

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **045054**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.27

(21) Номер заявки
202090977

(22) Дата подачи заявки
2018.10.12

(51) Int. Cl. **A61K 31/505** (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)

**(54) НОВАЯ КОМБИНАЦИЯ АКТИВНЫХ АГЕНТОВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ПРОГРЕССИРУЮЩИХ ФИБРОЗИРУЮЩИХ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЛЕГКИХ (PF-ILD)**

(31) **17197719.2**

(32) **2017.10.23**

(33) **EP**

(43) **2020.09.04**

(86) **PCT/EP2018/077952**

(87) **WO 2019/081235 2019.05.02**

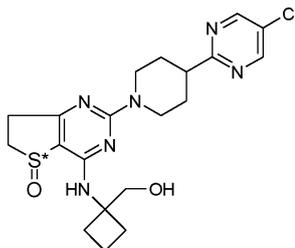
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**БЁРИНГЕР ИНГЕЛЬХАЙМ
ИНТЕРНАЦИОНАЛЬ ГМБХ (DE)**

(72) Изобретатель:
**Херрман Франциска Елена,
Никколаус Петер, Воллин Штефан
Людвиг Михаэль (DE)**

(74) Представитель:
**Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)**

(56) KATRIN E. HOSTETTLER ET AL.: "Anti-fibrotic effects of nintedanib in lung fibroblasts derived from patients with idiopathic pulmonary fibrosis", RESPIRATORY RESEARCH, BIOMED CENTRAL LTD., LONDON, GB, vol. 15, no. 1, 12 December 2014 (2014-12-12), page 157, XP021207508, ISSN: 1465-9921, DOI: 10.1186/S12931-014-0157-3, the whole document
WO-A1-2017016530
US-A1-2015045376
WO-A1-2013026797
US-A1-2014228286

(57) Изобретение относится к новому комбинированному лечению/ комбинированному лекарственному средству для лечения PF-ILD, включающему в качестве первого компонента комбинации терапевтически эффективное количество нинтеданиба или его фармацевтически приемлемой соли и в качестве второго компонента комбинации терапевтически эффективное количество PDE4B-ингибитора формулы I



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемую соль.

B1**045054****045054****B1**

1. Предпосылки создания изобретения

Интерстициальные заболевания легких (ILD) включают большую и разнообразную группу из более чем 200 заболеваний легких и респираторных состояний, которые характеризуются воспалением и фиброзом интерстициальной ткани, ткани и пространства между альвеолярными мешочками легкого (см., например, du Bois, Nat. Rev. Drug Discov. 2010, 9, 129-140). ILD затрагивают альвеолярный эпителий, эпителий легочных капилляров, базальную мембрану, периваскулярную и перилимфатическую ткани. ILD может развиваться, когда поражение легких запускает атипичный заживляющий ответ.

Обычно, организм генерирует только необходимое количество ткани для репарации повреждения. Но при ILD, репарационный процесс происходит неправильно и ткань вокруг альвеолярных мешочков (альвеол) становится рубцовой и утолщается. Это значительно усложняет кислороду прохождение в кровотоки.

Пролонгированное ILD может приводить к легочному фиброзу, но это не всегда так.

Следовательно, ILD также включает так называемые прогрессирующие фиброзирующие интерстициальные заболевания легких (PF-ILD).

При прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваниях легких (PF-ILD), ответ на повреждение легких при фиброзирующих ILD включает развитие фиброза, который становится прогрессирующим, самоподдерживающимся и независимым от исходной клинической ассоциации или пускового механизма. Постулируется, что на этой стадии необходима нацеленная антифиброзная терапия для замедления прогрессирования заболевания.

На основании сходности в обоих поведении, как в биологическом, так и клиническом, то есть самоподдерживающийся фиброз и прогрессирующее снижение функции легких и ранней смертности, считается оправданным группировать пациентов с PF-ILD вместе, независимо от исходного диагноза ILD.

Количество пациентов с различными фиброзирующими ILD, например, идиопатической неспецифической интерстициальной пневмонией (iNSIP) или хроническим гиперчувствительным пневмонитом (CHP), сходно с количеством или ниже количества пациентов с IPF; количество пациентов с прогрессирующим фенотипом в пределах каждой группы, при этом все еще оставаясь достоверным, еще ниже. Таким образом, группирование пациентов с PF-ILD вместе рассматривается только как облегченный путь предоставления эффективных терапий для всех пациентов с прогрессирующим фиброзирующим интерстициальным заболеванием легких.

Пациент страдает от PF-ILD, в том случае, если лечащий врач диагностирует для этого пациента интерстициальное заболевание легких (ILD) и что дополнительно по меньшей мере один из следующих критериев для прогрессирующего фиброзирующего интерстициального заболевания легких выполняется в течение 24 месяцев после первого визита к лечащему врачу, несмотря на лечение с применением неутвержденных лекарственных средств, применяемых в клинической практике для лечения ILD, как оценено лечащим врачом (неутвержденные лекарственные средства, применяемые в клинической практике для лечения ILD, включают, но не ограничиваясь только ими, кортикостероиды, азатиоприн, микофенолата мофетил (MMF), n-ацетилцистеин (NAC), ритуксимаб, циклофосфамид, циклоспорин, такролимус):

Клинически достоверное снижение форсированной жизненной ёмкости (FVC) %, прогнозируемое на основании относительного снижения $\geq 10\%$

Граничное снижение FVC %, прогнозируемое на основании относительного снижения ≥ 5 до $< 10\%$ в комбинации с ухудшением респираторных симптомов

Граничное снижение FVC %, прогнозируемое на основании относительного снижения ≥ 5 до $< 10\%$ в комбинации с увеличением участков фиброзных изменений при томографии грудной клетки.

Ухудшение респираторных симптомов, а также увеличение участков фиброзных изменений при томографии грудной клетки. Тем самым должны быть исключены изменения, обусловленные сопутствующими заболеваниями, например, инфекции, сердечная недостаточность.

Фиброзирующее заболевание легких на компьютерной томографии с высоким разрешением (HRCT), определяемое как ретикулярная аномалия с тракционным бронхоэктазом с или без образования пустот, с распространенностью заболевания $> 10\%$, осуществляемое в течение 12 месяцев после первого визита к лечащему врачу.

Для пациентов на фоне заболевания соединительной ткани (CTD): стабильное CTD, как определяется по отсутствию инициации новой терапии или отмены терапии в связи с CTD в течение 6 недель до первого визита к лечащему врачу.

Диффузионная способность легких для монооксида углерода (DLCO), скорректированная на гемоглобин (Hb) при первом визите к лечащему врачу $\geq 30\%$ и $< 80\%$ прогнозируется как нормальная при втором визите к лечащему врачу.

FVC $\geq 45\%$ прогнозируется при втором визите к лечащему врачу.

Примерами PF-ILD являются идиопатический фиброз лёгких (IPF), идиопатическая неспецифическая интерстициальная пневмония (iNSIP), гиперчувствительный пневмонит (HP), неклассифицируемые идиопатические интерстициальные пневмонии, ревматоидный артрит ILD (RA-ILD), Синдром Шегрена ILD, системная красная волчанка ILD (SLE-ILD), полимиозит и дерматомиозит ILD (PM/DM-ILD), сме-

шанное заболевание соединительной ткани ILD (MCTD-ILD), системный склероз ILD (SSc-ILD), другие заболевания соединительной ткани ILD (CTD-ILD), саркоидоз, асбестоз, силикоз.

Наиболее выраженными PF-ILD являются идиопатический фиброз лёгких (IPF) и системный склероз интерстициальная болезнь лёгких (SSc-ILD). Идиопатический фиброз лёгких (IPF) представляет собой PF-ILD, для которого не может быть идентифицировано объективной причины (которая является определением для "идиопатический") и который связан с типическими данными как радиографически (базальный и плевральный расположенный фиброз с образованием пустот), так и патологически (временно и пространственно гетерогенный фиброз, гистопатологическое образование пустот и фибробластных очагов).

Идиопатический фиброз лёгких (IPF) представляет собой хроническое фиброзное необратимое и в конечном итоге летальное заболевание легких, которое характеризуется прогрессирующим фиброзом в интерстициальной ткани в легких, что приводит к снижению объема лёгких и прогрессирующей легочной недостаточности. IPF также характеризуется специфической гистопатологической картиной, известной как обычная интерстициальная пневмония (UIP) (Raghu и др., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 183: 788-824.). Легочные функции у пациентов с фиброзом легких, вызываемые либо IPF или любым другим PF-ILD, определяются как форсированная жизненная ёмкость (FVC).

Термин IPF обозначает рубцевание легочной ткани и вызывает ухудшение диспноэ (нехватку воздуха). IPF обычно связан с плохим прогнозом со средней продолжительностью жизни 2-3 лет после постановки диагноза. Полагают, что IPF является результатом aberrантного процесса заживления ран, включающего /вовлекающего аномальное и чрезмерное отложение коллагена (фиброз) в интерстициальной ткани легких с минимальным ассоциированным воспалением (Harari S, Caminati A (2010). "IPF: new insight on pathogenesis and treatment". *Allergy.* 65 (5): 537-553).

Фибробласты осуществляют центральную роль в патогенезе фиброзных процессов, которые являются общими для ILD, PF-ILD и IPF, и несколько факторов оказывают влияние на их пролиферацию и синтез их внеклеточного матрикса (ECM). При ILD, эти мезенхимальные клетки имеют повышенную активность по отношению к их пролиферации, миграции, синтезу внеклеточного матрикса (ECM) и ответу на фиброгенные цитокины. Повышенное отложение ECM из активированных фибробластов (называемых "миофибробласты") способствует усилению жесткости легочной ткани и разрушению областей альвеолярного обмена кислорода, что приводит к прогрессирующему диспноэ и в конечном итоге летальному исходу.

На основании сходства в обеих этиологических патофизиологиях и клиническом течении PF-ILD и IPF, предполагается, что терапевтически активные агенты, которые нацелены на фундаментальные процессы при прогрессирующем фиброзе легких при IPF, будут проявлять сопоставимые терапевтические эффекты при PF-ILD.

В 2014 году, Управление по контролю за пищевыми продуктами и лекарственными препаратами США (FDA) разрешило первые лекарственные средства для лечения IPF в США: нинтеданиб (OFEV) производства Boehringer Ingelheim Pharmaceuticals Inc. и пирфенидон (ESBRIET) производства InterMune Inc. Пирфенидон уже получил разрешение для лечения IPF в Европе, Японии и нескольких других странах в этом время и нинтеданиб получил разрешения для лечения IPF в Европе в январе 2015.

Следовательно, стандартными лечениями IPF в настоящее время являются либо лечение с применением пирфенидона (US 3,974,281 B) или лечение с применением нинтеданиба (US 6762180 B; P05-1275) (<https://consultqd.clevelandclinic.org/2015/09/pirfenidone-and-nintedanib-novel-agents-in-the-treatment-of-idiopathic-pulmonary-fibrosis/>).

