

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202390637** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.08.30**

(51) Int. Cl. *A61K 31/00* (2020.01)  
*A61K 31/145* (2006.01)  
*A61K 31/381* (2006.01)  
*A61K 31/4164* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
**2021.08.19**

---

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ,  
ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ ГИПЕРСЕКРЕЦИЕЙ СЛИЗИ**

---

(31) **63/068,235**

(32) **2020.08.20**

(33) **US**

(86) **PCT/US2021/046742**

(87) **WO 2022/040447 2022.02.24**

(88) **2022.04.28**

(71) Заявитель:

**ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЛЕЛЭНД СТЭНФОРД ДЖУНИОР  
ЮНИВЕРСИТИ (US)**

(72) Изобретатель:

**Аксельрод Джеффри, Милла Карлос,  
Владар Эстер (US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) В изобретении предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие введение пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, ингибитора гамма-секретазы (GSI), где введение GSI эффективно уменьшает количество слизи в легких указанного пациента или ингибирует накопление слизи в легких указанного пациента. В некоторых вариантах осуществления способы по изобретению эффективны при лечении респираторного заболевания, выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных заболеваний легких, респираторных инфекций, включая обострения хронических респираторных заболеваний, и накопление слизи в ответ на острую инфекцию. Способы по изобретению дополнительно включают способы лечения муковисцидоза, при которых GSI вводят пациенту, которому вводят или который нуждается в модуляторе CFTR, где количество слизи в легких такого пациента уменьшается или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется.

---

**A1**

**202390637**

**202390637**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-577311EA/026

### СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ РЕСПИРАТОРНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ХАРАКТЕРИЗУЮЩИХСЯ ГИПЕРСЕКРЕЦИЕЙ СЛИЗИ

#### Признание прав правительства

Настоящее изобретение было сделано при поддержке правительства по контракту GM098582, заключенному Национальным институтом здравоохранения. Правительство имеет определенные права на изобретение.

#### Перекрестная ссылка на родственные заявки

В соответствии с 35 U.S.C. § 119 (e), по настоящей заявке испрашивается приоритет по дате подачи предварительной заявки на патент США с серийным № 63/068,235, поданной 20 августа 2020 г., описание которой полностью включено в настоящий документ посредством ссылки.

#### Уровень техники

Эпителиальные клетки дыхательных путей включают смесь преимущественно мультиреснитчатых клеток (МСС) и секретирующих слизь бокаловидных клеток, представленных на поверхности просвета, и нижележащих базальных (стволовых) клеток. Каждая МСС содержит от 200 до 300 подвижных ресничек, которые скоординировано и направленно сокращаются, чтобы выталкивать вдыхаемые загрязняющие вещества, захваченные слоем слизи, из легких. (Tilley AE, Walters MS, Shaykhiev R, Crystal RG. Cilia dysfunction in lung disease. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:379-406). Бокаловидные клетки выделяют слизь, которая образует защитный барьер для дыхательного эпителия, и их активность и количество могут увеличиваться в ответ на вредные стимулы, такие как инфекция. Нарушение очищения дыхательных путей вызвать осаждение и/или ухудшить острые инфекции и хронические воспалительные состояния, такие как муковисцидоз (CF), первичная цилиарная дискинезия (PCD), хронический риносинусит (CRS), хроническая обструктивная болезнь легких (COPD) и астма (*Там же*).

CF считается наиболее тяжелой болезнью мукоцилиарного клиренса. (Bruscia EM, Bonfield TL. Innate and adaptive immunity in cystic fibrosis. *Clin Chest Med.* 2016;37(1):17-29). Мутации в регуляторе трансмембранной проводимости в CF (CFTR) приводит к обезвоживанию поверхности слизистой оболочки и накоплению густой аномальной слизи, которая одновременно препятствует очищению дыхательных путей и служит очагом полимикробной инфекции. Эти события способствуют тяжелому хроническому воспалению и циклам повторяющегося повреждения и несовершенного заживления. Это, в свою очередь, вызывает эпителиальную дисфункцию, которая включает структурные и функциональные изменения, такие как гиперплазия секретирующих слизь клеток, снижение количества МСС, аномальная архитектура ткани с рубцеванием, сниженная барьерная функция и сниженная регенерационная способность. (Adam D, et al. Cystic fibrosis airway epithelium remodelling: involvement of inflammation. *J Pathol.* 2015;235(3):408-419). Пациенты с CF неизбежно приходят к разрушению дыхательных

путей в форме бронхоэктаза, хронического кашля, одышки, синусита, трудно поддающейся лечению инфекции при повторном применении антибиотиков и кислородной зависимости. Эпителиальная дисфункция при CF считается основным фактором в прогрессировании заболевания, в конечном итоге приводя к трансплантации легкое, как только медицинские функции исчерпываются. (Regamey N, Jeffery PK, Alton EW, Bush A, Davies JC. Airway remodeling and its relationship to inflammation in cystic fibrosis. *Thorax*. 2011;66(7):624-629).

Функциональный баланс секреции слизи секреторными клетками и подвижности МСС приводит к эффективному процессу мукоцилиарного клиренса, который является жизненно важным для здоровья дыхательных путей. МСС окончательно дифференцированы и возникают из базальных клеток или типов секреторных клеток эпителия дыхательных путей, начиная с эмбрионального развития и продолжая регенеративный процесс на протяжении всей жизни. (Hogan BL, et al. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell*. 2014;15(2):123-138; Rock JR, et al. Basal cells as stem cells of the mouse trachea and human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(31):12771-12775). Дифференциация МСС начинается с события передачи сигнала Notch, при котором клетки отвечают на активацию трансмембранного белка Notch, становясь секреторными клетками, в то время как лиганд-экспрессирующие клетки, не отвечающие на Notch, направляются в судьбу клеток МСС через МСС-специфическую программу экспрессии гена, который управляет дифференциацией и, в конечном счете, продуцированием сотен регуляторных и структурных компонентов, необходимых для биогенеза подвижных ресничек. (Choksi SP, Lauter G, Swoboda P, Roy S. Switching on cilia: transcriptional networks regulating ciliogenesis. *Development*. 2014;141(7):1427-1441). Надежный мукоцилиарный клиренс требует продуцирования ресничек с правильным количеством, длиной, частотой биения и формой волны, и, главное, правильной направленностью вдоль оси ткани. Кроме того, было показано, что ингибирование передачи сигналов Notch в дифференцированном эпителии смещает клеточную композицию от секреторной к судьбе клеток МСС через индукцию трансдифференциации секреторных клеток в МСС (Lafkas et al. *Nature* 2015 Dec 3;528(7580):127-31).

Было показано, что эпителий дыхательных путей пациентов с CF и другими хроническими воспалительными заболеваниями имеет редкие или отсутствующие МСС, дефектный мукоцилиарный клиренс, и связанное с этим снижение барьерной функции и регенеративной способности. В моделях *in vitro* и на животных показано, что посредством подавления подачи сигнала Notch, ингибиторы гамма-секретазы способны восстанавливать здоровый баланс секреторных и МСС-клеток как за счет управления дифференциацией МСС *de novo*, так и за счет стимулирования трансдифференциации зрелых секреторных клеток в МСС, тем самым сохраняя эту клеточную композицию, барьерные и регенеративные фенотипы. (Vladar EK, Nayak JV, Milla CE, Axelrod JD. Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell

differentiation. JCI Insight. 2016;1(13);e88027). Кроме того, трансдифференциация зрелых секреторных клеток под действием ингибиторов гамма-секретазы происходит относительно быстро по сравнению с дифференциацией новых клеток, которая происходит относительно медленно.

Недавние достижения в лечении муковисцидоза привели к разработке класса лекарственных средств, известных как модуляторы CFTR. Эти лекарственные средства являются примером персонализированной медицины, поскольку они предназначены для лечения индивидуумов, несущих определенные мутации CFTR. Модуляторы CFTR можно классифицировать на три основных класса: потенциаторы, корректоры и супрессоры преждевременного стоп-кодона или агенты сквозного прочитывания. Потенциаторы CFTR увеличивают вероятность открытия каналов CFTR, которые имеют мутации гейтирования или проводимости. Корректоры CFTR предназначены для увеличения количества функционального белка CFTR, доставляемого на клеточную поверхность. Агенты сквозного прочитывания CFTR предназначены для «форсирования» сквозного прочитывания преждевременных стоп-кодонов, что приводит к продуцированию большего количества полноразмерного белка CFTR. (Derichs, N., Eur. Resp. Rev., 2013: 22: 127, 58-65). Усилители CFTR представляют собой разрабатываемый и тестируемый тип модулятора CFTR, и предназначены для увеличения количества белка CFTR, вырабатываемого клеткой на уровне транскрипции, тем самым потенциально улучшая функцию у пациентов с мутациями CFTR, которые приводят к недостаточному количеству белка на клеточной поверхности.

В то время как модуляторы CFTR улучшают функцию CFTR у пациентов с соответствующими мутациями CFTR, модуляторы не влияют на измененную клеточную композицию, повреждение архитектуры эпителиальных клеток и соответствующую эпителиальную дисфункцию. Для восстановления функции МСС и улучшения мукоцилиарного клиренса при муковисцидозе и других заболеваниях, характеризующихся гиперсекрецией слизи и/или недостаточным мукоцилиарным клиренсом, необходимы улучшенные терапии.

Ингибиторы гамма-секретазы (GSI) широко изучались в качестве фармакологических агентов для лечения болезни Альцгеймера из-за роли гамма-секретазы в образовании амилоида бета и образовании бляшек. (Barten DM, Meredith JE, Zaczek R, Houston JG, Albright CF: Gamma-secretase inhibitors for Alzheimer's disease: balancing efficacy and toxicity. *Drugs R D*. 2006, 7: 87-97. Evin G, Sernee MF, Masters CL: Inhibition of gamma-secretase as a therapeutic intervention for Alzheimer's disease: prospects, limitations and strategies. *CNS Drugs*. 2006, 20: 351-372). Кроме того, роль передачи сигналов Notch в раке человека привела к изучению GSI в качестве потенциальной терапии различных типов опухолей. (Shih I and Wang T, Notch Signaling, Gamma-Secretase Inhibitors, and Cancer Therapy, *Cancer Res* 2007, 67(5);1879-1882). Способность GSI блокировать передачу сигналов Notch также привела к предложениям об использовании GSI при лечении респираторных заболеваний, связанных с дисфункцией эпителиальных клеток. (EP

2932966 A1).

Гамма-секретаза представляет собой мультиединичный трансмембранный протеазный комплекс, состоящий из четырех отдельных белков. Они представляют собой аспартилпротеазу, которая расщепляет свои субстраты в трансмембранной области в процессе, называемом регулируемым внутримембранным протеолизом (RIP). (Kreft, AF, Martone, R, and Porte, A, Recent Advances in the Identification of gamma Secretase Inhibitors To Clinically Test the Ab Oligomer Hypothesis of Alzheimer's Disease, J. Med. Chem 2009, 52:6169-6188). В то время как гамма-секретаза представляла интерес в качестве терапевтической мишени в течение нескольких лет, из-за ее сложности, получение подробного понимания ее структуры и взаимосвязей между структурой и активностью было сложной задачей. Тем не менее, был достигнут значительный прогресс в выяснении некоторых взаимосвязей между структурой и активностью. (См. Wolfe, MS, Gamma-Secretase Inhibition and Modulation for Alzheimer's Disease, Curr Alzheimer Res. 2008; 5(2): 158-164).

GSI можно разделить на три основных типа в зависимости от того, где они связываются с гамма-секретазой: (1) связывающие GSI с активным сайтом, (2) связывающие GSI с сайтом докинга субстрата и (3) GSI с альтернативным сайтом связывания. Последняя категория может быть далее подразделена на GSI, содержащие карбоксамид и арилсульфонамид. (Kreft et al, at 6171).

Клинические испытания болезни Альцгеймера выявили токсичность, которая, как считается, связана с ингибированием гамма-секретазы. (David B. Henley, Karen L. Sundell, Gopalan Sethuraman, Sherie A. Dowsett & Patrick C. May (2014) Safety profile of semagacestat, a gamma-secretase inhibitor: IDENTITY trial findings, Current Medical Research and Opinion, 30:10, 2021-2032).

Дополнительные GSI были исследованы на предмет потенциальной терапии рака и обычно проявляют токсичность в высоких дозах.

### **Краткое изложение изобретения**

В настоящее время неожиданно было обнаружено, что низкие дозы ингибиторов гамма-секретазы (GSI) эффективны для устранения клеточных аномалий, наблюдаемых в связи с респираторными заболеваниями, характеризующимися гиперсекрецией слизи, и эффективны в дозах, обеспечивающих терапевтическую активность, и, как ожидается, позволяют избежать или минимизируют побочные эффекты, ранее связанные с этим классом молекул. Кроме того, было обнаружено, что GSI, вводимые в комбинации с модулятором CFTR, эффективны для коррекции дисфункции эпителиальных клеток в модельных системах на основе клеток муковисцидоза (первичных клеток пациентов), в отличие от некоторых преобладающих концепций, и действительно комбинация может быть синергической при улучшении функции ионных каналов CFTR и коррекции эпителиальных клеток.

Таким образом, в изобретении предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие введение

пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, GSI, где введение низкой дозы GSI эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких указанного пациента. В некоторых вариантах осуществления, способы по изобретению эффективны при лечении респираторного заболевания, выбранного из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных заболеваний легких, респираторных инфекций, включая обострения хронических респираторных нарушений, и накопление слизи в ответ на острую инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, авагацестата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигацестата, MRK 560, ниругацестата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегацестата.

В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, ниругацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата. В некоторых вариантах осуществления, GSI представляет собой GSI на основе карбоксиамида.

В некоторых вариантах осуществления, предложены способы лечения респираторных заболеваний, характеризующихся гиперсекрецией слизи, включающие системное введение семагацестата в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг в день, где введение семагацестата эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, семагацестат вводят в количестве от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, семагацестат вводят в количестве от примерно 0,5 мг до примерно 30 мг в день, или от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг в день, или от примерно 0,5 мг до примерно 10 мг в день. Например, семагацестат можно вводить в количестве примерно 0,1 мг, 0,25 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2,5 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг или 50 мг в день. Предпочтительно, семагацестат вводят перорально.

В варианте осуществления изобретения, предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий системное введение пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества семагацестата, где концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы включает AUC (площадь под кривой) менее 2100 нг•ч/мл, например, менее 1220 нг•ч/мл, где системное введение семагацестата является эффективным для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или предотвращения накопления слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, при многократном введении дозы, указанная концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии содержит AUC менее 1500 нг•ч/мл, менее 1200 нг•ч/мл или менее 900 нг•ч/мл,

например, AUC менее 1220 нг•ч/мл, менее 600 нг•ч/мл или менее 250 нг•ч/мл.

В дополнительных вариантах осуществления изобретения, предложены способы лечения муковисцидоза, включающие введение эффективного количества GSI пациенту, принимающему модулятор CFTR, где количество слизи в легких такого пациента снижается, или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется. В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, нирогацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата. В некоторых вариантах осуществления, GSI представляет собой семагацестат.

В некоторых из этих вариантов осуществления, модулятор CFTR выбран из группы, состоящей из потенциатора CFTR, корректора CFTR, ингибитора преждевременного стоп-кодона CFTR, усилителя CFTR и их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления, модулятор CFTR выбран из группы, состоящей из ивакафтора, лумакафтора, тезакафтора, элексакафтора и их комбинаций.

### **Краткое описание чертежей**

На фигуре 1 показаны данные доза-ответ для семагацестата в первичных эпителиальных клетках носа человека (HNEC) по сравнению с необработанными клетками и положительным контролем DAPT. МСС помечены зеленым (ацетилованный тубулин), и межклеточные контакты помечены красным (ECAD). Доля МСС увеличивается от его исходного уровня при 15,625 нМ семагацестата до своего максимума при примерно 125 нМ. Токсичность наблюдается при микромолярных дозах.

На фигуре 2 показано отношение МСС к общему количеству просветных клеток в HNEC, обработанных DAPT и различными дозами семагацестата.

На фигуре 3 показан способ подсчета отношения МСС к не реснитчатым клеткам в эпителии дыхательных путей у мышей, получавших системное лечение *in vivo* путем внутрибрюшинного (IP) дозирования семагацестата. Дыхательные пути из срезов легких одинакового размера помечены для всех ядер (красный; DAPI) и судьбы клеток МСС (зеленый; FoxJ1 и синий; ацетилованный тубулин). Клетки подсчитывают и определяют долю МСС перед условиями обработки без заслепления. В противном случае, мыши дикого типа несут FoxJ1::GFP для облегчения подсчета МСС.

На фигуре 4 показана масса тела на 9, 24 и 30 дни при ежедневном системном (в/б) введении семагацестата и контрольного носителя.

На фигуре 5 показано отношение МСС к общему количеству клеток на 7 день после трехдневного лечения DAPT и низкими и высокими дозами семагацестата с контролем носителем.

На фигуре 6 показано отношение МСС к общему количеству клеток на 31 день после трехнедельного лечения семагацестатом с контролем носителем.

На фигуре 7 показан эффект лечения GSI во время пролиферации (до дифференциации) и во время дифференциации HNEC.

На фигуре 8 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток по данным фигуры 7.

На фигуре 9 показано влияние продолжительности лечения GSI на зрелые (ALI+30d) HNEC, обработанные DAPT и семагацестатом в течение одной (ALI+30 - +37d) или двух недель (ALI+30 - +44d).

На фигуре 10 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток по данным фигуры 9.

На фигуре 11 показаны результаты HNEC, обработанных DAPT и семагацестатом, только во время дифференциации (ALI+0 - +21d) либо с апикальной, либо с базальной поверхности.

На фигуре 12 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток по данным фигуры 11.

На фигуре 13 показано влияние обработки семагацестатом и DAPT на модели эпителиальной культуры хронического воспаления дыхательных путей. Культуры HNEC обрабатывают IL-13 от ALI+7-14, чтобы вызвать воспаление. DAPT и семагацестат увеличивают долю МСС в контрольной группе (слева). Обработка IL-13 увеличивает долю муцин-положительных секреторных клеток и снижает долю МСС. Последующая обработка DAPT и семагацестатом восстанавливает клеточную композицию, увеличивая долю МСС и уменьшая долю муцин-положительных секреторных клеток.

На фигуре 14 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток по данным фигуры 13.

На фигуре 15 показаны типовые кривые культур, обработанных EPI, семагацестатом или обоими, в камере Уссинга.

На фигуре 16 показаны типовые кривые токов короткого замыкания (Isc) в камере Уссинга после обработки семагацестатом в клетках дикого типа и клетках CF.

На фигуре 17 показаны ответы Isc в камере Уссинга после обработки семагацестатом в клетках дикого типа и клетках CF. Исследуют два контрольных образца дикого типа (WT) и два образца пациентов с CF (CF1; редкая аллельная комбинация и CF2; F508Δ гомозигота). Активность тока CFTR оценивают по ответу ингибитора CFTR, и обнаруживают, что она равна или превышает контрольные токи носителя как в контрольных образцах дикого типа, так и в образцах CF. Значения нормированы на базовый ток.

На фигуре 18 показано, что при обработке *in vitro* в комбинации с модулятором CFTR лумакафтором, семагацестат снижает продуцирование слизи в образцах CF человека с различными мутациями CFTR.

На фигуре 19 показано влияние обработки семагацестатом, лумакафтором и их комбинациями на образцы CF человека с различными мутациями CFTR. Семагацестат эффективен для увеличения доли МСС в присутствии лумакафтора, и комбинация может быть более эффективной для некоторых доноров, чем когда они применяются отдельно.

На фигуре 20 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток для здорового пациента и донора CF 1 на фигуре 19.

На фигуре 21 показано влияние на здоровые и муковисцидозные первичные

эпителиальные клетки дыхательных путей, обработанные семагацестатом (LY45139) только во время дифференциации (ALI+0 - +21d).

На фигуре 22 показана СЭМ здоровых и CF первичных культур эпителия дыхательных путей человека, показывающая, что мультиреснитчатые клетки, образованные при обработке DAPT, неотличимы от таковых в необработанных здоровых культурах.

На фигуре 23 показан результат обработки DAPT в зрелых культурах муковисцидоза HNEC, демонстрирующий, что обработка GSI индуцирует образование дополнительных мультиреснитчатых клеток в зрелых культурах муковисцидоза, в то время как необработанные культуры больше не дифференцируют мультиреснитчатые клетки.

На фигуре 24 показаны результаты HNEC, обработанных во время дифференциации (ALI+0 - +21d) DAPT и высокой и низкой концентрациями GSI LY45139, PF-03084014, RO-4929097 и МК-0752.

На фигуре 25 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток для данных, показанных на фигуре 24.

На фигуре 26 показаны измерения активности тока короткого замыкания CFTR, измеренные в камерах Уссинга в культурах пациентов с CF, леченных LY45139, элексафтор/тезафтор/ивакафтор (или «ЕТИ») или обоими.

На фигуре 27 показаны измерения активности тока CFTR, измеренные в камерах Уссинга, в культурах пациентов с CF, леченных МК04752, ЕТИ или обоими.

На фигуре 28 показаны измерения активности тока CFTR, измеренные в камерах Уссинга, в культурах пациентов с CF, леченных МК04752, ЕТИ или комбинациями с уменьшенными дозами элексафтора (компонент Е комбинации модулятора ЕТИ).

На фигуре 29 показаны результаты обработки GSI DAPT на образование ионоцитов в HNEC, обработанных DAPT только во время дифференциации (ALI+0 - +21d).

На фигуре 30 показано влияние различных концентраций GSI МК-0752 и элексафтора на частоту биения ресничек (CBF).

На фигуре 31 показана частота биения ресничек (CBF) и длина ресничек HNE, обработанных DAPT, по сравнению с необработанным контролем.

На фигуре 32 показана характеристика реабсорбции жидкости, покрывающей поверхность дыхательных путей (ASL) культур CF HNEC, обработанных ЕТИ, семагацестатом или обоими.

На фигуре 33 показаны изображения, полученные из записанных с высокой скоростью видео микроскопических изображений движения латексных микроносителей как отражение транспорта слизи реснитчатой поверхностью клеточных культур. Культуры представляют собой HNEC от двух CF доноров (F508del гомозиготы) при обработке контролем-носителем, ЕТИ, семагацестатом (LY) или обоими в комбинации.

На фигуре 34 показано рассчитанное движение микроносителей культур, показанных на фигуре 33.

## Подробное описание изобретения

### Определения

Используемый в настоящем документе термин «заболевание, характеризующееся гиперсекрецией слизи» означает заболевание, при котором по меньшей мере одна патология заболевания обусловлена наличием слизи на эпителиальной поверхности в количестве, превышающем количество, присутствующее в нормальных условиях. Включены заболевания, при которых избыток слизи находится в мелких дыхательных путях, в которых она обычно отсутствует, и может быть вызван избыточным продуцированием бокаловидных клеток, гипертрофией слизистых желез, снижением МСС или другим недостаточным мукоцилиарным клиренсом.

Используемый в настоящем документе термин «эффективное количество» или «терапевтически эффективное количество» относится к количеству соединения по настоящему изобретению, эффективному для достижения желаемого терапевтического результата, такого как, например, снижение продуцирования бокаловидных клеток и/или увеличение продуцирования мультиреснитчатых клеток, тем самым улучшая мукоцилиарный клиренс. В контексте настоящего изобретения, желаемый терапевтический результат включает снижение выработки слизи в легких такого пациента или ингибирование накопления слизи в легких такого пациента. Хотя дозы, упомянутые в настоящем описании, являются рекомендациями, лечащий врач может отрегулировать дозу в соответствии с конкретными потребностями пациента, включая, например, тяжесть заболевания, размер и физическое состояние.

