

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046785

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.04.23

(21) Номер заявки
202092272

(22) Дата подачи заявки
2019.03.22

(51) Int. Cl. C12N 15/113 (2010.01)
C12N 5/079 (2010.01)
C12Q 1/68 (2018.01)

(54) СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ТРАНСТИРЕТИНОВОГО АМИЛОИДОЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ AG10

(31) 62/647,411; 62/765,096; 62/731,629;
62/758,235; 62/810,651

(32) 2018.03.23; 2018.08.17; 2018.09.14;
2018.11.09; 2019.02.26

(33) US

(43) 2021.01.15

(86) PCT/US2019/023555

(87) WO 2019/183463 2019.09.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЭЙДОС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Синха Ума, Рао Сатиш (US)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) US-A1-20140179751
US-A1-20170029390
Miller et al. "Enthalpy-Driven Stabilization of
Transthyretin by AG10 Mimics a Naturally Occurring
Genetic Variant That Protects from Transthyretin
Amyloidosis", Journal of Medicinal Chemistry, 22
August 2018 (22.08.2018), Vol. 61, pages 7862-7876;
entire document
US-A1-20180237396

(57) В изобретении описаны способы лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза у субъекта. Способы включают особые схемы применения, которые обладают большой эффективностью при лечении субъектов и хорошо переносятся субъектами.

046785 B1

046785 B1

046785

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет в соответствии с 35 U.S.C § 119(e) по предварительным заявкам США № 62/647411, поданной 23 марта 2018 г.; №62/765096, поданной 17 августа 2018 г.; № 62/731629, поданной 14 сентября 2018; №62/758235, поданной 9 ноября 2018; и № 62/810651, поданной 26 февраля 2019 г., раскрытие каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей полноте.

Заявление о правах на изобретения, сделанные на основе федерально спонсируемых исследований и разработок.

Не применимо.

Ссылка на "Список последовательностей", таблицу или компьютерную программу, содержащую приложение, представленное на компакт-диске.

Настоящая заявка включает в себя посредством ссылки во всей полноте список последовательностей, представленный в машиночитаемой форме вместе с настоящей заявкой. Представленный файл озаглавлен: "Список последовательностей - 051418-505".

Предшествующий уровень техники

Аберрантное взаимодействие и агрегация белков вследствие неправильного фолдинга белков или чрезмерной активации сигнального пути является основной причиной большого числа дегенеративных заболеваний человека. Таким образом, направленное воздействие на межбелковые взаимодействия (МБВ) представляет терапевтический интерес.

Одним из таких примеров аберрантной агрегации белков является растворимый белок транстиретин (TTR или преальбумин). TTR представляет собой гомотетрамерный белок массой 55 кДа, присутствующий в крови и спинномозговой жидкости. При диссоциации из гомотетрамерной формы димеры TTR могут неправильно складываться в амилоидогенные мономеры. Это наблюдалось с TTR дикого типа, а также с более чем 100 различными мутантными вариантами. Исследования показали, что стабилизация тетрамерной формы TTR ингибирует нарушенный фолдинг амилоидогенных мономеров, и последующее образование и отложение TTR амилоида.

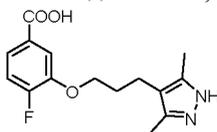
Производное бензоксазола, называемое тафамидис (2-(3,5-дихлорфенил)-1,3-бензоксазол-6-карбоновая кислота), было описано для ингибирования аномальной агрегации TTR и образования фибрилл, и сейчас оно проходит клинические испытания для лечения кардиомиопатии у пациентов с семейными формами и пациентов с TTR дикого типа. Тафамидис все еще проходит оценку со стороны Управления по контролю продуктов питания и лекарственных средств США, главного офиса регистрации лекарств.

Несмотря на продолжающиеся усилия по контролю и улучшению лечения субъектов с аномальной агрегацией TTR и образованием фибрилл, улучшения остаются незначительными. Например, недавний ретроспективный обзор Mayo Clinic, крупнейшего справочного центра по амилоидам в США, показал, что не было заметных изменений в общей смертности пациентов с транстиретиновой амилоидной кардиомиопатией (ATTR-СМ) в период с 1965 по 2013 год (Grogan и др. J Am Coll Cardiol 2016; 68 (10): 1014-20).

Таким образом, в данной области техники существует потребность в способах лечения аномальной агрегации TTR и образования фибрилл. Настоящее изобретение направлено на эти потребности, а также обеспечивает связанные преимущества.

Краткое изложение сущности изобретения

В некоторых аспектах в настоящей заявке представлены способы лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие применение у субъекта, нуждающегося в этом, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу:

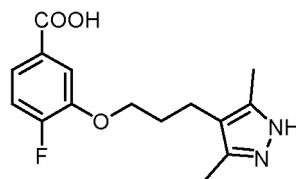


или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное терапевтически эффективное количество представляет собой общую суточную дозу примерно от 50 мг до 2000 мг.

В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет около 800 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет около 1600 мг. В некоторых вариантах осуществления применяют солевую форму HCl соединения 1.

В некоторых вариантах осуществления соединения 1 применяют один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления соединения 1 применяют два раза в сутки.

В некоторых аспектах в настоящей заявке представлены способы лечения транстриетинового (ТТР) амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающие применение у субъекта, нуждающегося в этом, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает необходимую минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови.

В дополнительном аспекте в настоящей заявке предусмотрена единичная стандартная доза примерно 10-1000 мг соединения 1, имеющего формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная дозированная форма содержит 200 мг соединения 1. В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная дозированная форма содержит 400 мг соединения 1. В некоторых вариантах осуществления единичная стандартная доза включает соль, образованную соединением 1 и HCl.

Другие объекты, особенности и преимущества настоящего изобретения будут очевидны специалисту в данной области техники из следующего подробного описания и чертежей.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 представляет фармакокинетические (ФК) профили в группах 1-4, принимающих однократно перорально возрастающие дозы 50, 150, 300 и 800 мг AG10 HCl.

Фиг. 2 представляет профили ФК у субъектов из группы 3, получавших однократную возрастающую дозу препарата после приема пищи или натощак, (пероральная доза AG10 HCl 300 мг).

Фиг. 3 представляет фармакокинетические профили групп 1-3, принимающих многократно возрастающие пероральные дозы 100, 300, 800 мг AG10 HCl каждые 12 ч в течение 12 дней.

Фиг. 4 показывает временную динамику анализа исключения флуоресцентного зонда (FPE) для группы 3, принимающей однократно возрастающую дозу (300 мг перорального AG10 HCl), демонстрирующую процентное связывание с мишенью в зависимости от времени. В этой группе у 6 субъектов применяли соединение 1, а у 2 субъектов применяли плацебо. В группу плацебо входят субъекты 1 и 4.

Фиг. 5 показывает временную динамику анализа FPE для группы 4, принимающую однократно возрастающую дозу (800 мг AG10 HCl перорально), демонстрирующую процент связывания с мишенью в зависимости от времени. В этой группе у 6 субъектов применяли соединение 1, а у 2 субъектов применяли плацебо. В группу плацебо входят субъекты 1 и 7.

Фиг. 6 показывает средний процент связывания с мишенью для каждой группы, принимающей однократно возрастающую дозу, в зависимости от времени.

Фиг. 7A-D показывают данные вестерн-блоттинга для группы 3, принимающей однократно возрастающую дозу (300 мг AG10 HCl). Стрелка сбоку от геля указывает положение тетрамера ТТР на основании молекулярной массы и распознавания специфическим антителом к ТТР.

Фиг. 8 показывает корреляцию между данными вестерн-блоттинга и данными FPE для группы 3, принимающей однократно возрастающую дозу (300 мг AG10 HCl перорально).

Фиг. 9 показывает временную динамику анализа FPE для группы 1, принимающей многократно возрастающую дозу (100 мг AG10 HCl перорально каждые 12 ч) в течение 12 дней. В этой группе у 6 субъектов применяли соединение 1, а у 2 субъектов применяли плацебо. В группу плацебо входят субъекты 1 и 8.

Фиг. 10 показывает временную динамику анализа FPE для группы 2, принимающей многократно возрастающую дозу (300 мг AG10 HCl перорально каждые 12 ч) в течение 12 дней. В этой группе у 6 субъектов применяли соединение 1, а у 2 субъектов применяли плацебо. В группу плацебо входят субъекты 3 и 5.

Фиг. 11 показывает временную динамику анализа FPE для группы 3, принимающей многократно возрастающую дозу (800 мг AG10 HCl перорально каждые 12 ч) в течение 12 дней. В этой группе у 6 субъектов применяли соединение 1, а у 2 субъектов применяли плацебо. В группу плацебо входят субъекты 1 и 7.

Фиг. 12 показывает пиковые, средние и минимальные процентные значения связывания с мишенью для группы 3 (800 мг AG10 HCl перорально каждые 12 ч) через 12 дней с использованием анализа FPE.

Фиг. 13 показывает данные вестерн-блоттинга для группы 3, принимающей многократно возрастающую дозу (800 мг AG10 HCl перорально каждые 12 ч). Стрелка сбоку от геля указывает положение тетрамера TTR на основании молекулярной массы и распознавания специфическим антителом к TTR. Субъекты 1 и 3 получали AG10, а субъект 2 - плацебо.

Фиг. 14 показывает совокупные фармакокинетические и фармакодинамические данные для групп, принимающих однократно возрастающую дозу, и групп, принимающих многократно возрастающую дозу; наблюдается предсказуемый дозозависимый ФД эффект.

Фиг. 15 показывает синтез аналогов AG10 1, 2, 3 и 4. (a) 5a, i) ацетилацетон, DBU, бензол, комнатная температура, 3 дня; ii) гидразингидрат, этанол, 90°C, 4 ч; iii) NaOH, MeOH/вода, 50°C, 14 ч; (b) 5b, i) ацетилацетон, DBU, бензол, комнатная температура, 3 дня; ii) гидразингидрат, этанол, 90°C, 4 ч; (c) i) NaN, MeI, ДМФ, комнатная температура, 12 ч; ii) NaOH, MeOH/вода, 50°C, 14 ч; (d) 5b, i) 3,5-гептандион, DBU, бензол, комнатная температура, 3 дня; ii) гидразингидрат, этанол, 90°C, 4 ч; (e) NaOH, MeOH/вода, 50°C, 14 ч.

Фиг. 16А-С показывают аффинность связывания и эффективность стабилизаторов для TTR в буфере. (a) Взаимодействие TTR со стабилизаторами, оцененное посредством ИТС (изотермической титрационной калориметрии). Термодинамические данные (сведены в табл. 5); ΔG - синие полосы, ΔH - зеленые полосы, а $-\Delta S$ - красные полосы. (b) Изменение флуоресценции, вызванное модификацией TTR в буфере (2,5 мкМ) с помощью зонда FPE, контролируемое в присутствии только зонда (контроль ДМСО) или стабилизаторов TTR (2,5 мкМ; соотношение стабилизаторов к TTR 1:1). (c) Гистограмма процентного связывания TTR в буфере стабилизаторами в присутствии зонда FPE, измеренной после 3 ч инкубации относительно одного зонда. Планки погрешностей указывают SD (n=3). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (*p<0,05; ***p<0,001).

Фиг. 17А-Д показывают эффективность стабилизаторов по связыванию и стабилизации TTR в сыворотке крови человека. (a) Типичное изображение вестерн-блоттинга для стабилизации TTR в сыворотке человека, подвергнутой кислотно-опосредованной (pH 4,0) денатурации в присутствии AG10 (10 мкМ) и других стабилизаторов, протестированных при их расчетной средней клинической C_{max} в равновесном состоянии при введении в указанных дозах: дифлунизал (250 мг 2 раза в сутки), 200 мкМ; тафамидис (80 мг 4 раза в сутки), 20 мкМ; толкапон (100 мг три раза в сутки), 20 мкМ. (b) Гистограмма данных стабилизации, полученных в экспериментах с вестерн-блоттингом. Планки погрешностей указывают стандартное отклонение (n=3). (c) Изменение флуоресценции, вызванное модификацией TTR в сыворотке человека с помощью зонда FPE, контролируемое в присутствии только зонда (контроль ДМСО), AG10 (10 мкМ) или стабилизаторов TTR (при их расчетном среднем клиническом значении C_{max} в равновесном состоянии). (d) Гистограмма процентного связывания TTR в сыворотке человека стабилизаторами в присутствии зонда FPE, измеренного после 3 ч инкубации, относительно только зонда. Планки погрешностей указывают среднее отклонение (n=4). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

Фиг. 18А-Д показывают кристаллические структуры, подчеркивающие аналогичные взаимодействия, вызванные мутацией T119M и связыванием AG10 с TTR. (a) Четвертичная структура AG10, связанного с V122I-TTR (PDB: 4HIQ), показана в виде ленты с индивидуально окрашенными мономерами. Крупный план одного из двух идентичных сайтов связывания T_4 с разноцветными лентами для двух мономеров тетрамера, составляющих сайт связывания. Ключевые водородные связи между пиразольным кольцом AG10 и S117/117' выделены пунктирными линиями. (b) Кристаллическая структура стабилизированного варианта T119M-TTR (PDB: 1FHN) с пунктирными линиями, выделяющими ключевые взаимодействия между гидроксильными группами S117 и S117'. (c) Кристаллическая структура TTRwt (PDB: 3CFM). (d) Кристаллическая структура термодинамически стабилизированного R104H-TTR (PDB: 1X7T).