Тем не менее, у пациентов с IPF, имеющих легкое или умеренное нарушение FVC (≥ 50 % предсказанного), оба в настоящее время разрешенные лекарственные средства пирфенидон и нинтеданиб, могут только уменьшать снижение FVC, согласующееся с замедлением прогрессирования заболевания, но оба неспособны остановить или даже обратить или вылечить симптомы IPF (Tzouveleakis и др., *Ther. Clin. Risk Management* 2015, 11, 359-370).

Несмотря на оба варианта лечения, либо с применением пирфенидона или нинтеданиба, проявляют благоприятные эффекты на замедление прогрессирования IPF заболевания.

Наиболее значимыми побочными эффектами, связанными с обоими препаратами, нинтеданибом и пирфенидоном, являются побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта, в особенности диарея, тошнота, рвота, боли в области живота, снижение аппетита и снижение веса тела. В случае, если развиваются побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта, то они обычно устраняются либо путем прерывания лечения, уменьшения дозы или симптоматического лечения побочных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта (см. Mazzei и др., *Ther. Adv. Respir. Dis.* 2015, том 9 [3], сс. 121-129).

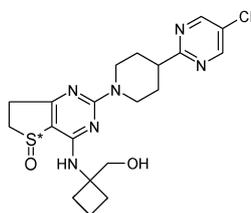
Благодаря этим "аккумулятивные побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта" пирфенидона с одной стороны и нинтеданиба с другой стороны, комбинированное лечение для IPF путем комбинирования пирфенидона и нинтеданиба не часто используется. В исследованиях было показано, что комбинированное лечение с применением пирфенидона и нинтеданиба приводит к увеличенным побочным явлениям со стороны желудочно-кишечного тракта, в особенности к диарее, тошноте, рвоте и

боли в эпигастральной области (Vancheri и др., Nintedanib with Add-on Pirfenidone in Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Results of the INJOURNEY Trial. Am J Respir Crit Care Med. 2017, Epub в печати).

В соответствии с вышеизложенным, поскольку эти оба активных компонента в настоящее время разрешены для лечения IPF, пирфенидон и нинтеданиб, - при введении отдельно - не способны останавливать или излечивать IPF, но вместо этого только могут замедлять прогрессирование заболевания IPF до определенной степени в процентах (Tzouveleakis и др., Ther. Clin. Risk Management 2015, 11, 359-370), и поскольку дополнительно оба компонента нинтеданиб и пирфенидон проявляют значительные побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта, которые накапливаются при комбинировании обоих соединений, существует настоятельная медицинская потребность в улучшенных лекарственных средствах для лечения IPF/лечения PF-ILD, в особенности для улучшенных комбинированных лечений/комбинированных лекарственных средств, содержащих в качестве первого компонента комбинации либо один из разрешенных лекарственных средств при IPF нинтеданиб или пирфенидон (с доказанной эффективностью для лечения IPF) и второй другой подходящий компонент комбинации, который является активным для лечения IPF/PF-ILD с приемлемой переносимостью (но который отличается от пирфенидона или нинтеданиба). Таким образом, это было бы чрезвычайно благоприятно обеспечивать новую комбинацию лекарственного средства с хорошей/улучшенной терапевтической эффективностью и с приемлемой переносимостью, в особенности по отношению к побочным явлениям со стороны желудочно-кишечного тракта.

Следовательно, задача настоящего изобретения состоит в обеспечении нового комбинированного лечения/комбинированного лекарственного средства для лечения PF-ILD/лечения IPF, включающего в качестве первого компонента комбинации один из разрешенных в настоящее время лекарственных средств для IPF, либо нинтеданиб или пирфенидон, и второй компонент комбинации (который отличается от нинтеданиба или пирфенидона), таким образом это комбинированное лечение / комбинированное лекарственное средство улучшено по сравнению с лечением PF-ILD/IPF с применением только первого компонента комбинации отдельно.

Эта задача решается путем обеспечения комбинированного лечения/комбинированного лекарственного средства для лечения PF-ILD / лечения IPF, которое включает в качестве первого компонента комбинации терапевтически эффективное количество нинтеданиба или его фармацевтически приемлемой соли и в качестве второго компонента комбинации терапевтически эффективное количество PDE4B-ингибитора формулы III



III.

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемую соль.

Это вышеуказанное новое комбинированное лечение / комбинированное лекарственное средство для лечения PF-ILD / лечения IPF, содержащее в качестве первого компонента комбинации нинтеданиб и в качестве второго компонента комбинации PDE4B-ингибитор формулы III, демонстрирует улучшенную терапевтическую эффективность при лечении PF-ILD/IPF по сравнению с лечением с применением нинтеданиба отдельно или по сравнению с лечением с применением вышеуказанного PDE4B-ингибитора отдельно. Эксперименты А) и В), как описано в разделе 6 (Экспериментальные данные) экспериментально продемонстрировали, что комбинация, содержащая PDE4B-ингибитор формулы III и нинтеданиб, проявляет:

а) отчетливый ингибирующий эффект на "переход фибробласта в миофибробласт" (что соответствует "второму уровню патогенеза фиброзных процессов, характерных для PF-ILD", в то время как нинтеданиб (разрешенное в настоящее время лекарственное средство для лечения IPF) не демонстрирует соответствующего ингибирующего эффекта на "переход фибробласта в миофибробласт" (следовательно, PDE4B-ингибитор формулы III проявляет "взаимодополняющий терапевтический эффект" к нинтеданибу, который указывает на то, что комбинация PDE4B-ингибитора формулы III и нинтеданиба будет иметь значительное преимущество по сравнению с лечением с применением нинтеданиба отдельно) и

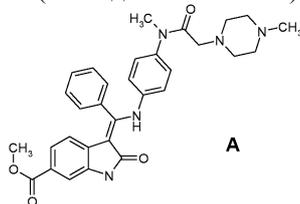
б) отчетливый "сверхаддитивный синергетический ингибирующий эффект" на "пролиферацию фибробластов" (что соответствует "третьему уровню патогенеза фиброзных процессов, характерных для PF-ILD", который тестируемые другие комбинации PDE4-ингибитор/нинтеданиб рофлумиласт/нинтеданиб и апремиласт/нинтеданиб неожиданно не проявляют).

Вышеуказанное комбинированное лечение/комбинированное лекарственное средство для лечения PF-ILD, в особенности для лечения IPF, согласно изобретению, содержащее в качестве первого компонента комбинации нинтеданиб и в качестве второго компонента новой комбинации PDE4B-ингибитор

формулы III, дополнительно проявляют приемлемую переносимость при лечении PF-ILD.

"Приемлемая переносимость" обозначает в контексте настоящего изобретения, что переносимость лечения с применением комбинации нинтеданиба с PDE4В-ингибитором формулы III, является лучше, чем переносимость комбинации нинтеданиба и пирфенидона, предпочтительно только незначительно хуже, более предпочтительно, не существенно хуже по сравнению с лечением с применением нинтеданиба отдельно и, таким образом, будет хорошо переноситься пациентом.

Нинтеданиб, соединение формулы A (свободное основание)



описан в US 6762180 B1 (WO 01/27081), который таким образом включен в качестве ссылки.

В US 7119093B (WO 2004/013099) описана моноэтансульфонатная соль этого соединения формулы A; другие солевые формы представлены в US 2009/0318471 A (WO 2007/141283).

Оба документа, US 7119093B и US 2009/0318471 A таким образом включены в качестве ссылки.

Нинтеданиб является чрезвычайно эффективным, перорально биодоступным ингибитором рецепторов фактора роста эндотелия сосудов (VEGFR), рецепторов фактора роста тромбоцитов (PDGFR) и рецепторов фактора роста фибробластов (FGFR). Он конкурентно связывается с аденозинтрифосфат (АТФ) связывающим карманом этих рецепторов и блокирует внутриклеточную передачу сигналов.

Дополнительно нинтеданиб ингибирует Fms-подобную тирозин-протеинкиназу 3 (Flt 3), лимфоцит-специфическую тирозин-протеинкиназу (Lck), тирозин-протеинкиназу lyn (Lyn) и прото-онкогенную тирозин-протеинкиназу src (Src) (Hilberg и др., Cancer Res. 2008, 68, 4774-4782). Недавно было обнаружено, что нинтеданиб также ингибирует рецептор колониестимулирующего фактора 1 (CSF1R) (Tandon и др., Am J Respir Crit Care Med 2017; 195:A2397).

Показано, что нинтеданиб также может ингибировать или ослаблять клеточную пролиферацию, способствующую ангиогенезу (Hilberg и др., Cancer Res. 2008, 68, 4774-4782), а также пролиферацию фибробластов в легких, миграцию (Hostettler и др., Respir Res. 2014, 15, 157) и трансформацию в миофибробласты (Wollin и др., Eur. Respir J 2015, 45, 1434-1445.), способствующих фиброзу легких (например, IPF), SSc-ILD и RA-ILD. Кроме того, были обнаружены его противофиброзная и противовоспалительная активность на моделях фиброза легких (Wollin и др., Eur. Respir J 2015, 45, 1434-1445; Wollin и др., J. Pharmacol. Exp. Ther. 2014, 394, 209-220). Дополнительно нинтеданиб продемонстрировал способность ингибировать миграцию фибробластов, пролиферацию и трансформацию в миофибробласты на SSc клеточных моделях, ослаблять фиброз кожи и легких на SSc и SSc-ILD животных моделях (Huang и др., Ann. Rheum. Dis. 2016, 74, 883-890, Huang и др., Ann Rheum Dis. 2017, Epub в печати), уменьшать фиброз легких на RA-ILD животных моделях (Redente и др., Am J Respir Crit Care Med 2016, 193, A4170) и ослаблять фиброз легких на мышинной модели хронического аллергического поражения легких, имеющего сходство с аспектами HP (Lee и др. Exp Lung Res. 2017 Epub в печати).

Фармацевтические дозированные формы, содержащие нинтеданиб, описаны в US 9907756B (WO 2009/147212) и в US 2011/0190318 (WO 2009/147220) и таким образом включены в настоящую заявку путем ссылки. Также, безводный порошковый препарат для ингаляции был описан (Vartiainen и др., Стендовый доклад на международном семинаре по фиброзу легких и дыхательный путей в Дублине, сентябрь 2016 г.).

Применение нинтеданиба для лечения различных заболеваний, и среди них также применение для лечения фиброзных заболеваний, описано в WO 2006/067165.

Нинтеданиб в качестве единственного компонента лечения для идиопатического фиброза лёгких обычно дозируют два раза в сутки в дозе 150 мг (два раза в сутки в дозе 100 мг для пациентов с печёночной недостаточностью лёгкой степени).

Кроме того, в WO 2006/067165 описано, что нинтеданиб можно комбинировать с различными компонентами комбинаций. Среди различных других компонентов комбинаций в WO 2006/067165 также предлагается комбинировать нинтеданиб с PDE4-ингибиторами, такими как, например, рофлумиласт.

