соединения для гематологического анализа с целью определения содержания лимфоцитов в цельной крови. Результаты выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

с) Исследования лимфопении у собак.

Бодрствующие собаки в условиях свободного поведения (Marshall Farms, n=8, с массой тела от 10,5 до 14,3 кг) получали пероральную дозу продукта, выступающего в роли отрицательного контроля (т.е. водный раствор 0,5% (мас./мас.) гидроксизтилцеллюлозы/0,6% (мас./мас.) полисорбата 80), или соединения А в количестве 3, 10 и 30 мг/кг, или BAF-312 в количестве 10 мг/кг как суспензии в группе продукта,

выступающего в роли отрицательного контроля, в соответствии со схемой исследования с повышающейся дозой по меньшей мере с 7-дневным периодом вымывания между каждым введением (5 мл/кг). Кровь собирали через 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 24, 48 и 168 ч для обоих соединений (и вплоть до 66 дней для BAF-312) для гематологического анализа с целью определения содержания лимфоцитов в цельной крови. Результаты выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

4. Фармакология *in vitro*.

а) Анализ мобилизации кальция (FlipR) в клетках яичника китайского хомячка (CHO), клетках Chem и HSC.

1) Клетки CHO.

Тестировали показатели активности соединения А, BAF-312 и финголимода после стабильной трансфекции Flp-In конструкцией гибрид hSIP₁-G-белок клеток CHO (собственная разработка) и выборочно тестировали в отношении конструкций hSIP₂ и гибрид hSIP₃-G-белок (собственная разработка). Создание линии клеток описано в патентном документе WO 2011/086079.

Активацию рецептора SIP₁ посредством соединений определяли количественно по эффекту на высвобождение кальция, связанное с рецептором SIP₁, в клеточном флуоресцентном анализе кальция с применением клеток CHO, у которых стабильно сверхэкспрессировался рецептор SIP₁ человека (система Flp-In, Invitrogen). Для усиления связывания G-белка и управления передачей сигнала на высвобождение Ca²⁺ сверхэкспрессированный рецептор дополнительно имел С-концевую последовательность модифицированного G-белка (G_{ai4qi4}), WO 02/04665. Изменения внутриклеточного кальция определяли посредством флуоресцентного измерения при помощи чувствительного к кальцию красителя fluo-4 (Invitrogen) в спектрофотометре для чтения планшетов для визуализации флуоресценции (FlipR, Molecular Dynamics).

Клетки CHO, стабильно сверхэкспрессирующие рецептор SIP₁ человека, высевали (40000 на лунку) в черные с прозрачным дном 96-луночные планшеты с покрытием поли-D-лизином (Becton Dickinson, Bicoat cellware) примерно за 18-24 ч до экспериментов. Клетки выращивали в термостате при 37°C с 5% диоксида углерода и 95% влажностью в среде для культивирования клеток на основе среды F-12 GlutaMAX (Gibco № 31765), дополненной 1% (об./об.) пенициллина/стрептомицина (PAN, № P06-07100), 10% (об./об.) эмбриональной телячьей сыворотки (FCS; Hyclone, FBS, обработанная активированным углем/декстраном, № SH30068) и гигромицином В (Invitrogen, № 10687-010), 300 мг/л (итоговые концентрации).

Перед экспериментом с FlipR клетки загружали сложным фтор-4-ацетоксиметилловым эфиром (fluo-4 AM, Invitrogen, № F14202) на 60 мин в термостате при 37°C с 5% диоксида углерода и 95% влажностью в буфере для внесения красителя, состоящем из сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS; Invitrogen № 14065049), дополненного fluo-4 AM в количестве 2 мкМ (все данные приведены для итоговой концентрации), Pluronic® F-127 0,05% (объем/объем) (Invitrogen, № P-3000MP), HEPES 20 mM (Gibco № 15630), пробенацидом 2,5 mM (Sigma № P-8761) и альбумином бычьей сыворотки (BSA) 0,05% (Sigma № A-6003), pH доведен до 7,5 при помощи гидроксида натрия. В течение периода загрузки клеток fluo-4 AM отщеплялся внутриклеточной эстеразой, что приводило в результате к захвату клетками красителя fluo-4. Загрузку завершали посредством промывания клеток в промывной камере для клеток (промывная камера Tecan Power) три раза при помощи указанного выше буфера, но без fluo-4 AM и BSA. Этот последний буфер также применяли в качестве буфера в последующих клеточных измерениях флуоресценции.

Клетки с загруженным красителем и промытые затем стимулировали при помощи соответствующих соединений с различными концентрациями, добавленными в виде раствора в DMSO (0,3% объем/объем максимальной итоговой концентрации DMSO) или при помощи SIP (100 нМ итоговая концентрация) в DMSO лишь в соответствующей концентрации (положительный контроль).

Соединения, которые активировали рецептор SIP, вызывали высвобождение внутриклеточного кальция из внутренних резервов, что приводило в результате к большому временному повышению флуоресцентного сигнала fluo-4, который отслеживали на протяжении примерно 3 мин. Процент активации, обусловленной тестируемым соединением, определяли из максимальной реакции флуоресценции по сравнению с максимальной реакцией флуоресценции на положительный контроль SIP. Все значения флуоресценции корректировали по значениям флуоресценции на исходном уровне, полученным при помощи клеток, которые предварительно инкубировали только с DMSO и не обрабатывали при помощи SIP (контроль на исходном уровне). Все измерения выполняли в трех повторностях. Исходя из активации при различных концентрациях рассчитывали значение EC₅₀.

2) Клетки Chem.

Анализы с GPCRProfiler® от Millipore применяли для определения EC₅₀-активности соединения А, BAF-312 и финголимода на рецепторах SIP₁, SIP₂, SIP₃, SIP₄ или SIP₅. В таких анализах применяли стабильные линии клеток GPCR ChemoScreen.

3) HSC.

HSC человека (Sciencell) высевали в количестве 25×10^3 клеток на лунку в 96-луночный планшет, 100 мкл/лунка, и оставляли для прикрепления клеток к стенкам на 24 ч в полной среде (Sciencell SC5301) с 1% дополнительных компонентов (Sciencell SC5352) и 2% FCS. Культуральную среду заменяли на Sciencell Medium с 2% FCS, но без дополнительных компонентов еще на один 24-часовой период. Клетки промывали и помещали в 100 мкл аналитического буфера (HBSS, 0,8 mM MgSO₄, 20 mM Hepes, 3,3 mM Na₂CO₃, 1 mM CaCl₂, 10% BSA). Клетки загружали Fluo4-AM в присутствии плуорониловой кислоты на 1 ч при 37°C в темноте. Среда загрузки удаляли и заменяли на 200 мкл/лунка аналитического буфера. Клеткам позволяли стабилизироваться в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте. Культуральный планшет помещали в аппарат FlipR, добавляли соединение А или BAF-312 до объема 50 мкл (5X раствор, итоговая концентрация 10 мкМ) и флуоресценцию кальция непрерывно записывали в течение 6 мин. Для экспериментов на десенсибилизацию после первого введения соединения А или BAF-312 культуральный планшет один раз промывали и позволяли восстанавливаться в течение 1 или 3 ч в аналитическом буфере перед вторым добавлением соединения А или BAF-312. Для контрольных экспериментов первое введение соединения А или BAF-312 заменяли на аналитический буфер, а второе введение соединения А или BAF-312 брали в качестве эталона сравнения. Результаты выражали в виде единиц флуоресценции (FU).

b) Анализ с β -аррестином.

Анализ с β -аррестином PathHunter® от DiscoverX применяли для определения EC₅₀-активности соединения А, BAF-312 и финголимода на рецептор S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ или S1P₅. Соединения тестировали в аналитической среде, содержащей 0,5% FBS.

c) Анализ с GTP γ S.

Этот способ описан в патентном документе WO 2011/086079.

d) Анализ интернализации.

Анализ интернализации при активации GPCR PathHunter® от DiscoverX применяли для определения EC₅₀-активности соединения А, BAF-312 и финголимода на рецептор S1P₁. Соединения тестировали в аналитической среде, содержащей 0,5% FBS.

e) Анализ с cAMP в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и HUVEC.

1) Клетки CHO.

Анализ с cAMP Hit Hunter® от DiscoverX применяли для определения EC₅₀-активности соединения А, BAF-312 и финголимода на S1P₁. Соединения тестировали в аналитической среде, содержащей 0,5% FBS.

2) HUVEC (эндотелиальные клетки пупочной вены человека).