Фиг. 19А-Е иллюстрируют водородные связи между пиразольным кольцом AG10 и S117/S117' TTR, которые важны для эффективного связывания с TTR. (a) Химические структуры и исследование докинга *in silico* синтезированных аналогов AG10 1, 2, 3 и 4. Сокристаллическая структура AG10, связанного с TTR, использованная для эксперимента по докингу. 1 - йодо-аналог AG10. 2 представляет собой метилэфирную форму AG10, которая не может формировать солевой мостик с K15/15'. 3 представляет собой метилпиразольную форму AG10, которая потенциально может формировать только одну водородную связь с K15 или K15'. 4 представляет собой диэтилпиразольный аналог AG10, который влияет на обе водородные связи с S117/ S117'. (b) Взаимодействие TTR с аналогами, оцененными путем ИТС. Термодинамические данные; ΔG - синие полосы, ΔH - зеленые полосы, а $-\Delta S$ - красные полосы, (c) Изменение флуоресценции, вызванное модификацией TTR в буфере (2,5 мкМ) с помощью зонда FPE, контролируемое в присутствии одного зонда (контроль ДМСО) или стабилизаторов TTR (2,5 мкМ; соотношение стабилизаторов к TTR 1:1). (d) Гистограмма процентной занятости TTR в буфере стабилизаторами в присутствии зонда FPE, измеренной после 3 ч инкубации, относительно одного зонда. Планки погрешностей указы-

вают SD (n=3). (e) Гистограмма данных вестерн-блоттинга для стабилизации TTR в сыворотке человека аналогами (10 мкМ; соотношение стабилизаторов к TTR 2:1). Планки погрешностей указывают SD (n=4). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Фиг. 20А-Ф иллюстрируют, что AG10 обладает высокой селективностью связывания TTR по сравнению с альбумином или другими многочисленными белками сыворотки человека. (a) Анализ путем гель-фильтрации и диализа, сравнивающий AG10 и тафамидис (каждый при 30 мкМ), при инкубации с очищенным сывороточным альбумином человека (600 мкМ). Концентрация тафамидиса, связанного с альбумином после гель-фильтрации (то есть время диализа 0 ч), была нормализована до 100%. Планки погрешностей указывают SD (n=3). (b) 24-часовой временной график диализа AG10 (10 мкМ), инкубированного с очищенным человеческим TTR (5 мкМ). Планки погрешностей указывают SD (n=3). (c) Изменение флуоресценции из-за модификации очищенного человеческого TTR (5 мкМ) с помощью зонда FPE, контролируемое в течение 6 ч в присутствии только зонда (черные кружки), зонда плюс альбумин (600 мкМ) (черные треугольники), зонда плюс все белки [фибриноген (5 мкМ), альбумин (600 мкМ), IgG (70 мкМ), трансферрин (25 мкМ)] (серые треугольники); зонда и AG10 (10 мкМ) (красные квадраты) или зонда и AG10 плюс альбумин (зеленые ромбы); зонда и AG10 плюс все [фибриноген (5 мкМ), альбумин (600 мкМ), IgG (70 мкМ), трансферрин (25 мкМ)] (синие круги), (d) Процент связывания TTR в буфере AG10 в присутствии зонда FPE и других белков сыворотки, измеренный после 3 ч инкубации относительно одного зонда, (e, f) Такой же эксперимент, описанный для AG10, был проведен для тафамидиса. Планки погрешностей указывают SD (n=3). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Фиг. 21А-Д показывают активность AG10 и тафамидиса в анализах FPE и вестерн-блоттинга, проведенных на объединенной сыворотке собак. (a) Изменение флуоресценции, вызванное модификацией TTR собаки в коммерчески доступной сыворотке собак породы бигль с помощью зонда FPE, контролируемое только в присутствии зонда (контроль ДМСО, черные кружки), AG10 (10 мкМ) или тафамидиса (10 мкМ). (b) Процентная связываемость TTR собаки в собачьей сыворотке AG10 и тафамидисом в присутствии зонда FPE, измеренная после 3 ч инкубации, относительно только зонда. Планки погрешностей указывают среднее отклонение (n=4). (c) Изображение вестерн-блоттинга для стабилизации TTR в объединенной собачьей сыворотке против кислотно-опосредованной денатурации в присутствии AG10 (10 мкМ) и тафамидиса (10 мкМ). Образцы сыворотки инкубировали с ДМСО или тестируемыми соединениями в ацетатном буфере (pH 4,0) в течение необходимого периода времени (0 и 72 ч) перед сшивкой и иммуноблоттингом. (d) Гистограмма данных стабилизации, полученных в экспериментах вестерн-блоттинга. Планки погрешностей указывают среднее отклонение (n=3). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Фиг. 22А-Д показывают, что перорально применяемый AG10 является эффективным в связывании и стабилизации TTR у собак. (a и b) Связываемость TTR у собак породы бигль после перорального приема (каждый день в течение 7 дней) возрастающих доз AG10. Кружки (●) обозначают день 1 до приема, квадраты (■) обозначают день 7 до приема (концентрация AG10 при C_{min}), а треугольники (▲) обозначают день 7 после приема (концентрация AG10 при C_{max}). Применяли четыре группы животных: (i) 0 мг/кг (n=12, 6 самцов/6 самок); (ii) 50 мг/кг (n=4, 2 самца/2 самки); (iii) 100 мг/кг (n=4, 2 самца/2 самки); (iv) 200 мг/кг (n=12, 6 самцов/6 самок). (b) Гистограмма, показывающая занятость TTR через 3 ч. Планки погрешностей указывают SD (n=3). (c и d) Фармакокинетико-фармакодинамический (ФК-ФД) анализ AG10 у собак, получавших однократную пероральную дозу AG10 HCl при (c) 5 мг/кг и (d) 20 мг/кг. График разброса концентрации [AG10] против % связываемости TTR образцов сыворотки, полученных от собак в различные моменты времени (n=4, 2 самца/2 самки на группу дозирования). Планки погрешностей указывают среднее отклонение (n=3). Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Фиг. 23 иллюстрирует % связывания TTR через 3 ч в сыворотке от 3 самцов макак-крабоедов после перорального применения AG10 HCl в дозе 5 мг/кг. Данные представляют собой среднее значение ± стандартное отклонение для 3 повторов.

Фиг. 24 иллюстрирует дозовую зависимость между пероральным введением AG10 и стабилизацией TTR у макак.

Фиг. 25 показывает стандартные калибровочные кривые, полученные с использованием набора ИФА для преальбумина (человеческого) от Aviva Systems Biology.

Фиг. 26 показывает относительное изменение концентрации TTR во времени для каждой группы MAD (общее количество принимавших препарат здоровых добровольцев=24; плацебо: активное вещество=1:3; группа MAD1=100 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD2=300 мг каждые 12 ч в течение

ние 12 дней; группа MAD3=800 мг каждые 12 ч в течение 12 дней). Изменение рассчитывали путем нормализации относительно базовых значений.

Фиг. 27 иллюстрирует среднее процентное изменение концентрации TTR в сыворотке крови от исходного уровня до дня 12 у всех пациентов MAD, получавших плацебо и AG10.

Фиг. 28 представляет исходный уровень и концентрацию TTR в сыворотке крови на 12-й день во всех группах, получавших плацебо и AG10 HCl (общее количество получавших дозу здоровых добровольцев=24; плацебо: активное вещество=1:3; группа MAD1=100 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD2=300 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD3=800 мг каждые 12 ч в течение 12 дней).

Фиг. 29 представляет исходные данные и концентрацию TTR в сыворотке крови на 12-й день во всех группах, получавших плацебо и AG10 (общее количество получавших препарат здоровых добровольцев=24; плацебо: активное вещество=1:3; группа MAD1=100 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD2=300 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD3=800 мг каждые 12 ч в течение 12 дней).

Фиг. 30 иллюстрирует дозозависимое изменение уровней TTR в сыворотке для субъектов в каждой группе лечения. Данные представлены как процентное изменение от исходного уровня до 28-го дня.

Фиг. 31 показывает, что все стабилизаторы AG10 и TTR, тафамидис и дифлунизал, увеличивают концентрации TTR в сыворотке. Отмеченные концентрации TTR в сыворотке для групп AG10 получены через 28 дней лечения. Отмеченная концентрация TTR для тафамидиса в сыворотке представляет собой 28-дневную интерполяцию, основанную на отмеченных 2-недельных и 6-недельных значениях. Отмеченные концентрации TTR для дифлунизала в сыворотке крови приведены после 1 года лечения.

Фиг. 32 показывает, что лечение AG10 восстанавливает низкие уровни TTR до нормального диапазона у пациентов с ATTR-СМ. Процент пациентов с ATTR-СМ в каждой группе лечения (плацебо, 400 мг 2 раза в сутки и 800 мг 2 раза в сутки), у которых наблюдается низкий и нормальный уровни концентрации TTR в сыворотке, отмечен до лечения (слева) и после 28 дней лечения (справа).

Фиг. 33 изображает распределение исходных концентраций TTR в сыворотке для каждого человека, участвовавшего в исследовании фазы 2.

Фиг. 34 иллюстрирует процент стабилизации TTR, определенный с помощью вестерн-блоттинга для оценки стабилизации тетрамерного TTR. Приведенные данные относятся ко всем лицам в исследовании (левый столбец), лицам с TTR дикого типа (средний столбец) и лицам с мутантным TTR (правый столбец). Приведенные планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего.

Фиг. 35 иллюстрирует процент связывания AG10, определенный с помощью анализа флуоресцентного зонда при минимальном уровне на 28 день (до введения дозы) и пике 28 дня (через 1 ч после введения дозы). Представленные данные относятся ко всем индивидуумам в исследовании (закрашенные столбцы), индивидуумам с TTR дикого типа (белые столбцы) и индивидуумам с мутантным TTR (столбцы с клетчатым рисунком).

Фиг. 36 изображает зависимость между связыванием флуоресцентного зонда и концентрацией AG10 в плазме крови. Когда флуоресцентный зонд связывается с TTR, определяется флуоресценция зонда, когда флуоресцентный зонд не может связываться с TTR из-за наличия AG10, флуоресценция не определяется.

Фиг. 37 изображает относительные единицы флуоресценции, измеренные при анализе флуоресцентного зонда в указанные моменты времени. Уровень до приема дозы - это минимальный уровень, а спустя 1 ч после приема дозы - это максимальный уровень. Ось Y представляет среднее значение от 60 мин для относительных единиц флуоресценции с поправкой на фон. Представленные данные получены от субъектов, получавших 400 мг соли, образованной AG10 и HCl, два раза в сутки.

Фиг. 38 представляет собой график относительных единиц флуоресценции, измеренных в анализе флуоресцентного зонда в указанные моменты времени. Ось Y представляет среднее значение от 60 мин для относительных единиц флуоресценции с поправкой на фон. Уровень до приема дозы - это минимальный уровень, а спустя 1 ч после приема дозы - это максимальный уровень. Представленные данные относятся к субъектам, получавшим 800 мг соли, образованной AG10 и HCl, два раза в сутки.

Фиг. 39 представляет собой график относительных единиц флуоресценции, измеренных в анализе флуоресцентного зонда в указанные моменты времени. Ось Y представляет среднее значение от 60 мин для относительных единиц флуоресценции с поправкой на фон. Уровень до приема дозы - это минимальный уровень, а спустя 1 ч после приема дозы - это максимальный уровень. Приведены данные от индивидуумов, получавших плацебо.

Фиг. 40 иллюстрирует процентную занятость AG10, определенную с помощью анализа флуоресцентного зонда, при минимальном уровне на день 14 (до введения дозы) и на пиковом уровне 14-го дня (через 0,5 ч после введения дозы). Приведенные данные относятся к группе, принимающей 800 мг два раза в сутки. Группа лечения AG10 HCl с белком TTR, имеющим мутацию V30M.

Фиг. 41 иллюстрирует процент стабилизации TTR, определенный с помощью вестерн-блоттинга для оценки стабилизации тетрамерного TTR. Приведенные данные относятся к индивидууму, получавшему дозу 800 мг два раза в сутки. Группа лечения AG10 HCl с белком TTR, имеющим мутацию V30M.

Фиг. 42А-D отображают случайные эффекты (ЭТА) по сравнению с графиками категоричной ковариаты на популяционной модели ФК. Панели А и В отображают влияние на клиренс, а панели С и D отображают влияние на объем. На графиках, обозначенных "DIS" (панели А и С) 0=здоровые добровольцы, 1=больные субъекты. На графиках, обозначенных "ConMed 1" (панели В и D) 0=субъекты получали либо фуросемид, либо торсемид, 1=пациенты не получали ни фуросемид, ни торсемид. DIS: 0 (n=42)=все здоровые взрослые добровольцы, получавшие AG10, из AG10-001 (SAD и MAD). 1 (n=32)=Это все пациенты, получавшие активное соединение ATTR-СМ из AG10-201, которые были включены в популяционный ФК-анализ. 16 в группе по 400 мг два раза в сутки и 16 в группе по 800 мг два раза в сутки. ConMed 1: 0 (n=49)=субъекты, не получающие сопутствующие диуретики: фуросемид или торсемид (42 здоровых взрослых добровольца, 7 пациентов с ATTR-СМ), 1 (n=25)=субъекты, получающие либо фуросемид, либо торсемид.

Фиг. 43 представляет сравнение минимальных уровней AG10 на 12-й день от MAD 3 (исследование AG10-001) с минимальными уровнями у пациентов с ATTR-СМ, которым вводили дозу 800 мг два раза в сутки (AG10-201). График в виде диаграммы размаха показывает от 25 до 75 перцентилей результатов с размахом, охватывающими от наименьшего до наибольшего значения в каждой группе. Линия обозначает медиану, а+ обозначает среднее значение. В обоих исследованиях для дозирования использовали таблетки AG10 по 200 мг.

Фиг. 44 представляет сравнение минимальных уровней AG10 у здоровых субъектов, получавших таблетки по 400 мг, с минимальным уровнем у пациентов с ATTR-СМ, которым вводили дозу AG10-201 400 мг два раза в сутки. График в виде диаграммы размаха показывает от 25 до 75 перцентилей результатов с размахом, охватывающим от наименьшего до наибольшего значения в каждой группе. Линия обозначает медиану, а+ обозначает среднее значение. В исследовании здоровых добровольцев (AG10-003) для дозирования использовали таблетки AG10 по 400 мг, а в исследовании AG10-201 фазы 2 для дозирования использовали таблетки по 200 мг.

Фиг. 45 представляет краткое изложение дизайна клинического исследования фазы 3 у субъектов с ATTR-СМ.

Фиг. 46 представляет сводную информацию о дизайне клинического исследования фазы 3 у субъектов с ATTR-PN.

Подробное описание изобретения

I. Общие сведения.

В настоящей заявке описаны способы лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза у субъекта. Способы включают специфические режимы дозирования, которые обладают большой эффективностью при лечении субъекта и хорошо переносятся субъектами.

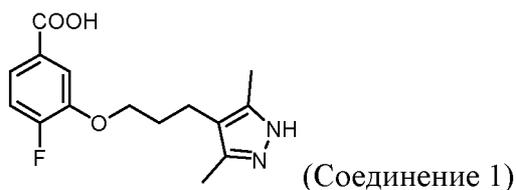
II. Определения.

Несмотря на то что здесь показаны и описаны различные варианты осуществления и аспекты настоящего изобретения, для специалистов в данной области техники будет очевидно, что такие варианты осуществления и аспекты представлены только в качестве примера. Многочисленные вариации, изменения и замены теперь будут очевидны специалистам в данной области техники без отхода от изобретения. Следует понимать, что различные альтернативы описанным здесь вариантам осуществления изобретения могут использоваться при практическом применении изобретения.

Заголовки разделов, используемые в настоящей заявке, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет. Все документы или части документов, цитируемые в заявке, включая, помимо прочего, патенты, заявки на патенты, статьи, книги, руководства и трактаты, настоящим явным образом включены посредством ссылки во всей полноте для любых целей.

Если не указано иное, технические и научные термины, используемые в настоящей заявке, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники. См., например, Singleton et al., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*, 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989). Любые способы, устройства и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящей заявке, могут быть использованы на практике этого изобретения. Следующие определения предоставлены для облегчения понимания некоторых терминов, часто используемых в настоящей заявке, и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

"Соединение 1" относится к химическому веществу 3-(3-(3,5-диметил-1Н-пиразол-4-ил)пропокси)-4-фторбензойной кислоте (AG10), имеющему формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли. Что касается конкретных количеств соединения 1, применяемых у пациентов, эта заявка относится к количеству применяемой HCl соли соединения 1. Специалист в данной области поймет, что для применения того же количества соединения 1 в свободном основании или в форме другой соли необходимы небольшие корректировки общего вводимого количества.

Термины единственного числа, используемые в настоящей заявке, означают один или несколько.

Термины "содержать", "включать" и "иметь" и их производные используются в настоящей заявке взаимозаменяемо как исчерпывающие не ограничивающие термины. Например, использование словосочетаний "содержащий", "включающий" или "имеющий" означает, что какой бы элемент ни состоял, ни имел, ни включался, это не единственный элемент, охватываемый подлежащим предложения, содержащего глагол.

Используемый в настоящей заявке термин "примерно" означает диапазон значений, включающий указанное значение, которое специалист в данной области техники счел бы достаточно похожим на указанное значение. В некоторых вариантах осуществления термин "примерно" означает в пределах стандартного отклонения с использованием измерений, обычно приемлемых в данной области техники. В некоторых вариантах осуществления "примерно" означает диапазон, простирающийся до $\pm 10\%$ от указанного значения. В некоторых вариантах осуществления "примерно" означает указанное значение.