Тем не менее, в отличие от нинтеданиба (который был разрешен для лечения IPF тогда же), PDE4-ингибитор рофлумиласт (изначально описанный в US 5712298 B) никогда не разрабатывался, ни утверждался для лечения пролиферативных фиброзных нарушений, таких как PF-ILD или IPF в особенности. Вместо этого, рофлумиласт тогда же был разрешен для лечения хронического обструктивного заболевания легких (COPD), которое является исключительно респираторным заболеванием, не вовлекающим любые фиброзные симптомы. Также другие PDE4-ингибиторы, такие как, например, апремиласт (изначально описанный в US 6020358B), которые появились на рынке в последующие годы, никогда не рассматривались как разработанные или подлежащие утверждению для лечения пролиферативных фиброзных заболеваний, таких как PF-ILD или, в особенности, для IPF, но вместо этого апремиласт был разре-

шен для лечения только псориаза (заболевание кожи).

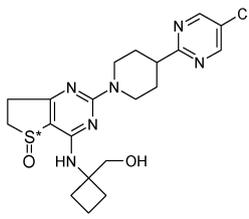
Дополнительно к рофлумиласту и апремиласту были опубликованы многие другие патентные заявки, в которых рассматривались другие PDE4/PDE4B-ингибиторы с улучшенными свойствами:

Птеридины в качестве PDE4-ингибиторов в WO 2006/056607, WO 2006/058869, WO 2006/058868 и WO 2006/058867.

Пиперазино-дигидротиенопиримидины в качестве PDE4-ингибиторов в WO 2006/111549, WO 2007/118793 и WO 2009/050242.

Пиперидинодигидротиенопиримидины в качестве PDE4B-ингибиторов в WO 2009/050248 и в WO 2013/026797.

PDE4B-ингибиторы формулы III



III

были описаны в US 8609670B (WO 2013/026797), который таким образом включен в качестве ссылки.

2. Общие термины и определения

Термины, которые специфически не определены в настоящей заявке, должны пониматься в значениях, в которых их понимает квалифицированный специалист в данной области техники в свете данного раскрытия и контекста. Однако, как используется в заявке, если специально не указано иначе, следующие термины будут иметь указанные значения и им присваиваются следующие обозначения.

Выражение "фармацевтически приемлемый" применяется в настоящей заявке по отношению к тем соединениям, материалам, композициям, и/или дозированным формам, которые с медицинской точки зрения, являются подходящими для применения для контактирования с тканями человека животных без проявления чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической ответной реакции или другой проблемы или осложнения, и соизмеримы с рациональным соотношением польза/риск.

Как используется в настоящей заявке, "фармацевтически приемлемая соль" относится к производным описанных соединений, где исходное соединение модифицируют путем получения его кислотных или основных солей. Примеры фармацевтически приемлемых солей включают, но не ограничиваясь только ими, соли неорганических или органических кислот щелочных остатков, таких как амины; щелочные или органические соли кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и подобные.

Термины "лечение" и "лечить", как используется в настоящей заявке, охватывает как терапевтическое, то есть лечебное и/или паллиативное, и превентивное, то есть профилактическое, лечение.

Терапевтическое лечение относится к лечению пациентов, у которых уже развилось одно или несколько из указанных состояний, которые проявляются в острой или хронической форме. Терапевтическое лечение может быть симптоматическим лечением для ослабления симптомов особого показания или этиологическим лечением для обратного развития или частичного обратного развития состояний показания или для остановки или замедления прогрессирования заболевания.

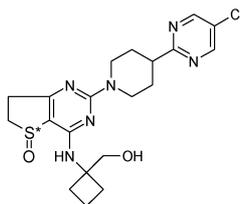
Профилактическое лечение ("предотвращение") относится к лечению пациентов, имеющих риск развития одного или нескольких указанных состояний, перед клиническим началом заболевания для уменьшения указанного риска.

Термины "лечение" и "лечить" включают введение одного или нескольких активных соединений для предотвращения или задержки начала симптомов или осложнений и для предотвращения или задержки развития заболевания, состояния или нарушения и/или для устранения или контролирования заболевания, состояния или нарушения, а также для облегчения симптомов или осложнений, связанных с заболеванием, состоянием или нарушением.

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество соединения согласно настоящему изобретению, которое (I) лечит или предотвращает конкретное заболевание или состояние, (II) ослабляет, облегчает или устраняет один или несколько симптомов конкретного заболевания или состояния, или (III) предотвращает или замедляет начало одного или нескольких симптомов конкретного заболевания или состояния, описанных в настоящем изобретении.

3. Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к способу лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD)), который включает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемой соли

и терапевтически эффективного количества ингибитора тирозинкиназы выбирают из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, указанный PDE4B-ингибитор формулы III вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции соединения формулы III у человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

В предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой идиопатический фиброз лёгких (IPF) или системный склероз ILD (SSc-ILD).

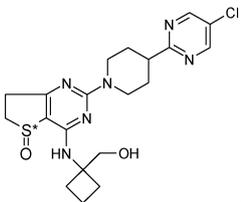
В другом предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, вышеуказанный PDE4B-ингибитор формулы III вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за одним, альтернативно или отдельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

В другом особо предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного способа, указанный PDE4B-ингибитор формулы III вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции соединения формулы III у человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

Кроме того, настоящее изобретение относится к PDE4B-ингибитору формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемой соли,

для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества указанного PDE4B-ингибитора формулы III в комбинации с терапевтически эффективным количеством ингибитора тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном вышеуказанном варианте осуществления прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких (PF-ILD) представляет собой либо идиопатический фиброз лёгких (IPF) или системный склероз ILD (SSc-ILD), более предпочтительно IPF.

В другом предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного PDE4B-ингибитор формулы III вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за одним, альтернативно или отдельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

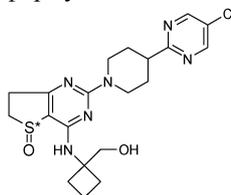
В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления вышеуказанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

В другом особо предпочтительном варианте осуществления, вышеуказанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, вышеуказанный PDE4B-ингибитор

формулы III вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции соединения формулы III в плазме крови человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

Кроме того, настоящее изобретение относится к ингибитору тирозинкиназы, выбранному из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемые соли, для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный способ включает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества указанного ингибитора тирозинкиназы в комбинации с терапевтически эффективным количеством PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемую соль.

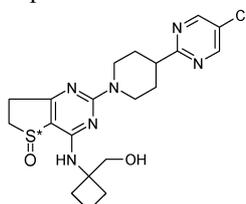
В предпочтительном вышеуказанном варианте осуществления одно или несколько прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD) будут представлять собой либо идиопатический фиброз лёгких (IPF) или системный склероз ILD (SSC-ILD, более предпочтительно IPF).

В другом предпочтительном варианте осуществления вышеуказанный ингибитор тирозинкиназы вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за одним, альтернативно или отдельно с PDE4B-ингибитором формулы III.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления вышеуказанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

В другом особо предпочтительном варианте осуществления, вышеуказанный способ ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

Настоящее изобретение относится к применению PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемой соли

для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где терапевтически эффективное количество указанного PDE4B-ингибитора формулы III или его фармацевтически приемлемой соли вводят пациенту, который в этом нуждается, в комбинации с терапевтически эффективным количеством ингибитора тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанное прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой либо идиопатический фиброз лёгких (IPF) или системный склероз ILD (SSC-ILD), более предпочтительно IPF.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный PDE4B-ингибитор формулы III вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за одним, альтернативно или отдельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нин-

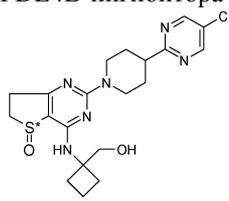
теданиб в форме его моноэтансульфоната. В другом особо предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного применения, указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В более предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к вышеуказанному применению PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

В особенно предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к вышеуказанному применению PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к вышеуказанному применению для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где PDE4B-ингибитор формулы III вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции соединения формулы III в плазме крови человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

Настоящее изобретение относится к применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где терапевтически эффективное количество указанного ингибитора тирозинкиназы вводят пациенту, который в этом нуждается, в комбинации с терапевтически эффективным количеством PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемую соль.

В предпочтительном варианте осуществления, изобретение относится к вышеуказанному применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанное прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой либо идиопатический фиброз лёгких (IPF) или системный склероз ILD (SSC-ILD), более предпочтительно IPF.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный ингибитор тирозинкиназы вводят одновременно, конкурентно, последовательно, один за одним, альтернативно или отдельно с PDE4B ингибитором формулы III или его фармацевтически приемлемой солью.

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната. В другом особо предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного применения, указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний лег-

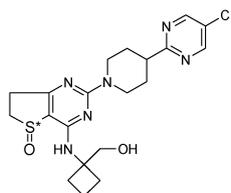
ких (PF-ILD).

В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к применению ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному применению ингибитора тирозинкиназы для приготовления фармацевтической композиции для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где PDE4B-ингибитор формулы III вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции соединения формулы III в плазме крови человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

PDE4B-ингибитор формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемую соль;

ингибитор тирозинкиназы, выбранный из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, и

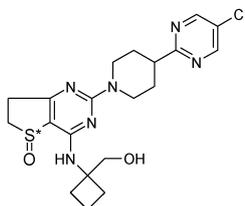
необязательно, один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанной фармацевтической композиции, где указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната. В другом особо предпочтительном варианте осуществления вышеуказанной фармацевтической композиции, указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к вышеуказанной фармацевтической композиции, где указанный PDE4-B-ингибитор формулы III в дозе, которая приводит к расчетной свободной фракции соединения формулы III в плазме крови человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, предпочтительно в интервале от 1 нмоль/л до 1000 нмоль/л.

В дальнейшем варианте осуществления настоящее изобретение относится к набору, который содержит

первую фармацевтическую композицию или дозированную форму, содержащую PDE4B-ингибитор формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр или его фармацевтически приемлемую соль,

необязательно, один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей и

вторую фармацевтическую композицию или дозированную форму, содержащую ингибитор тирозинкиназы, выбранный из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, и необязательно, один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей.

В предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному набору, который предназначен для применения в способе лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

В более предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному набору, который предназначен для применения в способе лечения либо идиопатического фиброза лёгких (IPF) или системного склероза ILD (SSc-ILD).

В другом предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному

набору, который предназначен для применения в способе лечения одного или нескольких PF-ILD, где указанную первую фармацевтическую композицию или дозированную форму вводят одновременно, конкурентно, последовательно, одну за одной, альтернативно или отдельно со второй фармацевтической композицией или дозированной формой.

В дальнейшем предпочтительном варианте осуществления изобретение относится к вышеуказанному набору, где указанный ингибитор тирозинкиназы второй фармацевтической композиции или дозированной формы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

В другом особо предпочтительном варианте осуществления вышеуказанного набора указанный ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната и его вводят в дозе, которая будет приводить к расчетной свободной фракции нинтеданиба моноэтансульфоната у человека в интервале от 1 нмоль/л до 300 нмоль/л, более предпочтительно в интервале от 10 нмоль/л до 100 нмоль/л.

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к вышеуказанному набору, где указанный PDE4-B-ингибитор формулы III в дозе, которая приводит к расчетной свободной фракции соединения формулы III в плазме крови человека в интервале от 1 нмоль/л до 2000 нмоль/л, предпочтительно 1 нмоль/л и 1000 нмоль/л.