«Ингибитор(ы) гамма-секретазы» или «GSI» означает молекулу, способную ингибировать или модулировать фермент гамма-секретазы и тем самым ингибировать передачу сигналов Notch. Примеры включают DAPT (N-[(3,5-дифторфенил)ацетил]-L-аланил-2-фенил]глицин-1,1-диметилэтиловый эфир), семагастат, авагастат ((2R)-2-[[4-хлорфенил]сульфонил][2-фтор-4-(1,2,4-оксадиазол-3-ил)фенил]метил]амино]-5,5,5-трифторпентанамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), DBZ (N-[(1S)-2-[[7S)-6,7-дигидро-5-метил-6-оксо-5H-добенз[b, d]азепин-7-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]-3,5-дифторбензолацетамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), L-685,458 ((5S)-(*трет*-бутоксикарбониламино)-6-фенил-(4R)-гидрокси-(2R)-бензилгексаноил)-L-лейци-L-фенилаланинамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), GS-1 (он же L-685458) (регистрационный номер CAS 292632-98-5; WO0177144); BMS-906024 (бис(фторалкил)-1,4-бензодиазепинон; регистрационный номер CAS 1401066-79-2), кренигасцестат (он же LY3039478) (Massard et al., "First-in-human study of LY3039478, a Notch signaling inhibitor in advanced or metastatic cancer," J Clin Oncol (2015) 33(15\_suppl):2533), MRK 560 (N-[*цис*-4-[(4-хлорфенил)сульфонил]-4-(2,5-дифторфенил)циклогексил]-1,1,1-трифторметансульфонамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), ниругастат (он же PF-03084014) ((S)-2-((S)-5,7-дифтор-1,2,3,4-тетрагидронафталин-3-иламино)-N-(1-(2-метил-1-(неопентиламино)пропан-2-ил)-1H-имидазол-4-ил)пентанамид; регистрационный номер CAS: 865773-15-5; (коммерчески доступный на [www.adooq.com](http://www.adooq.com))),

RO-4929097 (RO4929097 относится к 2,2-диметил-N-((S)-6-оксо-6,7-дигидро-5H-добензо[b,диазепин-7-ил)-N'-(2,2,3,3,3-пентафторпропил)малонамиду. Регистрационный номер CAS: 847925-91-1) (коммерчески доступный на [www.adooq.com](http://www.adooq.com)), МК-0752 (CAS № 471905-41-6 ([www.medchemexpress.com](http://www.medchemexpress.com))); итанапрацед (CAS № 749269-83-8 ([www.medchemexpress.com](http://www.medchemexpress.com))); LY-3056480 (Samarajeewa, Anshula & Jacques, Bonnie & Dabdoub, Alain. (2019). Therapeutic Potential of Wnt and Notch Signaling and Epigenetic Regulation in Mammalian Sensory Hair Cell Regeneration. *Molecular Therapy*. 27. 10.1016/j.yumthe.2019.03.017); фосциклопирокс (доступен в виде динатрия гептагидрата) (Patel, M.R., et al., Safety, dose tolerance, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of foscicliopirox (CPX-POM) in patients with advanced solid tumors. *Journal of Clinical Oncology* (2020) 38:6 suppl 518); таренфлурбил (CAS № 51543-40-9; (2R)-2-(3-фтор-4-фенилфенил)пропановая кислота); EVP-0962 (Rogers, K., et al., (2012). Modulation of  $\gamma$ -secretase by EVP-0015962 reduces amyloid deposition and behavioral deficits in Tg2576 mice. *Molecular Neurodegeneration*. 7. 61. 10.1186/1750-1326-7-61.; NIC5-15; E-2212; GSI-1; NGP-555; PF-0664867); бегацестат (он же GSI-953) (5-хлор-N-[(1S)-3,3,3-трифтор-1-(гидроксиметил)-2-(трифторметил)пропил]-2-тиофенсульфонамид) ([www.tocris.com](http://www.tocris.com)); GSI-136 (5-хлор-N-[(2S)-3-этил-1-гидроксипентан-2-ил]тиофен-2-сульфонамид) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/gsi-136>); и BMS-708163 (Gillman, KW et al, Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable Gamma-Secretase Inhibitor. *ACS Med. Chem. Lett.* (2010) 1(3)120-124). См. также Sekioka, R. et al., Discovery of N-ethylpyridine-2-carboxamide derivatives as a novel scaffold for orally active gamma secretase modulators. *Bioorg. & Med. Chem.*, (2020) 28(1): 115132. «GSI на основе карбоксамида» означает GSI, имеющий карбоксамидную группу, и включает молекулы, образованные замещением карбоксамида, а также производные известных GSI на основе карбоксамида, такие как DAPT. Примеры включают DAPT (N-[(3,5-дифторфенил)ацетил]-L-аланил-2-фенил]глицин-1,1-диметилэтиловый эфир), семагацестат, авагацестат ((2R)-2-[[4-хлорфенил)сульфонил][[2-фтор-4-(1,2,4-оксадиазол-3-ил)фенил]метил]амино]-5,5,5-трифторпентанамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), DBZ (N-[(1S)-2-[[7S)-6,7-дигидро-5-метил-6-оксо-5H-добензо[b, d]азепин-7-ил]амино]-1-метил-2-оксоэтил]-3,5-дифторбензолацетамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), L-685,458 ((5S)-(трет-бутоксикарбониламино)-6-фенил-(4R)-гидрокси-(2R)-бензилгексаноил)-L-лейцил-L-фенилаланинамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), BMS-906024 (бис(фторалкил)-1,4-бензодиазепинон; регистрационный номер CAS 1401066-79-2), кренигасцестат (он же LY3039478) (Massard et al., "First-in-human study of LY3039478, a Notch signaling inhibitor in advanced or metastatic cancer," *J Clin Oncol* (2015) 33(15\_suppl):2533), MRK 560 (N-[цис-4-[(4-хлорфенил)сульфонил]-4-(2,5-дифторфенил)циклогексил]-1,1,1-трифторметансульфонамид) (коммерчески доступный на [www.tocris.com](http://www.tocris.com)), нирогацестат (он же PF-03084014) ((S)-2-((S)-5,7-дифтор-1,2,3,4-тетрагидронафталин-3-иламино)-N-(1-(2-метил-1-(неопентиламино)пропан-2-ил)-1H-имидазол-4-ил)пентанамид; регистрационный номер CAS: 865773-15-5; (коммерчески

доступный на [www.adooq.com](http://www.adooq.com))), RO-4929097 (RO4929097 относится к 2,2-диметил-N-((S)-6-оксо-6,7-дигидро-5H-дибензо[b,диазепин-7-ил)-N'-(2,-2,3,3,3-пентафторпропил)малонамиду. Регистрационный номер CAS: 847925-91-1) (коммерчески доступный на [www.adooq.com](http://www.adooq.com)) и BMS-708163 (Gillman, KW et al, Discovery and Evaluation of BMS-708163, a Potent, Selective and Orally Bioavailable Gamma-Secretase Inhibitor. ACS Med. Chem. Lett. (2010) 1(3)120-124). См. также Sekioka, R. et al., Discovery of N-ethylpyridine-2-carboxamide derivatives as a novel scaffold for orally active gamma secretase modulators. Bioorg. & Med. Chem., (2020) 28(1): 115132. GSI включают любую форму соли, полиморф, гидрат, аналог или пролекарство, которое сохраняет ингибирующую или модулирующую активность гамма-секретазы.

«Лечить», «лечение», «предотвращать», «профилактика», «ингибировать» и соответствующие термины включают терапевтическое лечение, профилактическое лечение и лечение, снижающее риск развития у субъекта нарушения или фактора риска. Лечение не требует полного излечения нарушения или состояния и включает уменьшение тяжести, уменьшение симптомов, уменьшение других факторов риска, связанных с состоянием, и/или эффекты, модифицирующие заболевание, такие как замедление прогрессирования заболевания.

Прежде чем настоящее изобретение будет описано более подробно, следует понимать, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, поскольку они, конечно, могут варьироваться. Также следует понимать, что используемая в настоящем документе терминология предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничен только прилагаемой формулой изобретения.

Если указан диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, до десятой доли единицы нижнего предела, если контекст явно не указывает иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим установленным или промежуточным значением в указанном диапазоне охватывается изобретением. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны и также охватываются изобретением, с учетом любого специально исключенного предела в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение.

Определенные диапазоны представлены в настоящем документе с числовыми значениями, которым предшествует термин «примерно». Термин «примерно» используется в настоящем документе для обеспечения буквальной поддержки точного числа, которому оно предшествует, а также числа, которое близко или приблизительно соответствует числу, которому предшествует термин. При определении того, является ли число близким или приблизительным к специально названному числу, близкое или приблизительное не названное число может быть числом, которое в контексте, в котором

оно представлено, обеспечивает существенный эквивалент специально названного числа.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области, к которой относится данное изобретение. Хотя любые способы и материалы, подобные или эквивалентные тем, что описаны в настоящем документе, также могут быть использованы при практическом применении или тестировании настоящего изобретения, теперь описаны типовые иллюстративные способы и материалы.

Все публикации и патенты, цитируемые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или патент были конкретно и индивидуально указаны для включения посредством ссылки и включены в настоящее описание посредством ссылки для раскрытия и описания методов и/или материалов, в связи с которыми публикации цитируются. Ссылка на любую публикацию предназначена для ее описания до даты подачи заявки и не должна толковаться как признание того, что настоящее изобретение не имеет права предшествовать такой публикации в силу предшествующего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

Следует отметить, что используемые в настоящем документе и в прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если из контекста явно не следует иное. Далее следует отметить, что формула изобретения может быть составлена таким образом, чтобы исключать любой необязательный элемент. Как таковое, это заявление предназначено служить предшествующей основой для использования такой исключительной терминологии, как «исключительно», «только» и подобной, в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием «отрицательного» ограничения.

Как будет очевидно специалистам в данной области техники после прочтения настоящего описания, каждый из отдельных вариантов осуществления, описанных и проиллюстрированных в настоящем документе, имеет отдельные компоненты и признаки, которые можно легко отделить или объединить с признаками любого из других нескольких вариантов осуществления, не выходя за объем или сущность настоящего изобретения.

### **Подробное описание**

#### **Ингибиторы гамма-секретазы**

Разнообразные GSI были разработаны в качестве потенциальных клинических кандидатов для лечения болезни Альцгеймера и онкологических заболеваний. (См. Kreft et al, 6171). DAPT был одним из первых выявленных GSI. Модификации DAPT привели к клиническим кандидатам.

Семагестат представляет собой (2S)-2-гидрокси-3-метил-N-[(1S)-1-метил-2-оксо-2-[[[(1S)-2,3,4,5-тетрагидро-3-метил-2-оксо-1H-3-бензазепин-1-ил]амино]этил]бутамид, низкомолекулярный ингибитор гамма-секретазы, первоначально разработанный для

лечения болезни Альцгеймера. (См. патент США № 7,468,365). Известно, что семагастат существует в ряде полиморфных форм, включая дигидрат и по меньшей мере две безводные формы. (*To же*, см. также патент США № 8,299,059). См. также Yi et al, DMD (2010) 38:554-565; <http://doi:10.1124/dmd.109.030841>.

Нирогастат (он же PF-03084014) представляет собой ((S)-2-((S)-5,7-дифтор-1,2,3,4-тетрагидронафталин-3-иламино)-N-(1-(2-метил-1-(неопентиламино)пропан-2-ил)-1H-имидазол-4-ил)пентанамид, низкомолекулярный ингибитор гамма-секретазы, разработанный для лечения рака. Он доступен в виде гидробромида ([www.medchemexpress.com](http://www.medchemexpress.com)), и существует в виде твердых форм (см. патент США № 10,590,087). См. Wei P, et al. Evaluation of selective gamma-secretase inhibitor PF-03084014 for its antitumor efficacy and gastrointestinal safety to guide optimal clinical trial design. Mol Cancer Ther. 2010 Jun;9(6):1618-28; и Kumar, S., et al., Clinical Activity of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014 in adults with desmoid tumors (aggressive fibromatosis). J. Clin Oncol. (2017) May 10;35(14):1561-1569. Семнадцать пациентов получали дозу 50 мг перорально два раза в день в течение 3-недельных циклов в течение шести циклов (18 недель).

МК-0752 представляет собой низкомолекулярный ингибитор гамма-секретазы, который изучается для лечения рака. Клинические данные фазы I описаны в Krop I, et al. Phase I pharmacologic and pharmacodynamic study of the gamma secretase (Notch) inhibitor МК-0752 in adult patients with advanced solid tumors. J Clin Oncol. 2012;30(19):2307-2313. В этом исследовании, из 103 пациентов, которые получали МК-0752, 21 пациент получал непрерывную дозу один раз в сутки по 450 и 600 мг; 17 получали по периодической схеме 3 из 7 дней по 450 и 600 мг; и 65 получали один раз в неделю по 600, 900, 1200, 1500, 1800, 2400, 3200 и 4200 мг. Наиболее распространенными токсичными эффектами, связанными с лекарственными препаратами, были диарея, тошнота, рвота и утомляемость. Было обнаружено, что токсичность зависит от схемы, при этом еженедельное дозирование считается хорошо переносимым. См. также Matthews et al, Journal of Chromatography B, 863 (2008) 36-45; <https://doi:10.1016/j.jchromb.2007.12.025>.

RO-4929097 представляет собой низкомолекулярный ингибитор гамма-секретазы, который изучается для лечения рака. См., например, Tolcher AW, Messersmith WA, Mikulski SM et al. Phase I study of RO4929097, a gamma secretase inhibitor of Notch signaling, in patients with refractory metastatic or locally advanced solid tumors. J Clin Oncol 2012; 30: 2348-2353; Wu et al, Journal of Chromatography B, 879 (2011) 1537-1543. В этом исследовании пациенты получали увеличивающиеся дозы RO4929097 перорально по двум схемам: (A) 3 дня подряд в неделю в течение 2 недель каждые 3 недели; (B) 7 дней подряд каждые 3 недели; и (C) непрерывный ежедневный прием. Токсичность включала утомляемость, тромбоцитопению, лихорадку, сыпь, озноб и анорексию. Исследование пришло к выводу, что RO4929097 хорошо переносился в дозе 270 мг по схеме A и 135 мг по схеме B; и безопасность схемы C не была полностью оценена.

Кренигасцестат (он же LY3039478) представляет собой низкомолекулярный

ингибитор гамма-секретазы, который изучается для лечения рака. См. Yuen E., et al., Evaluation of the effects of an oral notch inhibitor, crenigacestat (Ly3039478), on QT interval, and bioavailability studies conducted in healthy subjects. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2019 Mar;83(3):483-492. В этом исследовании, кренигацестат вводили здоровым субъектам в виде однократной пероральной дозы 25, 50 или 75 мг или в виде внутривенной дозы 350 мкг  $^{13}\text{C}^{15}\text{N}^2\text{H}$ -кренигацестата.

В исследовании фазы III при болезни Альцгеймера, семагацестат в дозах 100 мг и 140 мг в день не улучшал когнитивный статус, и у пациентов, принимавших самые высокие дозы, наблюдалось значительное ухудшение когнитивных способностей. Семагацестат также был связан с большим количеством побочных эффектов, включая рак кожи и инфекции. Doody, R.S., et al., *N Engl J Med* 369;4: 341-350 (July 25, 2013). В более раннем исследовании фазы I сообщалось, что у субъектов, принимавших 5 мг, 20 мг или 40 мг в день в течение 14 дней, наблюдались побочные эффекты, сходные с плацебо, в то время как у 2 из 7 субъектов, получавших суточную дозу 50 мг, сообщалось о побочных эффектах, которые могли быть связаны с приемом лекарственного средства. Siemers E, Skinner M, Dean RA, et al. Safety, tolerability, and changes in amyloid beta concentrations after administration of a gamma-secretase inhibitor in volunteers. *Clin Neuropharmacol.* 2005;28(3):126- 132.

Из-за доказательств того, что передача сигналов Notch нарушена при многочисленных злокачественных новообразованиях, GSI были разработаны как потенциальные терапевтические средства против рака, в качестве монотерапии или в комбинации с другими агентами. См., например, Takebe N, Nguyen D, Yang SX. Targeting notch signaling pathway in cancer: clinical development advances and challenges. *Pharmacol Ther.* 2014 Feb;141(2):140-9. doi: 10.1016/j.pharmthera.2013.09.005. Epub 2013 Sep 27; Shao H, Huang Q, Liu ZJ. Targeting Notch signaling for cancer therapeutic intervention. *Adv Pharmacol.* 2012;65:191-234. doi: 10.1016/B978-0-12-397927-8.00007-5.

В настоящее время обнаружено, что низкие дозы GSI эффективны при лечении респираторных заболеваний, характеризующихся гиперсекрецией слизи, и эффективны в дозах, обеспечивающих терапевтическую активность, при этом позволяя избежать или свести к минимуму неблагоприятные эффекты, ранее связанные с этим классом молекул. Используемый в настоящем документе термин «низкая доза» GSI относится к дозе, которая является эффективным количеством для лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, и представляет собой более низкую дозу по сравнению с дозой GSI, подходящей для введения пациенту, страдающему от нейродегенеративного нарушения, онкологического нарушения или респираторного заболевания, не характеризующегося гиперсекрецией слизи. Например, низкой дозой может быть доза, дающая пиковый уровень в плазме в субмикромольном диапазоне. Следует понимать, что низкую дозу GSI можно вводить в виде однократной суточной дозы, многократных доз в сутки (например, 2 или 3 дозы в сутки), периодически или еженедельно, при этом схема дозирования зависит от дозированной формы (например,

немедленное высвобождение или контролируемое высвобождение) и потребности пациента. Введение может осуществляться в течение длительного периода времени, периодически или может осуществляться в течение ограниченного периода времени с повторным введением, если и до той степени, в которой это определено лечащим врачом пациента. Например, GSI можно давать ежедневно в течение 1, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 24, 28 или 30 дней, а затем прекращать. В некоторых вариантах осуществления, GSI вводят периодически, например, каждые 3 дня или еженедельно. Следует иметь в виду, что ссылки на суточные дозировки в настоящем документе могут быть выполнены с помощью схем дозирования, отличных от ежедневных, например, недельная доза 35 мг будет соответствовать суточной дозе 5 мг/день. Подобным образом, в данной области техники известны составы с медленным высвобождением, такие как составы депо или пластыри, и их можно использовать для получения доз, эквивалентных суточным дозам, описанным в настоящем документе. При необходимости, схему дозирования GSI можно повторить.

Например, каждый из GSI семагацестата, нирогацестата (PF-03084014), RO-4929097 и МК-0752 при введении в наномолярном диапазоне к эпителиальным клеткам носа человека эффективен в блокировании передачи сигналов Notch, стимулировании дифференциации в МСС и неотложных состояниях, связанных с избыточной секрецией слизи бокаловидными клетками. Следовательно, относительно низкие системные уровни GSI могут обеспечить эффективное лечение респираторных заболеваний, связанных с гиперсекрецией слизи, при этом позволяя избежать или свести к минимуму побочные эффекты, наблюдаемые при более высоких дозах.

Кроме того, было обнаружено, что GSI, вводимые в комбинации с модулятором CFTR, эффективны для коррекции дисфункции эпителиальных клеток в модельных системах на основе клеток муковисцидоза (первичных клеток пациентов), в отличие от некоторых преобладающих концепций, и действительно комбинация может быть синергической в улучшении функции ионных каналов CFTR и коррекции эпителиальных клеток. Например, теперь было показано, что различные GSI не мешают ионным каналам CFTR и не ингибируют действие модуляторов CFTR на ионные каналы CFTR в эпителиальных клетках дыхательных путей при муковисцидозе. Было обнаружено, что лечение GSI неожиданно улучшает реабсорбцию жидкости, покрывающей поверхность дыхательных путей (ASL) клетками CF в той же степени, что и лекарственные средства-модуляторы CFTR. Дополнительные данные свидетельствуют о том, что лечение GSI может быть синергическим с лечением модулятором CFTR, что позволяет снизить дозы одного или обоих лекарственных средств и дополнительно снизить потенциальную токсичность каждого из них.

GSI можно вводить в виде фармацевтических дозированных форм, известных в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, пероральные твердые дозировки, пероральные жидкости, инъекцию, трансдермальный пластырь и ингаляцию. Дозированные формы могут быть составлены с эксципиентами и другими соединениями для облегчения введения субъекту и для поддержания стабильности при хранении. См.

“Remington’s Pharmaceutical Sciences” (Mack Publishing Co., Easton, PA). Пероральные фармацевтические составы включают таблетки, минитаблетки, пеллеты, гранулы, капсулы, гели, жидкости, сиропы и суспензии. Предпочтительно, GSI вводят перорально, как правило, в виде пероральной твердой дозировки, хотя пероральные жидкости могут быть желательны для определенных групп населения, которые испытывают трудности с таблетками и капсулами, таких как пациенты детского и пожилого возраста. Пероральные дозированные формы могут быть с немедленным высвобождением или с контролируемым высвобождением.

Таблетированные формы семагацестата известны в данной области техники. (См. патент США № 8,299,059). Сообщается, что при пероральном приеме, семагацестат имеет период полувыведения приблизительно 2,5 часа. Следовательно, в одном варианте осуществления изобретения, семагацестат может быть предложен в виде состава с немедленным высвобождением. Семагацестат с немедленным высвобождением может быть предложен в виде разовой суточной дозы или разделен на несколько суточных доз, которые можно вводить 2, 3, 4 или более раз в день. В другом варианте осуществления изобретения, семагацестат предложен в виде препарата с пролонгированным высвобождением. Состав с пролонгированным высвобождением может обеспечить удобство для пациента за счет сокращения ежедневных введений, и может улучшить комплаентность для пациента. Кроме того, составы с контролируемым высвобождением по настоящему изобретению могут быть полезны для уменьшения пиков и углублений сыворотки, тем самым потенциально снижая нежелательные явления.

Пероральные составы с контролируемым высвобождением известны в данной области техники и включают составы с замедленным высвобождением, пролонгированным высвобождением, отсроченным высвобождением и пульсирующим высвобождением. См. «Remington's Pharmaceutical Sciences» (Mack Publishing Co., Easton, PA). Активный агент может быть составлен в виде матричного состава с одним или несколькими полимерами, которые замедляют высвобождение лекарственного средства из дозированной формы, включая гидрофильные или гелеобразующие агенты, гидрофобные матрицы, липидные или восковые матрицы и биоразлагаемые матрицы. Активный агент может быть составлен в форме микроносителей, например, с сердцевинкой из инертного сахара, и покрытых известными эксципиентами для задержки или замедления высвобождения активного агента путем диффузии. В данной области известны энтеросолюбильные покрытия для использования для замедления высвобождения активного агента до тех пор, пока дозированная форма не перейдет из среды с низким рН желудка в среду с более высоким рН тонкого кишечника, и они могут включать сополимеры метилакрилата и метакриловой кислоты, фталат ацетата целлюлозы (САР), сукцинат ацетата целлюлозы, фталат гидроксипропилметилцеллюлозы, сукцинат ацетата гидроксипропилметилцеллюлозы, фталат поливинилацетата (PVAP), шеллак, альгинат натрия и тримеллитат ацетата целлюлозы.