Используемые в настоящей заявке термины "лечение", или "облегчение", или "улучшение" используются здесь взаимозаменяемо. Эти термины относятся к подходу к получению полезных или необходимых результатов, включая терапевтическую пользу, но не ограничиваясь этим. Под терапевтическим эффектом понимается устранение или облегчение основного заболевания, которое лечат. Кроме того, терапевтический эффект достигается за счет устранения или облегчения одного или нескольких физиологических симптомов, связанных с основным заболеванием, так что улучшение наблюдается у субъекта, несмотря на то, что субъект все еще может страдать от основного расстройства. Лечение включает замедление развития клинических симптомов заболевания путем применения композиции; подавление заболевания, то есть уменьшение клинических симптомов заболевания; ингибирование заболевания, то есть остановку развития клинических симптомов путем применения композиции после первоначального появления симптомов; и/или облегчение заболевания, то есть уменьшение клинических симптомов путем применения композиции после их первоначального появления. Например, некоторые описанные в настоящей заявке способы лечат транстиретиновый (TTR) амилоидоз путем снижения или уменьшения возникновения, или прогрессирования образования фибрилл TTR; или лечат TTR амилоидоз путем уменьшения симптомов TTR амилоидоза.

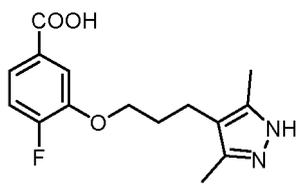
"Эффективное количество" или "фармацевтически эффективное количество" - это количество, достаточное для достижения заявленной цели (например, достижения эффекта, для которого его применяют, лечения заболевания, снижения активности фермента, уменьшения одного или нескольких симптомов заболевания или состояния). Примером "эффективного количества" является количество, достаточное для того, чтобы способствовать лечению или уменьшению симптома или симптомов заболевания, которое также может называться "терапевтически эффективным количеством". "Уменьшение" симптома или симптомов (и грамматические эквиваленты этой фразы) означает уменьшение степени тяжести или частоты симптома (симптомов) или устранение симптома (симптомов). Эффективность также может быть выражена как "кратное" увеличение или уменьшение. Например, терапевтически эффективное количество может иметь по меньшей мере 1,2-кратный, 1,5-кратный, 2-кратный, 5-кратный или больший эффект по сравнению с контролем.

"Пациент", или "субъект", или "субъект, нуждающийся в этом" относится к живому организму, страдающему или подверженному заболеванию или состоянию, которое можно лечить с использованием способов, представленных в настоящей заявке. Этот термин не обязательно указывает на то, что у субъекта диагностировано конкретное заболевание, но обычно относится к человеку, находящемуся под медицинским наблюдением. Неограничивающие примеры включают людей, других млекопитающих, быков, крыс, мышей, собак, обезьян, коз, овец, коров, оленей и других животных, не относящихся к млекопитающим. В некоторых вариантах осуществления пациентом, субъектом, или субъектом, нуждающимся в лечении, является человек.

III. Подробное описание вариантов осуществления.

Методы.

В одном аспекте в настоящей заявке предложен способ лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза. Способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли, где терапевтически эффективное количество составляет общую суточную дозу примерно от 10 мг до 2000 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно от 10 мг до 50 мг, от 50 мг до 300 мг, от 50 мг до 150 мг, от 150 мг до 800 мг, от 800 мг до 1600 мг или от 800 мг до 2000 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно от 10 мг до 50 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно от 50 мг до 300 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет от 50 мг до 150 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет от 150 мг до 800 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет от 800 мг до 1600 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет от 800 мг до 2000 мг. Понятно, что в настоящем описании указанное количество соединения 1 представляет собой количество вводимой HCl-соли соединения 1. Специалист в данной области поймет, что для введения того же количества соединения 1 в свободном основании или в форме другой соли необходимы небольшие корректировки общего вводимого количества.

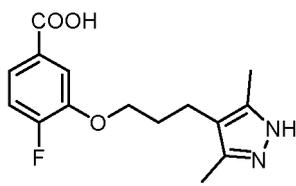
В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 10 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 25 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 50 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 1000 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 150 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 300 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 600 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 800 мг. В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет примерно 1,600 мг.

Соединение 1 можно применять один раз в сутки (SID или qd), два раза в сутки (BID или q12h), три раза в сутки (TID) или четыре раза в сутки (QID). В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют три раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют четыре раза в сутки.

В некоторых вариантах осуществления примерно 50 мг соединения 1 применяют один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 150 мг соединения 1 применяют один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 300 мг соединения 1 применяют один раз в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 800 мг соединения 1 применяют один раз в сутки.

В некоторых вариантах осуществления примерно 100 мг соединения 1 применяют два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления около 300 мг соединения 1 применяют два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 400 мг соединения 1 применяют два раза в сутки. В некоторых вариантах осуществления примерно 800 мг соединения 1 применяют два раза в сутки.

В другом аспекте в настоящей заявке обеспечивается способ лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза. Способ включает применение у субъекта, нуждающегося в этом, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови, равную по меньшей мере 5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1

поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови на уровне по меньшей мере 6 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 7,5 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 8 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 5 до 30 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 5 до 25 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 6 до 20 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 7,5 до 15 мкМ. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 7,5 до 10 мкМ.

В некоторых вариантах осуществления субъекты, получающие терапевтически эффективное количество соединения 1, проявляют увеличение концентрации транстиретина (TTR) в сыворотке крови по сравнению с исходными уровнями. В некоторых вариантах осуществления субъекты, получающие терапевтически эффективное количество соединения 1, проявляют по меньшей мере примерно 10, 15, 20, 25, 30% или более увеличение концентраций транстиретина (TTR) в сыворотке крови по сравнению с исходными уровнями после 28 дней лечения. В некоторых вариантах осуществления субъекты, получающие терапевтически эффективное количество соединения 1, проявляют по меньшей мере примерно 25% повышение концентрации транстиретина (TTR) в сыворотке крови по сравнению с исходными уровнями после 28 дней лечения. В некоторых вариантах осуществления субъекты до лечения имеют уровни TTR в сыворотке крови ниже исходной концентрации TTR в сыворотке (20 мг/дл TTR). В некоторых вариантах осуществления субъект, получающий эффективное количество соединения 1 в течение 28 дней, будет проявлять повышенные уровни TTR в сыворотке крови, так что уровень TTR в сыворотке крови будет выше базового уровня. В некоторых вариантах осуществления субъекты, проявляющие повышенный уровень TTR, являются субъектами, у которых диагностирована транстиретиновая амилоидная (ATTR) кардиомиопатия.

Существует множество заболеваний или расстройств, связанных с транстиретиновым (TTR) амилоидозом. К ним относятся, помимо прочего, семейная амилоидная полинейропатия, семейная амилоидная кардиомиопатия, сенильный системный амилоидоз, центральный амилоидоз, глазной амилоидоз, лептоменингеальный амилоидоз, окулолептоменингеальный амилоидоз, амилоидоз стекловидного тела, амилоидоз желудочно-кишечного тракта, нейропатический амилоидоз, не-нейропатический амилоидоз, ненаследственный амилоидоз, реактивный/вторичный амилоидоз, церебральный амилоидоз.

В некоторых вариантах осуществления заболевание или нарушение, связанное с транстиретиновым (TTR) амилоидозом, представляет собой лептоменингеальный амилоидоз. В некоторых вариантах осуществления субъекты с лептоменингеальным амилоидозом имеют белок транстиретин с мутацией аспарагиновой кислоты на глицин в положении 18 (D18G). В некоторых вариантах осуществления субъекты с лептоменингеальным амилоидозом имеют белок транстиретин с мутацией глицина на аргинин в положении 53 (G53R). Белок транстиретин (TTR) дикого типа представлен в настоящей заявке как SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления субъекты с лептоменингеальным амилоидозом имеют белок транстиретин с мутацией тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C). Субъекты с мутацией тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C) могут проявлять симптомы ATTRm-PN, симптомы лептоменингеального амилоидоза или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъектов с лептоменингеальным амилоидозом имеется транстиретиновый белок с мутацией треонина на пролин в положении 49 (T49P). Субъекты с мутацией треонина на пролин в положении 49 (T49P) могут проявлять симптомы ATTRm-CM, симптомы лептоменингеального амилоидоза или их комбинацию.

В некоторых вариантах осуществления транстиретиновый (TTR) амилоидоз представляет собой транстиретиновую амилоидную (ATTR) кардиомиопатию или ATTR полинейропатию. В некоторых вариантах осуществления TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию треонина на аланин в положении 60 (T60A). В некоторых вариантах осуществления TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию пролина на серин в положении 24 (P24S). В некоторых вариантах осуществления TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию аспарагиновой кислоты на аланин в положении 38 (D38A). В некоторых вариантах осуществления TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию лейцина на гистидин в положении 58 (L58H). У пациентов с этими мутациями часто наблюдается комбинация симптомов ATTR кардиомиопатии и ATTR полинейропатии. Белок транстиретин (TTR) дикого типа представлен в настоящей заявке как SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, транстиретиновый (TTR) амилоидоз представляет собой

транстриетиновую амилоидную (ATTR) кардиомиопатию. В некоторых вариантах осуществления заболевание, связанное с транстриетиновым (TTR) амилоидозом, представляет собой транстриетиновую амилоидную (ATTR) полинейропатию.

ATTR кардиомиопатия включает ATTR кардиомиопатию дикого типа (ATTRwt-CM) и генетическую (семейную) ATTR кардиомиопатию (ATTRm-CM). ATTRm-CM обусловлена мутацией в белке TTR, тогда как ATTRwt-CM не обусловлена мутацией. Вместо этого ATTRwt-CM обычно является возрастным процессом. В некоторых вариантах осуществления ATTR кардиомиопатия представляет собой ATTRwt-CM. В некоторых вариантах осуществления ATTR кардиомиопатия представляет собой ATTRm-CM. В некоторых вариантах осуществления субъекты с ATTRm-CM имеют мутацию валина на изолейцин в положении 122 (V122I) в белке TTR. В некоторых вариантах осуществления субъекты с ATTRm-CM имеют белок транстриетин с мутацией треонина на пролин в положении 49 (T49P). Субъекты с мутацией треонина на пролин в положении 49 (T49P) могут проявлять симптомы ATTRm-CM, симптомы лептоменингеального амилоидоза или их комбинацию. Белок транстриетин (TTR) дикого типа представлен в настоящей заявке как SEQ ID NO: 1.

ATTR полинейропатия включает как полинейропатию дикого типа, так и генетическую (семейную) полинейропатию ATTR. Как обсуждалось в отношении кардиомиопатии, ATTRm-PN вызвана мутацией в белке TTR, тогда как ATTRwt-PN не включает генетический компонент. В некоторых вариантах осуществления ATTR-PN представляет собой ATTRwt-PN. В некоторых вариантах осуществления ATTR-PN представляет собой ATTRm-PN. В некоторых вариантах осуществления ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который включает мутацию валина на метионин в положении 30 (V30M). В некоторых вариантах осуществления ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который включает мутацию фенилаланина на лейцин в положении 64 (F64L). В некоторых вариантах осуществления ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который включает мутацию тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C). Субъекты с мутацией тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C) могут проявлять симптомы ATTRm-PN, симптомы лептоменингеального амилоидоза или их комбинацию. Белок транстриетин (TTR) дикого типа представлен в настоящей заявке как SEQ ID NO: 1.

ATTR кардиомиопатия (как дикого типа, так и семейная) представляет собой медленно прогрессирующее заболевание, которое вызывает сердечную недостаточность и смерть пораженных субъектов. Способы согласно настоящему раскрытию обеспечивают клиническое улучшение у субъектов с ATTR кардиомиопатией путем остановки или замедления накопления фибрилл TTR в миокарде. Посредством этого процесса описанные в настоящее время способы обеспечивают клинические улучшения у пациентов с ATTR кардиомиопатией. Клинические улучшения включают, помимо прочего, улучшение по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA), улучшение показателей по опроснику Канзас-Сити по кардиомиопатии, показателей EuroQoL-5 (EQ-5D-5L), улучшение результатов теста 6-минутной ходьбы, улучшение маркеров, связанных со здоровьем сердца, таких как тропонин T, тропонин I, натрийуретический пептид B-типа (BNP) и N-концевой про-BNP, снижение частоты госпитализаций, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, и/или снижение смертности.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящей заявке, улучшают, стабилизируют или замедляют ухудшение у субъектов по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). По функциональной классификации NYHA тяжесть симптомов сердечной недостаточности классифицируется как один из четырех функциональных классов. Функциональная классификация NYHA широко используется в клинической практике и в исследованиях, поскольку она обеспечивает стандартное описание степени тяжести, которое можно использовать для оценки ответа на лечение и для ведения пациентов. Функциональная классификация NYHA основана на тяжести симптомов и ограничении физической активности:

класс I: без ограничения физической активности. Обычная физическая активность не вызывает чрезмерной одышки, усталости или сердцебиения;

класс II: Незначительное ограничение физической активности. Комфортно в покое, но обычная физическая активность приводит к чрезмерной одышке, утомляемости или сердцебиению;

класс III: выраженное ограничение физической активности. Комфортно в покое, но меньшая, чем обычная физическая активность, приводит к чрезмерной одышке, усталости или сердцебиению;

класс IV: невозможность выполнять какую-либо физическую активность без дискомфорта. Могут присутствовать симптомы в состоянии покоя. Если предпринимаются какие-либо физические нагрузки, дискомфорт увеличивается.

В некоторых вариантах осуществления изобретения применение терапевтически эффективного количества соединения I снижает показатели у субъекта по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA). В некоторых вариантах осуществления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса IV до класса III, с класса IV до класса II или с класса IV до класса I. В некоторых вариантах осуществления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса IV до класса III. В некоторых вариантах осуществления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса IV до класса II. В некоторых вариантах осуществ-

ствления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса III до класса II. В некоторых вариантах осуществления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса III до класса I. В некоторых вариантах осуществления показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса II до класса I.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящей заявке, улучшают, стабилизируют или замедляют ухудшение в соответствии с классификацией субъектов по Опроснику Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ). В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают улучшенные показатели по опроснику Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ) (Green CP, et al. (2000) *Journal of the American College of Cardiology* 35: 1245-55), содержание которого включено в настоящую заявку в качестве ссылки для всех целей. KCCQ содержит конкретные вопросы, связанные со здоровьем сердца, и предоставляет достоверные, надежные и чувствительные оценки качества жизни, связанного со здоровьем, специфичные для патологии.

Вопросы KCCQ просят субъектов оценить, насколько ограничены (например, строго ограничены, значительно ограничены, умеренно ограничены, слегка ограничены или совсем не ограничены) они в нормальных аспектах своей жизни. В некоторых вариантах осуществления изобретения у субъектов наблюдается среднее улучшение по меньшей мере на один уровень (например, от строго ограниченного до значительно ограниченного, от значительно ограниченного до умеренно ограниченного, от умеренно ограниченного до слегка ограниченного) по всем вопросам анкеты после лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, представленные в настоящей заявке, улучшают, стабилизируют или задерживают ухудшение показателей по EuroQoL-5 (EQ-5D-5L) у субъектов. EQ-5D-5L - это краткий, универсальный инструмент для самостоятельной оценки, который занимает около 5 мин. Опросник состоит из двух частей. В первой части респондентов просят оценить их текущее состояние здоровья по 5 параметрам (мобильность, уход за собой, обычная деятельность, боль или дискомфорт, тревога или депрессия), причем каждое измерение имеет пять уровней функций (1 - нет проблем, 2 - небольшая проблема, 3 - средняя проблема, 4 - серьезная проблема и 5 -экстремальная проблема). Вторая часть представляет собой самооценку респондентами текущего состояния здоровья по визуальной аналоговой шкале (EQ VAS) с конечными точками, помеченными как "наилучшее воображаемое состояние здоровья" (100 баллов) и "наихудшее воображаемое состояние здоровья" (0 баллов). Баллы по 5 параметрам могут использоваться для расчета единственного значения индекса, также известного как индекс оценки общего состояния здоровья. Анкета EQ-5D-5L находится в открытом доступе и может быть получена в EuroQoL.