В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к вышеуказанным наборам, которые дополнительно содержат листок-вкладыш, содержащий напечатанные инструкции для одновременного, конкурентного, последовательного, одна за одной, альтернативного или отдельного применения первой и второй фармацевтической композиции или дозированных форм для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к любому из вышеуказанных наборов, который дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий напечатанные инструкции для одновременного, конкурентного, последовательного, одна за одной, альтернативного или отдельного применения первой и второй фармацевтической композиции или дозированных форм для лечения идиопатического фиброза лёгких (IPF).

В другом особенно предпочтительном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к любому из вышеуказанных наборов, который дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий напечатанные инструкции для одновременного, конкурентного, последовательного, одна за одной, альтернативного или отдельного применения первой и второй фармацевтической композиции или дозированных форм для лечения системный склероз ILD (SSc-ILD).

4. Краткое описание фигур:

Фиг. 1: Эксперимент A1)

Ингибирование в зависимости от концентрации стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка фибробластами легких человека от пациентов с IPF с помощью соединения формулы III (закрашенные кружки, черная линия; IC₅₀=210 нмоль/л) или комбинации соединения формулы III с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая линия; IC₅₀=110 нмоль/л).

□ представлено измеренное ингибирование экспрессии α -SMA белка фибробластами в присутствии 100 нМ нинтеданиба отдельно, который не продемонстрировал ингибирующего эффекта.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченным (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к TGF- β леченным клеткам (=0% ингибирование).

Фиг. 2: Эксперимент A2)

Ингибирование в зависимости от концентрации TGF- β -стимулируемой экспрессии α -SMA белка фибробластами легких человека от пациентов с IPF с помощью апремиласта (закрашенные кружки, черная линия; IC₅₀=3 мкмоль/л) или комбинации апремиласта с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая линия; IC₅₀=2 мкмоль/л).

□ представлено измеренное ингибирование экспрессии α -SMA белка фибробластами в присутствии 100 нМ нинтеданиба отдельно, который не продемонстрировал ингибирующего эффекта.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченным (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к TGF- β леченным клеткам (=0% ингибирование).

Фиг. 3: Эксперимент A3)

Ингибирование в зависимости от концентрации стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка фибробластами легких человека от пациентов с IPF с помощью рофлумиласт N-оксида (закрашенные кружки, черная линия; IC₅₀=14 нмоль/л) или комбинации рофлумиласт N-оксида с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая линия; IC₅₀=8,5 нмоль/л).

□ представлено измеренное ингибирование экспрессии α -SMA белка фибробластами в присутствии 100 нМ нинтеданиба отдельно, который не продемонстрировал ингибирующего эффекта.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченным (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к TGF- β леченным клеткам (=0% ингибирование).

мулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к TGF- β леченым клеткам (=0% ингибирование).

Фиг. 4: Эксперимент В1)

Ингибирование в зависимости от концентрации FGF плюс IL-1 β -стимулированной пролиферация фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью соединения формулы III (закрашенные кружки, черная жирная линия; IC₅₀=255 нмоль/л) или комбинации соединения формулы III с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая жирная линия; IC₅₀=23 нмоль/л). Рассчитанная аддитивная кривая комбинации обоих лекарственных средств представлена незаштрихованными треугольниками и пунктирной линией.

□ представляет FGF плюс IL-1 β -стимулированная пролиферация фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью 100 нМ нинтеданиба отдельно.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченым (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к FGF + IL-1 β леченым клеткам (=0% ингибирование).

Фиг. 5: Эксперимент В2)

Ингибирование в зависимости от концентрации FGF плюс IL-1 β -стимулированной пролиферация фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью апремиласта (закрашенные кружки, черная жирная линия; IC₅₀=1,8 мкмоль/л) или комбинации апремиласта с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая жирная линия; IC₅₀=1,6 мкмоль/л). Рассчитанная аддитивная кривая комбинации обоих лекарственных средств представлена незаштрихованными треугольниками и пунктирной линией.

□ представляет FGF плюс IL-1 β -стимулированная пролиферация фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью 100 нМ нинтеданиба отдельно.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченым (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к FGF + IL-1 β леченым клеткам (=0% ингибирование).

Фиг. 6: Эксперимент В3)

Ингибирование в зависимости от концентрации FGF плюс IL-1 β -стимулированной пролиферация фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью рофлумиласт N-оксида (закрашенные кружки, черная жирная линия; IC₅₀=440 пмоль/л) или комбинации рофлумиласт N-оксида с 100 нмоль/л нинтеданиба (незаштрихованные кружки, серая жирная линия; IC₅₀=534 пмоль/л).

Рассчитанная аддитивная кривая комбинации обоих лекарственных средств представлена незаштрихованными треугольниками и пунктирной линией.

□ представляет FGF плюс IL-1 β -стимулированную пролиферацию фибробластов легких человека от пациентов с IPF с помощью 100 нМ нинтеданиба отдельно.

Данные представлены в виде \pm СПС для n=5 доноров. Данные нормированы к нелеченым (нестимулированным) контрольным клеткам (=100% ингибирование) и к FGF + IL-1 β леченым клеткам (=0% ингибирование).

5. Экспериментальные данные

6.1 Патогенез фиброзных процессов, которые характерны для ILD, PF-ILD и IPF

Патогенез фиброзных процессов, которые характерны для ILD, PF-ILD и IPF, в настоящее время не конца изучены.

Основными характеристиками IPF являются изменения эпителиальных и мезенхимальных клеток, а также взаимодействие между этими клетками, в то время как в настоящее время полагают, что воспалительные процессы играют только незначительную роль [Lehtonen и др., Respiratory Research (2016) 17: 14].

Одна из получивших широкое распространение гипотез для объяснения механизмов при патогенезе IPF указывает на то, что повреждение альвеолярного эпителия приводит к чрезмерной ответной реакции заживления ран с чрезмерным высвобождением факторов роста и транскрипции и последующей активацией цитокинов и трансформации фибробластов в фенотип секретирующих миофибробластов, что приводит к чрезмерной продукции белков внеклеточного матрикса (ECM), [King TE, Jr, Pardo A, Selman M., Lancet. 2011;378:1949-1961]. Фибробластные центры, типичная гистологическая характеристика особенность IPF, представляет собой специфический агрегат клеток, в особенности фибробластов и миофибробластов, покрытых поврежденным и гиперпластическим эпителием, и ECM, продуцируемые миофибробластами [Kuhn C, McDonald JA.. Am J Pathol. 1991;138:1257-1265]. Исследования показали, что IPF пациенты с высоким количеством фибробластных очагов имеют сокращенное выживание [Kaarteenaho R., Respir Res. 2013;14(1):43]. Дополнительно, было показано, что степень экспрессии альфа актина гладких мышц (α -SMA), маркера миофибробластов, в легких IPF-пациентов, находится в обратной зависимости от выживания пациентов [Waisberg DR, Parra ER, Barbas-Filho JV, Fernezlian S, Capelozzi VL]. Повышенной экспрессии теломеразы фибробластов предшествует экспрессия миофибробластами альфа актина гладких мышц при идиопатическом фиброзе лёгких [Clinics (Sao Paulo) 2012;67:1039-1046].

Существующие в настоящее время концепции патогенеза фиброзных процессов свидетельствуют о

том, что после воздействия эндогенных или экзогенных стимулов, эпителий легких инициирует повреждающую ответную реакцию, которая приводит к продукции растворимых факторов, таких как трансформирующий ростовой фактор бета-1 (TGF- β 1), фактор роста тромбоцитов (PDGF), фактор роста соединительной ткани (CTGF), и цитокины, включая интерлейкин-4 (IL-4) и интерлейкин-13 (IL-13). Эти вещества способствуют захвату воспалительных клеток и мезенхимальную активацию, которая вызывает распространение находящихся в ткани пост-эмбриональных фибробластов, которые, как полагают, приводят к появлению активированных миофибробластов. Эти клетки являются центральными в процессе заживления ран, но, если они немодулируемые, откладывают чрезмерное количество ECM и разрушают нормальную архитектуру легких. Во время нормального процесса заживления ран, миофибробласты активированы временно и вызывают непосредственно продукцию гранулирующей ткани путем выработки ECM и проявления сил сцепления. После осуществления заживления, гранулирующая ткань рассасывается и миофибробласты подвергаются запрограммированной клеточной гибели для восстановления нормальной архитектуры и функции ткани [Klingberg и др., *J Pathol.* 2013; 229: 298-309]. Нарушения на любой стадии в этом процессе может вызывать патологию ткани. Если заживляющий ответ является недостаточным, как это наблюдается при синдроме острой дыхательной недостаточности у взрослых, развивается патология, при которой доминируют острые повреждения и, вследствие этого, диффузное альвеолярное повреждение. Однако если доминирует фаза заживления, окружение ткани сдвигается в сторону фиброза и ремоделирования и развивается патология, при которой доминирует нерегулируемое накопление рубцовой ткани. Полагают, что фибробласты и активированные миофибробласты являются центральными в этом процессе [Moore и др., *Curr Pathobiol Rep.* сентябрь 2013 г.; 1 (3): 199-208].

На последующем уровне, фибробласты и миофибробласты при IPF демонстрируют патологический фенотип, который характеризуется неконтролируемой пролиферацией и выживанием. Эти клетки накапливаются в интерстициальной ткани легких, где они откладывают чрезмерные количества обогащенных коллагеном-I ECM и в конечном итоге организуются в фибробластные центры, описанные выше. Поскольку эти участки распространяются и становятся прилегающими к альвеолярному пространству, то они, вероятно, сначала прорывают, а затем в конечном итоге разрушают альвеолярные базальные мембраны [White и др., *J Pathol.* 2003; 201: 343-354].

Это распространение в значительной степени приписывается резистентности к запрограммированной клеточной гибели, которая была описана для первичных фибробластов, полученных из легочной ткани IPF [Maher и др., *Am J Respir Crit Care Med.* 2010; 182: 73-82 и Nho и др., *PLoS one* 2013; 8]. Для этого наблюдения предложено несколько возможных механизмов, включая аномалии апоптотических путей, aberrantную Wnt передачу сигналов [Chang и др., *J Biol Chem.* 2010; 285: 8196-8206] и дефектную аутофагию [Patel и др., *PLoS One* 2012; 7].

Тем не менее, различные хорошо охарактеризованные цитокины, включая TGF- β , либо были обнаружены в поврежденных легких или продуцируются воспалительными клетками, удаленными из легких. Кроме того, на животной модели легочного фиброза, продукция TGF- β увеличена перед синтезом коллагена и он главным образом продуцируется с помощью альвеолярных макрофагов. При прогрессирующем идиопатическом фиброзе лёгких, могут быть обнаружены большие отложения TGF- β с помощью иммуногистохимического окрашивания, главным образом в эпителиальных клетках в областях регенерации и ремоделирования легких. Это свидетельствует о том, что патогенез прогрессирующего фиброза, характерного для заболевания легких, таких как ILD, PF-ILD и IPF, может представлять собой aberrantный репаративный процесс (см. Khali и др., *Ciba Found Symp.* 1991; 157: 194-207 и Cutroneo и др., *J. Cell. Physiol.* 211: 585-589, 2007).