Циклический AMP в ответ на соединение А, BAF-312 или финголимок оценивали в клетках HUVEC, обработанных форсколином, при помощи набора cAMP HTRF® (Cisbio). Вкратце, HUVEC (Lonza) высевали в количестве 5×10^3 клеток на лунку в белый 96-луночный планшет (половина объема) на 24 ч в среду EGM2 (Lonza). В начале эксперимента среду EGM2 заменяли на аналитический буфер, который состоял из HBSS, содержащей Hepes (10 mM), BSA (0,1%) и IBMX (0,5 mM). Клеткам позволяли восстановиться в течение 15 мин. Соединение А, BAF-312 или финголимок (10 nM - 100 мкМ) добавляли к клеткам на 15 мин с последующим добавлением форсколина (FSK, 10 мкМ). После 45 мин обработки FSK реакцию останавливали посредством добавления MAb к cAMP-криптану и cAMP-D2 на 1 ч. В конце инкубирования считывали флуоресценцию (Envision, Perkin Elmer) и рассчитывали соотношение FRET в соответствии с протоколом аналитического набора. При помощи программного обеспечения Sanofi BI-OST@T-SPEED в соответствии с моделью логистического уравнения рассчитывали эффективность соединения А, BAF-312 или финголимода (EC₅₀).

f) Фосфорилирования Akt и ERK_{1/2} в анализах клеток.

RPTEC (в основных условиях или после стимуляции туникамицином).

Клетки RPTEC (Lonza) высевали в количестве $0,3 \times 10^6$ клеток на лунку в 6-луночные планшеты по 2 мл на лунку полной среды REBM/REGM (Lonza) на 24 ч. Клетки подвергали сывороточному голоданию в течение дополнительного 24-часового периода в 900 мкл среды для поддержания клеток в неактивном состоянии. Повышающиеся концентрации соединения А (10X) добавляли до объема 100 мкл в каждую лунку на 10 мин при 37°C. При необходимости за 30 мин до добавления соединения А добавляли туникамицин (100 мкл). После удаления среды клетки промывали при помощи холодного PBS и лизировали на льду в 100 мкл холодного буфера RIPA, содержащего 1% тритона, ингибиторы протеаз и фосфатаз. Для вестерн-блоттинга 30 мкг общего белкового лизата загружали в 4-12% бис-трис-гели (Invitrogen). После прогонки и переноса нитроцеллюлозные мембраны изучали при помощи антитела к фосфо-Akt (фосфо-Ser473, Cst № 9271) и антитела к фосфо-Erk_{1/2} (фосфо-Tyr202/Tyr204, Cst № 4377). Тубулиновое мечение при помощи антитела к α -тубулину (Cst № 2144) применяли для нормализации после денситометрического анализа пленок.

g) Фосфорилирования Akt и ERK_{1/2} в анализах клеток HUVEC в условиях голодания.

Клетки HUVEC (Lonza) высевали в количестве $0,3 \times 10^6$ клеток на лунку в 6-луночные планшеты по 2 мл на лунку полной среды EGM2 (Lonza) на 24 ч. Клетки подвергали сывороточному голоданию в те-

чение дополнительного 24-часового периода в 900 мкл среды для поддержания клеток в неактивном состоянии. Повышающиеся концентрации соединения А, BAF-312 или финголимода (10X) добавляли до объема 100 мкл в каждую лунку на 10 мин при 37°C. После удаления среды клетки промывали при помощи холодного PBS и клетки лизировали на льду в 100 мкл буфера RIPA, содержащего 1% тритона, ингибиторы протеаз и фосфатаз. Для вестерн-блоттинга 30 мкг общего белкового лизата загружали в 4-12% бис-трис-гели (Invitrogen). После прогонки и переноса нитроцеллюлозные мембраны изучали при помощи антитела к фосфо-Akt (фосфо-Ser473, Cst № 2965) и антитела к фосфо-Erk_{1/2} (фосфо-Tyr202/Tyr204, Cst № 4377). Тубулиновое мечение при помощи антитела к α -тубулину (Cst № 2144) применяли для нормализации после денситометрического анализа пленок.

h) Анализ индуцированного туникамицином апоптоза.

Эффект соединения А на индуцированный туникамицином (TN) апоптоз у RPTEC измеряли посредством аналитического набора Caspase-Glo 3/7 (Promega). Вкратце, клетки RPTEC (Lonza) высевали в 96-луночные белые планшеты в количестве 30×10^3 клеток на лунку в REGM (среда REBM с добавлением 0,5% FCS и Single quotes, Lonza) и оставляли для прикрепления клеток к стенкам на 24 ч. Спустя 24 ч полную среду заменяли на среду, не содержащую сыворотку и дополнительные компоненты (56 мкл/лунка). Клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин соединением А (итоговые концентрации 0,3-30 мкМ, 7 мкл) с последующим добавлением туникамицина (TN, итоговая концентрация 0,1 мкг/мл, 7 мкл). Спустя 24 ч при 37 °C с 5% CO₂ добавляли 70 мкл реактива Caspase-Glo и культуральный планшет помещали на качалку на 1 ч. Люминесценцию регистрировали посредством ридера Envision (Perkin Elmer). Результаты выражали в виде процента ингибирования TN-индуцированного апоптоза.

i) Анализ TNF α -индуцированной сверхэкспрессии молекул адгезии.

Экспрессию ICAM-1, VCAM-1 и P/E-селектинов измеряли у HUVEC посредством ELISA. Клетки HUVEC высевали в 96-луночные планшеты в количестве 25×10^3 клеток на лунку до объема 100 мкл в среду EGM2 (Lonza), оставляли для прикрепления клеток к стенкам на 24 ч. Спустя 24 ч полную среду заменяли на среду для поддержания клеток в неактивном состоянии (EGM2 без дополнительных компонентов и сыворотки) на 3 ч. После этого клетки предварительно обрабатывали соединением А или BAF-312 (1-30 мкМ) в течение 18 ч. Затем клетки обрабатывали при помощи TNF- α (3 нг/мл) в среде без факторов роста на протяжении дополнительного 6 ч периода. Среда удаляли, а клетки промывали и фиксировали при помощи 100 мкл раствора RLC2 на лунку (Alphelys № 01-RLC2-RTU30) в течение 20 мин при 4°C. Фиксированные клетки промывали два раза при помощи 100 мкл HBSS перед добавлением антител к ICAM-1 (№ BBA3, R&D System), антител к VCAM-1 (№ BBA5, R&D System) и антител к P/E-селектинам (№ BBA1, R&D system) на 1 ч. После тщательного промывания на 2 ч добавляли антитела к мышиному IgG с HRP (№ NA931, Amersham). После промывания и добавления субстрата для HRP (OPD, Sigma № P9187) считывали оптическую плотность при 450 нм (Envision). Результаты выражали в виде процента ингибирования TNF- α -индуцированной экспрессии молекул адгезии.

j) Анализ измерения сопротивления в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и эндотелиальных клетках.

1) Клетки CHO.

Анализ сопротивления от CEREP применяли для определения EC₅₀-активности соединения А, BAF-312 и финголимода на S1P₁.

2) Эндотелиальные клетки.

Соединение А, BAF-312, финголимод, SEW2871 и S1P (применяемый в качестве положительного контроля) тестировали в зависимости от концентрации в отношении их эффекта на изменение формы, которое выявляли посредством изменений электрического сопротивления (система X-celligence) с целью отслеживания десенсибилизации рецептора S1P₁ как на клетках микрососудистого эндотелия кожи человека (HDMEC), так и на эндотелиальных клетках пупочной вены человека (HUVEC). На 1 день первоначальные клетки высевали в 96-луночные e-планшеты, предварительно покрытые коллагеном-I, в количестве 20000 клеток на лунку. После 24 ч прикрепления клеток к стенкам и пролиферации HDMEC и HUVEC подвергали 1^у стимулированию в течение 1 ч посредством либо S1P (1 мкМ), соединения А (1 мкМ для HDMEC; 0,1, 1, 10 мкМ для HUVEC), BAF-312 (1, 10, 100 нМ лишь в HUVEC), финголимода (100 нМ для HDMEC; 1, 10, 100 нМ для HUVEC), либо SEW2871 (0,1, 1, 10 мкМ, только в HUVEC). После инкубирования с агонистами S1PR клетки осторожно промывали два раза при помощи среды с последующим 5,5 ч периодом восстановления. Затем эффект предыдущего 1-го стимулирования на десенсибилизацию рецептора оценивали при помощи 2-го стимулирования повышающимися концентрациями S1P (0,1, 1 и 10 мкМ) и измерения полученного в результате сопротивления. Все измерения осуществляли по меньшей мере в трех повторностях. Все концентрации 1-го стимулирования составляли >EC₉₀ в HDMEC. Результаты выражали в произвольных единицах сопротивления как среднее $\pm$ s.e.m.