В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие описанные в настоящей заявке способы лечения, имеют среднее улучшение по меньшей мере на один, два, три, четыре, пять, шесть, семь, девять или десять пунктов по индексу оценки общего состояния здоровья EuroQoL-5 (EQ-5D-5L). В некоторых вариантах осуществления пациенты, получающие способы лечения, описанные в настоящей заявке, имеют среднее улучшение по меньшей мере на пять баллов по индексу оценки общего состояния здоровья EuroQoL-5 (EQ-5D-5L).

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают характеристики субъекта в тесте шестиминутной ходьбе. Тест с шестиминутной ходьбой - это шестиминутная прогулка в произвольном темпе на время для оценки уровня функциональных возможностей субъекта. Субъектам разрешается остановиться и отдохнуть во время теста, если уровень нагрузки превышает их уровень комфорта. Оценка до, после и во время лечения является относительно простой, и состоит из измерения расстояния, которое проходит субъект за шестиминутный период времени. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления субъекты увеличивают общее расстояние, пройденное в тесте шестиминутной ходьбы после лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления субъекты проходят по меньшей мере на 25 м дальше, по сравнению с исходным расстоянием, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекты проходят как минимум на 30 м дальше, по сравнению с исходным расстоянием, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления субъекты проходят по меньшей мере на 50 м дальше, по сравнению с исходным расстоянием, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления субъекты проходят по меньшей мере на 75 м дальше, по сравнению с исходным расстоянием, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения субъекты проходят по меньшей мере на 100 м дальше, по сравнению с исходным расстоянием, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления субъекты, получающие способы лечения, описанные в настоящей заявке, имеют замедленное сокращение расстояния за шесть минут ходьбы. Например, в некоторых вариантах осуществления субъект проходит примерно такое же расстояние за шесть минут ходьбы, что и до лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект проходит на 10 м меньше за шестиминутный тест ходьбы. В некоторых вариантах осуществления тест с шестиминутной ходьбой используют для сравнения экспериментальной группы с группой без лечения. В некоторых вариантах осуществления среднее изменение между группами от исходного уровня составляет по меньшей мере 10 м. В некоторых вариантах осуществления среднее изменение между группами от исходного уровня составляет по меньшей мере 20 м. В некоторых вариантах осуществления среднее изменение между группами

от исходного уровня составляет по меньшей мере 30 м. В некоторых вариантах осуществления способы лечения, представленные в настоящей заявке, снижают ухудшение расстояния в тесте шестиминутной ходьбы по сравнению с индивидуумами, не получающими лечение.

Тропонин Т, тропонин I, мозговой натрийуретический пептид (BNP) и N-концевой про-BNP представляют собой полипептиды, уровень которых повышен в сыворотке крови субъектов с плохим здоровьем миокарда. В некоторых вариантах осуществления уровень тропонина Т, тропонина I, BNP и/или N-концевого про-BNP снижается после лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления уровень тропонина Т, тропонина I, BNP и/или N-концевого про-BNP снижается примерно на 10% по сравнению с исходным уровнем тропонина Т, тропонина I, BNP и/или N-концевого про-BNP у указанного субъекта до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления уровень тропонина Т, тропонина I, BNP и/или N-концевого про-BNP снижается примерно на 15% по сравнению с исходным уровнем тропонина Т, тропонина I, BNP и/или N-концевого про-BNP у указанного субъекта до лечения соединением 1.

Как обсуждалось выше, клиническое улучшение, обеспечиваемое в некоторых вариантах осуществления раскрытых способов, снижает частоту госпитализаций, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, у субъектов, получающих лечение, по сравнению с теми, кто не получает лечения. В некоторых вариантах осуществления у пациентов отмечается в среднем по меньшей мере на 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5 меньше госпитализаций, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, в год, по сравнению с теми, кто не получает лечения.

Дополнительным клиническим преимуществом, которое обеспечивается в некоторых вариантах осуществления способов, раскрытых в настоящей заявке, является снижение уровня смертности по сравнению с индивидуумами, не получающими лечения. В некоторых вариантах осуществления изобретения уровень смертности снижается примерно на 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28, 30 или более процентов по сравнению с субъектами, которые не получали лечение.

ATTR полинейропатия представляет собой заболевание, при котором отложения амилоида TTR (ATTR) повреждают или иным образом нарушают нормальную функцию нервов. ATTR полинейропатия - это прогрессирующее заболевание, которое вызывает кахексию и смерть пораженных субъектов. Способы настоящего раскрытия обеспечивают клиническое улучшение у субъектов с ATTR полинейропатией путем остановки или замедления накопления фибрилл TTR. Посредством этого процесса описанные в настоящее время способы обеспечивают клинические улучшения у пациентов с ATTR полинейропатией. Клинические улучшения включают улучшение показателя по шкале невропатических нарушений (NIS) или модифицированной шкале невропатических нарушений +7 (mNIS+7), улучшение показателя по Норфолкскому опроснику качества жизни по диабетической невропатии, улучшение показателя по комбинированной шкале вегетативных симптомов (COMPASS-31), улучшение алиментарного статуса, оцененного с помощью модифицированного индекса массы тела (МИМТ), и/или улучшение показателя теста 10-метровой ходьбы субъекта, но не ограничиваются этим.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают улучшенный показатель по шкале невропатических нарушений (NIS). NIS относится к системе оценок, которая измеряет слабость, ощущения и рефлексы. Шкала NIS оценивает стандартную группу мышц на предмет слабости (1 - слабость на 25%, 2 - на 50%, 3 - на 75%, 3,25 - движение против силы тяжести, 3,5 - движение против силы тяжести отсутствует, 3,75 - дрожание мышц без движения, и 4 - паралич), стандартную группу рефлексов растяжения мышц (0 - нормально, 1 - снижено, 2 - отсутствует), а также прикосновение-давление, вибрацию, положение и движение сустава и булавочный укол (все оценивается на указательном пальце и большом пальце ноги: 0 - нормально, 1 - уменьшено, 2 - отсутствует). Оценки корректируются с учетом возраста, пола и физической подготовки.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, замедляют прогрессирование заболевания, так что скорость увеличения показателя по шкале NIS снижается по сравнению с субъектом, который не принимает соединение 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, останавливают прогрессирование заболевания, так что не отмечается изменений показателя MS после лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель NIS после лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель NIS по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель NIS по меньшей мере на 5% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель NIS по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель NIS на по меньшей мере 15% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают улучшенный показатель по модифицированной шкале невропатических нарушений (mNIS+7). mNIS+

относится к основанной на клиническом обследовании оценке неврологических нарушений (NIS) в сочетании с электрофизиологическим анализом функции малых и крупных нервных волокон (NCS и QST) и измерением вегетативной функции (постуральное артериальное давление). Шкала mNIS+7 является модификацией шкалы NIS+7 (которая представляет собой NIS плюс семь тестов). NIS+7 анализирует слабость и рефлексы растяжения мышц. Пять из семи тестов включают характеристики нервной проводимости. Этими характеристиками являются амплитуда электрически вызванного мышечного ответа малоберцового нерва, скорость проводимости двигательного нерва и дистальная латентность двигательного нерва (MNDL), большеберцовая MNDL и амплитуда потенциала действия сенсорного нерва икроножной мышцы. Эти значения скорректированы с учетом переменных возраста, пола, роста и массы тела. Остальные два из семи тестов включают определение порога вибрации и снижение частоты сердечных сокращений при глубоком дыхании. Показатель mNIS+7 модифицирует NIS+7 для учета использования "Умного" соматотопического количественного анализа чувствительности, новых вегетативных оценок и применения амплитуды электрически вызванного мышечного ответа локтевого, малоберцового и большеберцового нервов, а также потенциалов действия сенсорных локтевых и икроножных нервов (Suangprasert, N. et al., Retrospective study of a TTR FAP cohort to modify NIS+7 for therapeutic trials, *J. Neurol. Sci.*, 2014. 344(1-2): pgs. 121-128). Дополнительные сведения об анализе mNIS+7 можно найти в US 2017/0307608, содержание которого включено в настоящую заявку в качестве ссылки для всех целей.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, замедляют прогрессирование заболевания, так что скорость увеличения показателя mNIS+7 снижается по сравнению с субъектом, который не принимает соединение 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, останавливают прогрессирование заболевания, так что не отмечается изменений показателя mNIS+7 после лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель mNIS+7 после лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель mNIS+7 по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель mNIS+7 по меньшей мере на 5% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель mNIS+7 по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, снижают показатель mNIS+7 по меньшей мере на 15% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают улучшенные показатели по Норфолкскому опроснику качества жизни при диабетической невропатии (QOL-DN). Этот опросник хорошо известен специалисту в данной области техники и представляет собой проверенный вопросник, который фиксирует боль, связанную с большими волокнами, мелкими волокнами и вегетативной невропатией. Анкета включает вопросы, связанные с симптомами, которые испытывает субъект, и вопросы, связанные с влиянием невропатии на повседневную деятельность субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, замедляют прогрессирование заболевания, так что скорость снижения показателя по Norfolk QOL-DN уменьшается по сравнению с субъектом, не принимающим соединение 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, останавливают прогрессирование заболевания таким образом, что не наблюдается изменений показателя Norfolk QOL-DN после лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, замедляют прогрессирование заболевания, так не наблюдается изменений показателя Norfolk QOL-DN после лечения соединением 1.

В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают показатель Norfolk QOL-DN после лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают показатель Norfolk QOL-DN по меньшей мере на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 или 60% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают показатель Norfolk QOL-DN по меньшей мере на 5% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают показатель Norfolk QOL-DN по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, улучшают показатель Norfolk QOL-DN по меньшей мере на 15% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1. В некоторых вариантах осуществления способы, описанные в настоящей заявке, обеспечивают изменение показателя Norfolk QOL-DN у субъекта примерно на -1,5; -2,0; -2,5; -3,0; -3,5; -4,0; -4,5; -5,0; -5,5; -6,0; -6,7; -7,0; -7,5; -8,0; -8,5; -9,0; -9,5 или -10,0 по сравнению с базовыми показателями субъекта.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают

улучшенный показатель по комбинированной шкале оценки вегетативных симптомов (COMPASS-31). Комбинированная шкала оценки вегетативных симптомов (COMPASS-31) - это опросник пациента, который оценивает симптомы дисавтономии. В одном варианте осуществления способы по изобретению обеспечивают субъекту улучшение по сравнению с исходным уровнем по шкале COMPASS-31. Такое улучшение может принимать форму увеличения по меньшей мере на 0,1, например, по меньшей мере на 0,2, по меньшей мере на 0,3, по меньшей мере на 0,4 или по меньшей мере на 0,5, например, на 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 или 0,5 балла по шкале COMPASS-31. В некоторых вариантах осуществления способы замедляют прогрессирование заболевания, так что нет изменений показателя COMPASS-31. В других вариантах осуществления способы по изобретению замедляют скорость уменьшения показателя COMPASS-31, например, скорость уменьшения показателя COMPASS-31 у субъекта, получавшего AG10, по сравнению со скоростью уменьшения показателя COMPASS-31 у субъекта, не получавшего AG10.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают улучшенный алиментарный статус, измеренный с помощью модифицированного индекса массы тела (МИМТ), который определяют путем умножения ИМТ индивидуумов на их уровни сывороточного альбумина. Расчет МИМТ учитывает вклад отека в общую массу тела. В одном варианте осуществления способы по раскрытию обеспечивают субъекту улучшение МИМТ по сравнению с исходным уровнем. Такое улучшение может принимать форму снижения показателя МИМТ примерно на 2, 5, 7, 10, 12, 15, 20 или примерно 25. В других вариантах осуществления способы останавливают увеличение показателя индекса МИМТ, например, способ обеспечивает 0% увеличения показателя МИМТ. В других вариантах осуществления способы по изобретению замедляют скорость увеличения показателя МИМТ, например, скорость увеличения показателя МИМТ у субъекта, получавшего AG10, по сравнению со скоростью увеличения показателя МИМТ у субъекта, который не получает AG10.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают улучшение в тесте на 10-метровую ходьбу. Этот тест измеряет скорость ходьбы людей на 10 м. В одном варианте осуществления способы, раскрытые в настоящем описании, обеспечивают испытуемому увеличение показателя 10-метровой ходьбы по сравнению с исходным уровнем. В некоторых вариантах осуществления изобретения увеличение от исходного уровня в тесте на 10-метровую ходьбу составляет примерно 0,025; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06; 0,07; 0,08; 0,09; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5 или примерно 5,0 м/с.

В некоторых вариантах осуществления способы, раскрытые в настоящей заявке, обеспечивают улучшенные показатели по шкале Дайка/Рэнкина. Показатель Дайка/Рэнкина известен в данной области техники и присваивается врачом после оценки симптомов пациента, невропатических нарушений, результатов тестов и анализа способности пациента выполнять повседневные действия. Классифицируется только инвалидность, связанная с периферической невропатией. При принятии решения о том, испытывает ли пациент трудности или неспособность выполнять определенные задачи или повседневные действия, для суждения следует использовать не только отчет пациента; врач должен использовать объективные критерии. Стадии (0-8) описаны ниже:

0. Нет невропатии

Отсутствие симптомов ($NSS < 1$), признаков ($NIS < 2$ баллов); или аномальных показателей (например, 7 тестов $< 97,5$) невропатии.

1. Минимальная невропатия (только один из А, В. С является аномальным)

- a) Тесты - единственное отклонение от нормы (например, 7-й тест $> 97,5$); или
- b) признаки невропатии - единственное отклонение от нормы (например, $NIS > 2$ баллов); или
- c) симптомы невропатии - единственное отклонение от нормы (например, $NSS > 1$).

2. Минимальная невропатия: 1a + 1b.

3. Симптоматическая невропатия: 1a, 1a+1c; 1a+1c или 1b+1c. Пациент может продолжать обычные повседневные дела, работать или отдыхать, а также выполнять обычные семейные и социальные обязанности.

* Симптомы невропатии: $NSS \geq 1$ симптомы мышечной слабости, атрофии или судорог; отрицательные или положительные невропатические сенсорные симптомы (N-NNS, P-NSS); или невропатические вегетативные симптомы.

Обычные повседневные действия, работа, отдых, социальная и семейная деятельность: несмотря на невропатические симптомы, пациент может работать в соответствии с его обычной деятельностью, выполнять свои обычные домашние обязанности и участвовать в рекреационных мероприятиях. Как правило, пациент может сохранять нормальную активность, несмотря на некоторые двигательные, сенсорные или вегетативные симптомы. Пациенты могут быть неспособны выполнять экстраординарные действия, например, соревновательные виды спорта, упражнения на выносливость и т.д.

4. Симптоматическая невропатия (определенная в п.3), мешающая и ограничивающая работу, обычные повседневные действия, рекреационную деятельность или семейные и социальные обязанности, но независимое функционирование возможно без посторонней помощи. При этом имеется недвусмысленное ограничение обычной* работы, жизненных или рекреационных, семейных или социальных обязанностей* из-за невропатии.

* Степень моторных, сенсорных или вегетативных симптомов или нарушений в достаточной степени ограничивает способность работать, выполнять обычные повседневные действия, рекреационные мероприятия, или выполнять семейные и обычные социальные обязанности. Использование трости или ортопедического устройства, вероятно, помещает пациента в эту (или более высокую) категорию, если только пациент не способен выполнять "обычные" повседневные действия, рекреационные мероприятия, и выполнять социальные и семейные обязанности (тогда они попадают в более низкую категорию).