На основании этих исходных данных относительно фиброза, является очевидным, что патология фиброзных процессов, лежащих в основе ILD, PF-ILD и в особенности IPF, может быть разделена на "три различных уровня патогенеза фиброзных процессов", в соответствии с которыми хронологический порядок в особенности второго и третьего уровня еще не полностью понятен и также может частично рассматриваться параллельно.

На первом уровне фиброзных процессов, после воздействия эндогенных или экзогенных стимулов, эпителий легких обычно инициирует поражающий ответ, который приводит к продукции растворимых факторов, таких как трансформирующий ростовой фактор бета-1 (TGF- β 1), цитокины и профиброзные медиаторы/фиброзные маркеры, такие как, например, проколлаген, фибронектин и MCP-1.

После этого, на втором уровне патогенеза фиброзных процессов, эти профиброзные медиаторы/фиброзные маркеры способствуют мезенхимальной активации, которая вызывает распространение резидентных в тканях пост-эмбриональных фибробластов, которые, как полагают, приводят к появлению миофибробластов, активированной формы фибробластов. Эти миофибробласты являются центральными в процессе заживления ран, но, если они немодулированы, то они продуцируют чрезмерные количества материала внеклеточного матрикса и коллагена/рубцовой ткани. Этот "миофибробластный фенотип" дополнительно характеризуется сильной экспрессией α -актина гладких мышц (α -SMA). Трансформация/активация фибробластов в миофибробласт, который интенсивно экспрессирует α -SMA белок, составляет второй уровень патогенеза фиброзных процессов, характерных для ILD, PF-ILD и IPF.

Следовательно, количественное определение экспрессии белка α -актин гладких мышц (α -SMA) является подходящим критерием для определения степени трансформации/активации фибробластов в миофибробласты, что соответствует второму уровню патогенеза фиброзных процессов, характерных для ILD, PF-ILD и IPF.

Третий уровень патогенеза фиброзных процессов, характерных для ILD, PF-ILD и IPF характеризуется неконтролируемой пролиферацией/делением клеток и выживанием фибробластов и миофибробластов, вероятно, благодаря их резистентности к запрограммированной клеточной гибели. Пролиферирующие фибробласты и миофибробласты накапливаются в интерстициальной ткани легких, где они откладывают чрезмерные количества обогащенного коллагеном-I ЕСМ и в конечном итоге организуются в фибробластные центры.

Количественное определение деления клеток (например, путем количественного определения инкорпорации BrdU в ДНК пролиферирующих фибробластов) является подходящим критерием для определения степени пролиферации фибробластов, что соответствует третьему уровню патогенеза фиброзных процессов, характерных для ILD, PF-ILD и IPF.

6.2 Принцип экспериментальных анализов А) и В):

Фибробласты легких IPF-пациентов (IPF-LF клетки), выращиваемые в планшетах на 96 лунок, инкубировали в течение 30 мин с различными концентрациями PDE4 ингибиторов "Соединение формулы III", "апремилласт" или "рофлумиласт-N-оксид" или с комбинацией каждого из вышеуказанных PDE4-ингибиторов с нинтеданибом.

После инкубирования с соединением, клетки стимулировали с помощью релевантных для анализа стимулов и инкубировали в течение релевантных для анализа времени в присутствии тестируемых соединений.

α -SMA белок определяли с помощью вестерн-заместительного анализа (MSD), используя моноклональные антитела к актину гладких мышц.

BrdU, инкорпорированный в ДНК пролиферирующих клеток, определяли с помощью ELISA.

BrdU представляет собой аналог предшественника ДНК тимидина. В пролиферирующих клетках, ДНК реплицируется перед осуществлением деления клеток. Если BrdU добавляют в культуру клеток, то пролиферирующие клетки будут инкорпорировать его и их ДНК, точно так же, как они бы инкорпорировали тимидин. Количество BrdU в ДНК клеток может быть обнаружено с помощью специфических анти-BrdU флуоресцирующих антител с последующей проточной цитометрии или с помощью клеточного ELISA с моноклональными антителами к BrdU.

6.3 Эксперимент А): Исследование белка α -SMA (актин гладких мышц) (вестерн-заместительного анализа)

Высевание и истощение клеток

Фибробласты IPF-легких (пассаж 5-8) высевали в планшеты для культивирования тканей на 96 лунок в количестве 4500 клеток/лунку с 100 мкл/лунку FBM + дополнительные компоненты. Через 24 часа после высеваания клетки промывали один раз с помощью FBM среды без дополнительных компонентов и истощали в течение 24 ч.

Эксперимент А1)

В эксперименте А1) PDE4B-ингибитор формулы III использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 1) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеданиба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 1).

Эксперимент А2)

В эксперименте А2) апремилласт использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 2) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеданиба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 2).

Эксперимент А3)

В эксперименте А3) рофлумиласт-N-оксид использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 3) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеданиба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 3).

Разведения тестируемых соединений

Все "тестируемые соединения" (PDE4B-ингибитор формулы III, апремилласт или рофлумиласт) приготавливали 1000× в 0,1 ммоль/л HCl или ДМСО и осуществляли серийные разведения 1:3,16 (в 0,1 ммоль/л HCl или ДМСО). Для получения 2 концентрированных соединения-среда, приготавливали 1:500

разведение (2 мкл 1000x разведения добавляли к 998 мкл FBM плюс 2 нмоль/л PGE2).

Предварительное инкубирование с тестируемыми соединениями

Через 48 ч после высевания среду отсасывали и добавляли FBM (100 мкл на лунку). После инкубирования в течение 1 ч при 37°C 90 мкл среды, содержащей 2x концентрированные соединения (при различных концентрациях) плюс 2x концентрированный PGE2 (2 нмоль/л) добавляли в течение 30 мин.

Конечная концентрация для PGE2 составляла 1 нмоль/л.

Стимуляция

Через 30 мин после предварительного инкубирования с тестируемым соединением (190 мкл), добавляли 10 мкл 20x концентрированного TGF-β и клетки стимулировали в течение 48 ч при температуре 37°C.

Для этого маточный раствор TGF-β (20 мкг/мл, восстановленный в 4 ммоль/л стерильной HCL) разводили 1:200 в истощенной среде для достижения концентрации 100 нг/мл. 10 мкл этой TGF-β среды или истощенной среды добавляли к указанным лункам. Концентрацию тестируемого соединения поддерживали во время стимуляции. Конечная концентрация TGF-β составляла 4 нг/мл.

Белковые лизаты

Через 48 ч после стимуляции супернатанты удаляли и хранили при -80°C для дальнейших экспериментов.

Клетки промывали один раз с помощью ледяного PBS и добавляли на лунку 50 мкл RIPA буфера, содержащего 1x ингибитор протеазы. Лизаты инкубировали в течение 5 мин на льду, затем хранили при -80°C.

Вестерн-заместительный анализ α-SMA

После размораживания, 25 мкл каждого лизата переносили на мембрану многоэлементный планшет на 96 лунок (MSD) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре с осторожным встряхиванием. После окончания времени инкубирования, планшеты промывали 3 раза с помощью 200 мкл 1x Трис-промывочного буфера (MSD) и добавляли 150 мкл 3% блокирующего буфера в течение 1 часа. После блокирования, планшеты промывали 3 раза с помощью 200 мкл 1x Трис-промывочного буфера и 25 мкл раствора антитела (на планшет 0,75 мл 3% блокирующего буфера, 2,25 мл 1x Трис-промывочного буфера, 1,2 мкл анти-α-SMA антитела (1:2500), 15 мкл козьего антимиошиного сульфо-меченного антитела (1:200) добавляли в течение 1 ч. После АВ-инкубирования планшеты промывали 3 раза с помощью 200 мкл 1x Трис-промывочного буфера и добавляли на лунку 150 мкл 1x MSD буфера считывания.

Планшеты анализировали с помощью Sector Imager (MSD).

6.4 Эксперимент В: Анализ пролиферации клеток

Высевание и истощение клеток

Фибробласты IPF-легких (пассаж 5-8) высевали в планшеты для культивирования тканей на 96 лунок в количестве 2500 клеток/лунку с 100 мкл/лунку FBM + дополнительные компоненты. Через 24 ч после высевания клетки промывали один раз с помощью FBM среды без дополнительных компонентов и затем выдерживали в этой среде в течение 24 ч истощения.

Эксперимент В1)

В эксперименте В1) PDE4B-ингибитор формулы III использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 4) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеданиба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 4).

Пунктирная линия с незаштрихованными треугольниками представляет "рассчитанную аддитивную кривую" комбинированного лечения с применением 100 нмоль/л нинтеданиба с соответствующей концентрацией PDE4B-ингибитора формулы III.

Эксперимент В2)

В эксперименте В2) апремиласт использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 5) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеданиба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 5).

Пунктирной линией с незаштрихованными треугольниками представляет "рассчитанная аддитивная кривая" комбинированного лечения с применением 100 нмоль/л нинтеданиба с соответствующей концентрацией апремиласта.

Эксперимент В3)

В эксперименте В3) рофлумиласт-N-оксид использовали в качестве "тестируемого соединения"

в возрастающих концентрациях либо отдельно (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую на фиг. 6) или

в возрастающих концентрациях совместно с фиксированной концентрацией 100 нмоль/л нинтеда-

ниба (см. незаштрихованные кружки и серая жирная линия на фиг. 6).

Пунктирная линия с незаштрихованными треугольниками представляет "рассчитанную аддитивную кривую" комбинированного лечения с применением 100 нмоль/л нинтеданиба с соответствующей концентрацией рофлумиласт-N-оксида.

Разведения тестируемых соединений

Все тестируемые соединения приготавливали 1000x в 0,1 ммоль/л HCl или ДМСО и осуществляли серийные разведения 1:3,16 (в 0,1 ммоль/л HCl или ДМСО). Для получения 1x концентрированного соединения в среде 1 мкл 1000x ДМСО разведение добавляли к 999 мкл FBM.

Предварительное инкубирование с тестируемыми соединениями

Через 48 ч после высевания, среду удаляли путем отсасывания и 90 мкл соединения или истощенной среды добавляли в течение 30 мин.

Стимуляция

Через 30 мин после предварительного инкубирования с тестируемым соединением (90 мкл) добавляли 10 мкл 10x концентрированного FGF плюс IL-1 β и клетки стимулировали в течение 92 ч при температуре 37°C.

Для этого FGF и IL-1 β маточные растворы (250 и 10 мкг/мл соответственно) разводили в истощенной среде для достижения концентрации 200 нг/мл и 300 пг/мл для FGF и IL-1 β соответственно. 10 мкл этой стимулирующей среды или истощенной среды добавляли к указанным лункам.

Концентрация тестируемого соединения поддерживали во время стимуляции. Конечная концентрация FGF составляла 20 нг/мл.

Конечная концентрация IL-1 β составляла 30 пг/мл.