5. Фармакология in vivo.

а) Крысиная модель ишемически-реперфузионного (I/R) повреждения почек.

Самцы крыс линии Fischer (n=3-9, от 250 до 300 г) (Charles River Laboratory, Франция) получали пероральное введение соединения А в количестве 0,3, 1 и 30 мг/кг, или BAF-312 в количестве 3, 10 и 30 мг/кг,

или продукта, представляющего собой носитель (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80 0,5% в воде), с объемом введения 2 мл/кг за 1 ч до почечной ишемии. Во второй серии экспериментов соединение А вводили дважды в день в течение 5 дней для оценки потенциальной тахифилаксии. Вкратце, животных подвергали мнимой операции (т.е. лапаротомии, изоляции почечной артерии) или 25-минутной билатеральной обтурации почечной артерии под анестезией пентобарбиталом (50 мг/кг и.п.). Внимательно отслеживали температуру тела (37-38°C) и гидратацию (брюшинная инъекция физиологической сыворотки) для стандартизации хирургической процедуры и ограничения межиндивидуальной вариабельности. В конце ишемического периода почки подвергали реперфузии путем удаления зажимов, а качество реперфузии контролировали до реализации плана наложения швов на мышцы и кожу (животных с недостаточной реперфузией немедленно исключали). Двадцать четыре часа спустя собирали кровь и почки. Кровь центрифугировали (3000 g, 10 мин), замораживали гепаринизированную плазму для оценки уровня креатинина при помощи биохимического анализатора (P400, Horiba, Франция). Одну почку замораживали для вестерн-блоттинг анализов для оценки тканевого альбумина (антитело к альбумину, Santa Cruz) и тканевого HSP70 (моноклональное антитело к HSP70 от Santa Cruz № SC32239), а вторую почку фиксировали (10% нейтрально-буферизованным формалином) и заливали парафином для гистологических анализов на шлифы толщиной 5 мкм (количественная оценка острого канальцевого некроза при помощи классического окрашивания гематоксилин-эритрозин-шафраном, модифицированной окраски трихромом по Массону и периодной кислотой-реактивом Шиффа, ассоциированными с синим альцином) и иммуногистохимических анализов (окрашивание макрофагов при помощи моноклонального антитела к CD68 от Acris, № BM4000 и окрашивание капилляров при помощи моноклонального антитела к PECAM от Santa Cruz, № SC1506, при помощи робота Ventana, VMS Inc.). Острый канальцевый некроз выражали как процент канальцев, у которых наблюдали некроз клеток на 12-15 участках в почечной кортикомедуллярной области. Иммуномечение CD68 и PECAM выражали как процент числа положительных пикселей (алгоритм Aperio) на всем участке. Уровень креатинина в плазме выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

b) Мышиная модель индуцированного рабдомиолизом повреждения почек.

Самцы мышей линии Swiss (CD1) (n=5-15, возрастом 13-14 недель) (Charles River Laboratory, Франция) получали пероральное введение соединения А в количестве 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг или продукта, представляющего собой носитель, (метилцеллюлоза 0,6% - твин 80, 0,5% в воде) с объемом введения 10 мл/кг за 1 ч. до инъекции глицерина. Внутримышечную инъекцию глицерина (50% в PBS объем/объем) или продукта, представляющего собой носитель (PBS), осуществляли в задние конечности (2 инъекции на лапу в икроножную и в прямую мышцу бедра) в количестве 8 мл/кг под анестезией пентобарбитала (33 мг/кг) и кетамина (40 мг/кг). Двадцать четыре часа спустя кровь собирали, центрифугировали (3000 g, 10 мин) и замораживали гепаринизированную плазму для оценки уровня креатинина при помощи биохимического анализатора (P400, Horiba, Франция). Результаты выражали как среднее $\pm$ s.e.m.

Результаты.

Соединение в соответствии с настоящим изобретением под названием "соединение А" подвергали различным экспериментам *in vitro* и *in vivo* для того, чтобы продемонстрировать его активность в условиях АКІ и для выявления его отличий относительно функциональных антагонистов S1P₁.

1. Безопасность для сердечно-сосудистой функции.

Несмотря на то, что соединение А является агонистом S1P₁, у которого отсутствует функциональный антагонизм, потенциальные мишень-ориентированные проблемы могут быть схожи с таковыми при применении функциональных антагонистов S1P₁. На сегодняшний день был получен огромный клинический опыт со смешанным соединением S1P_{1/3/4/5}, финголимодом, который индуцирует атриовентрикулярную блокаду и брадикардию (Schmouder et al., 2006, J Clin Pharmacol 46: 895-904). Существует множество доклинических подтверждений, свидетельствующих о вовлеченности S1P₃ в такие результаты кардиотоксичности, следовательно, область сместилась в сторону поиска селективных соединений для S1P₁ для преодоления таких недостатков. Тем не менее, селективные соединения для S1P₁, которые переходят на клиническую фазу испытаний, по-видимому, также индуцируют брадикардию (Gergely et al., 2012, BJP 167: 1035-1047), но их влияние на атриовентрикулярную блокаду до настоящего времени не известно. Поэтому в дополнение к обычным исследованиям был проведен ряд исследований для оценки потенциальной кардиотоксичности соединения А. В анализе с hERG IC₅₀ для соединения А составляла >30 мкМ. В анализе с волокнами Пуркинье кролика значимый эффект соединения А, тестируемого в диапазоне от 0,3 до 10 мкМ, отсутствовал, хотя сокращение потенциала действия наблюдали при 26 мкМ.

Эффект на частоту сердцебиения, или атриовентрикулярную блокаду, или любые другие параметры ECG отсутствовал в телеметрическом исследовании на собаках в количестве 30 или 100 мг/кг п.о. и 10 или 30 мг/кг в.в. (инфузия на протяжении 30 мин). Значимое изменение давления крови при обеих дозах отсутствовало.

2. Почечная фармакология *in vivo*.

Крысиную модель ишемически-реперфузионного (I/R) повреждения почек применяли для моделирования повреждения почек, возникающего после операции на сердце у пациентов. В этой модели соединение А значительно уменьшало (85-90%) тяжесть АКІ, что видно из ограничения роста уровня креатинина в сыворотке (клинически подтвержденный биомаркер). На фиг. 1А представлены результаты 5

независимых исследований). Эффект был дозозависимым и статистически значимым при 1 и 3 мг/кг п.о. (фиг. 1А). Гистологический анализ показывал, что соединение А оказывает непосредственные эффекты на сосудистую систему посредством предупреждения экстравазации альбумина (фиг. 1С) и сохранения капилляров. Соединение А также защищало проксимальные каналы почек от некроза, уменьшало инфильтрацию макрофагов и повышало уровень почечного белка HSP70 (маркер, ассоциированный с заживлением после ишемического повреждения почек). Соединение А не демонстрировало никаких признаков тахифилаксии, поскольку сходная активность сохранялась после 5 дней повторяемого введения BID по сравнению с однократным введением (фиг. 1D).

Рабдомиолиз является другой значительной причиной АКІ у пациентов, и его воспроизводили у мышей посредством внутримышечной инъекции глицерина. Глицерин индуцировал прогрессивное мышечное повреждение с высвобождением миоглобина и последующей дисфункцией почек. Как видно на модели I/R, соединение А в значительной степени (~85% при 10 мг/кг п.о.) и дозозависимым образом предупреждало ухудшение функции почек в этой модели (n=3 независимых исследования, фиг. 2).

Эффекты соединения А сравнивали в модели ишемии-реперфузии почек с S1P₁-селективным функциональным антагонистом, BAF-312. BAF-312 по меньшей мере в 10-раз более эффективный в большинстве *in vitro* анализов с S1P₁ (в том числе анализах с эндотелиальными клетками - см. табл. 1) и оказывал схожее с соединением А воздействие на плазму/почку у крыс. Тем не менее, несмотря на улучшенные свойства эффективности/воздействия у BAF-312, он не мог демонстрировать более 40% уменьшения уровня креатинина в сыворотке в модели ишемии-реперфузии, даже при дозах до 30 мг/кг п.о. (фиг. 1B).

3. Выявление отличий в отношении лимфопенической активности.