В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из группы, состоящей из

семагацестата, авагацестата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигацестата, MRK 560, ниругацестата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY- 3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегацестата.

В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из семагацестата, ниругацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата. В одном варианте осуществления, GSI представляет собой семагацестат.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося повышенной секрецией слизи, включающий системное введение пациенту, нуждающемуся в этом, от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг семагацестата в день, где пероральное введение семагацестата эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирование накопления слизи в легких такого пациента. Предпочтительно, семагацестат вводят системно в дозах от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг в день или от примерно 0,5 мг до примерно 30 мг в день, и наиболее предпочтительно, от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг в день или от 0,5 мг до примерно 10 мг в день. Например, семагацестат можно вводить в количестве примерно 0,1 мг, 0,25 мг, 0,5 мг, 1 мг, 2,5 мг, 5 мг, 10 мг, 15 мг, 20 мг, 25 мг, 30 мг, 35 мг, 40 мг, 45 мг или 50 мг в день.

В другом варианте осуществления предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 5 мкг до примерно 1 мг/кг в день, предпочтительно от примерно 50 до примерно 100 мкг/кг семагацестата в день.

В варианте осуществления изобретения предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий системное введение пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества семагацестата, где концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы включает AUC (площадь под кривой) менее 1220 нг•ч/мл, где системное введение семагацестата является эффективным для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или ингибирования накопления слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, при многократном введении дозы, концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии составляет AUC менее 1220 нг•ч/мл, менее 600 нг•ч/мл или менее 250 нг•ч/мл.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий системное введение пациенту, нуждающемуся в этом, от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг ниругацестата в день, где пероральное введение семагацестата эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, ниругацестат вводят системно в дозах от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг в день, или от примерно 0,5 до примерно 30 мг, или от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг в день.

В другом варианте осуществления предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 8 мкг до примерно 0,9 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 10 до примерно 300 мкг/кг нирогацестата в день.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 0,1 мг до примерно 20 мг RO-4929097 в день, где пероральное введение RO-4929097 эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, RO-4929097 вводят системно в дозах от примерно 0,1 до примерно 10 мг в день, или от примерно 0,5 мг до примерно 10 мг в день, или от примерно 0,1 мг до примерно 5 мг в день.

В другом варианте осуществления предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 5 мкг до примерно 0,4 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 50 до примерно 100 мкг/кг RO-4929097 в день.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 0,1 мг до примерно 40 мг МК-0752 в день, где пероральное введение МК-0752 эффективно уменьшает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, МК-0752 вводят в дозе в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 30 мг в день или от примерно 0,1 до примерно 20 мг в день и наиболее предпочтительно, от примерно 0,1 до примерно 10 мг в день.

В другом варианте осуществления предложены способы лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающие системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 2,5 мкг до примерно 0,6 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 2,5 до примерно 500 мкг/кг МК-0752 в день.

В некоторых вариантах осуществления, респираторное заболевание, характеризующееся гиперсекрецией слизи, выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического фиброза легких и других фиброзных нарушений легких и респираторных инфекций, включая обострения хронических респираторных нарушений и накопление слизи в ответ на острую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, респираторное заболевание представляет собой муковисцидоз. В других вариантах осуществления, респираторное заболевание представляет собой хроническую обструктивную болезнь легких.

В некоторых вариантах осуществления, GSI вводят путем ингаляции. В предпочтительных вариантах осуществления, GSI вводят перорально. В одном варианте

осуществления, GSI предложен в виде пероральной твердой дозированной формы с немедленным высвобождением. В другом варианте осуществления, GSI предложен в виде пероральной твердой дозированной формы с контролируемым высвобождением. В другом варианте осуществления, GSI предложен в виде жидкой дозированной формы. В еще одном варианте осуществления, GSI предложен в виде дозированной формы для ингаляции.

### **Комбинированная терапия муковисцидоза**

Лекарственные средства-модуляторы CFTR обеспечили значительный прогресс в лечении муковисцидоза. Однако они не устраняют повреждения, возникающие в эпителии легких из-за муковисцидоза. Кроме того, модуляторы CFTR ограничены для использования у пациентов со специфическими мутациями CFTR, на которые воздействует конкретное лекарственное средство-модулятор CFTR.

Тип или типы клеток, наиболее сильно экспрессирующие функциональный CFTR не определены. Было предложено, что редкий тип клетки, названный ионоцитом, может быть основным источником экспрессии CFTR и, следовательно, активности. Plasschaert, L.W., et al., A single-cell atlas of the airway epithelium reveals the CFTR-rich pulmonary ionocyte. *Nature* (2018) 560: 377-381; <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0394-6>. Кроме того, предположительно, ожидается, что популяция ионоцитов будет уменьшаться при ингибировании Notch, и активность CFTR также уменьшится. (*Там же*, 380). Другие данные, опубликованные совсем недавно, позволяют предположить, что различные типы клеток экспрессируют различные уровни CFTR Carraro, G., et al., *Nat. Med.* (2021) May;27(5):806-814. Doi: 10.1038/s41591-021-01332-7. Epub 2021 May 5. В отличие от опубликованных утверждений о влиянии GSI на активность CFTR, теперь было обнаружено, что лечение GSI не снижает активность CFTR. Скорее, было обнаружено, что лечение GSI неожиданно улучшает частоту биения ресничек (CBF) и транспорт слизи клеток CF в той же степени, что и лекарственные средства-модуляторы CFTR. Дополнительные данные свидетельствуют о том, что лечение GSI может быть синергетическим с лечением модулятором CFTR, что позволяет снизить дозы одного или обоих лекарственных средств и дополнительно снизить потенциальную токсичность каждого из них.

Соответственно, способы по настоящему изобретению направлены на устранение дисфункции, присутствующей при муковисцидозе дыхательных путей и других эпителиальных клеток, которая приводит к гиперсекреции слизи (и часто к инфекции), путем стимуляции дифференциации MCC и уменьшения клеток, секретирующих слизь, и обеспечения улучшения мукоцилиарного клиренса. Введение GSI может улучшить функцию эпителия при муковисцидозе независимо от мутаций CFTR, вызывающих основное заболевание. Следовательно, при лечении муковисцидоза, GSI можно вводить отдельно или в комбинации с любым модулятором CFTR или комбинацией модуляторов CFTR.

В некоторых вариантах осуществления изобретения предложены способы лечения

муковисцидоза, включающие введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества GSI и модулятора CFTR. GSI можно вводить до, после или одновременно с модулятором CFTR. В некоторых вариантах осуществления, GSI вводят перорально пациенту, принимающему модулятор CFTR. GSI можно назначать в виде одного курса лечения или можно назначать периодически в сочетании со схемой дозирования модулятора CFTR.

Например, модулятор CFTR можно вводить ежедневно, и GSI можно вводить ежедневно в течение 1, 3, 5, 7, 10, 14, 18, 21, 24, 28 или 30 дней, а затем прекратить. В некоторых вариантах осуществления, GSI вводят периодически, например, каждые 3 дня или еженедельно. Следует иметь в виду, что ссылки на суточные дозировки в данном документе могут быть выполнены с помощью схем дозирования, отличных от ежедневных, например, недельная доза 35 мг будет соответствовать суточной дозе 5 мг/день. Подобным образом, в данной области техники известны составы с медленным высвобождением, такие как составы депо или пластыри, и их можно использовать для получения доз, эквивалентных суточным дозам, описанным в настоящем документе. При необходимости, схему дозирования GSI можно повторить. В некоторых вариантах осуществления, GSI выбран из семагацестата, нирогацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата. В одном варианте осуществления, GSI представляет собой семагацестат.

Модуляторы CFTR, применимые в настоящем изобретении, включают потенциаторы, корректоры, супрессоры преждевременного стоп-кодона, усилители CFTR и их комбинации. Продаваемые в настоящее время модуляторы CFTR включают ивакафтор, люмакафтор, тезакафтор и элексакафтор и их комбинации. Ивакафтор продается в форме таблеток и гранул как KALYDECO. (См. патенты США № 7,495,103 и 8,754,224). Ивакафтор и тезакафтор продаются как SYMDEKO. (См. патенты США № 7,745,789; 7,776,905; 8,623,905 и 10,239,867). Комбинация люмакафтора и ивакафтора продается как ORKAMBI. (См. патенты США № 8,507,534 и 10,597,384). Комбинация элексакафтора, ивакафтора и тезакафтора («ETI») продается как TRIKAFTA. Дополнительные модуляторы CFTR, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, находятся в разработке. (См. например, патенты США №№ 10,647,717; 10,604,515; 10,568,867; 10,428,017; 10,399,940; 10,259,810; 10,118,916; 9,895,347; 10,550,106; 10,548,878; 10,392,378; 10,494,374; 10,377,762; 10,450,273; 9,890,149 и 10,258,624).

В варианте осуществления изобретения предложены способы лечения муковисцидоза путем введения терапевтически эффективного количества GSI и модулятора CFTR. В другом варианте осуществления, предложен способ лечения муковисцидоза, в котором GSI системно вводят пациенту, которому вводят или который нуждается во введении модулятора CFTR. GSI можно вводить одновременно, до или после введения модулятора CFTR. В некоторых вариантах осуществления, GSI вводят периодически в сочетании со схемой дозирования модулятора CFTR.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у

пациента, которому вводят, или который нуждается во введении модулятора CFTR, включающий системное введение такому пациенту от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг семагацестата в день, где пероральное введение семагацестата эффективно снижает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, семагацестат вводят системно в дозах от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг в день. В некоторых вариантах осуществления, семагацестат вводят в дозе от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг в день.

В одном варианте осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение семагацестата нуждающемуся в этом пациенту в дозе от примерно 5 мкг до 1 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 50 до 100 мкг/кг в день.

В некоторых вариантах осуществления, семагацестат вводят перорально пациенту, принимающему модулятор CFTR, где концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы включает AUC (площадь под кривой) менее 1220 нг•ч/мл, где системное введение семагацестата является эффективным для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или предотвращения накопления слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, при многократном введении дозы, концентрация семагацестата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии составляет AUC менее 1220 нг•ч/мл, менее 600 нг•ч/мл или менее 250 нг•ч/мл. Уровни семагацестата в равновесном состоянии можно определить примерно через 1 неделю или примерно через 2 недели или более после введения терапевтически эффективного количества семагацестата.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, которому вводят или который нуждается во введении модулятора CFTR, включающий системное введение пациенту, нуждающемуся в этом, от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг нирогацестата в день, где пероральное введение нирогацестата эффективно для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или ингибирования накопления слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, нирогацестат вводят системно в дозах от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг в день, или от примерно 0,5 до примерно 30 мг, или от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг в день.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 8 мкг до примерно 0,9 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 10 до примерно 300 мкг/кг нирогацестата в день.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 0,1 мг до примерно 20 мг RO-4929097 в день, где пероральное введение RO-4929097 эффективно снижает количество слизи в легких такого пациента или ингибирует накопление слизи в легких такого пациента. В

некоторых вариантах осуществления, RO-4929097 вводят системно в дозах от примерно 0,1 до примерно 10 мг в день, или от примерно 0,5 мг до примерно 10 мг в день, или от примерно 0,1 мг до примерно 5 мг в день.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 5 мкг до примерно 0,4 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 50 до примерно 100 мкг/кг RO-4929097 в день.

В некоторых вариантах осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение нуждающемуся в этом пациенту от примерно 0,1 мг до примерно 40 мг МК-0752 в день, где пероральное введение МК-0752 эффективно для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или ингибирования накопления слизи в легких такого пациента. В некоторых вариантах осуществления, МК-0752 вводят в дозе в диапазоне от примерно 0,1 до примерно 30 мг в день или от примерно 0,1 до примерно 20 мг в день и наиболее предпочтительно, от примерно 0,1 до примерно 10 мг в день.

В другом варианте осуществления предложен способ лечения муковисцидоза у пациента, принимающего модулятор CFTR, включающий системное введение пациенту, нуждающемуся в этом, от примерно 2,5 мкг до примерно 0,6 мг/кг в день, предпочтительно, от примерно 2,5 до примерно 500 мкг/кг МК-0752 в день.

Предпочтительно GSI вводят перорально. GSI может быть предложен в виде пероральной дозированной формы с немедленным высвобождением или в виде пероральной дозированной формы с контролируемым высвобождением.

Как правило, субъект-человек, которого лечат способами по изобретению, например, как описано выше, является человеком, у которого было диагностировано респираторное заболевание, характеризующееся гиперсекрецией слизи. В некоторых случаях, респираторное заболевание, характеризующееся гиперсекрецией слизи, которое диагностировано у субъекта, выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных нарушений легких и респираторных инфекций, включая обострения хронических респираторных заболеваний и накопление слизи в ответ на острую инфекцию. В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой субъекта, у которого диагностирован муковисцидоз. В других вариантах осуществления, субъект представляет собой субъекта, у которого диагностировано хроническое обструктивное заболевание легких.

Следующие примеры предлагаются в качестве иллюстрации, а не в качестве ограничения.

### **Примеры**

#### **Пример 1: Лечение HNEC с помощью GSI**

Культуры на поверхности раздела воздух-жидкость (ALI) готовят, как описано в Vladar EK, Nayak JV, Milla CE, Axelrod JD. Airway epithelial homeostasis and planar cell polarity signaling depend on multiciliated cell differentiation. JCI Insight. 2016;1(13);e88027. Эпителиальные клетки носа человека (HNEC) получают из синоназальных эпителиальных щеток человека или из ткани, полученной от пациентов, которым была проведена операция эндоскопической пазухи в Stanford Hospital и культивируют, как описано у Vladar et al.

Культуры обрабатывают различными дозами семагацестата. DAPT (Abcam) (0,5 мкг) используют в качестве положительного контроля активности GSI. Культуры метят в ALI+21d антителами против ацетилированного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный) для маркировки ресничек и эпителиальных прикреплений. Результаты, показанные на фигуре 1, демонстрируют дозу-ответ для HNEC, обработанных семагацестатом, и демонстрируют эффективное превращение в МСС при наномолярных концентрациях семагацестата.

Используя ECAD, подсчитывают общее количество клеток, и анти-ацетилированный  $\alpha$ -тубулин используют для подсчета количества МСС (не включает незрелые МСС, которые были предназначены, но еще не сформировали реснички, поскольку внимание сосредоточено на «функциональных» МСС). Отношение определяют как количество МСС/общее количество просветных клеток. Подсчет проводят на одном типовом изображении из 5 повторов культуры от одного донора. Результаты, показанные на фигуре 2, показывают, что как 1 мкМ DAPT, так и семагацестат в дозах от 500 нМ до 31,25 нМ вызывают значительное увеличение этого отношения (все  $p < 0,01$  по ANOVA с апостериорным критерием множественных сравнений Даннета).

Эффективные дозы семагацестата более чем на два порядка ниже доз, используемых в исследованиях болезни Альцгеймера у человека.

### Пример 2. Модели мышей in vivo.

Подобраным по возрасту самцам и самкам мышей Foxj1-GFP в возрасте 10-40 недель дают семагацестат или носитель путем внутрибрюшинного (в/б) введения. В первом эксперименте, семагацестат вводят в дозах 0,1 мг/кг и 1 мг/кг два раза в день в течение трех дней и сравнивают с введением только носителя. Мышей умерщвляют на 7 день. На фигуре 3 показан способ оценки клеточного состава дыхательных путей. В дыхательных путях примерно одинакового размера, фиксированных PFA, ядра (красные; DAPI) оценивают либо как МСС (зеленые, GFP), либо как не реснитчатые клетки (отсутствие GFP). Ацетилированный тубулин (синий) маркирует реснички. Образцы являются заслепленными для группы лечения перед подсчетом очков. На фигуре 5 показано увеличение соотношения реснитчатых и не реснитчатых клеток после 3 дней системного (в/б) лечения семагацестатом как в низких, так и в высоких дозах.

Во втором эксперименте, носитель и семагацестат вводят один раз в день в течение 5 дней подряд в неделю в течение трех недель с дозой семагацестата 1 мг/кг. Важной токсичностью, наблюдаемой в многочисленных клинических испытаниях GSI, включая

крупные испытания болезни Альцгеймера, является токсичность для желудочно-кишечного тракта. В качестве суррогатной меры ЖК токсичности, контролируют массу тела на протяжении всего эксперимента. Массу тела измеряют в дни 1, 9, 24 и 30, и мышей умерщвляют на 31 день. Ни в одной группе не отмечено ни смертности, ни побочных эффектов. На фигуре 4 показана масса тела на 9, 24 и 30 день, и не видно существенной разницы в группах лечения по сравнению с контрольными группами, получавшими носитель. На фигуре 6 показано значительное увеличение соотношения реснитчатых и не реснитчатых клеток после 3 недель системного (в/б) семагестата.

В течение трехдневного лечения наблюдают тенденцию доза-ответ, при этом высокая доза достигает статистической значимости (фигура 5). Ответ на трехнедельное лечение в более высокой дозе является очень значительным (фигура 6).

Пример 3: Зависимость образования мультиреснитчатых клеток от сроков лечения в дифференцирующемся и зрелом эпителии дыхательных путей

Первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека обрабатывают DAPT и LY45139: i) только во время пролиферации (ALI-5 - -1d), ii) только во время дифференциации (ALI+0 - +21d) или iii) непрерывно в течение всей продолжительности культивирования с последующим путем мечения ALI+21d антителами против ацетилованного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный). Обработка GSI во время дифференциации мультиреснитчатых клеток (только дифференциация и непрерывная обработка) увеличивает количество клеток МСС. Результаты, показанные на фигуре 7, показывают, что обработка GSI только во время пролиферации не влияет на дифференциацию и не оказывает вредное воздействие на последующую дифференциацию или общую структуру эпителия. На фигуре 8 показан количественный анализ (МСС на общее количество просветных клеток) данных, показанных на фигуре 7.

Зрелые (ALI+30d) первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека обрабатывают DAPT и семагестатом в течение одной (ALI+30 до +37d) или двух недель (ALI+30 до +44d), затем метят антителами против ацетилованного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный). Результаты, показанные на фигуре 9, показывают, что обработка GSI индуцирует образование дополнительных клеток с множеством ресничек в зрелых культурах, в то время как необработанные культуры больше не дифференцируют клетки со множеством ресничек. На фигуре 10 показан количественный анализ данных, показанных на фигуре 9.

Первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека обрабатывают DAPT и LY45139 только во время дифференциации (ALI+0 до +21d) либо с апикальной, либо с базальной поверхности, затем метят на ALI+21d антителами против ацетилованного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный). Результаты, показанные на фигуре 11, показывают, что обработка GSI индуцирует образование реснитчатых клеток как при апикальном, так и при базальном применении. Апикальная обработка устраняет границу раздела воздух-жидкость, что приводит к плохой эпителиальной структуре и дифференциации клеток с множеством ресничек в необработанных культурах, что

частично устраняется обработкой GSI. На фигуре 12 показана количественная оценка данных, показанных на фигуре 11. Этот результат предполагает, что как системное, так и ингаляционное воздействие, вероятно, будут эффективными *in vivo*.

Результаты показывают, что обработка во время или после дифференциации увеличивает отношение МСС к общему количеству клеток. Обработка во время пролиферации (до дифференциации) не имеет явного эффекта, ни положительного, ни отрицательного.

#### Пример 4: Модель хронического воспаления, индуцированного IL-13

Введение IL-13 культурам ALI индуцирует гиперплазию бокаловидных клеток и является полезной моделью хронического воспаления. Культуры ALI HNEC готовят, как описано Vldar et al. Культуры ALI обрабатывают с и без введения IL-13 в 7-14 дни. DAPT (1 мкМ), семагестат (125 нМ) или контрольный носитель вводят в 14-21 дни. Фиксированные PFA культуры окрашивают на Muc5AC (красный; секреторные клетки, продуцирующие муцин), ацетилированный тубулин (зеленый; МСС) и E-кадгерин (синий, чтобы выявить границы клеток).

На фигуре 13 показан эффект обработки семагестатом и DAPT в модели хронического воспаления с ALI. Культуры HNEC от пациента с CF обрабатывают IL-13 ALI+7-14, чтобы вызвать воспаление. DAPT и семагестат увеличивают долю МСС в контрольной группе (слева). Обработка IL-13 увеличивает долю муцин-положительных секреторных клеток и снижает долю МСС. Последующее лечение DAPT или семагестатом восстанавливает клеточный состав, увеличивая долю МСС и уменьшая долю муцин-положительных секреторных клеток.

На фигуре 14 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток по данным с фигуры 13.

#### Пример 5: Типовые кривые камеры Уссинга

Клетки, выращенные на границе раздела воздух-жидкость устанавливают на удерживающий ползунок и вставляют в камеру Уссинга для электрофизиологических измерений тока короткого замыкания ( $I_{sc}$ ). Растворы в серозной и слизистой бане готовят так, что между обеими сторонами устанавливается градиент хлорида. После получения стабильных базовых записей тока, агонисты добавляют в следующем порядке: амилорид (10 мкМ) для блокировки активности натриевого канала, форсколин (10 мкМ) для стимуляции CFTR, ивакафтор (10 мкМ) для потенцирования активности CFTR и CFTR<sub>inh</sub>-172 (20 мкМ) для блокировки тока CFTR. Для каждого агониста сигналы отслеживают до того момента, как будет отмечено плато в токе, затем добавляют следующий агонист. Дельта- $I_{sc}$  в ответ на CFTR<sub>inh</sub>-172 используют в качестве основного считывания для CFTR-опосредованного транспорта хлорида. Результаты показаны на фигуре 15.

#### Пример 6: Электрофизиологический анализ активности CFTR

Чтобы оценить влияние GSI (DAPT, семагестат) на функцию CFTR в культивируемом эпителии, HNEC от пациентов с CF и контрольной группы без CF собирают и выращивают на границе раздела воздух-жидкость до зрелости (+21d) в

соответствии с Vladar et al. Затем культуры обрабатывают DAPT, семагацестатом, модулятором CFTR люмакафтором или контрольным носителем, добавляя их к основной среде 3 раза в неделю в течение 2 недель. Затем фильтровальные вставки оценивают на ток короткого замыкания ( $I_{sc}$ ) в зависимости от градиента хлорида в камерах Уссинга для оценки активности CFTR. На фигуре 16 показаны типовые кривые. На фигуре 17 количественно показана активность канала CFTR, оцениваемая по ингибированию тока после добавления CFTR<sub>inh</sub>172 для двух контрольных культур дикого типа и двух культур, полученных от пациентов с CF (генотипы: редкий/редкий=W1282X [класс I]/I1234V [класс II] и F508Δ/F508Δ). Следует отметить, что во всех случаях токи CFTR в культурах, обработанных семагацестатом, равны или выше, чем в контрольных условиях.

#### Пример 7: Производство слизи в клетках CF человека

На фигуре 18, дублированные культуры из эксперимента в примере 6 фиксируют PFA и окрашивают на Muc5AC (красный; слизь) и ацетилированный тубулин (зеленый; MCC). Обратите внимание на толстые нити слизи (красные) в культурах CF, обработанных носителем, которые были резистентны к промыванию. Культуры, обработанные семагацестатом, демонстрируют гораздо меньше слизи без нитей. Эффект наблюдается в гомозиготных F508Δ и W1282X/I1234V (редкий генотип, чувствительный к модулятору) клетках при обработке комбинацией модулятора CFTR люмакафтора и ивакафтора.