Анализ BrdU

Пролиферацию определяли с помощью колориметрического иммунологического анализа для количественного определения пролиферации клеток, на основании инкорпорации BrdU во время синтеза ДНК.

Анализ осуществляли в соответствии с инструкциями производителя.

Через 72 ч после стимуляции осуществляли 1:100 разведение BrdU в истощенной среде (полученная концентрация 100 мкмоль/л) и добавляли 10 мкл на лунку (конечная концентрация на лунку 10 мкмоль/л). Приблизительно через 18 ч BrdU среду удаляли путем отсасывания. Клетки фиксировали и денатурировали в течение 30 мин при комнатной температуре с реагентом FixDenat. Реагент удаляли путем перехвата и добавляли анти-BrdU-POD рабочий раствор (время инкубирования: 90 мин). Планшет промывали три раза с помощью 200 мкл промывочного буфера, затем инкубировали с раствором субстрата приблизительно в течение 10 мин. Реакцию останавливали путем добавления 1 моль/л H₂SO₄ к раствору субстрата и планшеты анализировали при 450 нм на фотометре (EnVision 2104 Multilabel планшет-ридер, PerkinElmer).

6.5 Анализ данных

x-кратность относительно нестимулированного контроля рассчитывали на основании полученных показаний оптической плотности (ОП) для BrdU анализа или MSD единиц (α -SMA анализ).

Значение ингибирования в % рассчитывали на основании x-кратного относительно нестимулированного контроля.

В каждом из экспериментов для различных доноров все значения ингибирования определяли в двух или трех повторах.

Значения холостых проб вычитали из всех значений.

Значения IC₅₀ стимулированных клеток определяли в соответствии со следующей формулой:

$$\text{Значение ингибирования в \%} = 100 - (Y/K1) * 100$$

K1 = среднее значение ОП стимулированных контрольных лунок без обработки тестируемым соединением минус среднее значение ОП нестимулированных контрольных лунок без обработки тестируемым соединением Y = ОП стимулированной лунки, обработанной соединением

Рассчитывали нелинейную регрессию log (концентрация ингибитора) относительно значения ингибирования в %, используя трехпараметрическую подгонку с переменным угловым коэффициентом с помощью программного обеспечения Graph Pad Prism Software.

Для расчета аддитивного эффекта соединения формулы III, апремиласта или рофлумиласт-N-оксида в комбинации с нинтеданибом использовали следующую формулу

$$\text{Эффект PDE4 ингибитора (EB) + эффект нинтеданиба (EN) = EB+N = EB + EN - (EB*EN)}$$

= пунктирная кривая (Poch & Holzmann, 1980).

Тестируемые соединения

Тестируемые соединения Соединение формулы III, апремиласт, рофлумиласт-N-оксид и нинтеданиб растворяли в ДМСО и хранили при -20°C. Приготавливали серийные разведения из 7 концентраций перед каждым экспериментом.

6.6 Материалы и способы

Материал	Поставщик	Номер заказа
Тестируемый образец IPF-LF клеточная линия (пассаж 5 - 8)	Asterand	D116769 D116783 D119873 BI209755 BI210978 BI212020
rhTGF- β	R&DSystems	240-B-010
rhFGF основной	R&DSystems	234_FSE
rhIL-1 β	R&DSystems	201-LB-005
rhPGE2	Tocris	2296
Моноклональное антитела к актину гладких мышц	Sigma	A2547
Козье антимышиное сульфо-меченное антитело	MSD	R32AC-1
Многоэлементный планшет на 96 лунок Plate High Bind	MSD	L15XB-3
MSD Blocker A	MSD	R93BA-4
MSD Трипс-промывочный буфер (10x)	MSD	R61TX-1
MSD Буфер считывания T (4x)	MSD	R92TC-2
RIPA буфер	Sigma	R0278-500ML
Смесь ингибиторов протеаз (100x)	ThermoScientific	78437
PBS	Gibco	10010023
BrdU-анализ	Roche	11647229001
Колба для клеточной культуры, 75 см ² , обработанная культурой ткани	BD Falcon™	353110
Колба для клеточной культуры, 175 см ² , обработанная культурой ткани	BD Falcon™	353112
Планшет на 96 лунок (клеточная культура)	Nunc microwell 96F	167008
DMCO	Merck	1.02952.1000
Cells-to-CT 1 Step TaqMan набор	Ambion	A25602

Среда для наращивания клеток:

FBM (минимальная среда для фибробластов, Lonza, № по кат.: CC-3131), дополненная инсулином, FGF-2, 0,5 % FBS, GA-1000 (все в FGM-2 SingleQuots, Lonza, № по кат. CC-4126)

Реагенты для субкультивирования IPF-LF клеток:

Нерес забуференный физиологический раствор (Lonza, № по кат. CC-5022)

Трипсин/EDTA (0,25 мг/мл) (Lonza, CC-5012)

TNS (трипсин-нейтрализирующий раствор, Lonza, CC-5002)

Истощенная среда:

FBM без дополнительных компонентов

Стимулирующая среда для α -SMA анализа: FBM плюс 4 нг/мл rhTGF- β и 1 нмоль/л PGE2

Стимулирующая среда для BrdU анализа:

FBM плюс 20 нг/мл rhbFGF плюс 30 пг/мл rhIL-1 β

6.7 Интерпретация экспериментов

Эксперимент А): Ингибирование стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка фибробластами легких человека от пациентов с IPF

Чем больше специфический активный агент имеет тенденцию ингибировать стимулируемую TGF- β экспрессию α -SMA белка фибробластами легких человека от IPF пациентов, тем больше этот агент будет иметь терапевтический эффект на втором уровне патогенеза фиброзных процессов, который заключается в переходе фибробластов в миофибробласты. Следовательно, в этом Эксперименте А), который имитирует второй уровень фиброзных процессов, был экспериментально определен эффект:

а) нинтеданиба отдельно, соединения формулы III отдельно, апремиласта отдельно и рофлумиласт-N-оксида отдельно и

б) соединения формулы III с нинтеданибом, апремиласта с нинтеданибом и рофлумиласт-N-оксида с нинтеданибом

на стимулируемую TGF- β экспрессию α -SMA белка фибробластами легких человека от IPF пациентов.

В то время как нинтеданиб, вводимый отдельно в концентрации 100 нмоль/л, не проявляет в этом эксперименте ингибирующего эффекта на стимулируемую TGF- β экспрессию α -SMA белка фибробластами легких человека (подтверждая тот факт, что нинтеданиб в этой концентрации отдельно не проявляет терапевтического эффекта на втором уровне патогенеза фиброзных процессов (см. □; на фиг. 1, 2 и 3: Ингибирование составляло ≤ 0), все тестируемые PDE4-ингибиторы (соединение формулы III, апремиласт и рофлумиласт-N-оксид), когда вводятся отдельно и также когда вводятся совместно с нинтедани-

бом в фиксированной концентрации 100 нмоль/л, проявляют, по меньшей мере, в определенных концентрациях ингибирование в зависимости от концентрации стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка фибробластами легких человека, что подтверждает определенный терапевтический эффект всех этих PDE4-ингибиторов на втором уровне патогенеза фиброзных процессов (активация миофибробластов).

На основании этих результатов можно сделать вывод о том, что PDE4-ингибиторы - по меньшей мере в определенном диапазоне концентраций - имеют потенциал проявлять зависимый от концентрации терапевтический эффект на "переход/активацию фибробласта в миофибробласт", явление, которое представляет второй уровень патогенеза фиброзных процессов, которые характерны для ILD, в особенности для PF-ILD, в то время как нинтеданиб в концентрации 100 нмоль/л отдельно не проявляет терапевтического эффекта на тот же самый "второй уровень патогенеза" в соответствии с этим экспериментом.

Следовательно, PDE4-ингибиторы проявляют по отношению к нинтеданибу так называемый "комплементарный эффект" или "дополнительный эффект" "переход/активацию фибробласта в миофибробласт" (= второй уровень патогенеза фиброзных процессов). Таким образом, введение нинтеданиба совместно с PDE4B-ингибитором формулы III будет проявлять превосходящий эффект на терапевтическую эффективность по сравнению с лечением IPF с применением, например, нинтеданиба отдельно.

Если Вы сравните измеряемое ингибирование на стимулируемую TGF- β экспрессию α -SMA белка фибробластов легких человека для соединения формулы III (фиг. 1), для апремиласта (фиг. 2) и для рофлумиласт-N-оксида (фиг. 3), то является очевидным, что только для соединения формулы III (фиг. 1) полная кривая концентрация/ингибирование расположена при ингибированиях "выше нуля", в то время как, например, для апремиласта и в особенности для рофлумиласт-N-оксида "низкие концентрации PDE4-ингибитора (либо отдельно или в комбинации с нинтеданибом)" приводят "к отрицательным ингибированиям стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка" (подтверждая отсутствие терапевтического эффекта на втором уровне фиброзных процессов для апремиласта и в особенности для рофлумиласт-N-оксида при этих более низких концентрациях (в то время как соединение формулы III, как видно, проявляет положительное ингибирование стимулируемой TGF- β экспрессии α -SMA белка при всех тестируемых концентрациях).

Эксперимент В): Ингибирование пролиферации фибробластов

Чем больше специфический активный агент имеет тенденцию ингибировать пролиферацию культивируемых фибробластов легких человека от IPF пациентов, тем больше этот агент будет иметь терапевтический эффект на третьем уровне патогенеза фиброзных процессов, который представляет собой пролиферацию фибробластов.

Следовательно, эффект

а) нинтеданиба отдельно, соединения формулы III отдельно, апремиласта отдельно и рофлумиласт-N-оксида отдельно и

б) соединения формулы III с нинтеданибом, апремиласта с нинтеданибом и рофлумиласт-N-оксида с нинтеданибом

на пролиферацию фибробластов легких человека от IPF пациентов был экспериментально определен в Эксперименте В).

В этом эксперименте В), который имитирует третий уровень патогенеза фиброзных процессов ("пролиферация фибробластов"), нинтеданиб, вводимый отдельно в концентрации 100 нмоль/л, уже проявляет отчетливый ингибирующий эффект на пролиферацию фибробластов легких человека (см. данные ингибирования обозначены символом \square на фиг. 4, 5 и 6).

Тем не менее, результаты Экспериментов В1) на фиг. 4, В2) на фиг. 5 и В3) на фиг. 6 демонстрируют, что не только нинтеданиб отдельно имеет ингибирующий эффект на пролиферацию фибробластов, но также и PDE4-ингибиторы, такие как соединение формулы III (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую в В1, фиг. 4)), апремиласт (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую в В2, фиг. 5)) и рофлумиласт-N-оксид (см. закрашенные кружки и черную жирную кривую в В3 на фиг. 6)) проявляют в целом ингибирующий эффект в зависимости от концентрации на пролиферацию фибробластов и, следовательно, имеют терапевтический эффект на пролиферацию фибробластов (третий уровень патогенеза фиброзных процессов).