S1P ответственен за выход лимфоцитов из лимфоузла в кровь посредством активации S1P₁. Эта активация S1P₁ вызывает интернализацию рецепторов с последующей рециркуляцией рецептора обратно на поверхность клетки, обеспечивая реактивацию. Однако функциональные антагонисты S1P₁ (финголимод, BAF-312) вызывают разложение интернализованного S1P₁ и, таким образом, вызывают значительные и долговременные уменьшения количеств S1P₁ на поверхности клеток. Вследствие этого функциональные антагонисты S1P₁ демонстрируют большое и длительное снижение уровней лимфоцитов в крови, наблюдаемое в доклинических и клинических испытаниях (Mandala et al., 2002, Science 296: 346-349; Gergely et al., 2012, BJP 167: 1035-1047).

Как и предполагалось, BAF-312 индуцировал сильную (-80%) и длительную лимфопению у крыс (фиг. 3А, 3В). Это было очевидно даже при дозах до 1 мг/кг п.о. (наиболее низкая тестируемая доза). 2 дозы, которые были частично эффективными в крысиной модели АКІ, были более высокими дозами (10 и 30 мг/кг п.о., фиг. 1B) и представляли собой дозы, вызывающие развитие лимфопении в значительной степени. В отличие от этого, соединение А в количестве 1 и 3 мг/кг п.о. не демонстрировало снижение уровня лимфоцитов даже после 5 дней повторяемого введения BID крысе (3 мг/кг перорально), фиг. 3С. Для более высоких доз соединения А выявляли дозозависимую лимфопению, но они были выше, чем необходимые дозы для полной защиты от АКІ.

Аналогичным образом не наблюдали никакой лимфопенической активности для соединения А у мышей в количестве 3 и 10 мг/кг (фиг. 4), доз, которые были активными в модели индуцированного глицерином рабдомиолиза (фиг. 2).

Соединение А не вызывало развитие лимфопении у собак в количестве 3 мг/кг п.о. (фиг. 5А). Эта не вызывающая развитие лимфопении доза у собак уже обеспечивала воздействие ($C_{\text{макс}}$ и AUC), которое превышало воздействие, необходимое для полной защиты от АКІ, у крыс (3 мг/кг), табл. 4. При более высоких дозах 10 и 30 мг/кг п.о. у собак соединение А индуцировало лишь временную лимфопению (фиг. 5А). В отличие от этого, BAF-312 индуцировал сильное ($I_{\text{макс}}$ ~80%) снижение уровня лимфоцитов в количестве 3 мг/кг п.о., которое длилось по меньшей мере 60 дней до восстановления (фиг. 5B).

Соединение А является уникальным агонистом S1P₁, так как оно впервые демонстрирует сильную защиту от АКІ в дозах, не вызывающих развитие лимфопении (фиг. 3D). Несмотря на то, что другие соединения для S1P₁, такие как финголимод и SEW2871, также являются активными в моделях АКІ, их эффекты проявляются при лимфопенических дозах (Awad et al., 2006, Am J Physiol Renal Physiol 290: F1516-F1524; Sanna et al., 2004, JBC 279: 13839-13848; Lai et al., 2007, Kidney Int 71: 1223-1231).

Такие данные *in vivo* подтверждают, что соединение А действует как агонист S1P₁, индуцируя защиту от АКІ в дозах, не вызывающих развитие лимфопении. Соединение А значительно отличается от BAF-312, который описан в настоящем документе, а также других функциональных антагонистов S1P₁, которые специально разработаны в качестве способствующих развитию лимфопении средств, например, при аутоиммунных заболеваниях.

4. Выявление отличий в отношении целостности эндотелиального барьера.

Функциональный антагонизм S1P₁ ассоциирован с эффектами, повреждающими эндотелиальный барьер. Отечность мышц и легких является выраженным побочным эффектом у пациентов с рассеянным склерозом, которые проходят лечение при помощи финголимоды (Jain and Bhatti, 2012, 28.: 672-680).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что длительное пероральное введение здоровым мышам финголимоды было способно проводить к значительному пропотеванию жидкости из сосудов (фиг. 6А, 6В) у линии с клиническими данными. Селективный агонист S1P₁ BAF-312, в количестве 1 и 3 мг/кг дважды

в день индуцировал даже большее пропотевание жидкости из сосудов в легком (фиг. 6А, 6В). Такие данные согласовываются с ранними сообщениями, демонстрирующими, что функциональные антагонисты $S1P_1$ изменяли целостность эндотелиального барьера и стимулировали экстравазацию белков из сосудов в легком (Shea et al., 2010, *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 662-673). В отличие от этого, соединение А не демонстрировало повышение пропотевания жидкости из сосудов (в количестве 3 и 10 мг/кг (репрезентативные дозы, обеспечивающие почти полный защитный от АКІ эффект у мышей), фиг. 6А, 6В). Аналогичным образом у крыс линии Fischer соединение А не индуцировало пропотевание жидкости из сосудов легкого в количестве 1 и 3 мг/кг (репрезентативные эффективные от АКІ дозы) или даже в еще более высокой дозе (10 мг/кг). В отличие от этого, BAF-312 индуцировал пропотевание жидкости из сосудов у крыс как в количестве 3 мг/кг (неэффективная от АКІ доза), а также в количестве 30 мг/кг (частично эффективная от АКІ доза).

С учетом наблюдаемых повреждающих эндотелиальный барьер свойств у BAF-312 (фиг. 6) защитные свойства BAF-312 могут нейтрализоваться его отрицательными для эндотелиального барьера эффектами, что приводит в результате лишь к частичному наблюдаемому защитному эффекту (фиг. 1В). Повреждение эндотелиального барьера является отличительной особенностью множества функциональных антагонистов $S1P_1$ (фиг. 6 и опубликованные данные). Таким образом, новый профиль соединения А обеспечивает возможность защиты от острого повреждения почек в дозах, которые являются скорее защитными для эндотелиального барьера, а не повреждающими.

5. Фармакология *in vitro*.

Было показано, что соединение А является эффективным агонистом $S1P_1$. В клетках CHO, сверхэкспрессирующих $S1P_1$ (гибрид с G-белком) человека EC_{50} составляла 31 нМ в анализе кальциевой мобилизации, 656 нМ в анализе с β -аррестином, 206 нМ в анализе с $GTP\gamma S$ и 213 нМ в анализе интернализации (табл. 1).

Таблица 1.

Значения EC_{50} для соединения А, BAF-312 и финголимода, полученные при помощи различных анализов in vitro.

Анализ	Тип клеток	Белки в аналитической среде	EC_{50} в нМ				
			Соединение А	BAF-312	Финголимода фосфат	S1P	SEW2871
FLIPR	Chem#	0%	86	29	26	9,6	-
	CHO	0%	31	2,8	0,14	7,5	24
GTPγS	CHO	0%	206	6,7	5	120	795
β-аррестин	CHO	0,5% FBS	656*	5,4*	7	30,9*	-
Интернализация	CHO	0,5% FBS	213*	< 0,59*	2,72*	48,1*	-
cAMP	CHO	0,5% FBS	22,6	0,47	-	78	-
cAMP	HUVEC	0,1% BSA	15,600	74	132	-	-
pERK1/2	HUVEC	0,1% FBS	190	4,9	9,4	-	-
pAkt	HUVEC	0,1% FBS	101	4,3	14,5	-	-
Сопротивление	CHO	10% FBS + 0,1% BSA	65	0,4	-	1,5	-
Сопротивление	HUVEC	2% FBS	172	0,21	0,12	-	54
е							

Были разработаны клетки Chem* и CHO для сверхэкспрессии S1P₁ человека. HUVEC эндогенно экспрессируют S1P₁. # - анализ ChemiScreen. "-" означает "не определено".

* значения являются средними 2 отдельных экспериментов. Анализ с β-аррестином соед. А - 800 и 511, BAF-312 - 7,9 и 2,83, S1P - 41 и 20,8; анализ интернализации: соед. А - 160 и 266, BAF-312 - <0,5 и 0,67, финголимода-Р - 0,7 и 4,74, S1P - 56 и 40,2.

Соединение А не отображало свойств функционального антагонизма и не индуцировало десенситизацию рецептора (фиг. 7-10). Это отличие было продемонстрировано в четырех независимых системах in vitro, в двух системах при помощи измерения сопротивления в эндотелиальных клетках HDMEC (клетках микрососудистого эндотелия кожи человека) и HUVEC (эндотелиальных клетках пупочной вены человека) и в двух системах при помощи анализа с FlipR в клетках CHO и клетках HSC (звездчатых клетках печени). Предварительная инкубация с соединением А (с последующим этапом промывания) обеспечивала почти полное 2-е стимулирование при помощи S1P (фиг. 7-9) или соединения А (фиг. 10). Тем не менее, предварительное инкубирование с функциональными антагонистами предупреждало полное 2-е стимулирование при помощи S1P (фиг. 7-9) или BAF-312 (фиг. 10). В анализе сопротивления HUVEC концентрация каждого такого соединения, которая начинала десенситизацию индуцированной S1P₁ реакции по значению сопротивления, была сравнима с ее абсолютной EC_{50} в данном анализе. BAF-312 начинал десенситизацию при $5 \times EC_{50}$, SEW2871 при $20 \times EC_{50}$, в то время как не наблюдали десенситизацию для соединения А до $60 \times EC_{50}$.