#### Пример 8: Комбинация семагацестата и модулятора CFTR

Для оценки эффектов комбинированной обработки семагацестатом и модулятором CFTR, контроль дикого типа и CF (F508Δ/F508Δ) HNEC культуры выращивают до зрелости с или без семагацестата от ALI +0-21d, и культуры обрабатывают с или без люмакафтора (VX-809) от ALI +19-21d и ивакафтора (VX-770) за десять минут до фиксации. Затем фиксированные PFA мембраны окрашивают на ацетилированный тубулин (зеленый; MCC) и E-кадгерин (красный). Результаты показаны на фигуре 19. Обратите внимание, что культуры, обработанные комбинацией, дифференцируют MCC так же или лучше, чем культуры, обработанные одним семагацестатом.

На фигуре 20 показан количественный анализ данных для здорового пациента и донора CF 1 на фигуре 19. В некоторых случаях, таких как этот, индуцированное семагацестатом увеличение соотношения MCC/общее количество клеток дополнительно увеличивается под действием люмакафтора. Хотя это не всегда наблюдается и не является статистически значимым среди всех культур, которые количественно оценивают, можно сделать вывод, что никакого значительного снижения ответа индуцированных семагацестатом MCC не видно. Пациенты с CF, которым не показано применение трикафты, отвечают на монотерапию семагацестатом так же, как и пациенты, получающие терапию корректором (не показано).

Пример 9: Обработка GSI индуцирует образование мультиреснитчатых клеток в эпителии муковисцидоза.

Первичные здоровые и муковисцидозные эпителиальные клетки дыхательных

путей обрабатывают семагацестатом (LY45139) только во время дифференциации (ALI+0 - +21d) и метят в ALI+21d антителами против ацетилированного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный). Фигура 21 показывает, что LY45139 является эффективным в увеличении соотношения МСС/общее количество клеток в культурах, полученных от пациентов с CF. Ожидается, что восстановление здорового соотношения МСС/общее количество клеток улучшит мукоцилиарный клиренс.

Пример 10: Обработка GSI индуцирует структурно нормальные реснички в здоровом эпителии и CF эпителии.

На фигуре 22 показана СЭМ здоровых и CF первичных культур эпителия дыхательных путей человека, показывающая, что мультиреснитчатые клетки, образованные при обработке DAPT, неотличимы от таковых в не обработанных здоровых культурах.

Зрелые (ALI+30d) первичные муковисцидозные клетки эпителия дыхательных путей человека обрабатывают DAPT в течение одной недели (ALI+30 - +37d), затем метят антителами против ацетилированного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный). Результаты, показанные на фигуре 23, показывают, что обработка GSI индуцирует образование дополнительных клеток с множеством ресничек в зрелых муковисцидозных культурах, в то время как не обработанные культуры не дифференцируют больше никаких мультиреснитчатых клеток.

Пример 11. Формирование мультиреснитчатых клеток индуцируется различными GSI.

Первичные клетки эпителия дыхательных путей человека обрабатывают во время дифференциации (ALI+0 - +21d) DAPT и высокими и низкими концентрациями GSI LY45139, PF-03084014, RO-4929097 и МК-0752 и метят в ALI+21d антителами против ацетилированного  $\alpha$ -тубулина (зеленый) и ECAD (красный), чтобы отметить реснички и эпителиальные прикрепления. Результаты показаны на фигуре 24. При высоких концентрациях, GSI нарушают структуру эпителия, но при низкой концентрации все индуцируют формирование мультиреснитчатых клеток, аналогично DAPT. На фигуре 25 показано количественное определение МСС на общее количество просветных клеток для данных, показанных на фигуре 24.

Пример 12: Ток CFTR не уменьшается при обработке GSI

Напрямую измеряют активность CFTR в культурах CF пациентов, леченных GSI с или без установленных эффективных *in vitro* доз трикафты (элексафтор/тезакафтор/ивакафтор или «ЕТИ»). Veit, G., et al., JCI (2020) 10.1172/jci.insight.139983. Измерения проводят в камерах Уссинга. Ни LY45139 (фигура 26), ни МК04752 (фигура 27) не ухудшают ток CFTR, индуцированный ЕТИ. В отдельных экспериментах наблюдается синергетический эффект комбинированной обработки: только GSI не демонстрирует эффект, но при комбинированной обработке дает больший ответ, чем только ЕТИ. Этот эффект не всегда наблюдается, но повышает вероятность того, что синергия может наблюдаться с более низкими дозами ЕТИ.

Для дальнейшего исследования этого тестируют МК04752 в комбинации с различными дозами ETI (фигура 28). Результаты показывают, что субоптимальные дозы ETI, по-видимому, потенцируются МК04752, что свидетельствует о синергии.

Пример 13. Обработка GSI не влияет на образование ионоцитов.

Так как ионоциты представляют особый интерес благодаря предшествующим утверждениям об экспрессии CFTR, в дополнение к измерению тока исследуют преобладание ионоцита при обработке GSI. Первичные здоровые клетки эпителия дыхательных путей обрабатывают DAPT только во время дифференциации (ALI+0 - +21d) и метят в ALI+21d анти-FOXI1 (зеленый; ионоцит-специфический маркер), и антителами против ацетилированного  $\alpha$ -тубулина (красный), и окрашивают DAPI (синий), чтобы отметить ядра. На фигуре 29 показано, что как необработанные, так и обработанные DAPT культуры содержат одинаковое небольшое количество FOXI1-положительных ядер, что является показателем ионоцитов. Поэтому, предыдущее предположение, что количество ионоцитом будет снижаться при ингибировании Notch является не корректным.

Пример 14: Влияние низких концентраций GSI МК-0752 и модулятора CFTR элексакафтора на частоту биения ресничек (CBF).

Первичные эпителиальные клетки носа от двух доноров CF (гомозиготы F508del) выращивают в фильтрах-вставках, как и в предыдущих экспериментах, до полной дифференциации. Оценивают, могут ли дозы как МК-0752, так и элексакафтора, более низкие чем дозы, использованные в предыдущих экспериментах, вызвать положительный ответ в CBF в качестве доказательства синергии между двумя лекарственными средствами. Во время дифференциации, культуры обрабатывают носителем в качестве контроля или GSI МК-0752 в дозе 125 нМ, или комбинацией тройного комбинированного модулятора с элексакафтором в дозе 100 нМ, или комбинируют обе обработки. Как только клетки достигают зрелости, апикальную поверхность осторожно промывают PBS, и затем помещают в инвертированный микроскоп на платформу с подогревом при 37°C. Высокоскоростную видеозапись при 200X реснитчатой поверхности проводят для оценки CBF в нескольких областях. Средняя CBF в Гц для каждого состояния представлена столбиками на фигуре 30. Обе обработки демонстрируют значительный эффект в увеличении CBF ( $p < 0,001$  для обеих против контроля). Кроме того, увеличение CBF, вызванное комбинированными обработками, больше, чем при применении любого лекарственного средства по отдельности ( $p < 0,005$  для всех сравнений), и демонстрирует синергию, поскольку увеличение CBF значительно выше ожидаемого при простом сложении их независимых эффектов (36% против 28%,  $p=0,049$ ).

Фигура 31 показывает частоту биений ресничек (CBF) и длину ресничек первичных эпителиальных клеток человека, обработанных DAPT, по сравнению с необработанным контролем. Результаты показывают, что мультиреснитчатые клетки, дифференцированные в присутствии обработки DAPT, имеют умеренное, но значительное увеличение частоты биений ресничек, но не демонстрируют разницу в длине ресничек.

Пример 15: Реабсорбция жидкости, покрывающей поверхность дыхательных путей (ASL), характерная для CF, ослабляется обработкой GSI в той же степени, что и лекарственными средствами-модуляторами CFTR.

Первичные эпителиальные клетки носа от двух доноров CF (F508del гомозиготы) выращивают в фильтрах-вставках, как и в предыдущих экспериментах, до полной дифференциации. Во время дифференциации их обрабатывают контролем носителем (синий), тройной комбинацией модулятора CFTR (элексафтор/тезакафтор/ивакафтор; оранжевый), GSI семагестатом (LY-45139) (серый) или обеими обработками в комбинации (желтый). После достижения зрелости, апикальную поверхность промывают осторожно PBS и затем 30 мкл PBS добавляют на поверхность. Фильтры-вставки затем взвешивают по точной шкале через 0, 12 и 24 часа после добавления жидкости. Изменение массы с течением времени берут как суррогат для реабсорбции жидкости. Результаты показаны на фигуре 32. Контрольные клетки демонстрируют типовой шаблон реабсорбции ASL в течение 48 часов, в отличие от обработанных клеток, которые демонстрируют значительно уменьшенную реабсорбцию ( $p < 0,001$  к контролю). Примечательно, все обработки лекарственными средствами существенно не отличаются по их действию на реабсорбцию жидкости ( $p > 0,3$  для всех сравнений между обработками лекарственным средством).

Пример 16. Значительное улучшение транспорта слизи при комбинированном лечении модулятором GSI и CFTR.

Первичные эпителиальные клетки носа от двух доноров CF (F508del гомозиготы) выращивают в двойном экземпляре, как в предыдущих экспериментах, до полной дифференциации с обработкой контролем носителем, тройным комбинированным модулятором CFTR (элексафтор/тезакафтор/ивакафтор), в GSI семагестатом (LY-45139) или обеими обработками в комбинации. После созревания, 20 мкл суспензии 2 мкм латексных микроносителей добавляют на апикальную поверхность и вставку вырезают для помещения под микроскоп, оснащенный высокоскоростным видеорегистратором. Затем получают изображения со скоростью 1000 кадров/секунду для отслеживания движения микроносителей как отражения транспорта слизи реснитчатой поверхностью и расстояния, пройденного отдельными оцениваемыми микроносителями. Фигура 33 показывает типовые изображения для каждой обработки. Результаты, показанные на фигуре 34, показывают, что в контрольных клетках микроносители двигаются незначительно, что отражает плохой транспорт слизи. Значительное увеличение движения наблюдают при обработке и EPI, и семагестатом ( $p < 0,01$  для любой обработки к контролю). Заметный рост транспорта отмечен для комбинации EPI и семагестата ( $p < 0,05$  для сравнения с любой обработкой по отдельности). Это можно принять как демонстрацию сильного улучшения мукоцилиарного транспорта при комбинированном лечении, и прогнозируют существенную выгоду для пациентов на терапии модулятором CFTR при добавлении лечения GSI.

Несмотря на прилагаемую формулу изобретения, описание также определяется

следующими абзацами:

1. Способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий:

введение низкой дозы GSI пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении; и где количество слизи в легких такого пациента уменьшается или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется.

2. Способ по абзацу 1, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных нарушений легких и респираторных инфекций, в том числе обострения хронических респираторных нарушений и накопления слизи в ответ на острую инфекцию.

3. Способ по абзацу 1 или 2, где GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, авагацестата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигацестата, MRK 560, ниругацестата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегацестата.

4. Способ по абзацу 3, где указанный GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, ниругацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата.

5. Способ по абзацу 4, где GSI представляет собой семагацестат.

6. Способ по абзацу 4, где GSI представляет собой МК-0752.

7. Способ по абзацу 4, где GSI представляет собой ниругацестат.

8. Способ по абзацу 4, где GSI равен RO-492907.

9. Способ по абзацу 4, где GSI представляет собой кренигацестат.

10. Способ по абзацу 2, где указанное введение GSI осуществляют перорально.

11. Способ по абзацу 2, где респираторное заболевание представляет собой муковисцидоз.

12. Способ по абзацу 2, где заболевание органов дыхания представляет собой хроническую обструктивную болезнь легких.

13. Способ по абзацу 5, где семагацестат вводят перорально в количестве от примерно 0,1 до примерно 50 мг в день.

14. Способ по абзацу 13, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг семагацестата в день.

15. Способ по абзацу 14, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 30 мг семагацестата в день.

16. Способ по абзацу 15, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг семагацестата в день.

17. Способ по абзацу 7, в котором ниругацестат вводят перорально в количестве от примерно 8 мкг до примерно 0,9 мг в день.

18. Способ по абзацу 17, где вводят от примерно 10 мкг до примерно 300 мкг ниругацестата в день.

19. Способ по абзацу 8, где RO-492907 вводят перорально в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 20 мг в день.

20. Способ по абзацу 19, где вводят от примерно 0,1 мг до примерно 10 мг RO-492907 в день.

21. Способ по абзацу 20, где вводят от примерно 0,1 мг до примерно 5 мг RO-492907 в день.

22. Способ по абзацу 6, где МК-0752 вводят перорально в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 40 мг в день.

23. Способ по абзацу 22, где вводят от примерно 0,1 мг до примерно 20 мг МК-0752 в день.

24. Способ по абзацу 23, где вводят от примерно 0,1 мг до примерно 10 мг МК-0752 в день.

25. Способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий:

системное введение пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества семагастата, где концентрация семагастата в плазме указанного пациента в стабильном состоянии примерно через 1 неделю или примерно через 2 недели или более после введения терапевтически эффективного количества составляет AUC менее 1220 нг•ч/мл, и

где введение семагастата является эффективным для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или ингибирования накопления слизи в легких такого пациента.

26. Способ по абзацу 25, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического фиброза легких и других фиброзных нарушений легких и респираторных инфекций, в том числе обострения хронических респираторных заболеваний и накопления слизи в ответ на острую инфекцию.

27. Способ по абзацу 26, где концентрация семагастата в плазме крови указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы составляет AUC менее 600 нг•ч/мл.

28. Способ по абзацу 27, где концентрация семагастата в плазме крови указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы составляет AUC менее 250 нг•ч/мл.

29. Способ по абзацу 26, где респираторное заболевание представляет собой муковисцидоз.

30. Способ по абзацу 26, где респираторное заболевание представляет собой хроническую обструктивную болезнь легких.

31. Способ лечения муковисцидоза, включающий:

введение эффективного количества GSI пациенту-человеку, которому вводят или который нуждается во введении одного или нескольких модуляторов CFTR,

и где количество слизи в легких такого пациента снижается или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется при введении GSI.

32. Способ по абзацу 31, где GSI выбран из группы, состоящей из семагастата, авагастата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигастата, MRK 560, ниругастата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегагастата.

33. Способ по абзацу 32, где GSI выбран из группы, состоящей из семагастата, ниругастата, МК-0752, RO-492907 или кренигастата.

34. Способ по абзацу 33, где GSI представляет собой семагастат.

35. Способ по абзацу 33, где GSI представляет собой МК-0752.

36. Способ по абзацу 33, где GSI представляет собой ниругастат.

37. Способ по абзацу 33, где GSI представляет собой RO-492907.

38. Способ по абзацу 33, где GSI представляет собой кренигастат.

39. Способ по абзацу 31, где указанное введение GSI осуществляется перорально.

40. Способ по абзацу 31, где модулятор CFTR представляет собой потенциатор CFTR.

41. Способ по абзацу 31, где модулятор CFTR представляет собой корректор CFTR.

42. Способ по абзацу 31, где модулятор CFTR представляет собой усилитель CFTR.

43. Способ по абзацу 31, где модулятор CFTR выбран из группы, состоящей из ивакафтора, лумакафтора, тезакафтора, элексакафтора и их комбинаций.

44. Способ по абзацу 31, где GSI вводят ежедневно.

45. Способ по абзацу 44, где GSI вводят до тридцати дней, и затем прекращают.

46. Способ по абзацу 31, где GSI вводят еженедельно.

47. Способ лечения муковисцидоза, включающий:

введение эффективного количества GSI пациенту-человеку, принимающему модулятор CFTR;

где GSI выбран из группы, состоящей из семагастата, авагастата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигастата, MRK 560, ниругастата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегагастата;

где модулятор CFTR выбран из группы, состоящей из ивакафтора, лумакафтора, тезакафтора, элексакафтора и их комбинаций; и

где количество слизи в легких такого пациента уменьшается или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется при введении GSI.

48. Способ по абзацу 47, где GSI выбран из группы, состоящей из семагастата, ниругастата, МК-0752, RO-492907 или кренигастата.

Хотя предыдущее изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера в целях ясности понимания, для специалистов в данной области техники очевидно, что в свете идей этого изобретения могут быть сделаны определенные

изменения и модификации без отклонения от сущности или объема прилагаемой формулы изобретения.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий:

введение низкой дозы GSI пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении; и где количество слизи в легких такого пациента уменьшается, или накопление слизи в легких такого пациента по существу улучшается или предотвращается при введении GSI.

2. Способ по п. 1, где низкая доза представляет собой эффективное количество для лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, и представляет собой более низкую дозу по сравнению с дозой GSI, подходящей для введения пациенту, страдающему нейродегенеративным заболеванием, онкологическим заболеванием или заболеванием органов дыхания, не характеризующимся гиперсекрецией слизи.

3. Способ по п. 2, где низкая доза GSI обеспечивает пиковый уровень в плазме в субмикромольном диапазоне.

4. Способ по п. 1, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных заболеваний легких, и респираторной инфекции, включая обострения хронических респираторных заболеваний и скопление слизи в ответ на острую инфекцию.

5. Способ по любому из предыдущих пунктов, где GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, авагацестата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигацестата, MRK 560, нирогацестата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегацестата.

6. Способ по п. 5, где указанный GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, нирогацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата.

7. Способ по п. 6, где GSI представляет собой семагацестат.

8. Способ по п. 6, где GSI представляет собой МК-0752.

9. Способ по п. 6, где GSI представляет собой нирогацестат.

10. Способ по п. 6, где GSI представляет собой RO-492907.

11. Способ по п. 6, где GSI представляет собой кренигацестат.

12. Способ по любому из предшествующих пунктов, где указанное введение GSI осуществляется перорально.

13. Способ по любому из предыдущих пунктов, где респираторное заболевание представляет собой муковисцидоз или хроническую обструктивную болезнь легких.

14. Способ лечения респираторного заболевания, характеризующегося гиперсекрецией слизи, включающий:

системное введение пациенту-человеку, нуждающемуся в таком лечении, терапевтически эффективного количества семагацестата, где концентрация семагацестата

в плазме указанного пациента в стабильном состоянии после многократного введения дозы включает AUC менее 1220 нг•ч/мл и

где введение семагацестата является эффективным для уменьшения количества слизи в легких такого пациента или ингибирования накопления слизи в легких такого пациента.

15. Способ по п. 14, где респираторное заболевание выбрано из группы, состоящей из муковисцидоза, хронической обструктивной болезни легких, первичной цилиарной дискинезии, хронического бронхита, астмы, идиопатических и вторичных бронхоэктазов, облитерирующего бронхиолита, идиопатического легочного фиброза и других фиброзных заболеваний легких, и респираторной инфекции, включая обострения хронических респираторных заболеваний и скопление слизи в ответ на острую инфекцию.

16. Способ по п. 15, где респираторное заболевание представляет собой муковисцидоз или хроническую обструктивную болезнь легких.

17. Способ по п. 14, п. 15 или п. 16, где семагацестат вводят в количестве от примерно 0,1 мг до примерно 50 мг в день.

18. Способ по п. 17, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг семагацестата в день.

19. Способ по п. 18, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 40 мг семагацестата в день.

20. Способ по п. 19, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 30 мг семагацестата в день.

21. Способ по п. 20, где вводят от примерно 0,5 мг до примерно 20 мг семагацестата в день.

22. Способ лечения муковисцидоза, включающий:

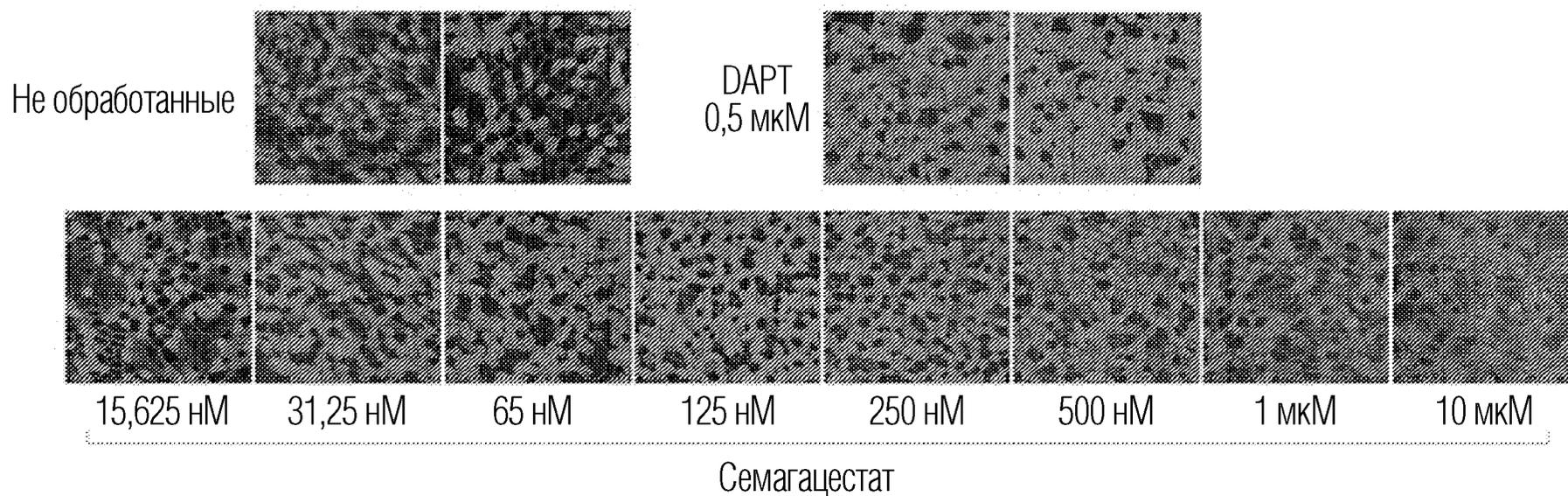
введение эффективного количества GSI пациенту-человеку, которому вводят или который нуждается в модуляторе CFTR,

где количество слизи в легких такого пациента уменьшается или накопление слизи в легких такого пациента ингибируется.