5. Симптоматическая нейропатия (определенная в 3), ограничивающая повседневную жизнь, работу и отдых. Необходима помощь других лиц, обеспечивающих уход* ($<2\frac{1}{2}$ ч в сутки). Если использование инвалидной коляски является обязательным при выполнении повседневных, рекреационных действий или социальных и семейных обязанностей, пациент обычно получает этот или более высокий балл (>5).

* Помощь членов семьи или приходящей медсестры необходима для повседневной жизни (купание, бритье, чистка зубов, прием пищи и т.д.), ежедневный прием анальгетиков или опиатов, или помощь для контроля вегетативной дисфункции, который пациент не может выполнять адекватно или безопасно самостоятельно.

6. Симптоматическая нейропатия (описанная в п.3), требующая помощи лиц, обеспечивающих уход, от $>2,5$ ч до <8 ч в сутки, как описано в п.5.

7. Симптоматическая нейропатия (определенная в п.3), требующая помощи лица, обеспечивающего уход, >8 ч в сутки, но не постоянно, как на стадии 8.

8. Симптоматическая нейропатия (определенная в п.3), требующая постоянного ухода в отделении интенсивной терапии.

Период времени для применения будет зависеть от ряда факторов, включая конкретное заболевание, которое лечат. Например, в конкретных заболеваниях или состояниях, связанных с транстиретиновым (TTR) амилоидозом, существует генетический компонент, так что может потребоваться хроническое (т.е. непрерывное, долгосрочное) применение. Однако в некоторых вариантах осуществления применение соединения 1 у субъекта с генетическим заболеванием TTR амилоидозом будет продолжаться, пока субъект демонстрирует или испытывает симптомы, связанные с заболеванием или состоянием TTR амилоидоза, или в течение установленного периода времени после того, как достигается определенная конечная точка (например, уменьшение или полное устранение симптомов). Если симптомы заболевания TTR амилоидозом возвращаются или начинают появляться снова, применение соединения 1 начинают повторно.

Для субъектов с TTR амилоидозом, не обусловленным генетически, доступен ряд вариантов применения, которые будут зависеть от тяжести заболевания и представленных клинических симптомов. В некоторых вариантах осуществления необходимо длительное применение соединения 1. В некоторых вариантах осуществления необходимо более кратковременное или быстрое применение соединения 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения применение соединения 1 у субъекта с TTR амилоидозом, не обусловленным генетически, продолжают, пока субъект демонстрирует или испытывает симптомы, связанные с заболеванием или состоянием TTR амилоидоза, или в течение заданного периода времени после достижения определенной конечной точки (например, уменьшения или полного устранения симптомов). Если симптомы заболевания TTR амилоидозом возвращаются или начинают появляться снова, применение соединения 1 начинают повторно.

В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение по меньшей мере 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 дней или более. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 или 56 дней. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 28 дней. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 56 дней. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 84 дней.

В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение по меньшей мере 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 или 50 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 6 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 12 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 18 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 30 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 36 месяцев. В некоторых вариантах осуществления соединение 1 применяют в течение 42 месяцев.

Предпочтительно агенты, используемые в терапии диуретиками, не изменяют экспозицию AG10 во время лечения. Таким образом, пациентам, получающим терапию диуретиками, можно вводить AG10 без изменения или специальных режимов дозирования. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления субъект, получающий AG10, также получает дополнительное терапевтическое диуретическое сред-

ство. Агенты для диуретической терапии включают этакриновую кислоту, буметанид, фуросемид и торсемид, но не ограничиваются ими. В некоторых вариантах осуществления диуретик выбран из группы, состоящей из фуросемида или торсемида.

Фармацевтические композиции.

Соединение 1 можно получить в различных композициях, подходящих для доставки субъекту. Композиция, подходящая для применения у субъекта, обычно включает соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

Фармацевтические композиции для применения соединения 1 могут быть удобно представлены в стандартной лекарственной форме, и могут быть получены любым из способов, известных в области фармации и доставки лекарств. Все способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, содержащим один или несколько дополнительных ингредиентов. Как правило, фармацевтические композиции получают путем равномерного и тщательного объединения активного ингредиента с жидким носителем или тонкоизмельченным твердым носителем, или с обоими, а затем, если необходимо, придания продукту формы необходимой композиции.

Подходящие составы для использования в настоящем изобретении можно найти в Remington: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21st Ed., Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2003), включенном в настоящую заявку в качестве ссылки. Описанные здесь фармацевтические композиции могут быть изготовлены способом, который известен специалистам в данной области техники, то есть с помощью обычных процессов смешивания, растворения, гранулирования, дражирования, измельчения, эмульгирования, инкапсулирования, улавливания или лиофилизации. Нижеуказанные способы и вспомогательные вещества являются просто примерными и никоим образом не ограничивают изобретение.

Соединение 1 можно включать в различные составы для терапевтического применения. Более конкретно, соединение 1 может быть включено в фармацевтические композиции, вместе или отдельно, с использованием соответствующих фармацевтически приемлемых носителей или разбавителей, и может быть включено в препараты в твердой, полутвердой, жидкой или газообразной формах, таких как таблетки, капсулы, пилюли, порошки, гранулы, драже, гели, суспензии, мази, растворы, суппозитории, инъекции, ингалянты и аэрозоли. Таким образом, применение соединения по настоящему изобретению может осуществляться различными способами, включая пероральное, трансбуккальное, парентеральное, внутривенное, внутрикожное (например, подкожное, внутримышечное), трансдермальное введение, и т.д. Более того, соединение 1 можно применять местным, а не системным образом, например, в форме депо или состава замедленного высвобождения.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция или каолином, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с водной или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом. Кроме того, эмульсии могут быть приготовлены с ингредиентом, не смешивающимся с водой, таким как масла, и стабилизированы поверхностно-активными веществами, такими как моно- и диглицериды, сложные эфиры ПЭГ и т.п.

Водные суспензии содержат активные вещества в смеси с вспомогательными веществами, подходящими для производства водных суспензий. Такие вспомогательные вещества представляют собой суспендирующие агенты, например карбоксиметилцеллюлозу натрия, метилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и аравийскую камедь; диспергирующие или смачивающие агенты могут быть натуральным фосфатидом, например лецитином, или продуктами конденсации алкиленоксида с жирными кислотами, например, полиоксиэтиленстеаратом, или продуктами конденсации этиленоксида с алифатическими спиртами с длинной цепью, например гептадекаэтиленоксицетанолом, или продуктами конденсации этиленоксида с частичными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола, такими как полиоксиэтиленсорбитан моноолеат, или продуктами конденсации этиленоксида с частичными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола, например, полиэтиленсорбитан моноолеатом. Водные суспензии могут также содержать один или несколько консервантов, например, этил или н-пропил, п-гидроксibenзоат, один или несколько красителей, один или несколько ароматизаторов, и один или несколько подсластителей, таких как сахароза или сахарин.

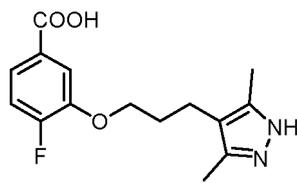
Диспергируемые порошки и гранулы, подходящие для приготовления водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов уже упомянуты выше. Также могут присутствовать дополнительные вспомогательные вещества, например, подсластители, ароматизаторы и красители.

Фармацевтические дозированные формы.

Настоящее описание включает фармацевтические дозированные формы соединения 1 или его фармацевтически приемлемые формы. Описанные в настоящей заявке дозированные формы подходят для перорального введения субъекту. Дозированная форма может быть в любой форме, подходящей для пе-

рорального введения, включая капсулу или таблетку, но не ограничиваясь ими.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения предлагается единичная дозированная форма в виде капсулы или таблетки, содержащая 10-1000 мг соединения 1, имеющего формулу:



или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 составляет примерно от 100 до 800 мг. В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 составляет примерно от 150 до 600 мг. В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 составляет примерно от 200 до 400 мг. В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 составляет примерно 200 мг. В некоторых вариантах осуществления количество соединения 1 составляет примерно 400 мг. В некоторых вариантах осуществления капсула или таблетка с одной дозой содержат HCl-соль соединения 1.

В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма соединения 1 представляет собой таблетку.

В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма соединения 1 представляет собой капсулу.

В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 0, № 1, № 2, № 3, № 4 или № 5. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 0. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 1. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 2. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 3. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 4. В некоторых вариантах осуществления единичная дозированная форма находится в капсуле размера № 5.

Наборы.

Описание также включает наборы, содержащие фармацевтические композиции и лекарственные формы по изобретению.

В некоторых аспектах настоящее изобретение обеспечивает набор, который включает соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль. Некоторые из описанных в настоящей заявке наборов включают этикетку, описывающую способ применения соединения 1. Некоторые из описанных в настоящей заявке наборов включают этикетку, описывающую способ лечения транстретинового (TTR) амилоидоза. В некоторых вариантах осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, включают этикетку с описанием способа лечения транстретиновой амилоидной кардиомиопатии, обусловленной транстретином дикого типа (ATTR-CM, также называемой сенильным системным амилоидозом). В некоторых вариантах осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, включают этикетку, описывающую способ лечения семейной амилоидной кардиомиопатии (ATTR-mCM). В некоторых вариантах осуществления наборы, описанные в настоящей заявке, включают этикетку, описывающую способ лечения семейной амилоидной полинейропатии (ATTR-PN, также называемой FAP).

Композиции по настоящему изобретению включают композиции, содержащие соединение 1 в бутылке, банке, флаконе, ампуле, тубе, блистерной упаковке или другой системе герметизации контейнера, одобренной Управлением по контролю продуктов питания и лекарственных средств (FDA) или другим регулирующим органом, способной обеспечить одну или несколько стандартных доз, содержащих соединение 1 или его фармацевтически приемлемую соль, но не ограничиваются ими. К упаковке или дозатору может также прилагаться уведомление, связанное с контейнером, в форме, предписанной государственным органом, регулирующим производство, использование или продажу фармацевтических препаратов, причем уведомление указывает на одобрение со стороны агентства. В некоторых аспектах набор может включать состав или композицию, как описано в настоящей заявке, систему герметизации контейнера, включающего состав, или одну или несколько единичных дозированных форм, включающих состав, и уведомление или инструкции, описывающие способ применения, как описано в настоящей заявке.

Упаковочные системы, такие как блистерные упаковки, включают термоформованную жесткую пленку или ПВХ, подходящие для фармацевтической упаковки, и крышку проталкиваемого типа. Крышка может включать фольгу, состоящую из грунтовки/алюминия/термосвариваемого покрытия, или может быть на бумажной основе. Специалист в данной области техники легко приготовит блистерные упаковки, содержащие соединение 1. Описанные в настоящей заявке бутылочные системы могут быть различных размеров (например, 75 см³, 100 см³, 200 см³ и т.д.), и обычно включают крышки, защищающие от доступа детей, которые могут быть изготовлены из полипропилена. В некоторых вариантах осуществле-

ния фармацевтическая лекарственная форма соединения 1 упакована во флаконы объемом 75 см³ с крышкой, защищенной от доступа детей. Специалист в данной области может легко приготовить описанные здесь бутылочные системы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее раскрытие предоставляет наборы для дозирования дважды в сутки. Эти наборы обеспечивают одну или несколько стандартных доз, содержащих соединение 1, для каждого применения.

В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет 800 мг, что означает, что 400 мг применяют при первой дозе, и 400 мг применяют во второй дозе. В некоторых вариантах осуществления две стандартные дозы, содержащие 200 мг соединения 1, применяют при первом приеме, и две стандартные дозы, содержащие 200 мг соединения 1, применяют при втором приеме. В некоторых вариантах осуществления одну стандартную дозу, содержащую 400 мг соединения 1, применяют при первом приеме, и одну стандартную дозу, содержащую 400 мг соединения 1, применяют при втором приеме. В некоторых вариантах осуществления применяют солевую форму, образованную соединением 1 и HCl.

В некоторых вариантах осуществления общая суточная доза соединения 1 составляет 1600 мг, что означает, что 800 мг применяют при первом приеме, и 800 мг применяют при втором приеме. В некоторых вариантах осуществления четыре стандартные дозы, содержащие 200 мг соединения 1, применяют при первом приеме, и четыре стандартные дозы, содержащие 200 мг соединения 1, применяют при втором приеме. В некоторых вариантах осуществления две стандартные дозы, содержащие 400 мг соединения 1, применяют при первом приеме, а две стандартные дозы, содержащие 400 мг соединения 1, применяют при втором приеме. В некоторых вариантах осуществления применяют солевую форму HCl соединения 1.

IV. Примеры.

Следующие ниже примеры предлагаются для иллюстрации, но не для ограничения заявленного изобретения.

Материалы и методы.

Были использованы следующие общие материалы и методы, где это указано, или их можно использовать в приведенных ниже примерах.

Определение концентрации AG10 в плазме крови.

Человеческую плазму, содержащую AG10 и внутренний стандарт AG10-D6, экстрагировали с помощью осаждения белка и анализировали с помощью Sciex API4000 ЖХ-МС-МС, снабженного колонкой для ВЭЖХ. Площадь пика иона продукта AG10 измеряли по сравнению с площадью пика иона продукта внутреннего стандарта AG10-D6. Количественное определение проводили с использованием линейного регрессионного анализа взвешенных наименьших квадратов $1/x^2$, полученных из калибровочных стандартов, приготовленных в день экстракции.

Анализ исключения флуоресцентного зонда (FPE).

Связывание AG10 в кармане связывания тироксина тетрамерного TTR определяли по способности флуоресцентного зонда (Зонд) ковалентно связываться со свободными сайтами связывания тетрамерного TTR в сыворотке в течение 6 ч реакции.

Аликвоты каждого образца сыворотки помещали в 96-луночные планшеты. Изменения флуоресценции ($\lambda_{ex}=328$ нм и $\lambda_{em}=384$ нм) после добавления зонда регистрировали каждые 15 мин с использованием флуоресцентного микропланшета в течение 6 ч при комнатной температуре.

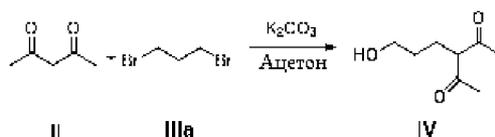
Вестерн-блоттинг для оценки стабилизации тетрамерного TTR.

Стабилизацию тетрамера TTR с помощью AG10 определяли путем сравнения количества тетрамерного белка TTR, остающегося после кислотной денатурации в течение 72 ч, с начальным количеством тетрамерного белка TTR, определяемым денситометрическим измерением гелей от вестерн-блоттинга.

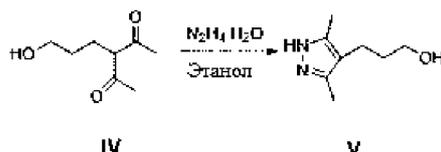
Образцы плазмы крови от субъекта разбавляли буфером для подкисления (ацетат натрия, KCl, ЭДТА, ДТТ, pH около 4,0) как для моментов времени 0 и 72 ч. Образцы времени 0 ч напрямую сшивали глутаровым альдегидом и затем гасили. 72-часовые образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 72 ч, а затем сшивали и гасили по тому же протоколу. Затем все образцы денатурировали путем добавления буфера для загрузки ДСН геля и кипятили перед загрузкой геля. Каждый образец разделяли в гелях ДСН-ПАГЭ и анализировали иммуноблоттингом с использованием анти-TTR антисыворотки (поликлональные кроличьи антитела против человеческого преальбумина, ДАКО Кат. № A0002). Плотность всех полос TTR количественно оценивали с использованием инфракрасной системы визуализации LICOR или системы флуоресцентной визуализации, и регистрировали. Нормализацию осуществляли по полосе IgG с использованием LICOR 925-32232 или Invitrogen 84546.