Данные в фиг. 7-10 указывают на то, что функциональные антагонисты (финголимода, BAF-312, SEW2871 и понесимода) индуцировали длительную десенситизацию рецептора.

Соединение А демонстрировало различные относительные эффективности в отношении сигнально-

го пути $S1P_1$ (табл. 1) по сравнению с BAF-312 или финголимодом. Так как условия анализа в отношении белка отличались в различных тестах, авторы настоящего изобретения исключали возможное влияние связывания белка на относительные эффективности при сравнении показателей эффективности в анализах на CHO в отношении cAMP, бета-аррестина и интернализации с применением одинаковых условий среды. Как показано в табл. 2, соединение А (относительно BAF-312 и $S1P$) является более специфическим по его активирующей способности в отношении cAMP по сравнению с интернализацией или β -аррестином.

Таблица 2. Относительные значения EC_{50} соединения А, BAF-312 и $S1P$ (нормализованные к анализу с cAMP). Среда содержала идентичные концентрации белка (0,5% FBS) в 3 тестах.

	cAMP	Интернализация	β -аррестин
	CHO	CHO	CHO
Соединение А	1	9,4	29
BAF-312	1	1,3	11,5
$S1P$	1	0,62	0,40

Соединение А индуцировало маркеры выживаемости pERK и pAkt в эпителиальных клетках почечных канальцев человека (RPTEC) с EC_{50} около 3 мкМ в основных условиях или после повреждения туникамицином (EC_{50} ~10 мкМ) зависимым от концентрации образом. Такие эффекты выживаемости были более выраженными в эндотелиальных клетках человека после выращивания клеток в условиях сывоточного голодания с EC_{50} , равной 101 нМ в отношении P-Akt и 190 нМ в отношении P-ERK_{1/2}. Более того, соединение А ингибировало индуцированный туникамицином апоптоз в RPTEC, оцененный по активности каспазы 3/7 с EC_{50} около 3-10 мкМ.

Соединение А, в отличие от BAF-312, уменьшало TNF α -индуцированную сверхэкспрессию молекул адгезии, включая ICAM-I, VCAM-I и P/E селектины, на трех типах эндотелиальных клеток человека (HRAEC, HUVEC и HRGEC). Известно, что такие маркеры эндотелиальной дисфункции повышены в образцах плазмы от пациентов с АКІ (Sadik et al., 2012, Mol Cell Biochem 359:73-81) и вовлечены в процесс инфильтрации воспалительных клеток в тубуло-интерстициальное пространство.

Соединение А имело приемлемый профиль селективности в отношении других рецепторов в семействе $S1PR$ (табл. 3), в отношении более 110 целей, в панели CEREP, в отношении более 216 киназ и в отношении более 5 целей в панели ионного канала. Как показано в табл. 3, соединение А является более селективным агонистом $S1P_1$ по сравнению с финголимодом. Недостаток активности в отношении $S1P_2$ и $S1P_3$ является особенно важным, поскольку эти рецепторы, согласно сообщениям, препятствуют функции $S1P_1$ на эндотелиальных клетках.

Таблица 3. Селективность соединения А, BAF-312 и финголимода относительно членов семейства сфингозиновых рецепторов

	EC_{50} в мкМ							
	$S1P_2$		$S1P_3$		$S1P_4$		$S1P_5$	
	FlipR (Chem)	β -аррестин	FlipR (Chem)	β -аррестин	FlipR (Chem)	β -аррестин	FlipR (Chem)	β -аррестин
Соединение А	> 30	> 10	> 30	> 10	> 30	2,5	1,0	1,3
BAF-312	> 30	> 10	> 30	> 10	> 30	2,1	0,30	0,035
Финголимод	> 30	–	0,82	–	0,12	–	0,12	–

"–" означает "не определено".

Избирательная активация некоторых сигнальных путей посредством соединения А (например, cAMP), несмотря на свойственную более слабую эффективность в отношении других (например, интернализации, β -аррестина), обеспечивает необходимый профиль для АКІ (т.е. минимальную десенсибилизацию рецептора без длительной лимфопении, с эндотелиальной защитой). Это резко отличается от того, что необходимо для функциональных антагонистов $S1P_1$ BAF-312 и финголимода при рассеянном склерозе (высокая десенсибилизация рецепторов, сильная лимфопения, при этом нежелательным побочным эффектом является повреждение эндотелиального барьера). Этот профиль определяет соединение А как новый класс специфического агониста $S1P_1$.

Таблица 4. Фармакокинетические свойства соединения А в количестве 3 мг/кг п.о. у самца крысы линии

Fisher и собаки породы бигль

	Крыса	Собака
Смакс (мкг/мл)	2,56	2,91
AUC (мкг.ч/мл)	13	41,3

Вывод.

Эти данные доклинических исследований указывают на сильное влияние соединения А на многие ожидаемые результаты механизма АКІ, в том числе значительное поддержание эндотелиальной барьерной функции, а также уменьшение канальцевого некроза и воспаления с участием макрофагов. Все защитные от АКІ дозы соединения А (как у мышей, так и у крыс) не вызывали развития лимфопении, и при соответствующих воздействиях их достигали у собак, при этом соединение А все еще не вызывало развития лимфопении. Поскольку соединение А не вызывало развития лимфопении во всех защитных от АКІ дозах, его механизм защиты от АКІ не зависит от лимфопении. Соединение А демонстрировало непосредственные защитные эффекты на эндотелиальные и эпителиальные клетки, которые, вероятно, лежат в основе механизма действия при АКІ.

Это резко отличается от существующих соединений для S1P₁, которые имеют отличный сигнальный профиль и являются i) функциональными антагонистами S1P₁, ii) повреждающими эндотелий и iii) проявляют лишь ограниченную активность в I/R-индуцированном АКІ при дозах, которые являются лимфопеническими.

Соединение А обеспечивает новую возможность лечения пациентов от АКІ без индукции развития лимфопении и, следовательно, с избеганием соответствующих побочных эффектов (в том числе инфекций). Следовательно, данное соединение может стать преобразующей терапией в области, где в настоящее время не существует доступных пациентам лекарственных средств.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения АКІ (острого повреждения почек).

2. Применение по п.1, где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота не индуцирует развитие лимфопении при введении защитной от АКІ дозы и индуцирует развитие ограниченной лимфопении при введении более высокой дозы.

3. Применение по п.1 или 2 в качестве не вызывающего развитие лимфопении средства.

4. Применение по п.1 или 2, где она не оказывает лимфопенический эффект при введении защитной от АКІ дозы.

5. Применение по п.1, где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота оказывает защитный эффект от АКІ при введении не вызывающей развитие лимфопении дозы.

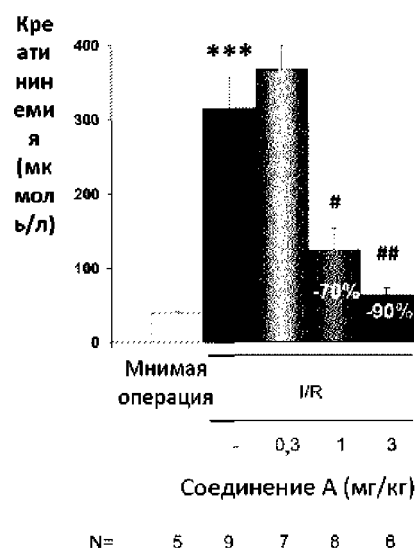
6. Применение {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли для предупреждения или лечения АКІ (острого повреждения почек), где {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусная кислота является селективным агонистом S1P₁, который не индуцирует десенситизацию рецепторов.

7. Применение {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли без лимфопенического эффекта при предупреждении или лечении АКІ.

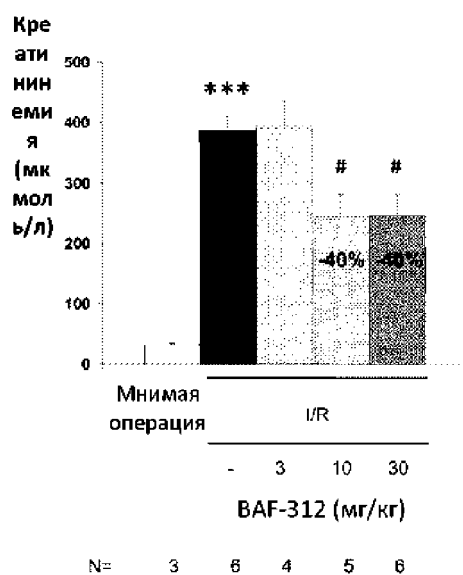
8. Применение фармацевтической композиции, содержащей в качестве активного ингредиента {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусную кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль и фармацевтически приемлемые наполнители для предупреждения или лечения АКІ (острого повреждения почек).