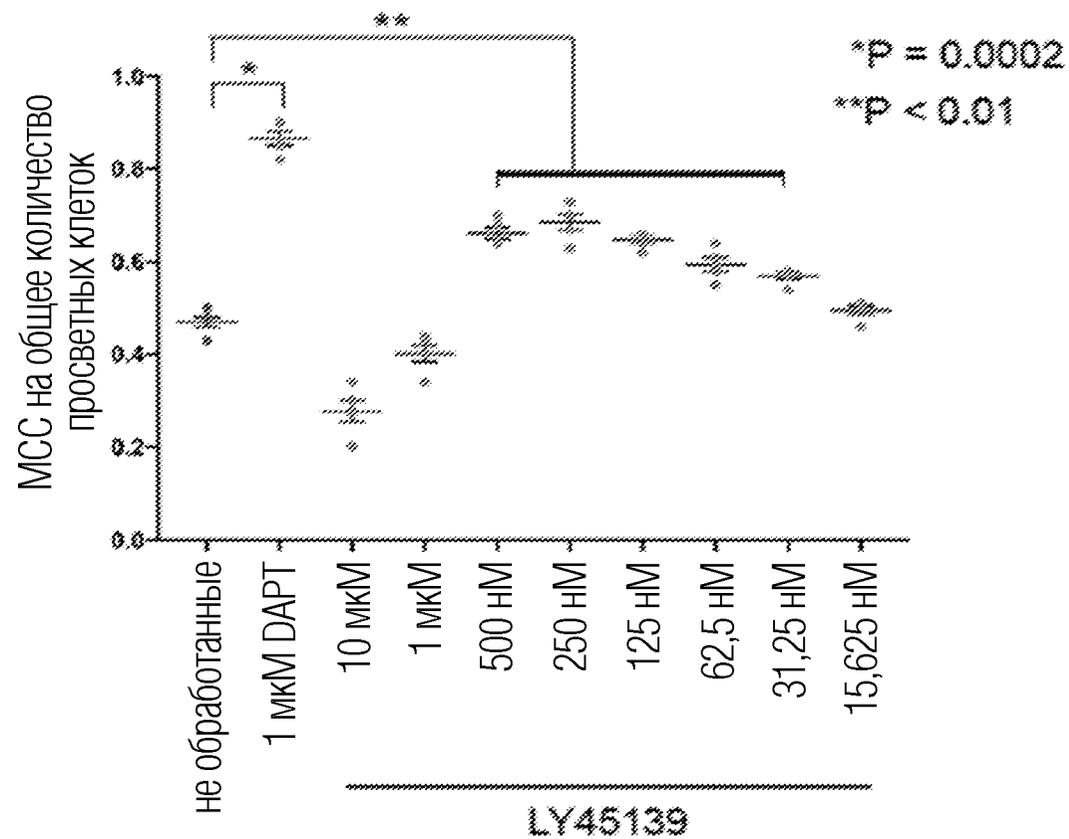
23. Способ по п. 17, где GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, авагацестата, GS-1, DBZ, L-685,458, BMS-906024, кренигацестата, MRK 560, ниругацестата, RO-492907, МК-0752, итанапрацеда, LY-3056480, фосциклопирокса, таренфлурбила и бегацестата.

24. Способ по п. 18, где GSI выбран из группы, состоящей из семагацестата, ниругацестата, МК-0752, RO-492907 или кренигацестата.

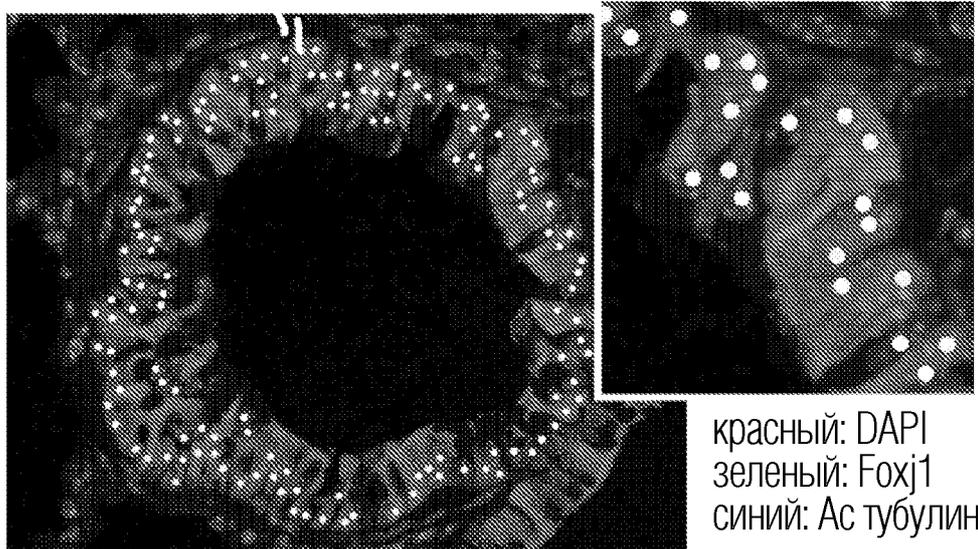
ФИГ. 1 Доза-ответ для семагацестата в HNEC



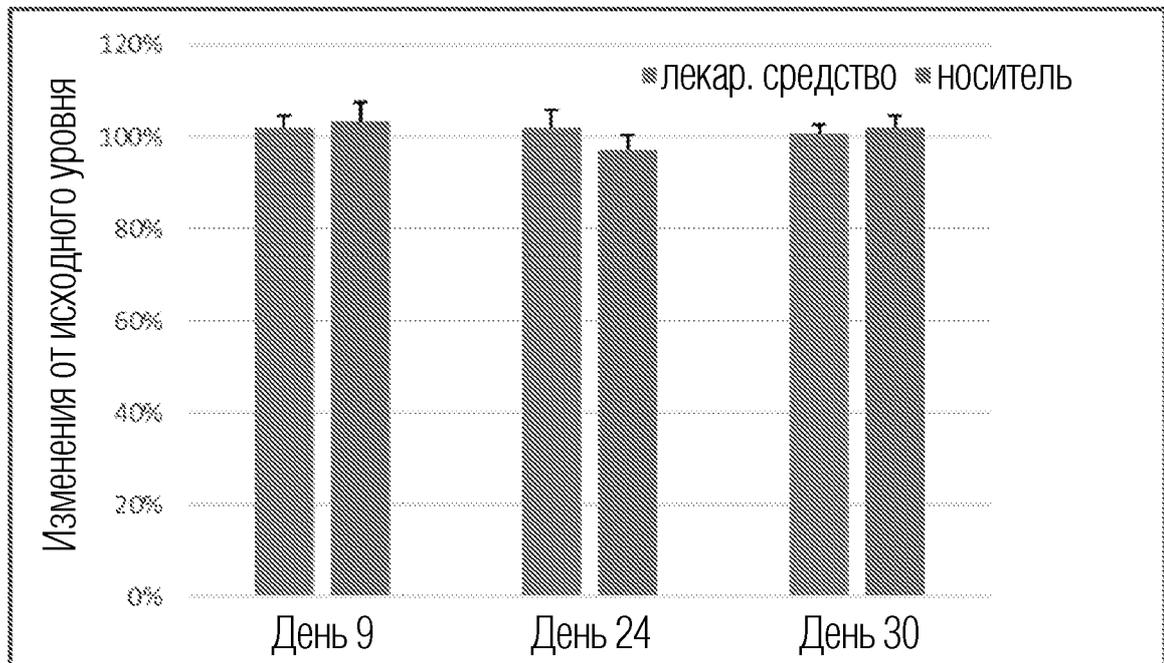
**ФИГ. 2** Отношение МСС к общему количеству просветных клеток в HNEC, обработанных DAPT и разными дозами семагцестата



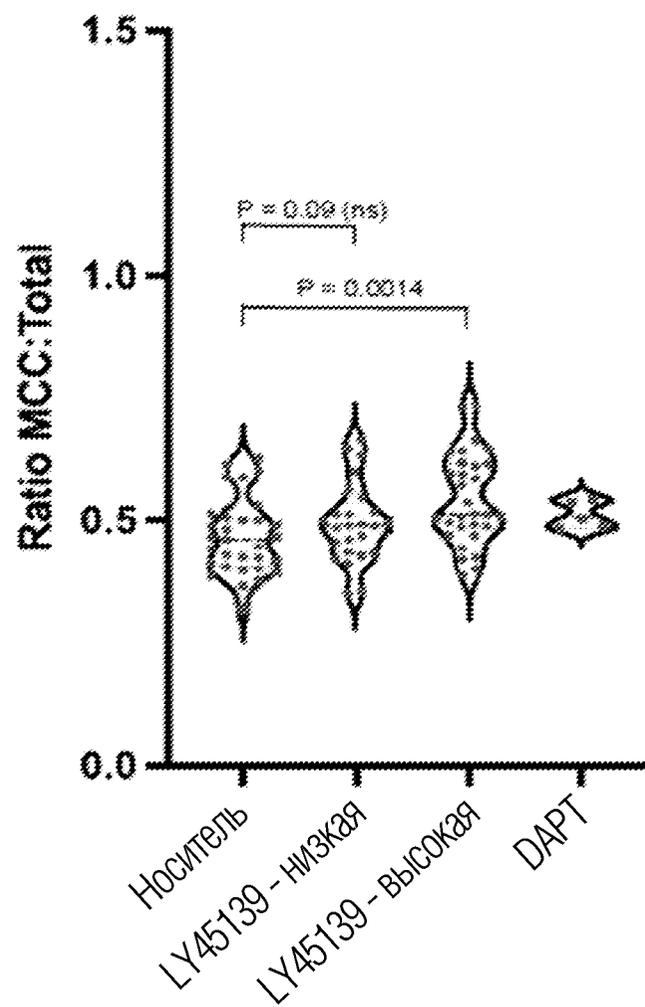
**ФИГ. 3** Эпителиальные клетки мыши через 3 дня системного (в/б) дозирования



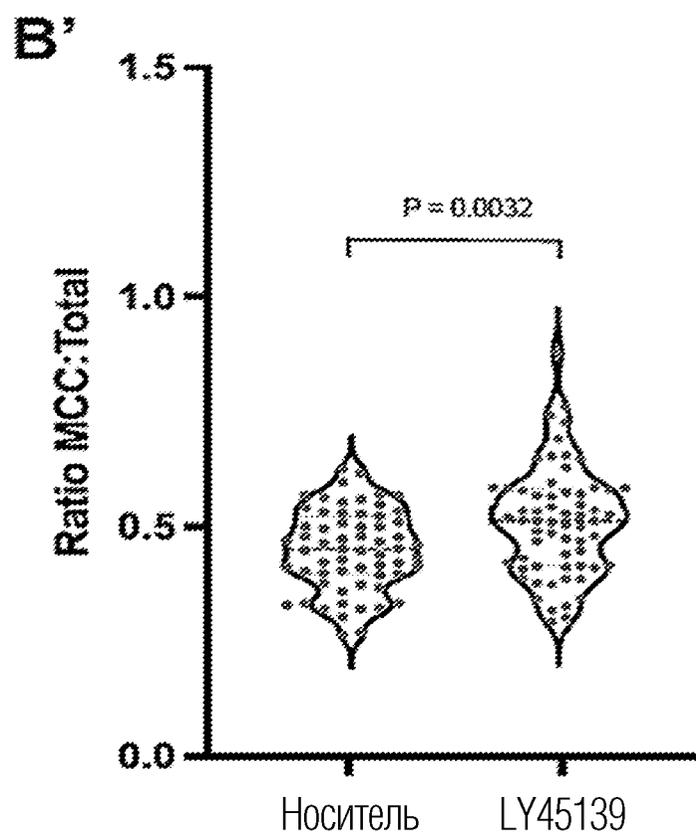
**ФИГ. 4** Масса тела в 9, 24 и 30 дни при ежедневном системном (в/б) введении семагцестата и контроля носителем



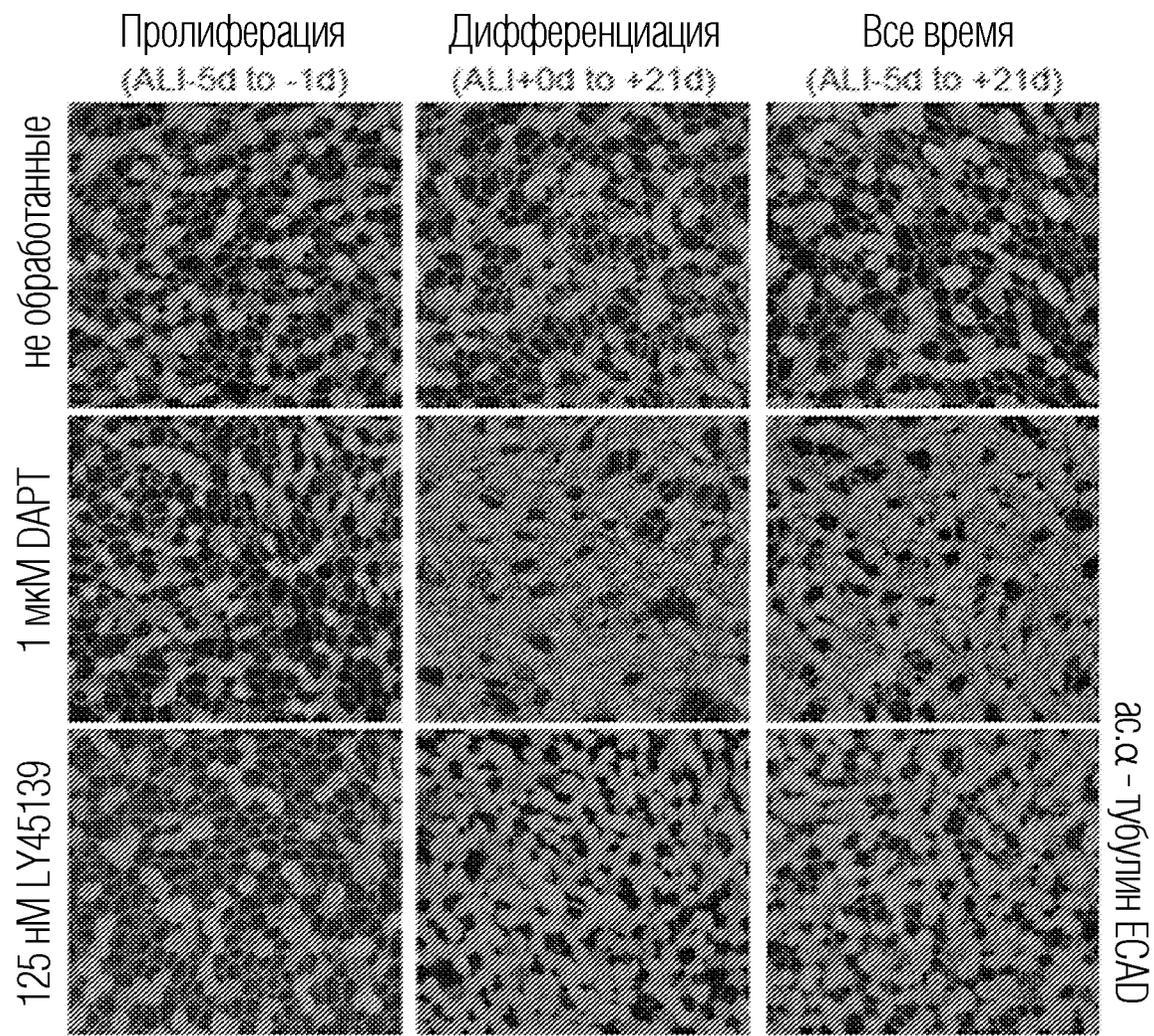
**ФИГ. 5** Отношение МСС к общему количеству клеток на 3 день после обработки DAPT и низкими и высокими дозами семагцестата



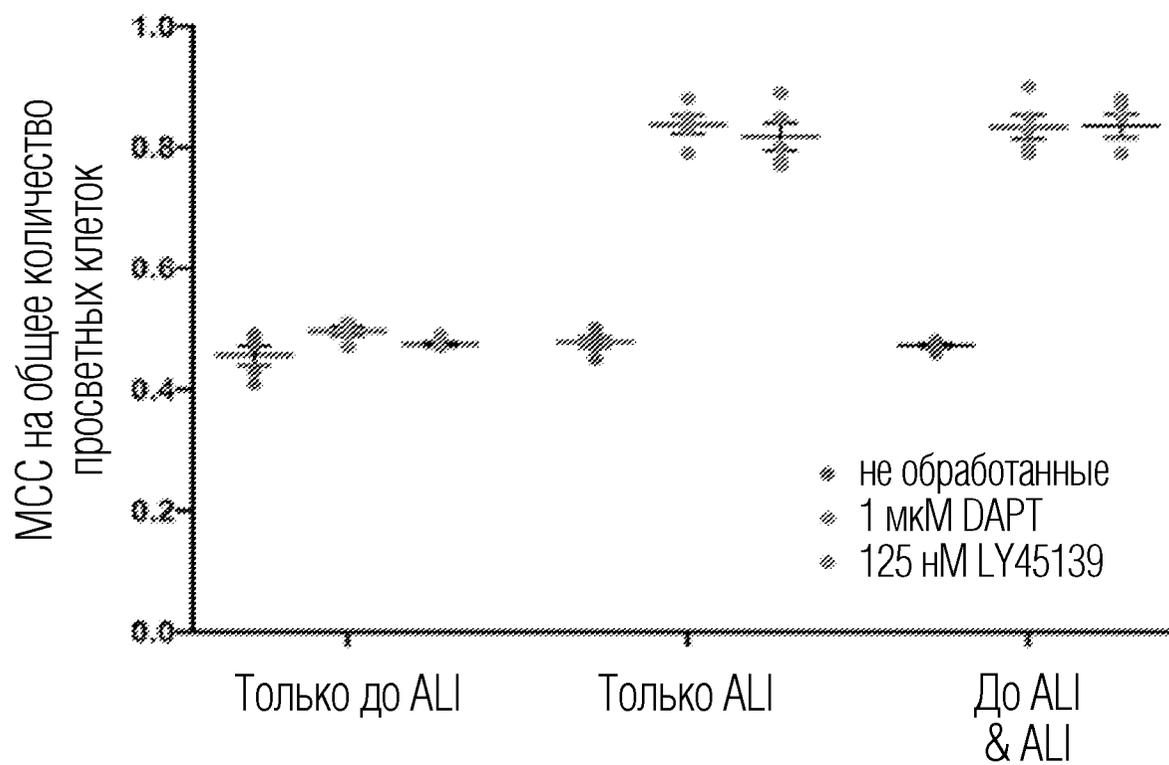
ФИГ. 6 Соотношение МСС к общему количеству клеток на 31 день после обработки семагацестатом



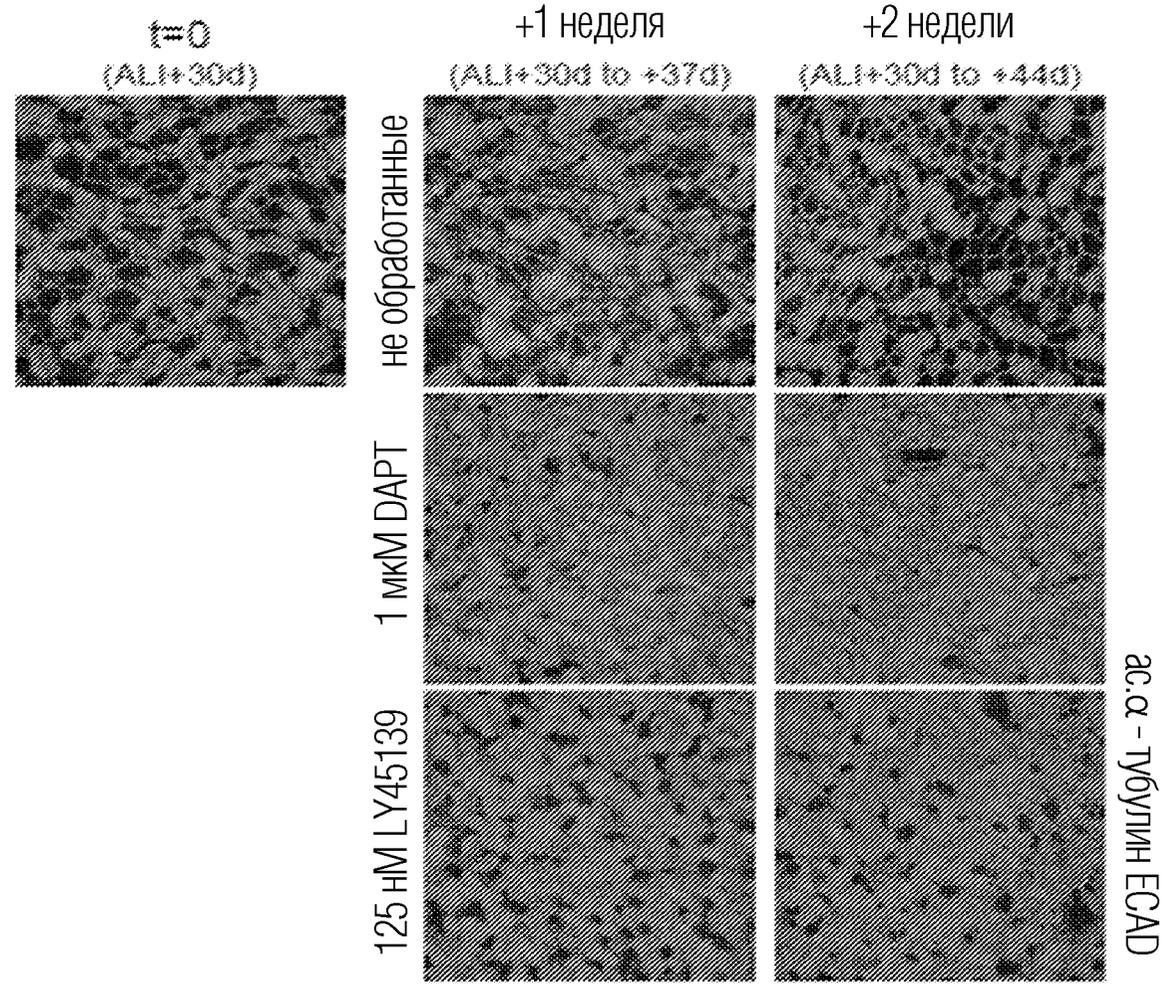
ФИГ. 7 Эффект обработки GSI во время пролиферации и дифференциации



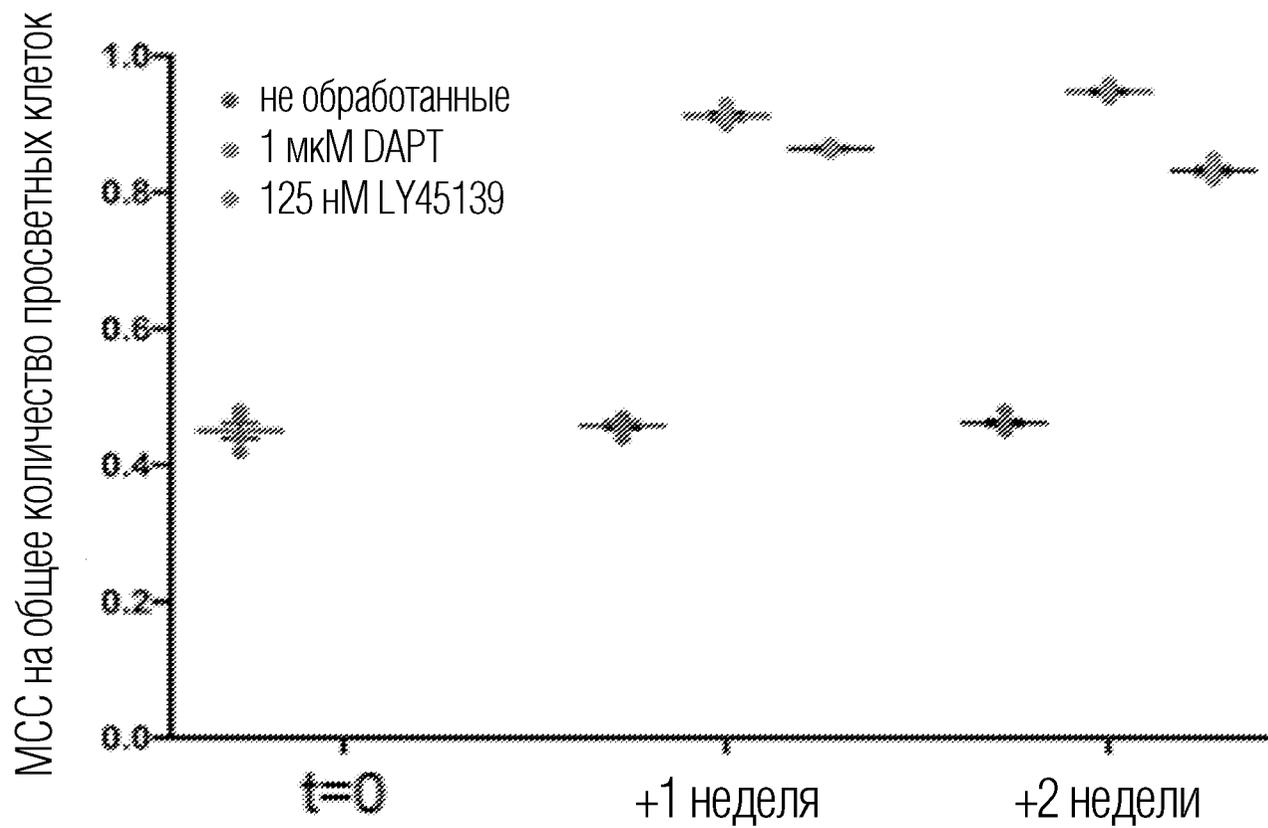
ФИГ. 8 МСС на общее количество просветных клеток для обработок на фигуре 7