Поскольку, очевидно, оба компонента нинтеданиб в фиксированной концентрации 100 нмоль/л и тестируемые PDE4-ингибиторы в зависимости от концентрации проявляют ингибирующий эффект на пролиферацию фибробластов, то можно предполагать простой "аддитивный эффект" для ингибирования пролиферации фибробластов с помощью комбинации 100 нмоль/л нинтеданиба и соответствующего PDE4-ингибитора в его соответствующей концентрации.

На фиг. 4, 5 и 6 пунктирные кривые с незаштрихованными треугольниками представляют эти "рассчитанные аддитивные комбинационные кривые", которые рассчитаны на основании простого "добавления" измеренного значения ингибирования для 100 нмоль/л нинтеданиба плюс измеренное значение ингибирования для соответствующего PDE4-ингибитора отдельно в изменяемых концентрациях.

Тем не менее, серые жирные кривые с незаштрихованными кружками на фиг. 4, 5 и 6 представляют "экспериментально измеренные кривые ингибирования для комбинаций, содержащих 100 нмоль/л нин-

теданиба и соответствующий PDE4-ингибитор в изменяемых концентрациях".

Неожиданно, на фиг. 4, на которой показано результаты Эксперимента В1) "экспериментально измеренные кривые ингибирования пролиферации фибробластов" для комбинации нинтеданиба с соединением формулы III (жирная серая линия, незаштрихованные кружки) являются "достоверно сдвинутыми влево" (что обозначает к более низким концентрациям соединения формулы III) по сравнению с соответствующей "рассчитанной аддитивной кривой ингибирования" для комбинации нинтеданиба с соединением формулы III (пунктирная кривая с незаштрихованными треугольниками).

Этот существенный "сдвиг влево" является очевидным индикатором для "сверхаддитивного синергетического эффекта" комбинации 100 нмоль/л нинтеданиба с соединением формулы III. Этот экспериментально наблюдаемый "сверхаддитивный синергетический эффект" для комбинации нинтеданиба и соединения формулы III является полностью неожиданным, в особенности, поскольку этот синергетический сверхаддитивный эффект, по-видимому, не представляет "классовый эффект".

На фиг. 5 представлены результаты соответствующего Эксперимента В2), где соединение формулы III заменяют на апремиласт. На фиг. 5 показано, что "экспериментально измеренные кривые ингибирования" для комбинации нинтеданиба с апремиластом (жирная серая линия, незаштрихованные кружки) не сдвинута влево, но вместо это даже незначительно сдвинута вправо (это обозначает к более высоким концентрациям апремиласта) по сравнению с соответствующей "рассчитанной аддитивной кривой ингибирования" для комбинации нинтеданиба с апремиластом (пунктирная кривая с незаштрихованными треугольниками). Такой "сдвиг вправо" теоретически будет даже являться индикатором "меньше, чем аддитивное ингибирование пролиферации фибробластов" ("антисинергетический эффект") с помощью комбинации нинтеданиба и апремиласта. Тем не менее, этот незначительный сдвиг вправо "измеренной кривой для комбинации нинтеданиб/апремиласт" по сравнению с "рассчитанной кривой комбинации нинтеданиб/апремиласт" более или менее находится в пределах планок погрешностей и, следовательно, не является статистически достоверным. Таким образом, для комбинации нинтеданиба с апремиластом экспериментально может наблюдаться более или менее нормальный "аддитивный эффект", как ожидается.

На фиг. 6 представлены результаты соответствующего Эксперимента В3), где соединение формулы III заменено на рофлумиласт-N-оксид. На фиг. 6 показано, что "экспериментально измеренные кривые ингибирования" для комбинации нинтеданиба с рофлумиласт-N-оксидом (жирная серая линия, незаштрихованные кружки) также сдвинута вправо, а не влево по сравнению с соответствующей "рассчитанная аддитивная кривая ингибирования" для комбинации нинтеданиба с рофлумиласт-N-оксидом (пунктирная кривая с незаштрихованными треугольниками). Такой "сдвиг вправо" является индикатором для "меньше, чем аддитивного ингибирования пролиферации фибробластов" (антисинергетический эффект) для комбинации нинтеданиба и рофлумиласт-N-оксида.

Этот "сдвиг вправо" "измеренной кривой комбинации нинтеданиб/рофлумиласт комбинация" по сравнению с "рассчитанной кривой комбинации нинтеданиб/рофлумиласт" представлен только для очень высокой концентрации рофлумиласт-N-оксида за пределами диапазона планок погрешностей.

Следовательно, для комбинации нинтеданиба с рофлумиласт-N-оксидом также экспериментально может быть определен более или менее "аддитивный эффект", как ожидается.

Этот "сверхаддитивный синергетический эффект" на ингибирование пролиферации фибробластов, которые наблюдается исключительно для комбинации нинтеданиба с соединением формулы III, также отображается в большом отличии значений IC_{50} , рассчитанных для кривых концентрация/ингибирование

а) измеренных для фибробластов легких человека от IPF пациентов, леченных с применением соединения формулы III отдельно на фиг. 4 (жирная черная кривая, IC_{50} -значение 255 нмоль/л) и

б) измеренных для фибробластов легких человека от IPF пациентов, леченных с применением комбинации, содержащей соединение формулы III и нинтеданиб на фиг. 4 (жирная серая кривая, IC_{50} -значение 23 нмоль/л).

В данном случае, IC_{50} -значение для кривой ингибирования, измеренной для соединения формулы III, вводимого отдельно, по сравнению со IC_{50} -значением для кривой ингибирования, измеренной для комбинации соединения формулы III с нинтеданибом является в 11-раз больше (255 нмоль/л /23 нмоль/л=11).

В противоположность этому соответствующие отличия для IC_{50} -значений для кривых ингибирования, измеренных для других PDE4-ингибиторов апремиласт и рофлумиласт-N-оксид, вводимых отдельно, по сравнению с кривой ингибирования, измеренной для соответствующей комбинации PDE4-ингибитора/нинтеданиб, являются намного меньше (в 1,13-раз больше для апремиласта, в 0,82-раз меньше для рофлумиласт-N-оксида).

Этот экспериментально определенный "сверхаддитивный синергетический эффект" на ингибирование пролиферации фибробластов, который наблюдается исключительно для комбинации соединения формулы III с нинтеданибом, очевидно, не представляет собой "классовый эффект", поскольку ни один из других тестируемых PDE4-ингибиторов апремиласт или рофлумиласт не проявляет в комбинации с нинтеданибом соответствующий сходный "сверхаддитивный синергетический эффект", а вместо этого только ожидаемый "аддитивный ингибирующий эффект" (нинтеданиб/рофлумиласт-N-оксид проявляет-

ся при больших концентрациях рофлумиласт-N-оксида даже "меньше, чем аддитивный ингибирующий эффект").

Следовательно, комбинация нинтеданиба с PDE4B-ингибитором формулы III демонстрирует благодаря экспериментально наблюдаемому сверхаддитивному синергетическому ингибирующему эффекту на пролиферацию фибробластов неожиданно значительно улучшенную терапевтическую эффективность для лечения PF-ILD-пациентов не только по сравнению с лечением с применением индивидуальных единичных агентов, а также по сравнению с альтернативными комбинациями нинтеданиб/рофлумиласт-N-оксид и нинтеданиб/апремилласт.

Следовательно, в Экспериментах А) и В) было экспериментально показано, что комбинация, содержащая PDE4B-ингибитор формулы III и нинтеданиб, проявляет:

1) на "втором уровне патогенеза фиброзных процессов, характерных для PF-ILD" (активация фибробластов в миофибробластов) значительный терапевтический эффект по сравнению с полным диапазоном тестируемых концентраций для PDE4B-ингибитора формулы III (при этом нинтеданиб отдельно не проявляет терапевтического эффекта на втором уровне) и

2) на "третьем уровне патогенеза фиброзных процессов, характерных для PF-ILD" (пролиферация фибробластов) неожиданно даже "сверхаддитивный синергетический терапевтический эффект" (который комбинации рофлумиласт-N-оксид/нинтеданиб- и апремилласт/нинтеданиб неожиданно не проявляют).

Другое дополнительное преимущество, которое очевидно проявляет комбинация PDE4B-ингибитора формулы III с нинтеданибом по сравнению с другими комбинациями PDE4-ингибитор/нинтеданиб (такими как, например, рофлумиласт-N-оксид/нинтеданиб), является ее относительно хорошая переносимость (в особенности по отношению к побочным явлениям со стороны желудочно-кишечного тракта).

Известно, что нинтеданиб, а также пирфенидон - только два разрешенные в настоящее время терапевтические агенты для лечения IPF - проявляют оба значительные побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта, такие как диарея, тошнота, рвота, потеря веса и др., которые являются основной причиной, почему нинтеданиб и пирфенидон обычно не комбинируются вследствие их аддитивных и, следовательно, более частых побочных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта.

В отличие от нинтеданиба и пирфенидона, было показано, что PDE4B-ингибитор формулы III является относительно свободным от типичных для PDE4-ингибитора побочных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта, таких как диарея, в соответствующем эксперименте на крысах (см. WO 2013/026797

Раздел 53: Эксперименты по "опорожнению желудка" и "кишечному транзиту" и фиг. 2a (опорожнение желудка) и 2b (кишечный транзит)). В этих экспериментах может быть показано, что возрастающее количество соединения из примера 2 (которое является идентичным к PDE4B-ингибитором формулы III в настоящей заявке) по сути не оказывает влияния на опорожнение желудка и на кишечный транзит пробного завтрака у крыс по сравнению с нелеченными крысами.

Тем не менее, в сходных экспериментах по "опорожнению желудка" и "кишечному транзиту" было показано, что альтернативный PDE4-ингибитор рофлумиласт проявляет очевидную тенденцию побочных явлений со стороны желудочно-кишечного тракта.

Дополнительно, также хорошо известно из клинических исследований, что рофлумиласт (который разрешен только для лечения COPD) проявляет значительные побочные явления со стороны желудочно-кишечного тракта у пациентов-людей с COPD, такие как диарея, тошнота, потеря веса.

В <http://www.rxlist.com/daliresp-drug.htm> было описано, что рофлумиласт, вводимый пациентам с COPD в дозе 500 мкг ежедневно, приводит

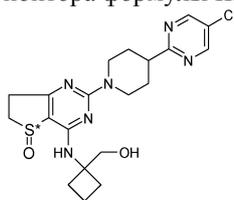
- у 9,5% всех пациентов к диарее (по сравнению с только 2,7% пациентов, получающих плацебо),
- у 4,7% всех пациентов к тошноте (по сравнению с только 1,4% пациентов, получающих плацебо),
- у 7,5% всех пациентов к снижению веса (по сравнению с только 2,1% пациентов, получающих плацебо) и
- у 4,4% всех пациентов к головной боли (по сравнению с только 2,1 % пациентов, получающих плацебо).