9. Способ лечения АКІ у нуждающегося в этом пациента, предусматривающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества {4-[5-(3-хлорфенокси)оксазоло[5,4-d]пиримидин-2-ил]-2,6-диметилфенокси}уксусной кислоты или ее фармацевтически приемлемой соли.

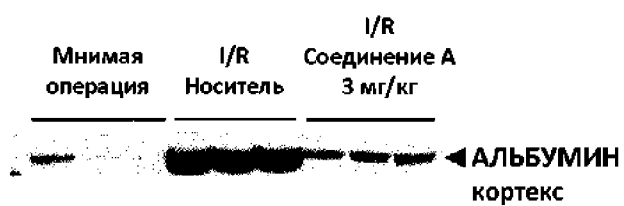
10. Способ по п.9, где лечение является профилактическим.



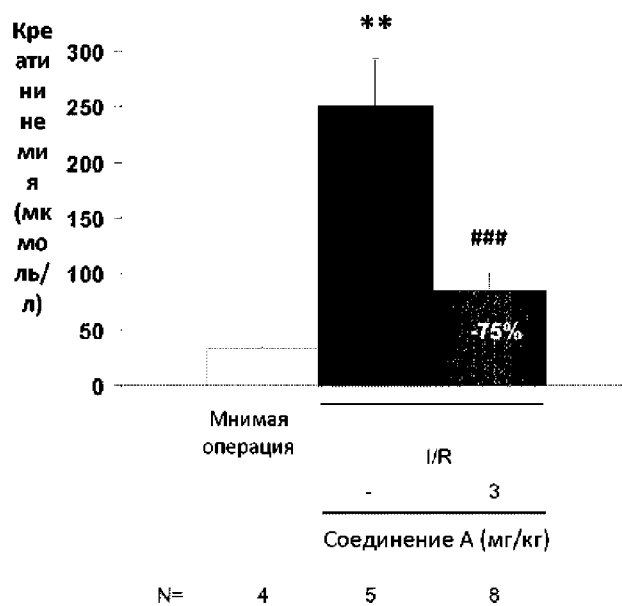
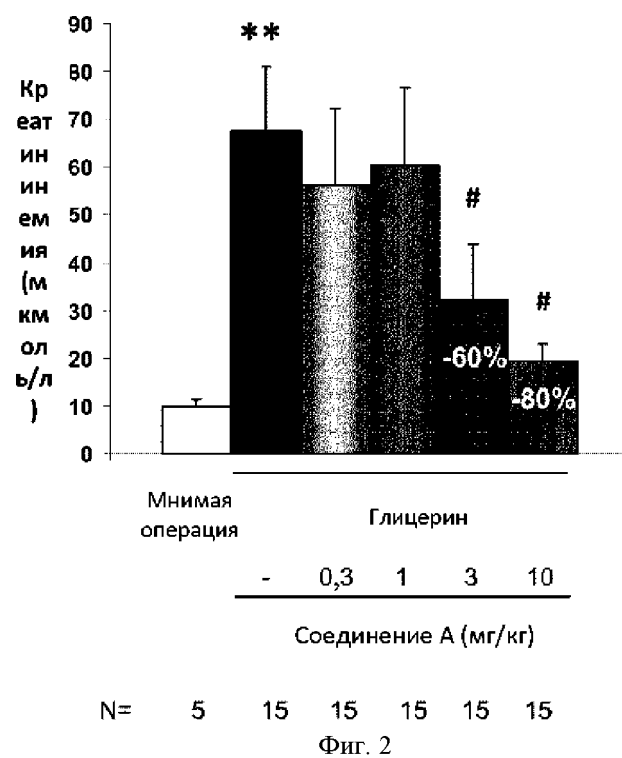
Фиг. 1-А