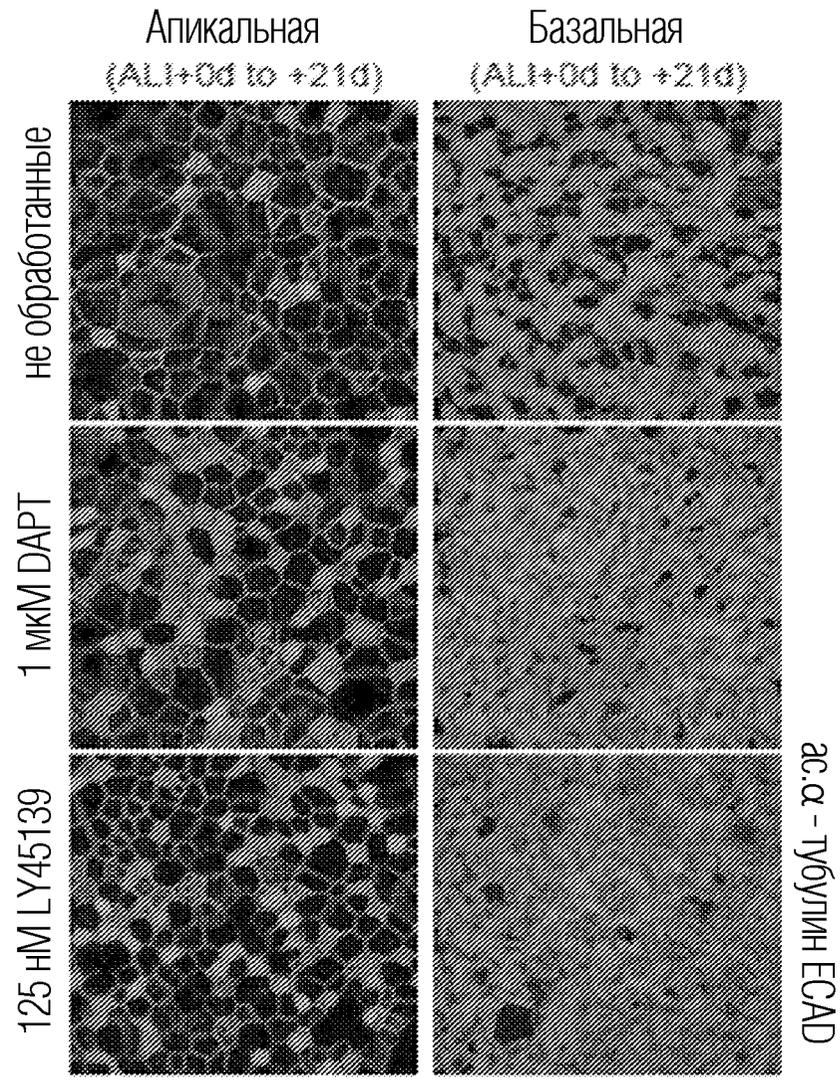
**ФИГ. 9** Эффект времени обработки GSI на зрелые первичные эпителиальные клетки дыхательных путей человека



ФИГ. 10 МСС на общее количество просветных клеток для обработок на фигуре 9

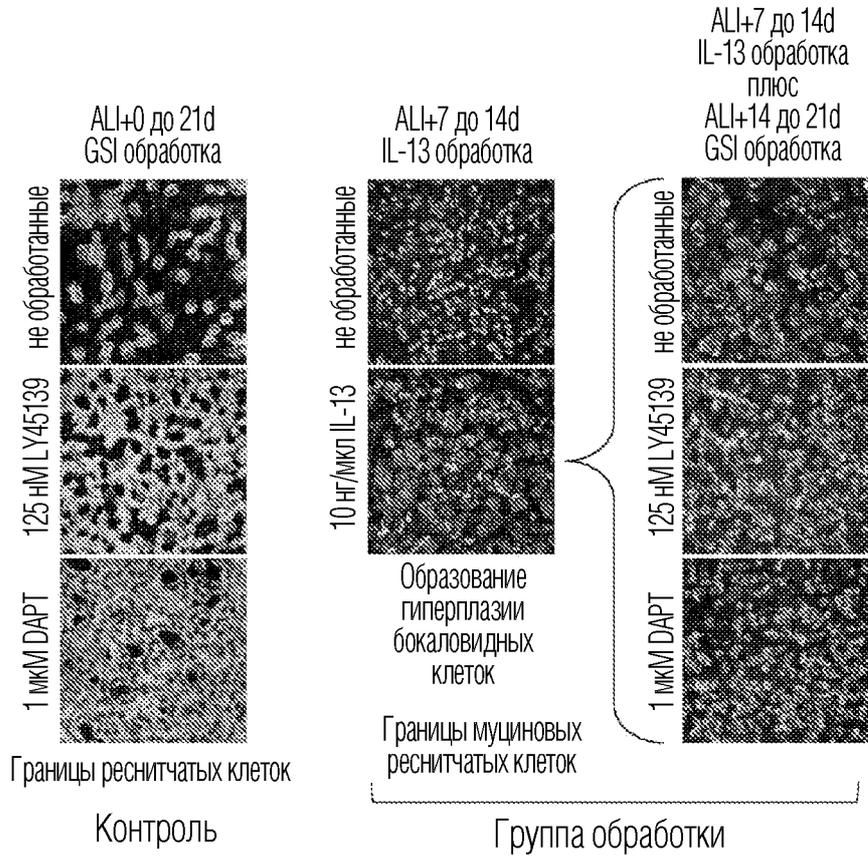


ФИГ. 11 Применение обработки GSI от апикальной или базальной поверхности

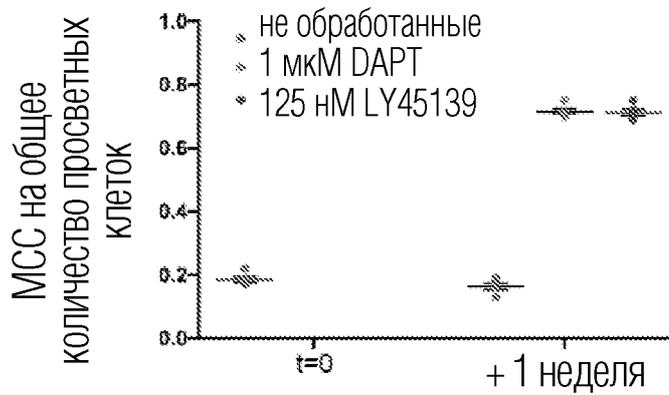




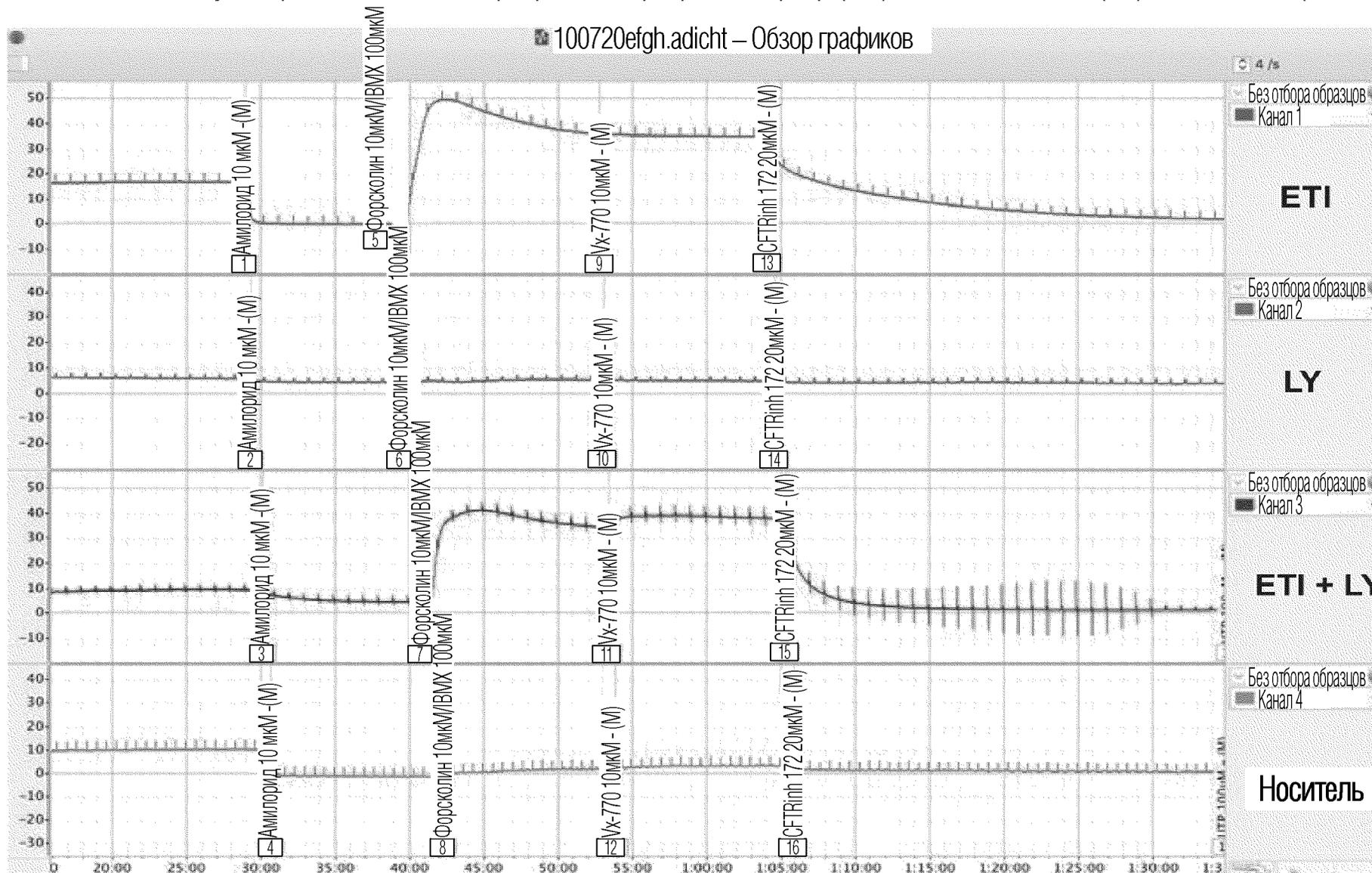
**ФИГ. 13** Обработка GSI в модели хронического воспаления IL-13



**ФИГ. 14** Соотношение МСС на общее количество просветных клеток для обработок на фигуре 13

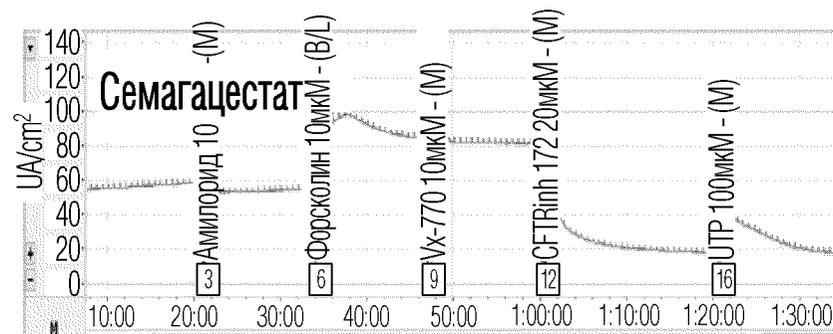
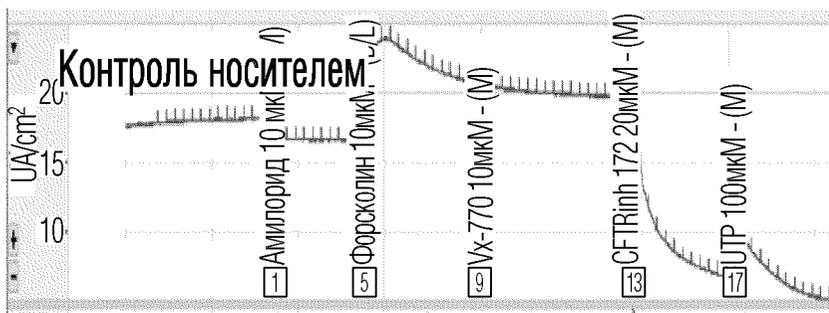


**ФИГ. 15** Типовые кривые камеры Уссинга культур эпителиальных клеток, обработанных контролем носителем, комбинацией модулятора CFTR элексакафтор-тезакафтор-ивакафтор (ETI), семагацестатом (LY) или обоими (ETI+LY)

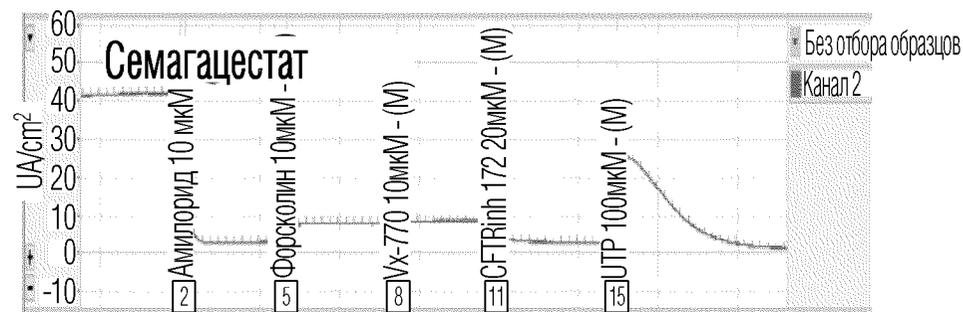


**ФИГ. 16** Токи короткого замыкания Уссинга, типовые кривые

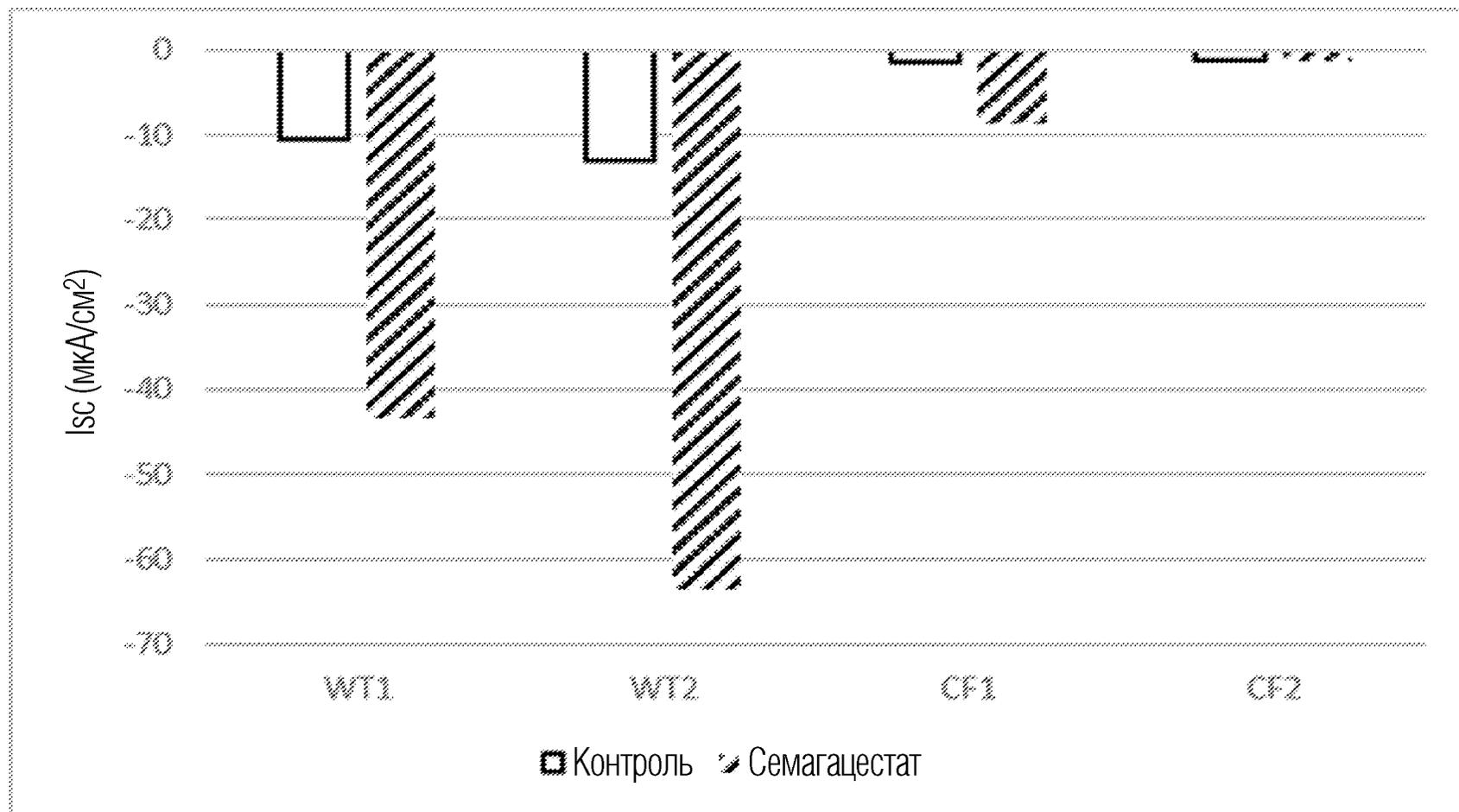
**Здоровый субъект**



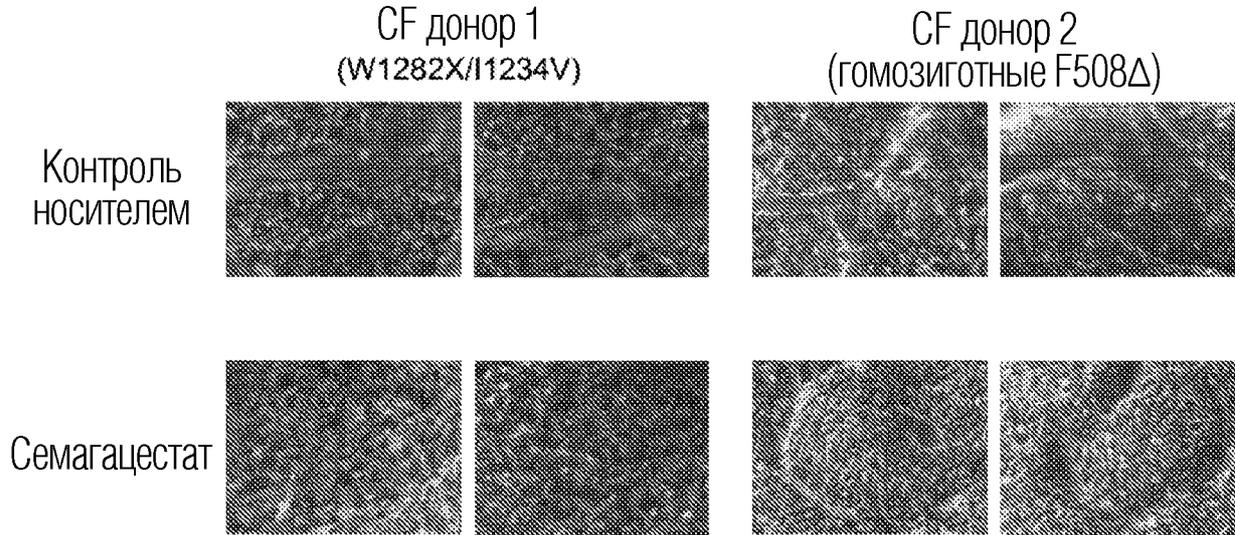
**Субъект с CF**



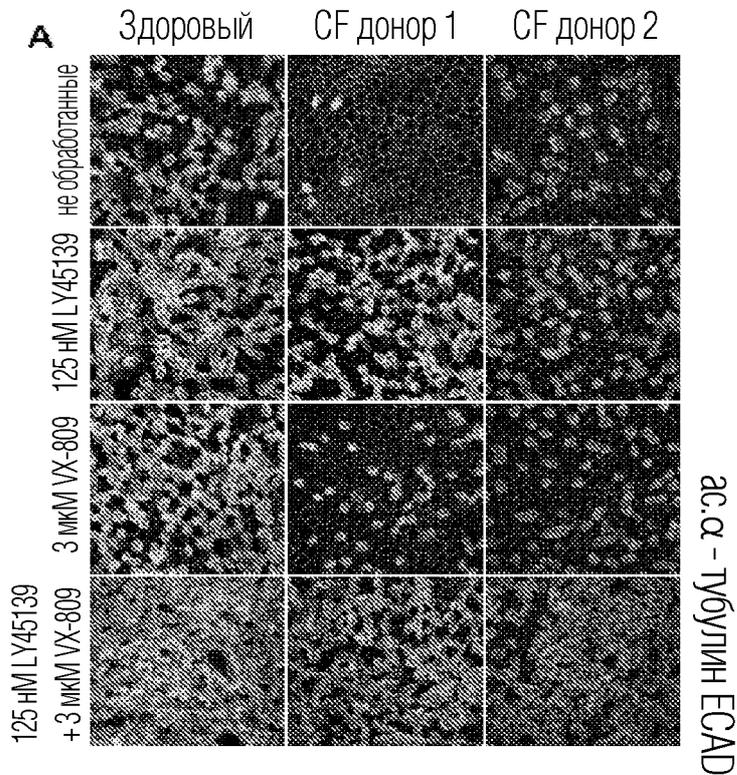
ФИГ. 17 Ответы CFTRinh-172 I<sub>sc</sub>