В экспериментах, таблицах и чертежах, более подробно обсуждаемых ниже, номинальное время взятия крови используют для всех фармакокинетических и фармакодинамических данных.

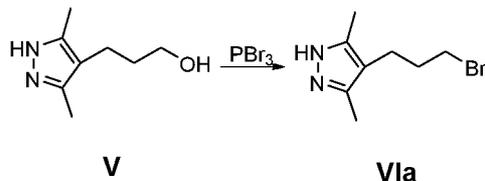
Пример 1. Приготовление AG10-HCl.



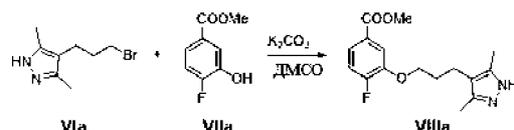
Соединение формулы IIIa (100 г; 495 ммоль; 1,0 экв.) растворяли в ацетоне (1 л). К вышеуказанному раствору добавляли соединение формулы II (49,59 г; 495 ммоль; 1,0 экв.) с последующим добавлением K_2CO_3 (82,14 г; 594,38 ммоль; 1,2 экв.) и KI (41,11 г; 247 ммоль; 0,5 экв.) при комнатной температуре при перемешивании. Реакционную смесь нагревали до $60 \pm 5^\circ C$ и перемешивали 40 ч при этой температуре. Реакционную смесь фильтровали и затем концентрировали при пониженном давлении с получением соединения формулы IV (102 г) в виде вязкой оранжевой жидкости.



Соединение формулы IV (100 г; 632 ммоль; 1,0 экв.) растворяли в этаноле (1 л). Гидразингидрат (87 г; 1738 ммоль; 2,75 экв.) и концентрированную HCl (4,6 мл; 0,2 экв.) добавляли к вышеуказанному раствору при комнатной температуре. Реакционную смесь нагревали до $75 \pm 5^\circ C$ и перемешивали в течение 3 ч при этой температуре. После завершения реакции по ТСХ (70% этилацетат: н-гексан, визуализация йодом) и наблюдения пика продукта в масс-спектре реакционную смесь концентрировали при пониженном давлении с получением соединения формулы V (70 г) в виде бесцветного жидкого сиропа, который использовали на следующем этапе.

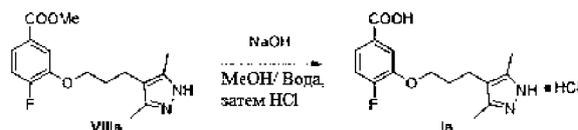


Соединение формулы V (35 г; 227 ммоль; 1,0 экв.) растворяли в 1,2-дихлорэтаноле (525 мл). PBr_3 (64,67 мл; 681 ммоль; 3 экв.) добавляли небольшими порциями при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь нагревали до $75 \pm 5^\circ C$ и перемешивали 3 ч при этой температуре. После завершения реакции по ТСХ (50% этилацетат: н-гексан, визуализация йодом) и наблюдения пика продукта в масс-спектре реакционную смесь разбавляли дихлорметаном (350 мл) и гасили насыщенным раствором $NaHCO_3$ до pH 7-8. Как органический, так и водный слой разделяли и собирали. Органический слой сушили над $MgSO_4$ и фильтровали. Фильтрат концентрировали при пониженном давлении, получая соединение формулы VIa (38 г) в виде вязкой оранжевой жидкости.



4-(3-Бромпропил)-3,5-диметил-1H-пиразол гидробромид (VIa) и ДМСО загружали в сосуд и перемешивали при $20 \pm 10^\circ C$ в течение 10 мин. Затем смесь нагревали до $55 \pm 5^\circ C$ при перемешивании. В эту смесь переносили перемешиваемый раствор, содержащий метиловый эфир 4-фтор-3-гидроксибензойной кислоты (VIIa), карбонат калия и безводный ДМСО. Раствор алкилбромидов в ДМСО медленно переносили для поддержания внутренней температуры $55,0 \pm 5^\circ C$. Добавление завершали через 6 ч, и смесь перемешивали при $55,0 \pm 5^\circ C$ в течение дополнительного часа. Смесь охлаждали до $25 \pm 5^\circ C$ в течение 30 мин и добавляли воду, поддерживая температуру ниже $25^\circ C$. Смесь экстрагировали этилацетатом, и водный слой снова экстрагировали этилацетатом. Объединенные этилацетатные растворы промывали рассолом. Объединенные растворы от промывания этилацетатом концентрировали под вакуумом до минимального объема и добавляли гептан, который осаждал VIIIa. Смесь нагревали до $75 \pm 5^\circ C$ и выдерживали при перемешивании в течение 1 ч. Смесь охлаждали до $25 \pm 5^\circ C$ в течение двух часов, и полученные твердые частицы собирали фильтрацией. Осадок на фильтре промывали этилацетатом в гептане (30%). Выделенные твердые частицы сушили в токе азота. Твердые вещества загружали в сосуд и объединяли с этилацетатом и гептаном. Полученную смесь нагревали до $75 \pm 5^\circ C$ для растворения твердых веществ. Раствор охлаждали до $25 \pm 5^\circ C$ в течение двух часов, и полученные твердые частицы собирали фильтрацией. Твердые вещества промывали смесью растворителей 30% этилацетат/гептан и сушили в вакуумном су-

шильном шкафу при 55°C, чтобы получить VIIa с чистотой >99,5%.



В стеклянный сосуд с рубашкой загружали соединение формулы VIIa (1,0 экв.) и метанол. Смесь охлаждали при перемешивании до 10±5°C, и в течение 20 мин загружали водный раствор гидроксида натрия (3 экв.). Смесь выдерживали при перемешивании при 20±5°C в течение не менее 2 ч, после чего реакцию завершали. Перемешивание прекращали и добавляли воду. Затем метанол удаляли перегонкой в вакууме при внутренней температуре не более 35°C. Полученный концентрированный прозрачный водный раствор охлаждали до 10°C и добавляли концентрированную HCl до тех пор, пока pH не снижался до 1,4-1,6 (pH-метр) для осаждения соли HCl. Твердые вещества собирали фильтрацией, промывали 0,2н. HCl и сушили в вакууме при 50°C с получением соединения формулы Ia с чистотой не менее 99,5%.

Пример 2. Клинические испытания фазы 1.

Исследование AG10-001 представляло собой двухчастное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое испытание с однократной и многократной возрастающей дозой, первое на людях, проведенное на здоровых взрослых добровольцах для оценки безопасности, переносимости, ФК и ФД AG10 после однократного и многократного приема. Это исследование также было разработано для оценки влияния приема пищи на ФК AG10.

Часть А представляла собой схему однократной возрастающей дозы (SAD), в которой 4 группы из 8 здоровых мужчин и/или женщин были произвольно распределены в группу AG10 или соответствующую группу плацебо в общем соотношении 3:1.

Часть В представляла собой схему многократной возрастающей дозы (MAD), где 3 группы из 8 здоровых мужчин и/или женщин были произвольно распределены в группу AG10 или группу плацебо в соотношении 3:1 в течение 12 дней приема доз. В общей сложности 4 группы, включающие 8 здоровых субъектов каждая (всего 32 субъекта, 24 получали дозу AG10 HCl и 8 - соответствующего плацебо), получавшие возрастающие дозы 50 мг, 150 мг, 300 мг и 800 мг препарата из слепого испытания, завершили часть исследования SAD. Одна из групп SAD получила две дозы по 300 мг: одну натощак, а другую после экспериментального завтрака с высоким содержанием жиров после соответствующего периода вымывания. Три группы, включающие 8 здоровых субъектов каждая (всего 24 субъекта, 18 получали дозу AG10 HCl и 6 - соответствующее плацебо), получавшие 100 мг, 300 мг или 800 мг препарата из слепого испытания каждые 12 ч в течение 12 дней, завершили часть испытания MAD.

Однократная нарастающая доза.

ФК профили, наблюдаемые для здоровых субъектов, получавших 50 мг AG10 HCl (группа SAD 1), 150 мг AG10 HCl (группа SAD 2), 300 мг AG10 HCl (группа SAD 3) и 800 мг AG10 HCl (группа SAD 4) показывают, что AG10 быстро абсорбируется при пероральном приеме со средним значением T_{max} менее одного часа и периодом полужизни около 22-27 ч. В табл. 1 перечислены средние геометрические параметры ФК для групп SAD 1-4. Кроме того, как показано на фиг. 1, существует умеренная межсубъектная вариабельность ФК в группах SAD 1-4, причем % KB для C_{max} находится в диапазоне от 10,0% до 41,9%, а % KB для AUC_{inf} находится в диапазоне от 12,5% до 40,4%.

Таблица 1

Средние геометрические значения параметров ФК для групп SAD 1-4

Доза (мг)	$T_{1/2}$ (ч)	T_{max} (ч)	C_{max} (мкМ)	C_{24} (мкМ)	AUC_{0-24} (ч * мкМ)	AUC_{last} (ч * мкМ)	AUC_{inf} (ч * мкМ)
50	25.0 ± 2.91	0.891 ± 0.736	7.20 ± 0.720	1.05 ± 0.130	58.9 ± 4.09	95.0 ± 11.8	97.1 ± 12.1
150	25.1 ± 3.58	0.849 ± 0.970	11.3 ± 4.76	1.78 ± 0.465	93.0 ± 16.8	166 ± 46.0	168 ± 46.8
300	22.0 ± 5.94	0.707 ± 0.274	15.1 ± 3.60	2.19 ± 0.435	100 ± 9.76	186 ± 73.8	191 ± 77.0
800	26.8 ± 8.48	0.794 ± 0.258	37.8 ± 11.3	4.51 ± 0.565	176 ± 27.7	410 ± 81.7	414 ± 87.5

Значения - среднее геометрическое ± SD.

Кроме того, как показано на фиг. 2 (показана группа 3), часть исследования SAD, посвященная влиянию пищи, показала минимальное влияние пищи на фармакокинетику AG10 с небольшим снижением C_{max} и небольшим увеличением T_{max} в состоянии после приема пищи по сравнению с приемом натощак, но в целом нет значительного изменения воздействия, как определено посредством AUC_{0-24} . Данные ФК для группы 3 показаны ниже в табл. 2.

Таблица 2

Параметры ФК для группы 3 SAD с приемом препарата с пищей и натошак

Условие	T _{max} (ч)	C _{max} (мкМ)	C ₂₄ (мкМ)	AUC ₀₋₂₄ (мкМ*ч)
Натошак				
Среднее геометрическое	0,707	15,1	2,19	99,6
Стандартное отклонение	0,274	3,60	0,43	9,76
% KB	38,7	23,8	19,8	9,80
С приемом пищи				
Среднее геометрическое	1,59	10,2	2,69	111
Стандартное отклонение	1,17	2,31	0,57	13,7
% KB	73,6	22,6	21,3	12,3

Все данные представлены в виде среднего геометрического значения.

Множественная нарастающая доза.

Фармакокинетические графики для группы 1 MAD (здоровые субъекты, получавшие 100 мг AG10 HCl каждые 12 ч в течение 12 дней), группы 2 (здоровые субъекты, получавшие дозу 300 мг AG10 HCl каждые 12 ч в течение 12 дней) и группы 3 (здоровые субъекты, получавшие 800 мг AG10 HCl каждые 12 ч в течение 12 дней) показаны на фиг. 3, и параметры ФК перечислены в табл. 3. Даже несмотря на то, что наблюдалась некоторая межсубъектная вариабельность значений C_{max} в каждой дозовой группе, значения AUC₀₋₁₂ были заметно схожими со значениями % KB в диапазоне от 8,8% до 22,2%. Никакого значительного накопления не наблюдалось в течение 12 дней приема дозы.

Таблица 3

Параметры ФК групп MAD 1-3

Доза	Статистика	День 1			День 12			Отношение накопления
		T _{max} (ч)	C _{max} (мкМ)	AUC ₀₋₁₂ (мкМ*ч)	T _{max} (ч)	C _{max} (мкМ)	AUC ₀₋₁₂ (мкМ*ч)	
100 мг каждые 12 ч	Средн. геом.	0.794	8.67	46.3	0.561	12.12	70.3	1.52
	SD	0.585	2.97	5.96	0.204	2.18	6.19	
	%CV	73.6	34.3	12.9	36.4	18.0	8.80	
300 мг каждые 12 ч	Средн. геом.	0.707	14.3	65.2	0.561	23.5	97.7	1.50
	SD	0.274	6.20	11.7	0.204	12.81	9.05	
	%CV	38.7	43.4	18.0	36.4	54.6	9.26	
800 мг каждые 12 ч	Средн. геом.	0.794	31.8	120	0.891	42.5	159	1.32
	SD	0.258	16.3	20.4	0.204	20.8	35.3	
	%CV	32.5	51.4	17.0	22.9	49.0	22.2	

Фармакодинамика AG10.

Фармакодинамические (ФД) свойства AG10 оценивали с использованием анализа исключения флуоресцентного зонда (FPE) и вестерн-блоттинга (как описано выше), оба из которых являются общепринятыми анализами связывания с мишенью TTR и стабилизации TTR.

Как показано на фиг. 4 и фиг. 5, данные анализа FPE подтверждают связывание с мишенью при однократной дозе 300 мг и 800 мг, с полной стабилизацией TTR при пиковых концентрациях и устойчивой стабилизацией до 12 ч, в диапазоне от 29% до 62% при дозе 300 мг и от 56% до 82% при 800 мг. Фиг. 6 показывает средний процент связывания с мишенью для каждой отдельной группы с возрастающей дозой как функцию времени; эти данные демонстрируют, что увеличение дозы усиливает стабилизацию. Аналогичным образом, вестерн-блоттинг (фиг. 7A-D) подтверждает полную стабилизацию TTR при пиковых концентрациях и устойчивую стабилизацию до 12 ч при однократной дозе 300 мг AG10 HCl. Результаты анализа FPE и вестерн-блоттинга для группы 3 SAD хорошо коррелируют с коэффициентом R²>0,9 (фиг. 8). Оба показателя фармакологической активности хорошо коррелируют друг с другом.

Кроме того, как показано на фиг. 9, 10 и 11 через 12 последовательных дней применения дозы AG10 HCl, 100 мг каждые 12 ч, 300 мг каждые 12 ч и 800 мг каждые 12 ч, данные анализа FPE подтверждают устойчивое связывание с мишенью в равновесном состоянии со средней стабилизацией TTR через 12 ч после введения дозы в последний день дозирования в диапазоне от 33% при дозе 100 мг каждые 12 ч до 89% при дозе 800 мг каждые 12 ч. На фиг. 12 показаны пиковый, средний и минимальный процент связывания TTR с мишенью в течение 12 дней приема в группе с 800 мг AG10 HCl каждые 12 ч.

На фиг. 13 показан вестерн-блоттинг TTR для трех субъектов из группы 3, получавших 800 мг AG10 HCl каждые 12 ч. Субъектам 1 и 3 вводили дозу AG10, субъект 2 получал плацебо. Дорожки, помеченные как 0 ч на 12-й день перед приемом дозы, содержат образцы минимального уровня AG10, соб-

ранные у субъектов после 11 дней введения дозы (всего 22 дозы). Дорожки, обозначенные как 12-й день после введения дозы, показывают образцы, собранные на пиковых уровнях после 23-й дозы AG10. Подкисление в течение 72 ч с последующей шивкой, ДСН-ПАГЭ и иммуноблоттингом, как описано выше, использовали для обнаружения стабилизации тетрамерного белка TTR. Субъект 2 не показывает оставшегося тетрамера TTR, как обнаружено в этом экспериментальном протоколе. Напротив, субъекты 1 и 3 демонстрируют полную стабилизацию тетрамерного TTR как на минимальном, так и на пиковом уровнях AG10.