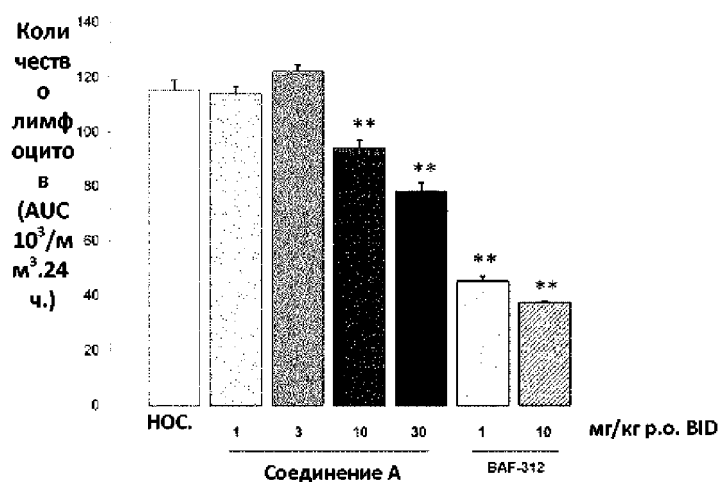


Фиг. 1-В

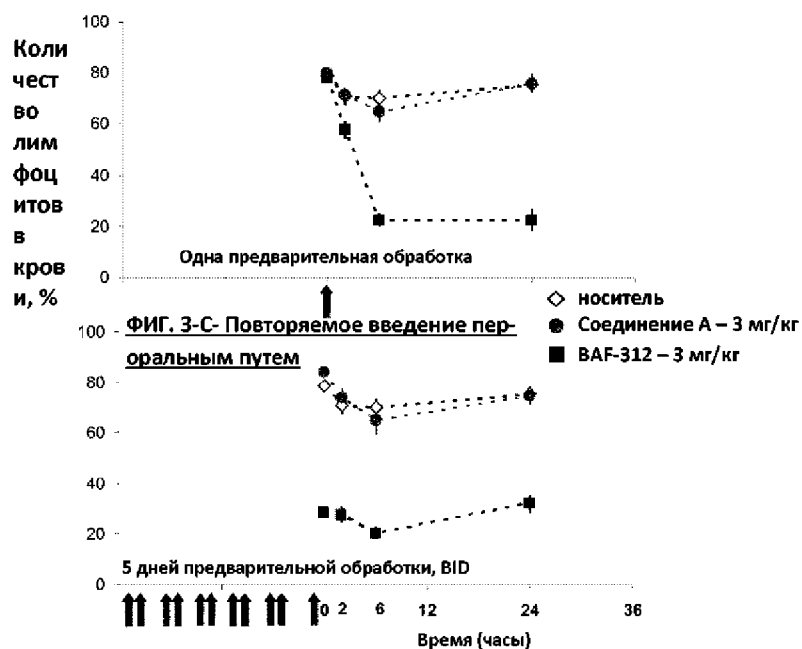


Фиг. 1-С

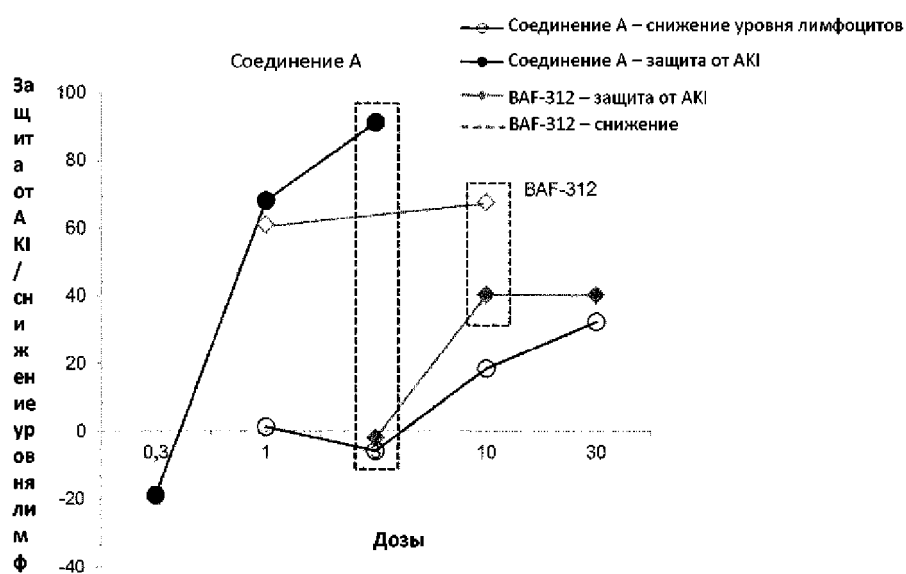




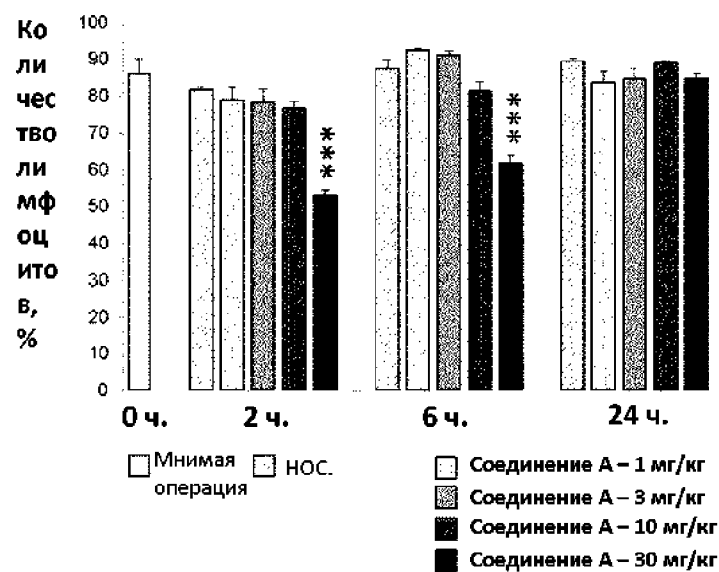
Фиг. 3-А

Однократное введение пероральным путем

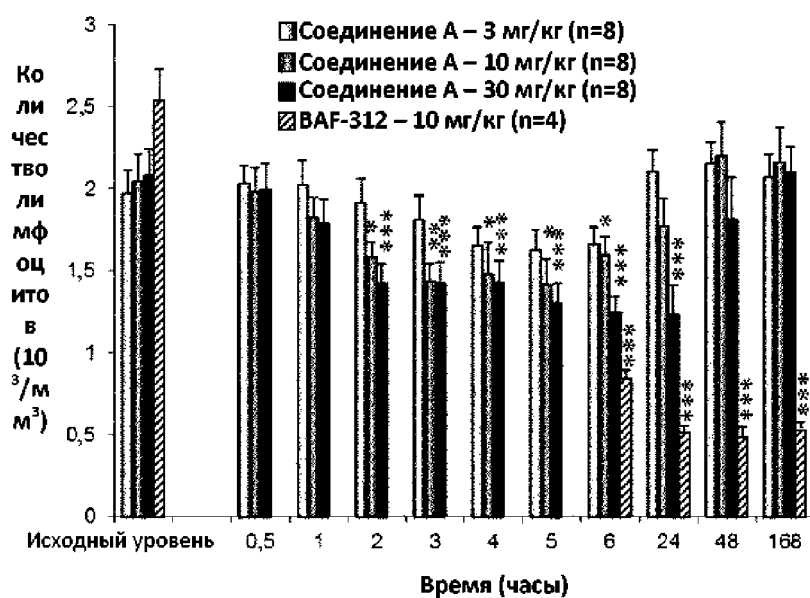
Фиг. 3-В, 3-С



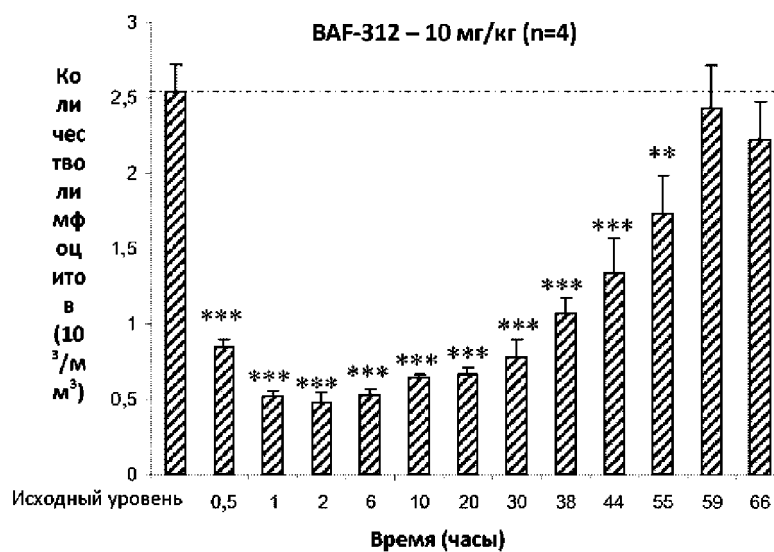
Фиг. 3-D



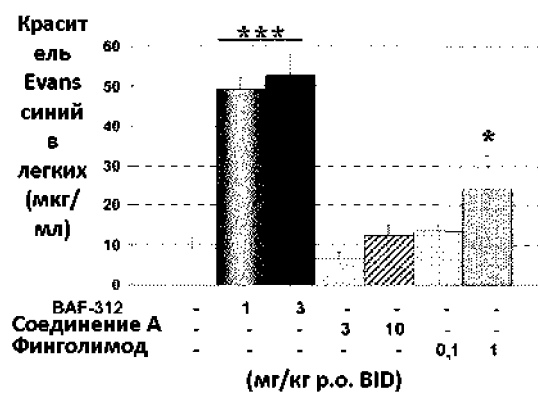
Фиг. 4



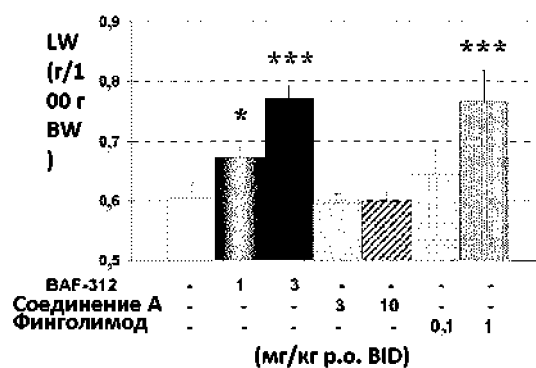
Фиг. 5-А



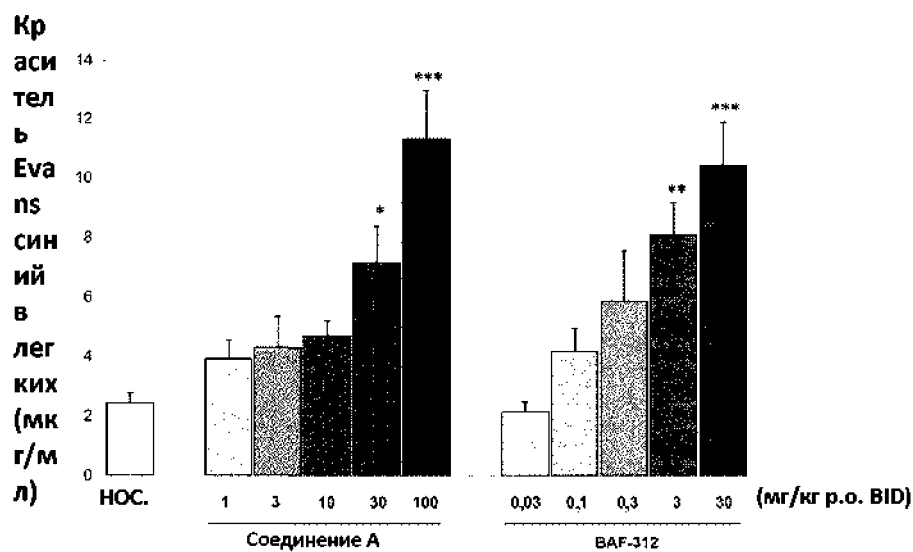
Фиг. 5-В



Фиг. 6-А