В связи с наблюдениями, указанными выше, комбинация PDE4B-ингибитора формулы III с нинтеданибом имеет лучшую переносимость по отношению к побочным явлениям со стороны желудочно-кишечного тракта по сравнению, например, с комбинацией рофлумиласта с нинтеданибом. Дополнительно, комбинация PDE4B-ингибитора формулы III с нинтеданибом имеет лучшую терапевтическую эффективность по отношению к лечению ILD, PF-ILD и в особенности IPF (см. фиг. 1-6) в комбинации с приемлемой переносимостью по отношению к побочным явлениям со стороны желудочно-кишечного тракта (WO 2013/026797 Раздел 5.3).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), который включает введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтиче-

ски эффективного количества PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемой соли

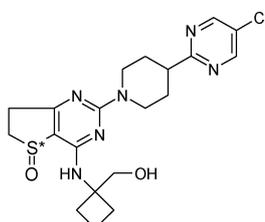
и терапевтически эффективное количество ингибитора тирозинкиназы, выбранное из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

2. Способ по п.1, где прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой идиопатический фиброз лёгких (IPF).

3. Способ по п.1 или 2, где PDE4B-ингибитор формулы III вводят одновременно, совместно, последовательно, один за другим, попеременно или раздельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемые соли.

4. Способ по одному из пп.1-3, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

5. Применение комбинации, содержащей терапевтически эффективное количество PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемую соль,

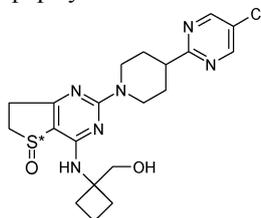
и терапевтически эффективное количество ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, состоящей из нинтеданиба и его фармацевтически приемлемой соли для изготовления лекарственного средства для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

6. Применение комбинации по п.5, где прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой идиопатический фиброз лёгких (IPF).

7. Применение комбинации по п.5 или 6, где указанный PDE4B ингибитор формулы III или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно, совместно, последовательно, один за другим, попеременно или раздельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемые соли.

8. Применение комбинации по одному из пп.5-7, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

9. Применение PDE4B-ингибитора формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемой соли

для приготовления фармацевтической композиции для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где терапевтически эффективное количество указанного PDE4B-ингибитора формулы III или его фармацевтически приемлемой соли вводят пациенту, который в этом нуждается, в комбинации с терапевтически эффективным количеством ингибитора тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

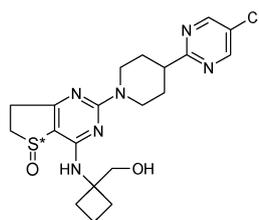
10. Применение PDE4B-ингибитора формулы III для приготовления фармацевтической композиции для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний

легких (PF-ILD) по п.9, где прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой идиопатический фиброз лёгких (IPF).

11. Применение PDE4B-ингибитора формулы III по п.9 или 10, где PDE4B-ингибитор формулы III или его фармацевтически приемлемую соль вводят одновременно, совместно, последовательно, один за одним, попеременно или раздельно с ингибитором тирозинкиназы, выбранным из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль.

12. Применение PDE4B-ингибитора формулы III по одному из пп.9, 10 или 11, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

13. Применение ингибитора тирозинкиназы, выбранного из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, для приготовления фармацевтической композиции для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD), где терапевтически эффективное количество указанного ингибитора тирозинкиназы вводят пациенту, который в этом нуждается, в комбинации с терапевтически эффективным количеством PDE4B-ингибитора формулы III



III,

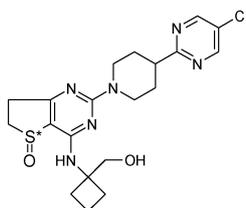
где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемой соли.

14. Применение ингибитора тирозинкиназы для приготовления фармацевтической композиции для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD) по п.13, где прогрессирующее фиброзирующее интерстициальное заболевание легких представляет собой идиопатический фиброз лёгких (IPF).

15. Применение ингибитора тирозинкиназы выбирают из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, по п.13 или 14, где указанный ингибитор тирозинкиназы вводят одновременно, совместно, последовательно, один за одним, попеременно или раздельно с PDE4B-ингибитором формулы III или его фармацевтически приемлемой солью.

16. Применение ингибитора тирозинкиназы по одному из пп.13, 14 или 15, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая PDE4B-ингибитор формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр; или его фармацевтически приемлемую соль

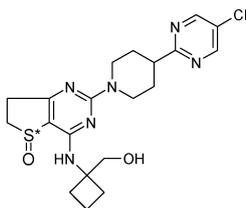
ингибитор тирозинкиназы, выбранный из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемые соли, и

один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей.

18. Фармацевтическая композиция по п.17, где ингибитор тирозинкиназы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

19. Фармацевтический набор, который содержит

первую фармацевтическую композицию или дозированную форму, содержащую PDE4B-ингибитор формулы III



III,

где S* представляет собой атом серы, который представляет хиральный центр, или его фармацевтически приемлемую соль,

один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей и вторую фармацевтическую композицию или дозированную форму, содержащую ингибитор тирозинкиназы, выбранный из группы, включающей нинтеданиб и его фармацевтически приемлемую соль, и один или несколько фармацевтически приемлемых носителей и/или наполнителей.

20. Применение фармацевтического набора по п.19 для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

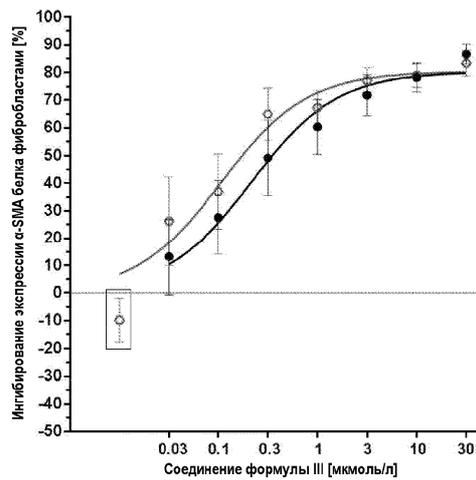
21. Применение фармацевтического набора по п.19 для лечения идиопатического фиброза лёгких (IPF).

22. Применение фармацевтического набора по п.19 в способе лечения, где первую фармацевтическую композицию или дозированную форму вводят одновременно, совместно, последовательно, одну за одной, попеременно или раздельно со второй фармацевтической композицией или дозированной формой.

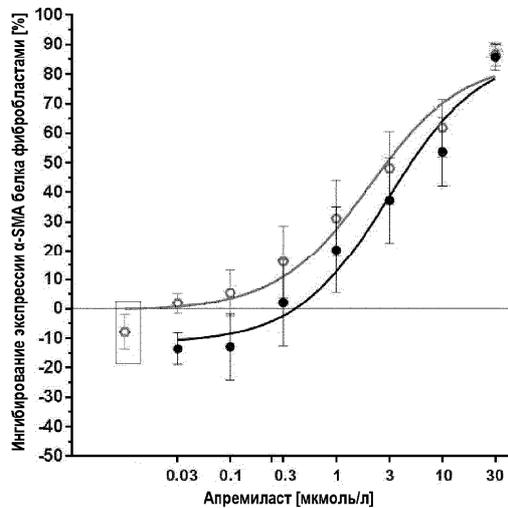
23. Набор по п.19, где ингибитор тирозинкиназы второй фармацевтической композиции или дозированной формы представляет собой нинтеданиб в форме его моноэтансульфоната.

24. Набор по любому из пп.19 и 23, который дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий напечатанные инструкции для одновременного, совместного, последовательного, одна за одной, попеременного или раздельного применения первой и второй фармацевтической композиции или дозированных форм для лечения одного или нескольких прогрессирующих фиброзирующих интерстициальных заболеваний легких (PF-ILD).

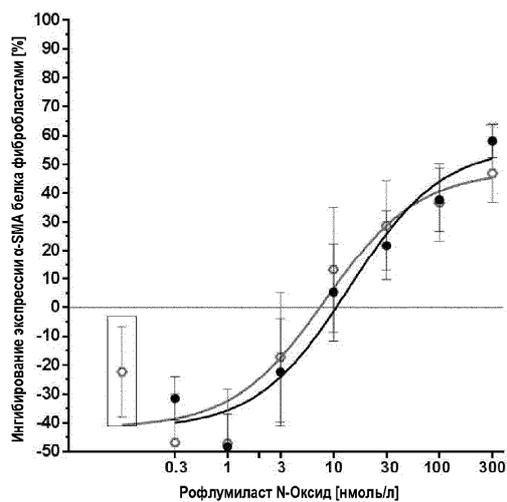
25. Набор по любому из пп.19 и 23, который дополнительно содержит листок-вкладыш, содержащий напечатанные инструкции для одновременного, совместного, последовательного, одна за одной, попеременного или раздельного применения первой и второй фармацевтической композиции или дозированных форм для лечения идиопатического фиброза лёгких (IPF).



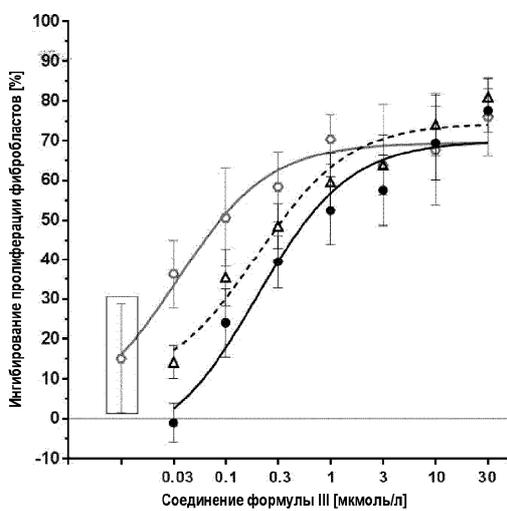
Фиг. 1



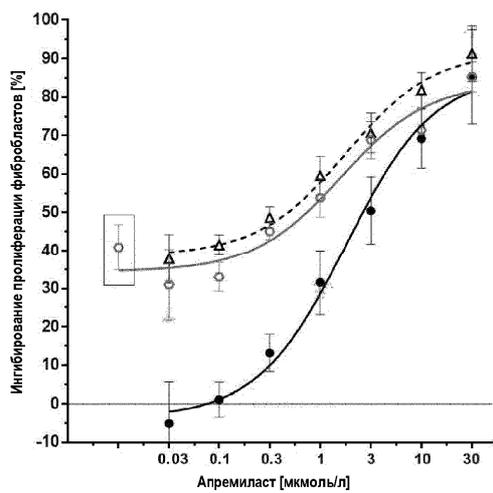
Фиг. 2



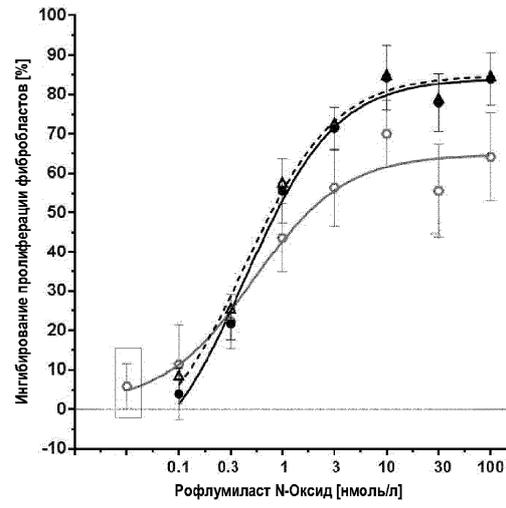
Фиг. 3



Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6