Совокупные данные ФК-ФД от групп SAD и MAD, показанные на фиг. 14, демонстрируют предсказуемый и дозозависимый ФД-эффект AG10, измеренный с помощью анализа FPE у людей, которым вводили дозу AG10.

Резюме.

Приведенные здесь данные для AG10 подтверждают связывание с мишенью с полной стабилизацией TTR при пиковых концентрациях как после однократной, так и после многократной дозы с устойчивой стабилизацией до 12 ч.

Пример 3. Планируемые клинические испытания фазы 2.

Фаза 2 испытания планируется как рандомизированное многоцентровое двойное слепое параллельное групповое плацебо-контролируемое исследование с диапазоном доз для оценки безопасности, переносимости, ФК и ФД AG10 у пациентов с АТТН-СМ, на фоне стабильной терапии сердечной недостаточности. За скринингом и рандомизацией последует 28-дневный период слепого плацебо-контролируемого лечения. Планируется, что примерно 45 человек примут участие в испытании фазы 2. Синописис исследования фазы 2 представлен в табл. 4.

Таблица 4

Краткое содержание испытания фазы 2

ОБЗОР КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ: Исследование AG10	
Методология	Это проспективное, рандомизированное, многоцентровое, двойное слепое, параллельное групповое, плацебо-контролируемое исследование с диапазоном доз будет оценивать безопасность, переносимость, ФК и ФД AG10 по сравнению с плацебо, при введении на фоне терапии стабильной сердечной недостаточности. За скринингом и рандомизацией последует 28-
	дневный слепой плацебо-контролируемый период лечения.
Количество пациентов	Примерно 45
Тестируемый продукт, дозировка и способ введения	AG10 HCl, 400 и 800 мг два раза в сутки, пероральное введение
Продолжительность исследования и лечения	Продолжительность исследования: всего 58 дней (с 1-го дня до последнего курса лечения, проведенного на 28-й день), за которым следует контрольный визит на 30 день. Кроме того, будет 28-дневный период скрининга. Продолжительность лечения: 28 дней приема.
Референтная терапия, дозировка и способ применения	Таблетки плацебо, соответствующие AG10 HCl, два раза в сутки, перорально
Фармакокинетика/фармакодинамика Меры по отбору образцов	Образцы крови для ФК будут собраны в дни 1, 14, 28. Образцы крови для ФД будут собраны в дни 1, 14 и 28.

Пример 4. Энтальпийная стабилизация транстиретина с помощью AG10 имитирует естественную генетическую вариацию, которая защищает от транстиретинового амилоидоза.

В следующем примере описывается корреляция между энтальпическим связыванием AG10 и повышенной эффективностью в стабилизации мультибелковых комплексов.

Материалы и методы.

Изотермическая титровальная калориметрия (ИТС). Эксперименты по связыванию проводили с использованием MicroCal REAQ-ИТС при 25°C. Раствор лиганда (25 мкМ в ФБР pH 7,4, 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 2,5% ДМСО) готовили и титровали в ячейке ИТС, содержащей 2 мкМ TTR в идентичном буфере. 19 инъекций лиганда (2,0 мкл каждая) вводили в ячейку ИТС (при 25°C) до точки, когда TTR полностью насыщался лигандом. Калориметрические данные были построены и подогнаны с использованием стандартной модели связывания с одним сайтом. Для контроля мы протестировали изменение энтальпии, вызванное титрованием холостой пробы ДМСО в буфере в TTR, и полученные энтальпии связывания

составили <0,4 ккал/моль. Мы также использовали ИТС для титрования тафамидиса и AG10 против сывороточного альбумина человека (HSA). Значение K_d для тафамидиса (2,3 мкМ) было аналогичным тому, о котором сообщалось ранее ($K_d=2,5$ мкМ; Отчет об оценке ЕМА №ЕМА/729083/2011). Аффинность связывания AG10 была рассчитана около 8 мкМ, что также согласуется с нашими данными на фиг. 20 (где AG10 имеет более низкое связывание с альбумином по сравнению с тафамидисом).

Анализ FPE на связывание TTR в буфере и сыворотке крови человека или собаки.

Аффинность связывания и селективность AG10 и других стабилизаторов к TTR в буфере и сыворотке определяли по их способности конкурировать со связыванием зонда при исключении флуоресцентного зонда (зонда FPE) с TTR в буфере и сыворотке человека. Зонд FPE представляет собой тиоэфирный лиганд TTR, который сам по себе не является флуоресцентным, однако после связывания с сайтом связывания T_4 TTR он ковалентно модифицирует лизин 15 (K15), создавая флуоресцентный конъюгат. Лиганды, которые связываются с сайтом T_4 TTR, будут снижать связывание зонда FPE, что наблюдается по более низкой флуоресценции. Анализ FPE был также адаптирован для использования с собачьей сывороткой. FPE с TTR в буфере: аликвоту 98 мкл TTR в ФБР (pH 7,4, конечная концентрация: 2,5 мкМ) смешивали с 1 мкл тестируемых соединений (2,5 мкМ) и 1 мкл зонда FPE (0,18 мМ исходный раствор в ДМСО: конечная концентрация: 1,8 мкМ). Изменение флуоресценции ($\lambda_{ex}=328$ нм и $\lambda_{em}=384$ нм) отслеживали с использованием спектрофотометра для микропланшетов (SpectraMax M5) в течение 6 ч при комнатной температуре. FPE с TTR в сыворотке человека и собаки: аликвоту 98 мкл объединенной сыворотки человека (приготовленной из плазмы мужчины AB, Sigma; номер по каталогу H4522; концентрация TTR 5 мкМ) или собачьей сыворотки (Innovative Research, номер по каталогу: IBG-SER; концентрация TTR 4,6 мкМ) смешивали с 1 мкл тестируемых соединений [Все соединения получали в виде 10 мМ исходных растворов в ДМСО и соответственно разбавляли ДМСО (конечные концентрации в сыворотке составляли: AG10 10 мкМ; дифлунизал 200 мкМ; тафамидис 20 мкМ; толкапон 20 мкМ)], и добавляли 1 мкл зонда FPE (исходный раствор 0,36 мМ в ДМСО: конечная концентрация: 3,6 мкМ). В случае собачьей сыворотки (после перорального применения AG10) в каждую лунку добавляли 1 мкл зонда FPE и 1 мкл ДМСО, и смешивали с 98 мкл соответствующего образца собачьей сыворотки. Изменение флуоресценции ($\lambda_{ex}=328$ нм и $\lambda_{em}=384$ нм) определяли с использованием спектрофотометра для микропланшетов (SpectraMax M5) в течение 6 ч при комнатной температуре.

Исследования стабильности TTR в сыворотке с помощью иммуноблоттинга. Вестерн-блоттинг проводили, как сообщалось ранее. Все соединения получали в виде 10 мМ исходных растворов в ДМСО и соответственно разбавляли ДМСО (конечные концентрации в сыворотке составляли: AG10 10 мкМ; дифлунизал 200 мкМ; тафамидис 20 мкМ; толкапон 20 мкМ). 2 мкл каждого соединения добавляли к 98 мкл сыворотки крови человека (концентрация TTR 5 мкМ). Образцы инкубировали при 37°C в течение 2 ч, а затем 10 мкл образцов разбавляли 1:10 буфером для подкисления (pH 4,0, 100 мМ ацетат натрия, 100 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ). Вестерн-блоттинг также проводили в буфере из мочевины (pH 7,4), как сообщалось ранее. Образцы инкубировали при комнатной температуре в течение 72 ч, сшивали глутаровым альдегидом (конечная концентрация 2,5%) в течение 5 мин, а затем гасили 10 мкл 7% раствора борогидрида натрия в 0,1 М NaOH. Все образцы денатурировали добавлением 100 мкл загрузочного буфера для ДСН геля и кипятили в течение 5 мин. 10 мкл каждого образца разделяли в 12% геле ДСН-ПАГЭ и анализировали иммуноблоттингом с использованием анти-TTR-антисыворотки (DAKO A0002, разведение 1:10 000 для сыворотки человека и 1:2000 для сыворотки собаки). Комбинированная интенсивность полос TTR (тетрамер TTR и тетрамер, связанный с RBP) была определена количественно с использованием системы визуализации Odyssey IR (LI-COR Bioscience) и представлена в виде процентного содержания тетрамера TTR относительно плотности тетрамера TTR контроля ДМСО через 0 ч (считается 100% стабилизацией) и 72 ч (остается от 10% до 35% TTR). Процент стабилизации тетрамера рассчитывали как

$$100 \times \left[\frac{\text{плотность тетрамера и тетрамера+RBP, 72 ч}}{\text{плотность тетрамера и тетрамера+RBP ДМСО, 0 ч}} \right].$$

Структурные исследования и моделирование *in silico*.

Анализ кристаллических структур TTR был проведен на четырех кристаллических структурах TTR, полученных с сайта RCSB PDB. Биологические сборки тетрамеров TTR были сконструированы с использованием рентгеновской кристаллографической информации об элементарной ячейке, приведенной в файлах pdb. Когда предлагается несколько моделей, использовали модель первого выбора. Были использованы начальные геометрические формы AG10 и его четырех производных (1, 2, 3 и 4), построенные с помощью Molden38, и были выполнены оптимизации геометрии на уровне гибридного функционала плотности B3LYP с базисным набором 6-311 + G(d) с использованием программного пакета Gaussian'09 (Валлингфорд, Коннектикут, США: Gaussian, Inc., 2009). Расчеты частоты для оптимизированных геометрий были выполнены, чтобы убедиться, что они не имеют мнимых частот. Для экспериментов по докингу использовали программу Dock 6. Кристаллическую структуру мутантного комплекса TTR V122I с AG10 (pdb id: 4HIQ) использовали в качестве рецептора. Тетрамерный TTR был построен с использованием кристаллографических данных, растворитель и другие гетероатомы были удалены, и была выбрана одна большая стыковочная решетка, включающая сайты связывания T_4 . Для всех экспериментов по до-

кинг использовали один и тот же рецептор и решетку. Докинг гибкого лиганда проводили для обеспечения возможности вращения вокруг торсионных углов. Пакет UCSF Chimera использовали для визуализации и анализа трехмерных структур.

Связывание AG10 и тафамидиса с сывороточным альбумином человека. Тестируемые соединения (AG10 или тафамидис; оба в концентрации 30 мкМ) инкубировали с человеческим сывороточным альбумином (HSA; 600 мкМ; альбумин из человеческой сыворотки; Sigma Aldrich, номер по каталогу: A3782) в буфере для анализа (10 мМ фосфат натрия, 100 мМ KCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7,6) в течение 1 ч при 37°C. 500 мкл раствора альбумина человека и смеси AG10 или тафамидиса в аналитическом буфере подвергали гель-фильтрации на колонках PD Minitrap G25 (GE Life Sciences, кат.№ 45-001-529) под действием силы тяжести, а фракции, содержащие HSA, были идентифицированы с помощью NanoDrop™. Концентрацию HSA (т.е. концентрацию в нулевой момент времени) также определяли с помощью NanoDrop™ (на основе калибровочных кривых известных концентраций HSA). Концентрация HSA составляла 351 мкМ для образца тафамидиса и 345 мкМ для образца AG10. Концентрацию тестируемых соединений в этих фракциях (т.е. концентрацию в нулевой момент времени) оценивали с помощью ВЭЖХ (на основе калибровочных кривых известных концентраций тестируемых соединений). Затем 500 мкл каждого образца HSA/тестируемого соединения добавляли в кассету для диализа Slide-A-Lyzer G2 (3,5K MWCO, Thermo Scientific, кат. № P187722). Кассеты для диализа помещали в 100 мл буфера для анализа и перемешивали при комнатной температуре. Через 24 ч образцы удаляли из диализной кассеты и измеряли объем. Концентрацию раствора альбумина человека и тестируемых соединений определяли с помощью NanoDrop™ и ВЭЖХ, как описано выше.

Диализ комплекса AG10.

TTR. AG10 (10 мкМ) инкубировали с человеческим TTR дикого типа (5 мкМ; очищен из плазмы человека; Sigma Aldrich, кат.№ P1742) в буфере для анализа (10 мМ фосфат натрия, 100 мМ KCl и 1 мМ ЭДТА, pH 7,6) в течение 1 ч при 37°C. Затем 500 мкл каждого раствора AG10/TTR добавляли в кассету для диализа Slide-A-Lyzer G2. Кассеты для диализа помещали в 100 мл буфера для анализа и перемешивали при комнатной температуре. Образцы из буфера для диализа были взяты в разные моменты времени (0; 0,5; 1; 2; 6 и 24 ч). Через 24 ч образцы удаляли из диализной кассеты, измеряли объем и нормализовали результаты. Концентрацию TTR и AG10, полученных из буфера для анализа, определяли с помощью NanoDrop™ и ЖХ-МС, соответственно.

Селективность AG10 и тафамидиса к TTR по сравнению с другими белками сыворотки. Анализ FPE был модифицирован и выполнен с использованием очищенного человеческого TTRwt (5 мкМ). Другие сывороточные белки добавляли либо по отдельности, либо в комбинации [фибриноген (5 мкМ), альбумин (600 мкМ), IgG (70 мкМ), трансферрин (25 мкМ)] к смеси TTR и FPE, и флуоресценцию отслеживали в течение 6 ч, как описано выше. Процент связывания зонда FPE с TTR в присутствии белков сыворотки, измеренный после 3 ч инкубации, использовали для расчета % связывания TTR.

7-дневное повторное пероральное введение AG10 собакам. 16 самцов (M) и 16 самок (F) собак породы бигль разделяли на четыре группы лечения, и перорально вводили через желудочный зонд носитель (6 самцов/6 самок при 0 мг/кг) или AG10 в 0,5% составе метилцеллюлозы (2 самца/2 самки в дозе 50 мг/кг, 2 самца/2 самки в дозе 100 мг/кг и 6 самцов/6 самок в дозе 200 мг/кг); всего использовали 32 собаки. Кровь (приблизительно 1,5 мл) собирали из яремной вены в пробирки для разделения сыворотки в 1 день исследования (перед введением дозы D1), в 7 день исследования перед введением дозы (перед введением дозы D7) и через 1 ч после введения дозы в 7 день исследования (после введения дозы D7). Эти образцы сыворотки были проанализированы на предмет занятости TTR с использованием анализа FPE, описанного выше.

Однократные пероральные дозы AG10 у собак для определения зависимости "воздействие-эффект" (ФК-ФД) в отношении связывания и стабилизации TTR. 4 самца и 4 самки собак породы бигль, разделенных на две группы лечения (n=2/пол/группа), всего 8 собак, были оценены для получения одновременных фармакокинетических (ФК) и фармакодинамических (ФД) данных по связыванию AG10 и стабилизации TTR. Каждое животное получало перорально через желудочный зонд (ПО) однократную дозу 5 или 20 мг/кг в 0,5% метилцеллюлозе. Кровь собирали и анализировали до введения дозы и через 2, 4, 6, 8, 12 и 24 ч после введения дозы. Концентрацию AG10 в этих образцах сыворотки анализировали с помощью ЖХ-МС, а занятость TTR - с помощью анализа FPE.