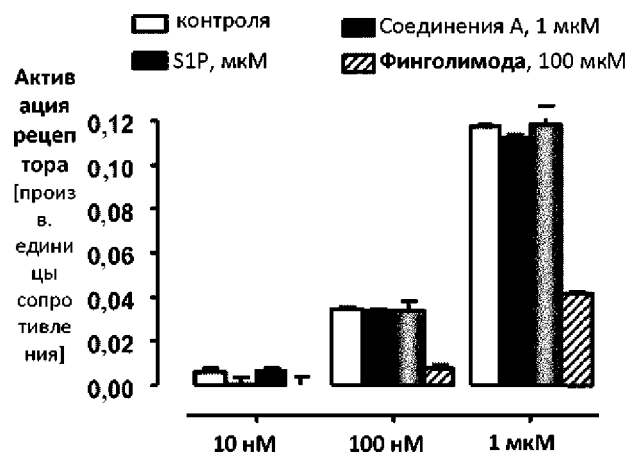


Фиг. 6-В

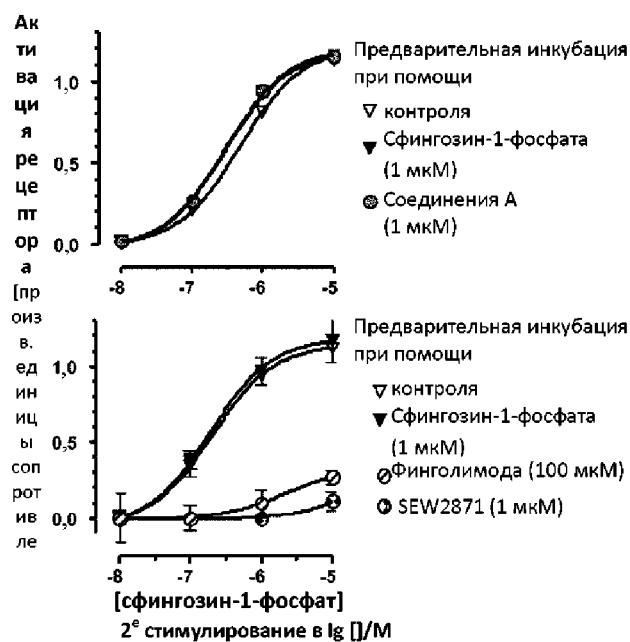


Фиг. 6-С

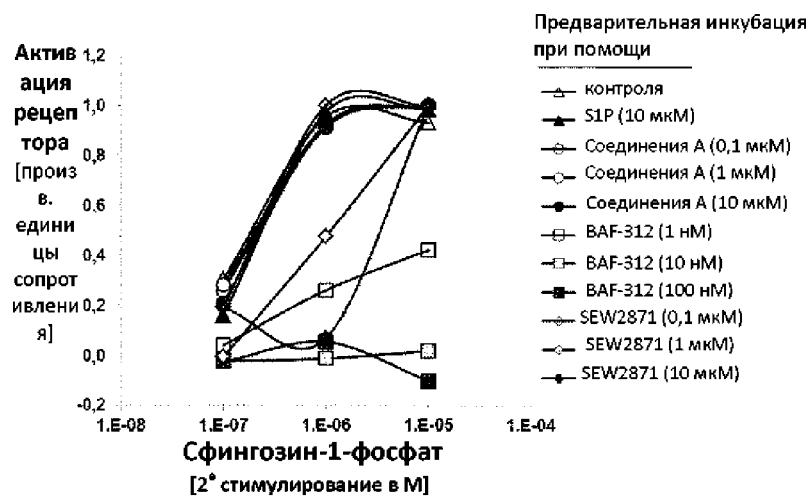
1° стимулирование при помощи

Сфингозин-1-фосфат
(2° стимулирование)

Фиг. 7



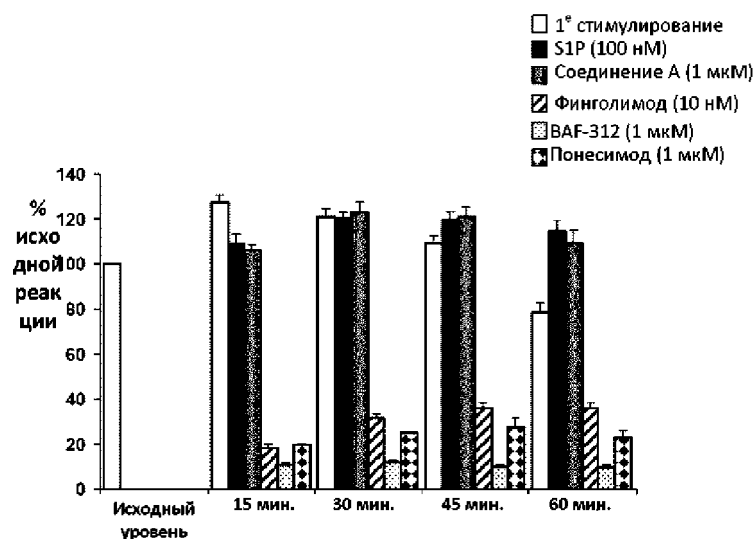
Фиг. 8-А



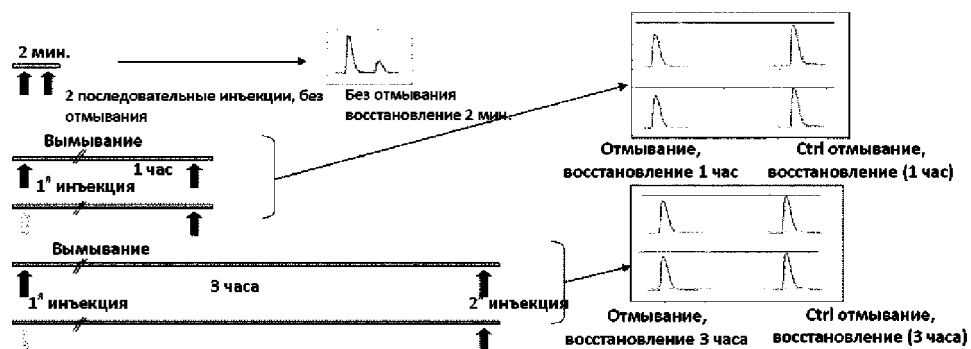
Фиг. 8-В



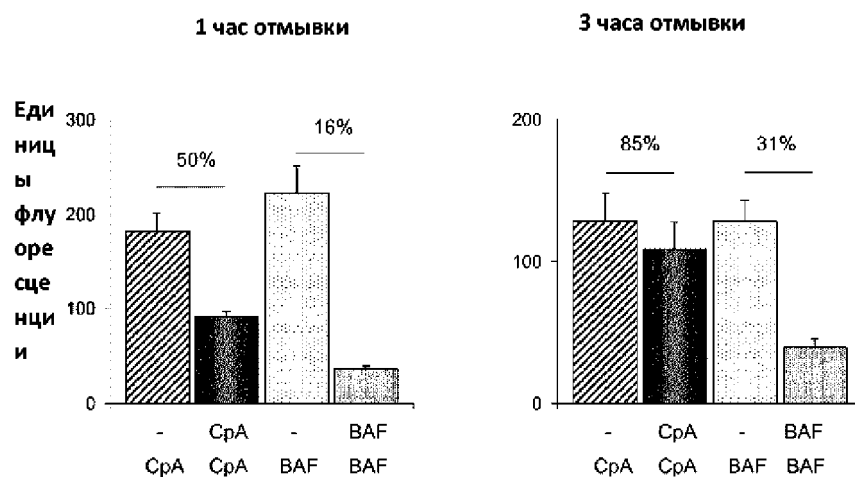
Фиг. 9-А



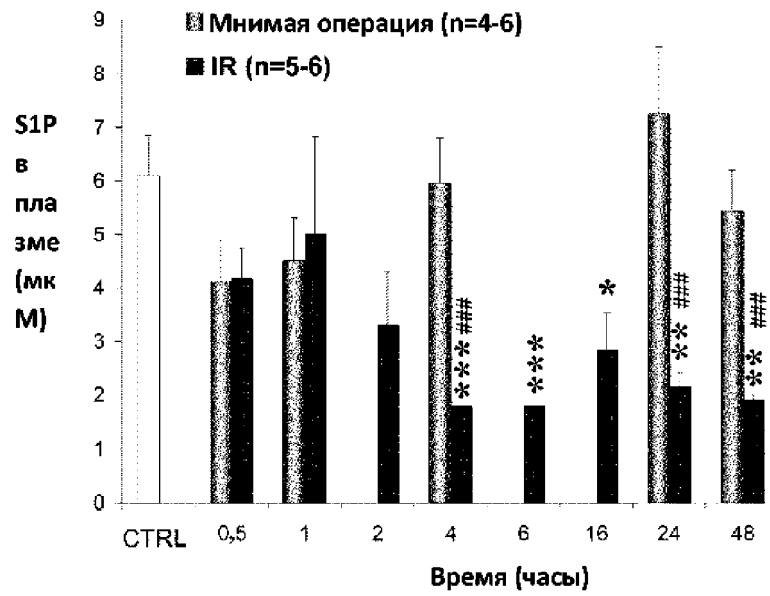
Фиг. 9-В



Фиг. 10-А



Фиг. 10-В



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2