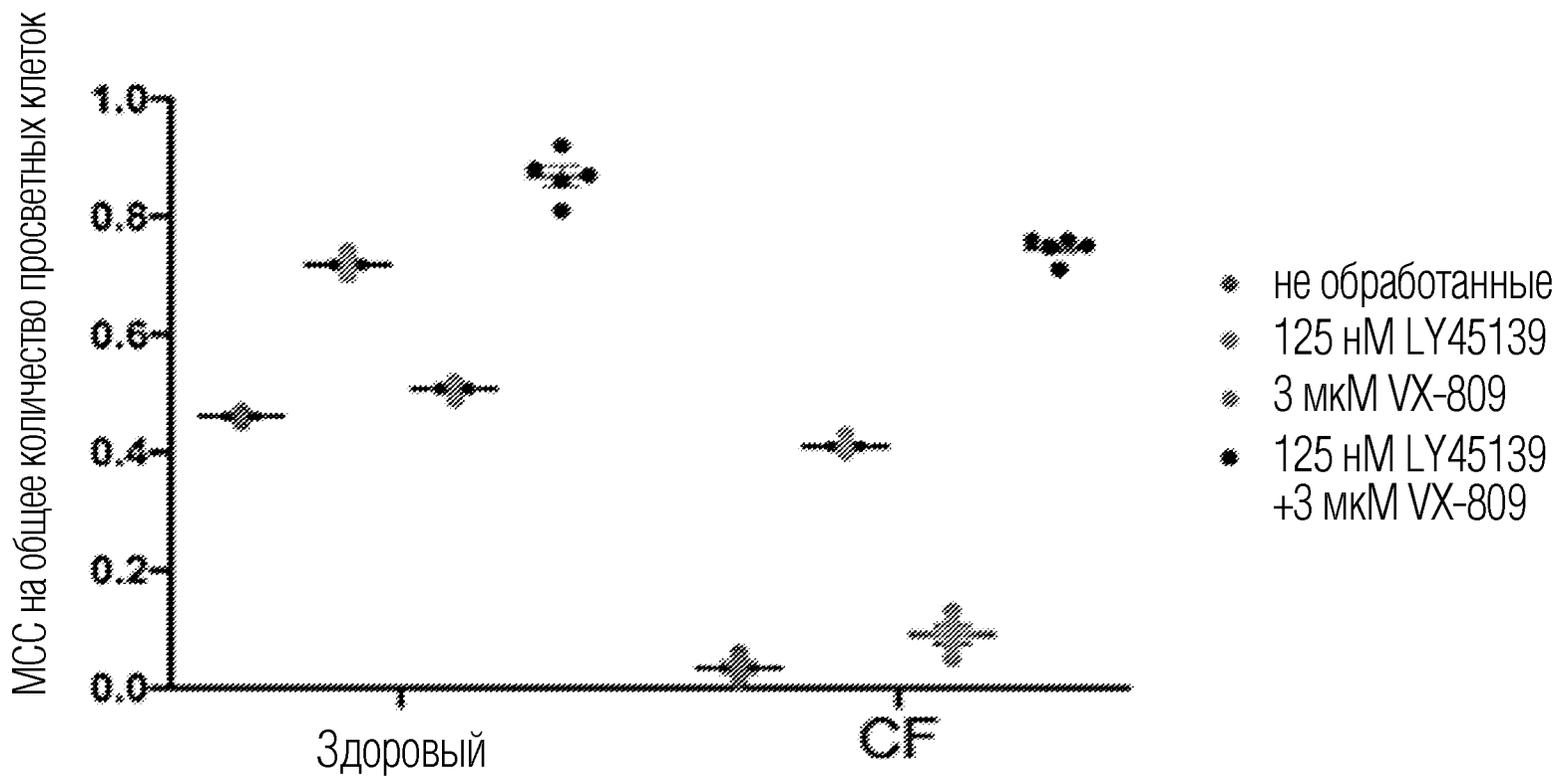
**ФИГ. 18** Сниженное продуцирование слизи в образцах CF человека, обработанных семагацестатом



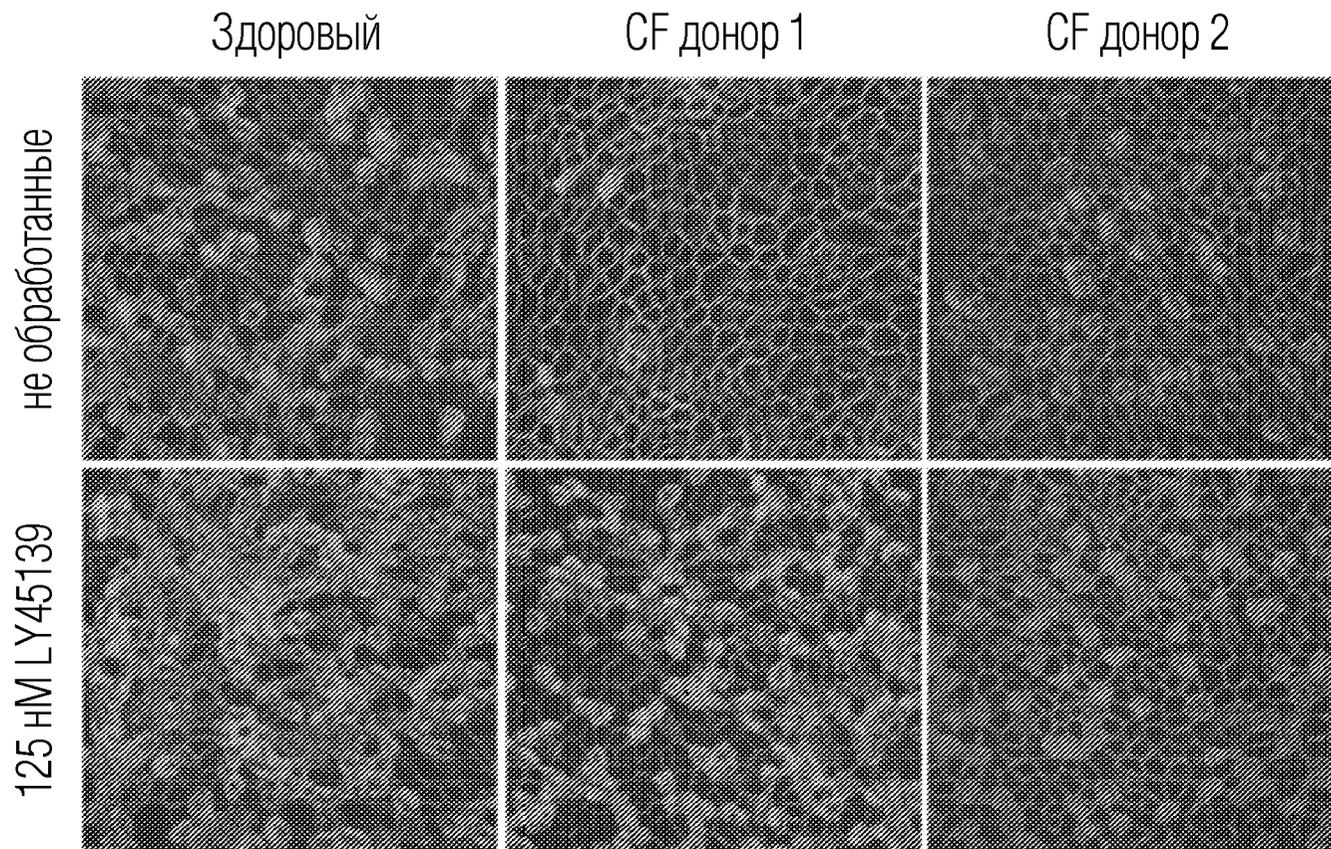
**ФИГ. 19** Образцы CF после обработки семагацестатом, люмакафтором и комбинациями



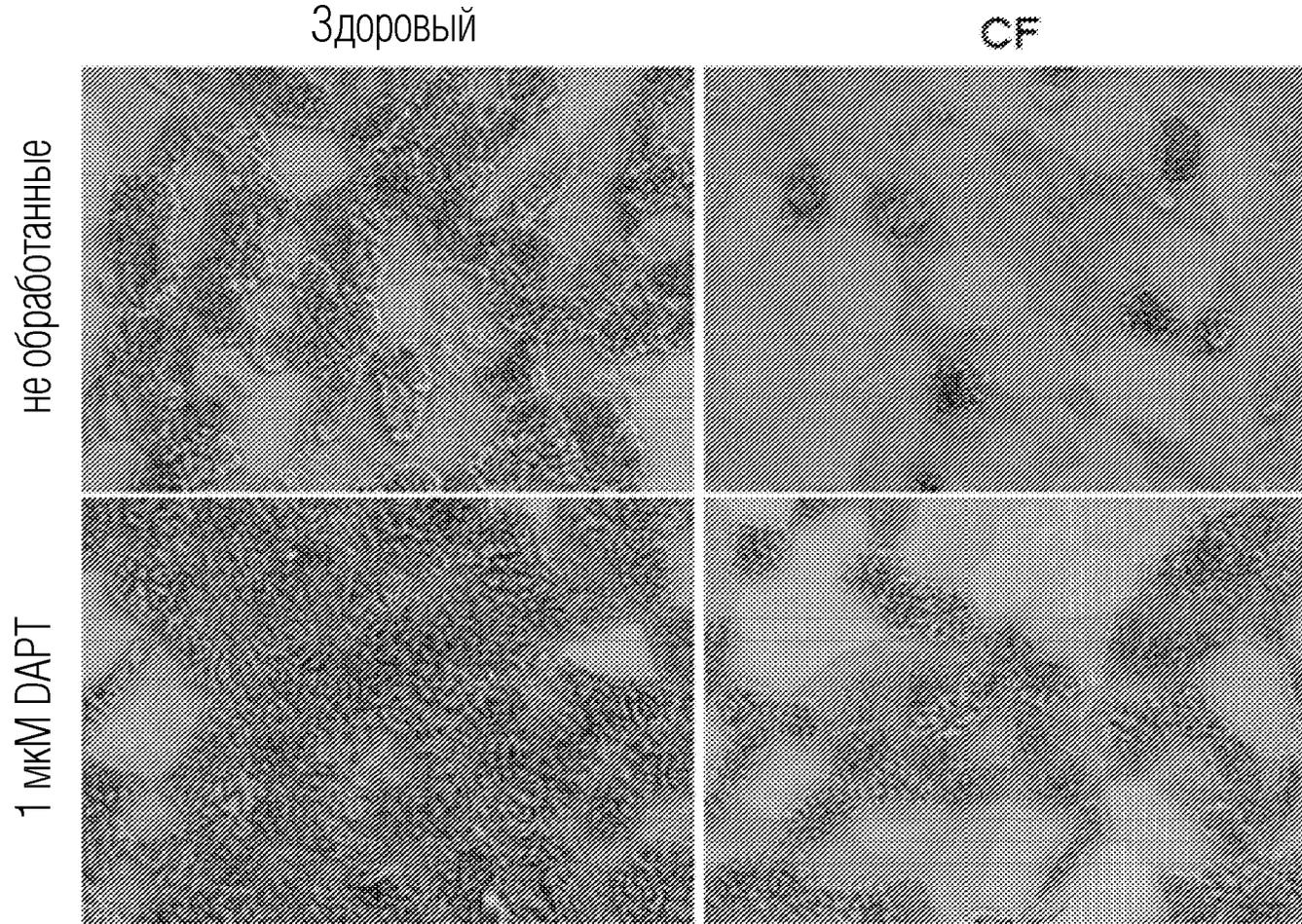
**ФИГ. 20** Соотношение МСС на общее количество просветных клеток для обработок на фигуре 19 для здорового и CF донора 1



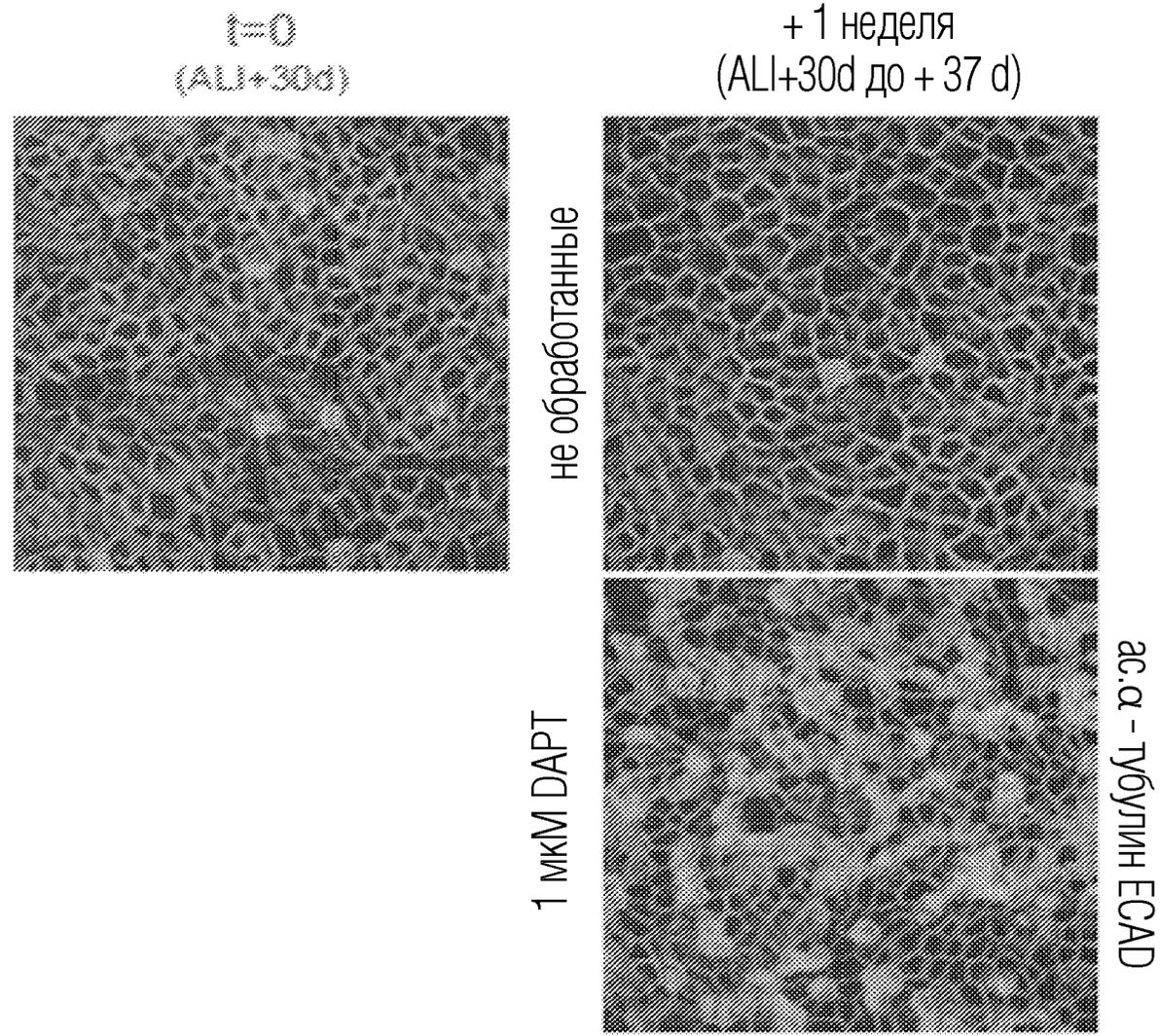
**ФИГ. 21** Действие на первичные здоровые и муковисцидозные клетки эпителия дыхательных путей, обработанных семагацестатом во время дифференциации



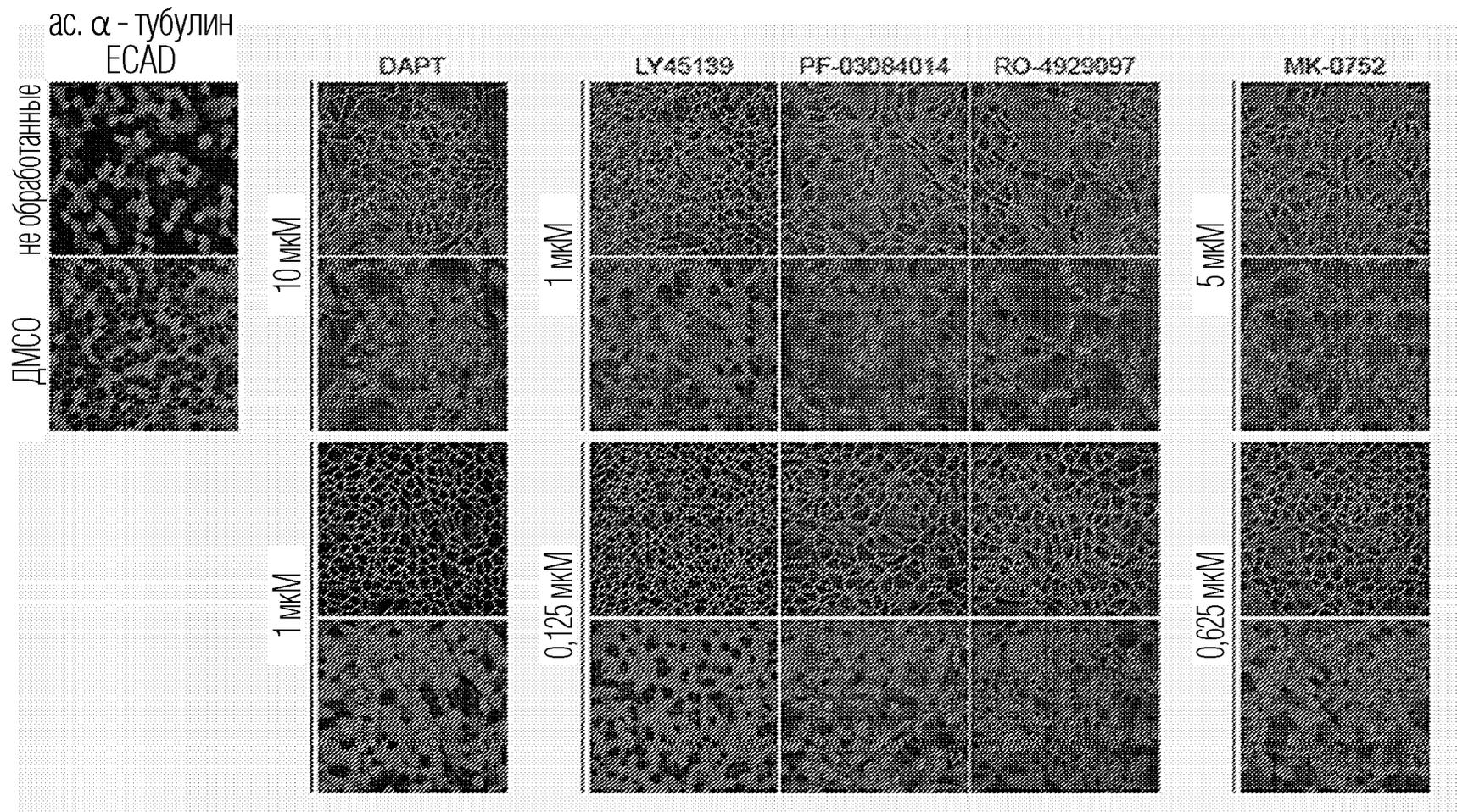
ФИГ. 22 СЭМ здоровых и CF первичных эпителиальных культур дыхательных путей человека



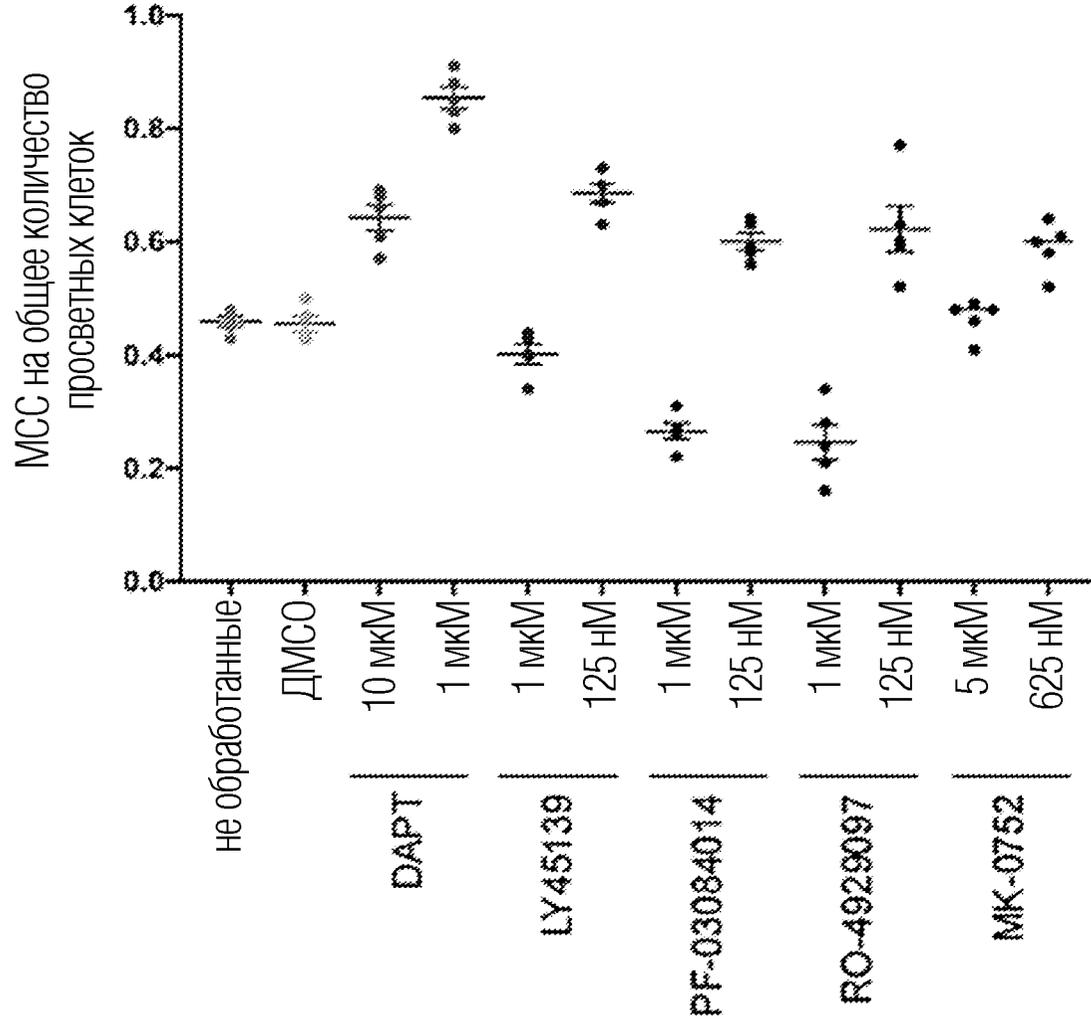
**ФИГ. 23** Обработка GSI индуцирует образование дополнительных мультиреснитчатых клеток в зрелых культурах муковисцидоза



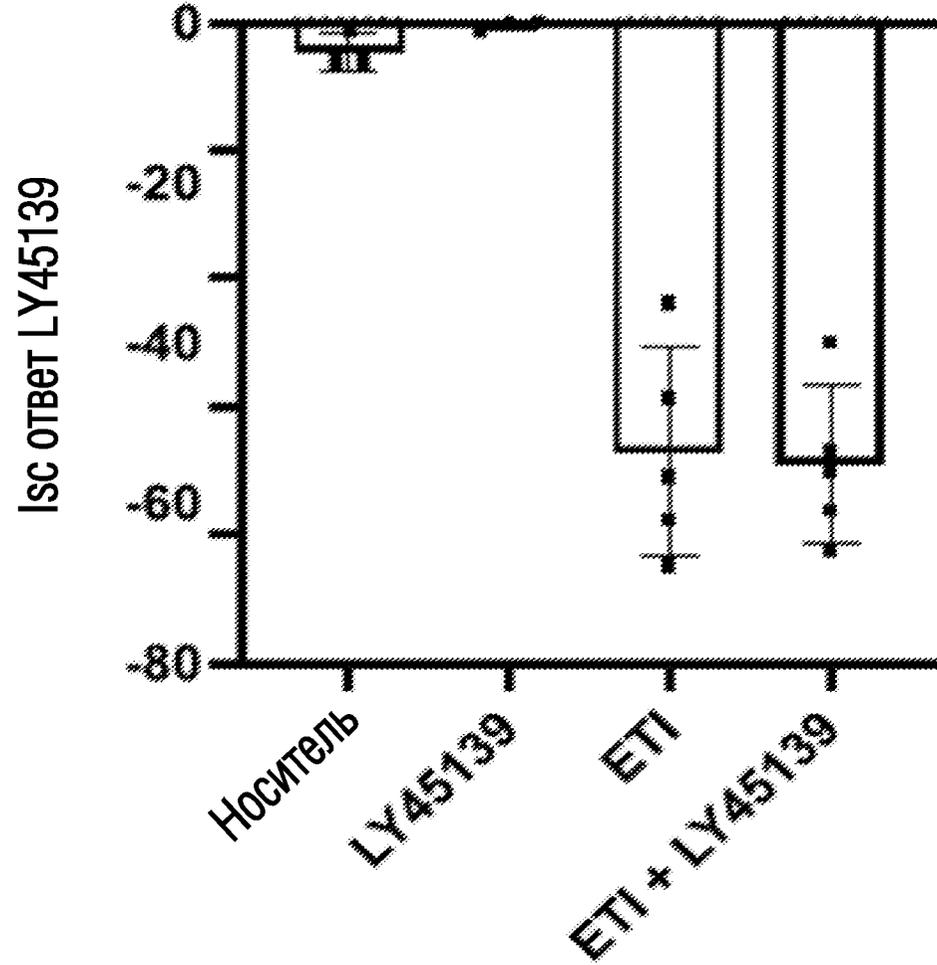
**ФИГ. 24** Первичные клетки эпителия дыхательных путей человека, обработанные во время дифференциации DAPT и высокими и низкими концентрациями различных GSI



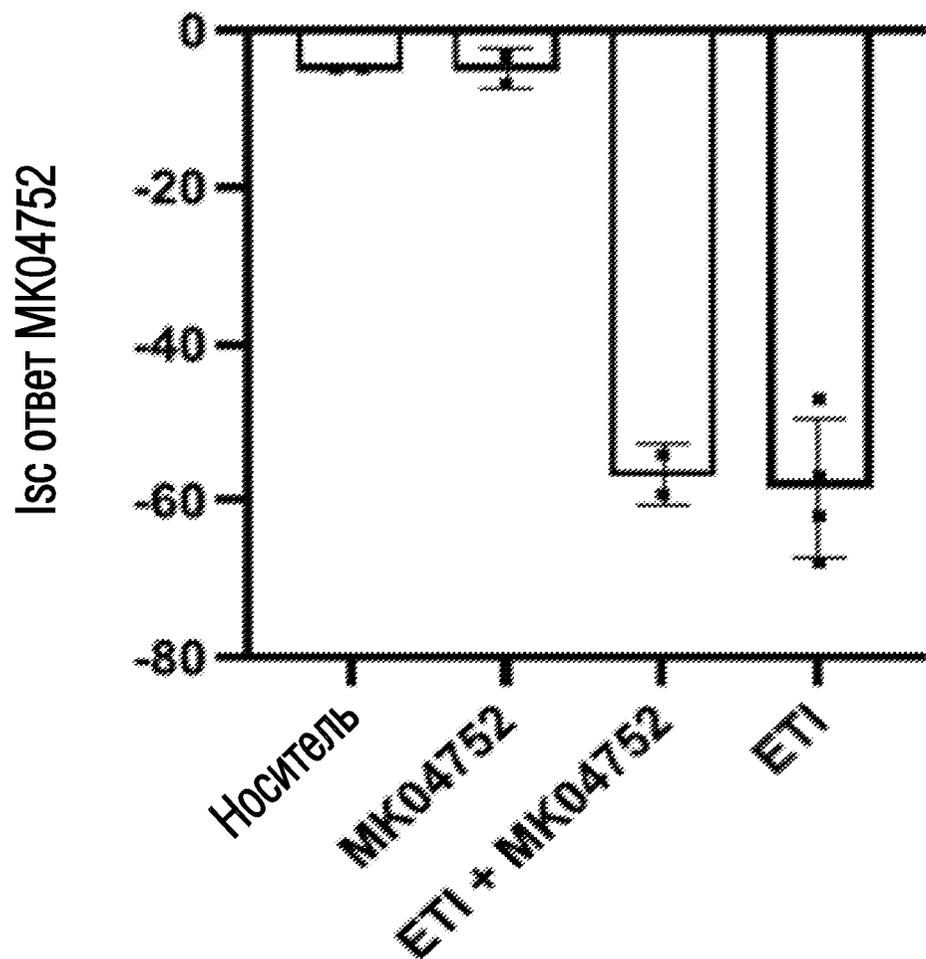
**ФИГ. 25** Соотношение МСС на общее количество просветных клеток для обработок, показанных на фигуре 24



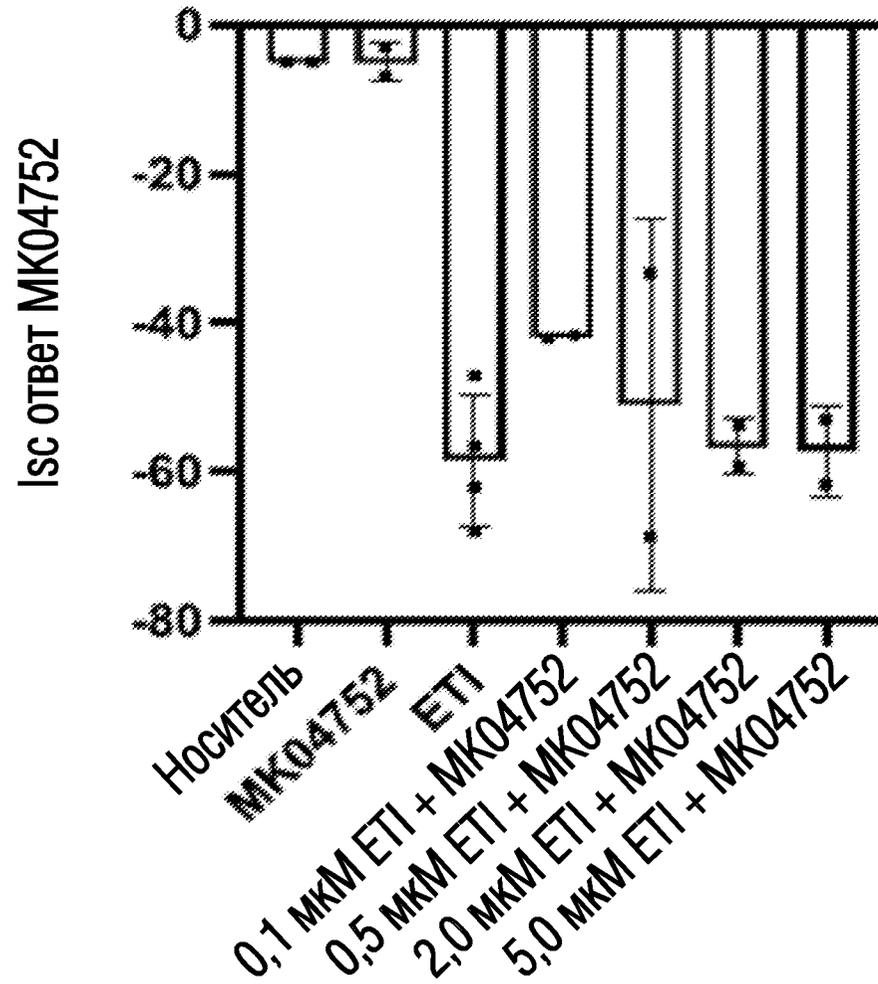
**ФИГ. 26** Активность CFTR с использованием камер Уссинга в культурах от пациентов с CF, леченных LY45139, ETI или обоими



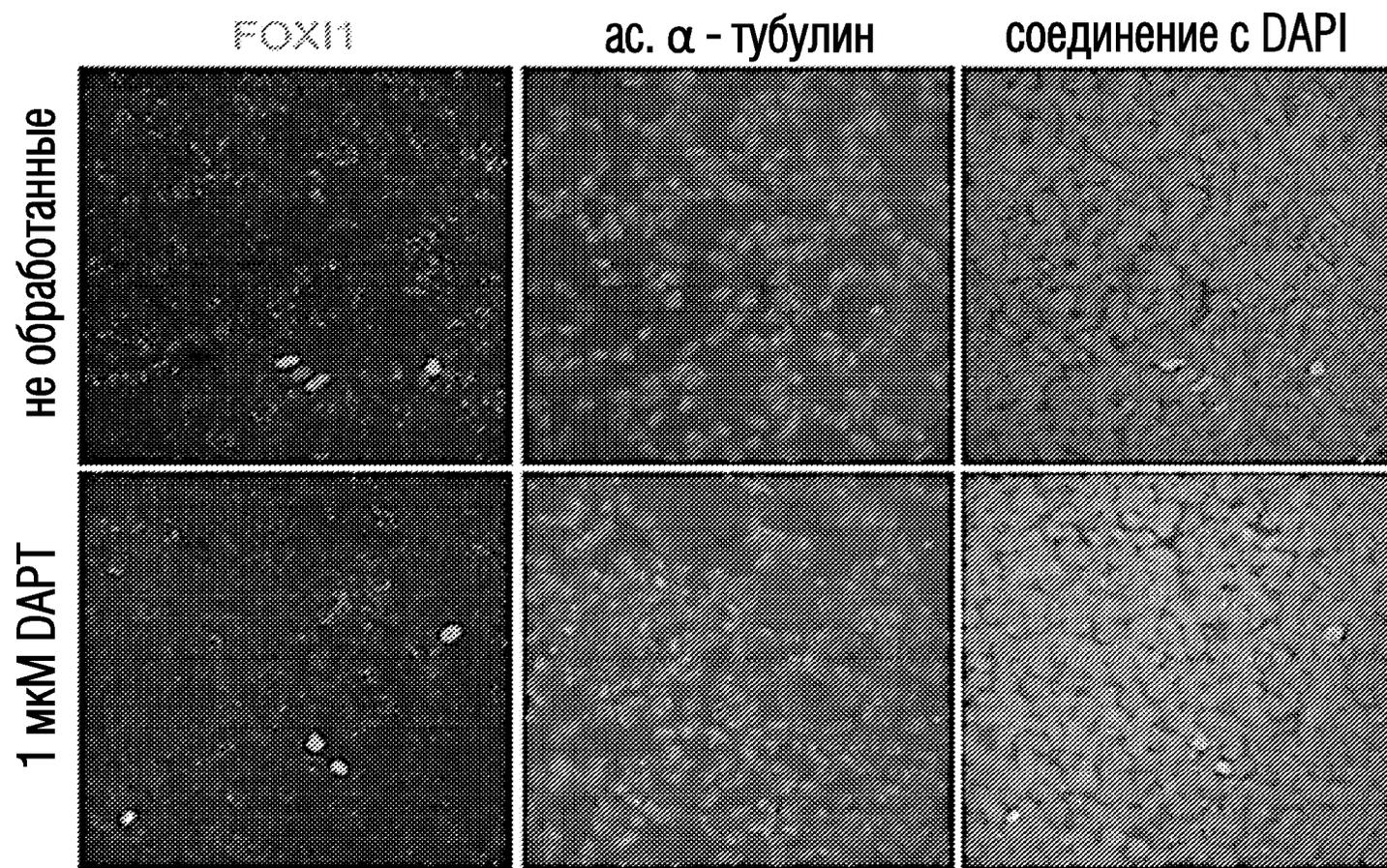
**ФИГ. 27** Активность CFTR с использованием камер Уссинга в культурах от пациентов с CF, леченных МК04752, ETI или обоими



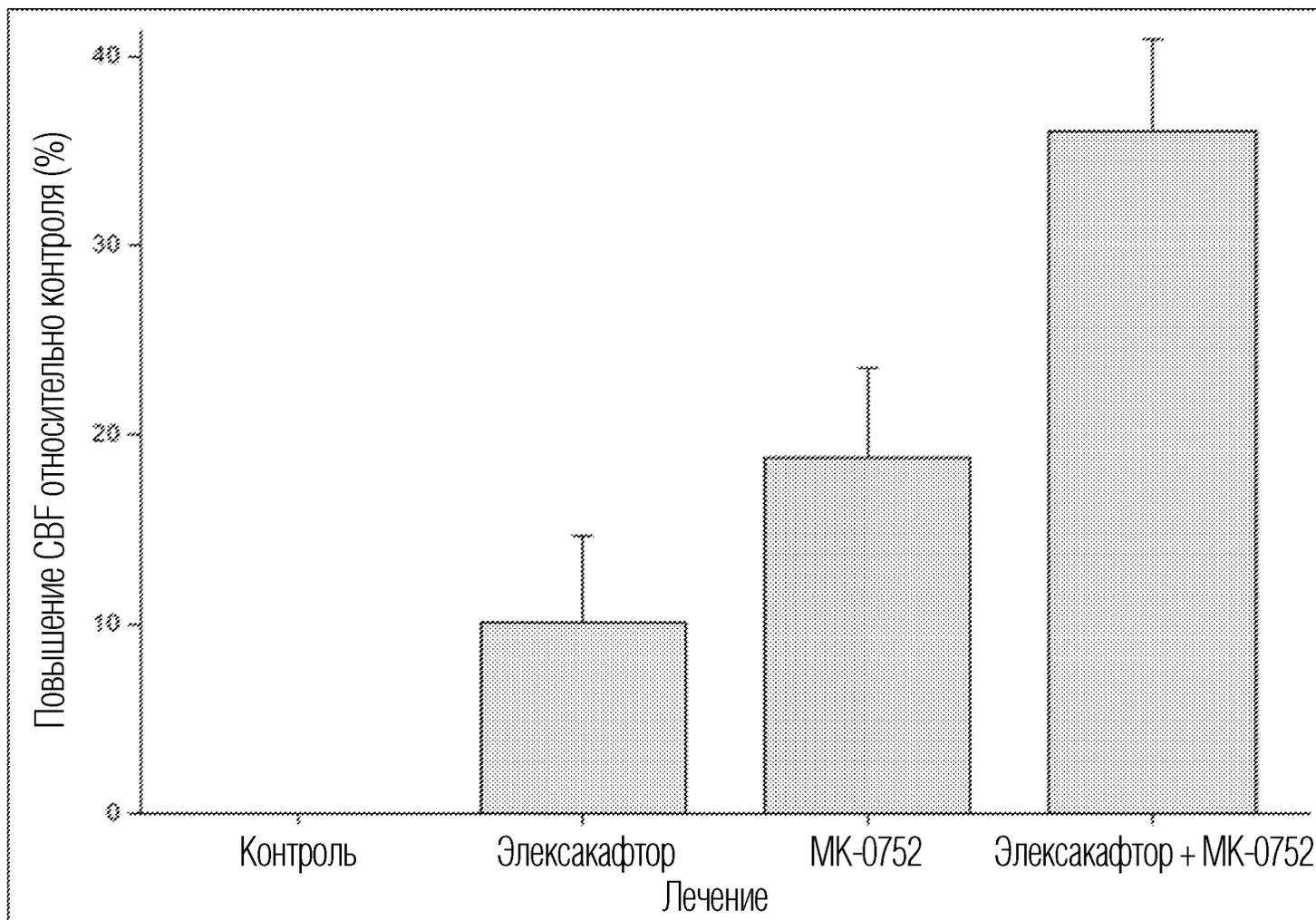
**ФИГ. 28** Активность CFTR с использованием камер Уссинга в культурах от пациентов с CF, леченных МК04752, ETI или комбинациями с пониженными дозами ETI



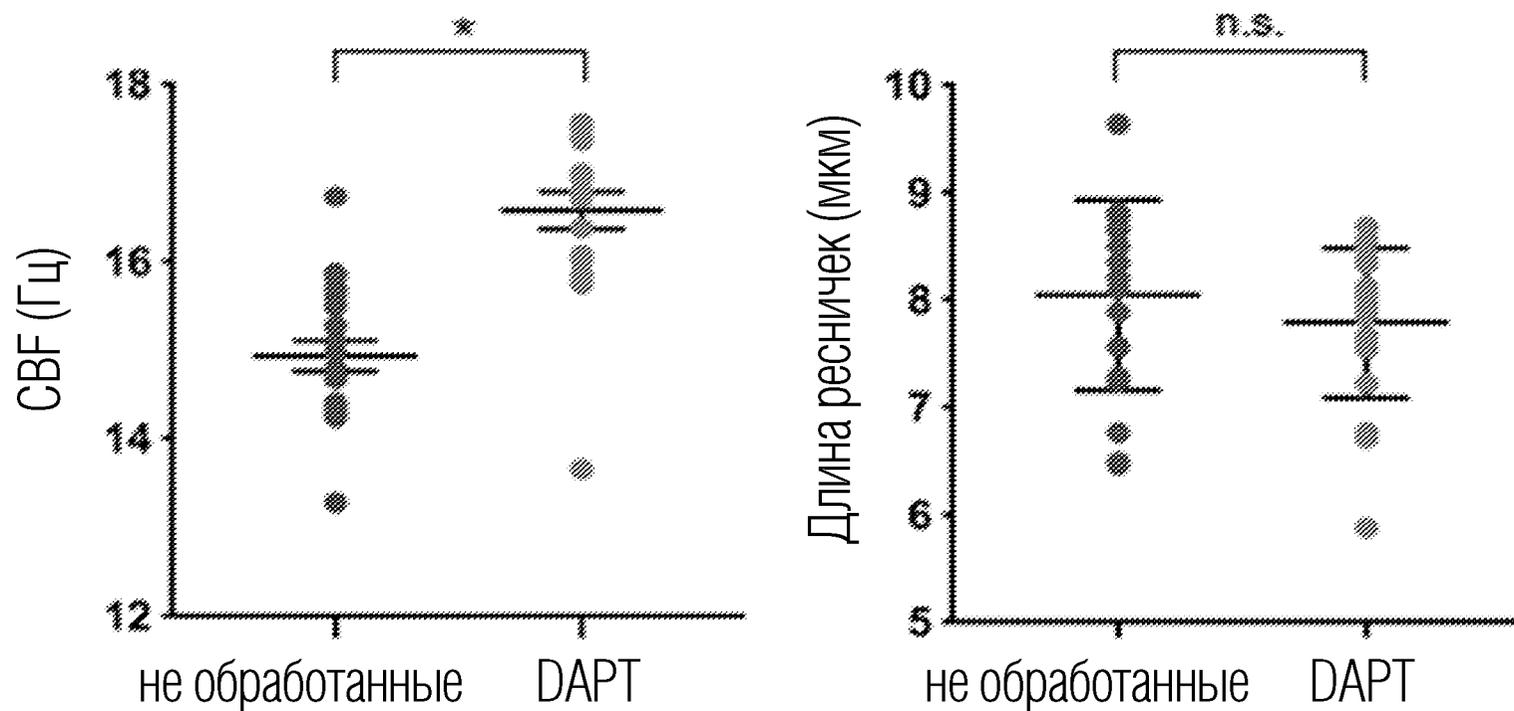
ФИГ. 29 Обработка GSI не оказывает влияние на образование ионоцитов



**ФИГ. 30** Действие GSI МК-0752, элексакафтора и их комбинации в низких дозах на частоту биения ресничек (CBF) клеток CF. Результаты представлены как среднее (95% UCL) относительно повышения CBF по сравнению с контрольными необработанными клетками.



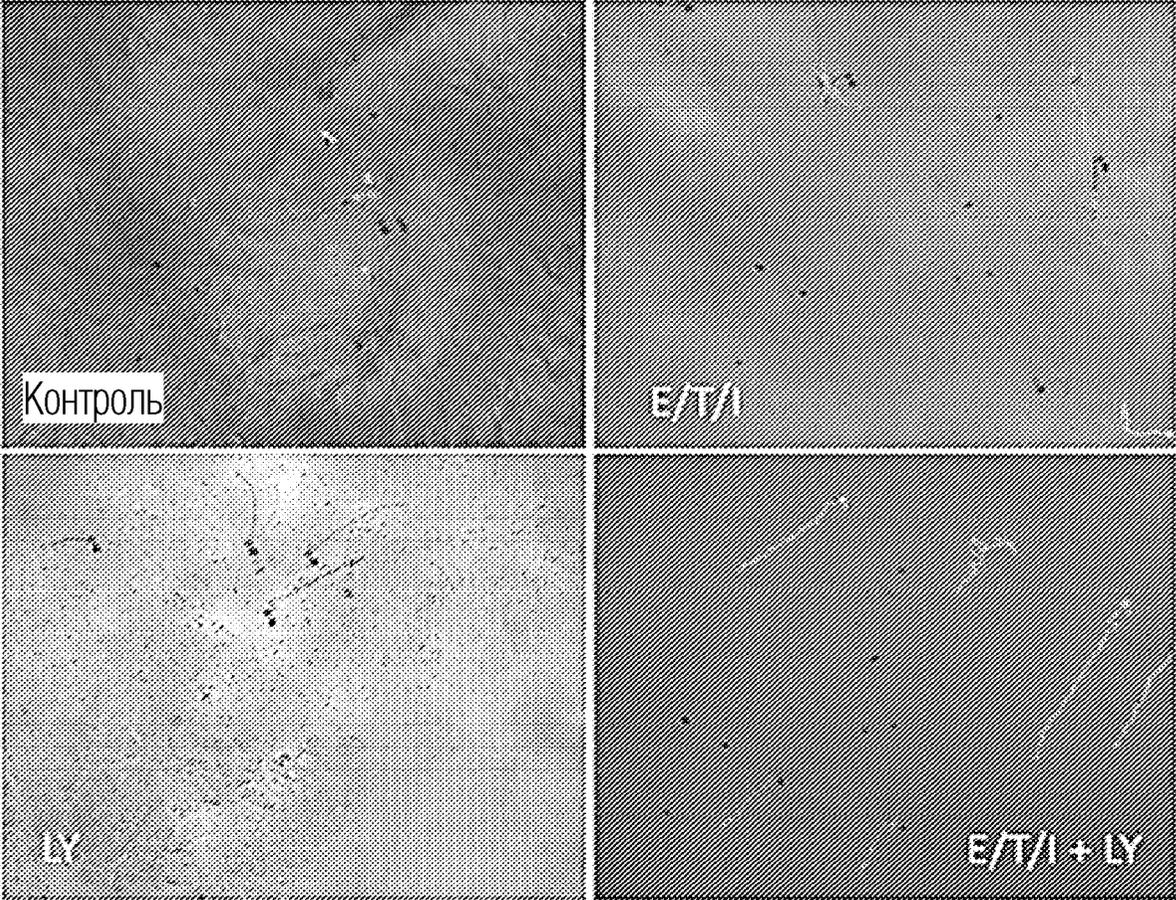
**ФИГ. 31** Частота биения ресничек (CBF) и длина ресничек первичных клеток эпителия человека, обработанных DAPT



**ФИГ. 32** Реабсорбция жидкости, покрывающей поверхность дыхательных путей (ASL), характерная для CF культур, обработанных EPI, семагацестатом или обоими



**ФИГ. 33** Изображения мукоцилиарного транспорта реснитчатой поверхности клеточных культур, обработанных контролем носителем, ETI, LY-45139 или обоими



**ФИГ. 34** Мукоцилиарный транспорт в культурах, обработанных ETI, LY-45139 или обоими, показанными на фигуре 33