Статистический анализ. Все результаты выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Весь статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad PRISM. Достоверность различий измеряли с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим тестом множественного сравнения Тьюки (n.s., недостоверно; *p≤0,05; **p≤0,01; ***p≤0,001).

Химия. Общая информация. Все реакции проводили в атмосфере аргона с использованием сухих растворителей в безводных условиях, если не указано иное. Используемые растворители были марки ACS от Fisher. Реагенты были приобретены у Aldrich and Fisher и использованы без дополнительной очистки. Реакции проверяли с помощью тонкослойной хроматографии (ТСХ), проводимой на пластинах силикагеля POLYGRAM® SIL 0,20 мм (арт. № 805023) с флуоресцентным индикатором UV254 с использо-

ванием УФ-света для визуализации. Нормально-фазовую колоночную флэш-хроматографию проводили с использованием силикагеля Davisil® (100-200 меш, Fisher). Спектры ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР регистрировали на спектрометре Jeol JNM-ECA600 и калибровали с использованием остаточного недегидрированного растворителя в качестве внутреннего стандарта. Константы взаимодействия (J) выражали в герцах. Для объяснения кратности использовали следующие сокращения: s=синглет, d=дублет, t=триплет, q=квартет, m=мультиплет. Масс-спектры высокого разрешения (МСВР) записывали с помощью JEOL DART AccuTOF (Прямой анализ в реальном времени). ВЭЖХ-анализ выполняли на системе ВЭЖХ Agilent серии 1100, подключенной к диодно-матричному детектору, работающему в УФ-диапазоне от 200 до 400 нм, и количественно определяли с помощью программного обеспечения Agilent Chemstation. Анализ ВЭЖХ выполняли как на колонке Waters™ XBridge C18 с насадкой L1 (4,6×250 мм, 5 мкм), так и на колонке Symmetric™ C4 (2,1×150 мм, 5 мкм) при температуре окружающей среды после инъекции 50 мкл каждого из контрольного буфера, стандарта и/или образца для получения хроматограммы. Подвижная фаза была получена из растворителя А, состоящего из метанола-воды (5:95, об./об.), содержащего 0,1% муравьиной кислоты, и растворителя В, состоящего из метанола-воды (95:5, об./об.), содержащего 0,1% муравьиной кислоты. Программа ВЭЖХ представляла собой метод разделения в градиенте, линейно возрастающем от 0% до 100% растворителя В от 0 до 20 мин, а затем поддерживаемого на 100% растворителя В до 30 мин.

Чистота ключевых соединений. Анализ ВЭЖХ выполняли на колонках с обращенной фазой как C18, так и C4. Чистота всех ключевых соединений составляла >95%. Описание анализа чистоты было включено в экспериментальный раздел. Подробная информация о ключевых соединениях ВЭЖХ (следы, время удерживания и % чистоты) включена в дополнительную информацию отредактированной рукописи.

Синтетические процедуры. AG10 и тафамидис были синтезированы, как сообщалось ранее. Толпапон и дифлунизал были приобретены у Fisher. Все аналоги AG10 получали, как описано ниже.

3-(3-(3,5-Диметил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)-4-йодобензойная кислота (1a).

Раствор метил-3-(3-бромпропокси)-4-йодобензоата (5a) (834 мг; 2,1 ммоль; 1 экв.) в бензоле (3 мл) по каплям добавляли к раствору ацетилацетона (0,43 мл; 4,2 ммоль; 2 экв.) и DBU (0,627 мл; 4,2 ммоль; 2 экв.) в бензоле (7 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 дня. Смесь фильтровали и концентрировали. К раствору этого промежуточного продукта в этаноле (5 мл) добавляли гидразингидрат (0,28 мл; 5,25 ммоль; 2,5 экв.) и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-20% MeOH/CH₂Cl₂) с получением метилового эфира соединения 1a. Гидроксид натрия (79 мг; 1,98 ммоль; 2 экв.) в воде (2,5 мл) добавляли к раствору промежуточного сложного эфира (412 мг; 0,99 ммоль) в метаноле (10 мл), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч (50°C). Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-5% MeOH/EtOAc) с получением соединения 1a (183 мг, выход 22% за три стадии); (чистота 98,3% по данным ВЭЖХ): t_R (колонка) (C18)=25,72 мин; t_R(C4)=16,06 мин. ¹H-ЯМР (CD₃OD, 600 МГц) δ 7,86 (d; 1H; J=8,4 Гц); 7,41 (d; 1H; J=1,2 Гц); 7,34 (dd; 1H; J=1,2 Гц и 8,4 Гц); 4,0 (t; 2H; J=6,0 Гц); 2,67 (t; 2H; J=7,2 Гц); 2,13 (s; 6H); 1,97-1,93 (m; 2H), ¹³C-ЯМР (CD₃OD; 600 МГц) δ 168,5; 157,6; 142; 139,2; 133,2; 123,1; 114; 117,8; 91,7; 67,5; 29,6; 18,7; 9,3; (HRMS (DART) m/z: рассчитано C₁₅H₁₇IN₂O₃ + H⁺ 401,0362; найдено 401,0347 (M+H⁺).

Метил-3-(3-(3,5-диметил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)-4-фторбензоат (2).

Раствор метил-3-(3-бромпропокси)-4-фторбензоата (5b) (780 мг; 2,69 ммоль; 1 экв.) в бензоле (3 мл) по каплям добавляли к раствору ацетилацетона (0,552 мл; 5,38 ммоль; 2 экв.) и DBU (0,804 мл; 5,38 ммоль; 2 экв.) в бензоле (7 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 дня. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-10% EtOAc/гексаны) с получением алкилированного промежуточного соединения, которое использовали непосредственно на следующей стадии. К раствору этого промежуточного продукта в этаноле (5 мл) добавляли гидразингидрат (0,36 мл; 6,73 ммоль; 2,5 экв.), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-20% MeOH/CH₂Cl₂) с получением соединения 2 (288 мг, выход 35%); (чистота 96,3% по данным ВЭЖХ): t_R (колонка) (C18)=25,11 мин; t_R (C4)=14,03 мин. ¹H-ЯМР (CD₃OD; 600 МГц) δ 7,63-7,58 (m; 2H); 7,19-7,15 (m; 1H); 4,00 (t; 2H; J=6,0 Гц); 3,86 (s; 3H); 2,58 (t; 2H; J=7,2 Гц); 2,12 (s; 6H); 1,97-1,92 (m; 2H), ¹³C-ЯМР (CD₃OD; 600 МГц) δ 168,1; 158,4; 156,7; 148,9; 128,5; 124,6; 117,6; 117,0; 115,6; 69,4; 53,3; 31,1; 20,2; 10,9; HRMS (DART) m/z: рассчитано для C₁₆H₁₉FN₂O₃ + H⁺ 307,1458; найдено 307,1463 (M+H⁺).

4-Фтор-3-(3-(1,3,5-триметил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)бензойная кислота (3).

К раствору 2 (21 мг; 0,07 ммоль; 1 экв.) в ДМФА (3 мл) добавляли гидрид натрия (5 мг; 0,21 ммоль; 3 экв.) и метилиодид (17 мкл; 0,28 ммоль; 4 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 2 ч. Смесь экстрагировали рассолом, фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 0,5-2% MeOH/EtOAc) с получением алкилирован-

ного промежуточного соединения, которое непосредственно использовали на следующей стадии. Гидроксид натрия (5,6 мг; 0,14 ммоль; 2 экв.) в воде (0,5 мл) добавляли к раствору алкилированного промежуточного соединения в метаноле (2 мл), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч (50°C). Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-5% MeOH/EtOAc) с получением соединения 3 (11 мг, выход 52% для двух стадий); (чистота 97,8% по данным ВЭЖХ): t_R (колонок) (C18)=25,25 мин; t_R (C4)=15,71 мин. ^1H -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 7,58-7,51 (m; 2H); 7,10-7,06 (m; 1H); 3,92 (t; 2H; $J=6,0$ Гц); 3,56 (s; 3H); 2,49 (t; 2H; $J=7,2$ Гц); 2,05 (s; 3H); 2,01 (s; 3H); 1,83-1,88 (m; 2H), ^{13}C -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 168,1; 154,6; 146,8; 145,3; 137,2; 128,1; 122,8; 115,5; 115,4; 114,8; 67,4; 34,3; 29,4; 18,8; 10,1; 7,9; HRMS (DART) m/z : рассчитано для $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{FN}_2\text{O}_3 + \text{H}^+$ 307,1458; найдено 307,1449 ($\text{M}+\text{H}^+$).

3-(3-(3,5-Диэтил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)-4-фторбензойная кислота (4).

Гидроксид натрия (3,2 мг; 0,08 ммоль; 2 экв.) в воде (0,5 мл) добавляли к раствору 6 (13 мг; 0,04 ммоль; 1 экв.) в метаноле (2 мл), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч (50°C). Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-5% MeOH/EtOAc) с получением соединения 4 (10 мг, выход 80%); (чистота 96,0% по данным ВЭЖХ): t_R (колонок) (C18)=25,16 мин; t_R (C4)=15,56 мин. ^1H -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 7,57-7,49 (m; 2H); 7,08-7,04 (m; 1H); 3,94 (t; 2H; $J=6,0$ Гц); 2,51-2,43 (m; 6H); 1,87-1,82 (m; 2H); 1,06 (t; 6H; $J=7,8$ Гц), ^{13}C -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 169,8; 157,9; 156,3; 149,3; 148,5; 124,6; 117,2; 117,1; 114,1; 69,4; 31,8; 20,1; 19,9; 14,7; HRMS (DART) m/z : рассчитано для $\text{C}_{17}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_3 + \text{H}^+$ 321,1614; найдено 321,1601 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Метил-3-(3-бромпропокси)-4-фторбензоат (5).

Соединение 5 синтезировали, как сообщалось ранее. К раствору метил-4-фтор-3-гидроксibenзоата (1,0 г; 5,87 ммоль; 1 экв.) и 1,3-дибромпропана (3,0 мл; 29,4 ммоль; 5 экв.) в ДМФА (15 мл) добавляли K_2CO_3 (0,98 г; 7,1 ммоль; 1,2 экв.). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч. Смесь разбавляли EtOAc (500 мл), промывали рассолом (3×200 мл) и сушили над Na_2SO_4 . Раствор фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-10% EtOAc/гексаны) с получением соединения 5 (1,3 г, выход 76%); ^1H -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 7,67-7,61 (m; 2H); 7,14-7,07 (m; 1H); 4,21 (t; 2H; $J=5,89$ Гц); 3,89 (s; 3H); 3,62 (t; 2H; $J=6,38$ Гц); 2,38-2,31 (m; 2H); (ESI+) m/z : рассчитано для $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{BrFO}_3 + \text{H}^+$ 290,00; найдено 290,01 ($\text{M} + \text{H}^+$).

Метил-3-(3-(3,5-диэтил-1H-пиразол-4-ил)пропокси)-4-фторбензоат (6).

Раствор 5b (100 мг; 0,35 ммоль; 1 экв.) в бензоле (2 мл) по каплям добавляли к раствору 3,5-гептандиона (0,095 мл; 0,7 ммоль; 2 экв.) и DBU (0,104 мл; 0,7 ммоль; 2 экв.) в бензоле (5 мл). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре 3 дня. Смесь фильтровали и концентрировали. Остаток очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-10% EtOAc/гексаны) с получением алкилированного промежуточного соединения, которое использовали непосредственно на следующей стадии. Гидразингидрат (0,047 мл; 0,875 ммоль; 2,5 экв.) добавляли к алкилированному промежуточному соединению в этаноле (4 мл), и реакционную смесь нагревали с обратным холодильником в течение 4 ч. Реакционную смесь концентрировали и очищали колоночной флэш-хроматографией (силикагель, 1-5% MeOH/EtOAc) с получением соединения 6 (75 мг, выход 65% за две стадии); ^1H -ЯМР (CD_3OD ; 600 МГц) δ 7,59-7,54 (m; 2H); 7,15-7,11 (m; 1H); 3,98 (t; 2H; $J=6,0$ Гц); 3,81 (s; 3H); 2,56-2,47 (m; 6H); 1,91-1,86 (m; 2H); 1,13 (t; 6H; $J=7,8$ Гц), ^1C NMR (CD_3OD ; 600 МГц) δ 167,9; 156,6; 156,2; 148,8; 148,7; 124,4; 117,5; 117,3; 116,9; 113,9; 69,5; 53,1; 31,8; 20,1; 14,7; HRMS (DART) m/z : рассчитано для $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_3 + \text{H}^+$ 335,1771; найдено 335,1773 ($\text{M}+\text{H}^+$).

Результаты.

Определение аффинности связывания и термодинамики взаимодействий между стабилизаторами и TTR. Мы использовали изотермическую титрационную калориметрию (ИТС) для определения аффинности связывания (K_d) и механизмов, лежащих в основе молекулярных взаимодействий всех стабилизаторов TTR в клинической разработке (например, AG10, тафамидиса, дифлунизала и толкапона) и аналогов AG10 1, 2, 3 и 4. Большинство известных лигандов TTR связываются с двумя идентичными сайтами связывания T_4 TTR с сильной отрицательной кооперативностью, и поэтому связывание первого лиганда будет доминировать в общей энергии связывания, а также в стабилизирующем эффекте. Хотя на термограммах ИТС можно наблюдать некоторые различия в кооперативности, эти различия будут иметь незначительное влияние на энергию связи, а также на стабилизирующий эффект. Следовательно, значения K_d , представленные в табл. 5, были основаны на данных, соответствующих независимой модели связывания с одним сайтом. Аффинность связывания AG10 и тафамидиса с TTR в буфере ($K_d=4,8\pm 1,9$ и $4,4\pm 1,3$ нМ, соответственно) была в 4 раза выше, чем у толкапона ($K_d=20,6\pm 3,7$ нМ) и в ~100 раз выше, чем у дифлунизала ($K_d=407\pm 35$ нМ). Значения K_d для соединений 1-4 варьировали от 90 до 1250 нМ, и результаты суммированы в табл. 5. Значение K_d для связывания стабилизатора с TTR представлено изменением свободной энергии Гиббса связывания (ΔG), где $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$. Анализируя термодинамическую сигнатуру каждой молекулы, мы можем оценить относительный вклад энтальпических (ΔH ; представляют собой образование или разрыв химических связей) и энтропийных (ΔS ; связанных с количеством беспорядка в системе, и часто преобладающих и способствующих высвобождению связанной молекулы воды из-за

гидрофобных взаимодействий) сил. Несмотря на схожую аффинность связывания AG10 и тафамидиса с TTR в буфере (т.е. аналогичные значения ΔG), их энергия связывания с TTR заметно различается. В то время как связывание AG10 ($\Delta H=-13,60$ ккал/моль и $T\Delta S=-2,26$ ккал/моль) является энтальпийным, связывание тафамидиса является приблизительно на 50% энтропийным и на 50% энтальпийным ($\Delta H=-5,00$ ккал/моль и $T\Delta S=6,39$ ккал/моль) (фиг. 16а и табл. 5). Связывание толкапона ($\Delta H=-10,1$ ккал/моль и $T\Delta S=0,4$ ккал/моль) и дифлунизала ($\Delta H=-8,38$ ккал/моль и $T\Delta S=0,34$ ккал/моль) является энтропийно благоприятным, но в основном обусловлено энтальпийными взаимодействиями. Неблагоприятная энтропийная энергия связи AG10 для TTR ($T\Delta S=-2,26$ ккал/моль) может быть обусловлена его более высокой полярностью и/или конформационной гибкостью по сравнению с другими стабилизаторами TTR. Термодинамика связывающих взаимодействий между соединениями 1-4 и TTR обсуждается ниже.

Таблица 5

Сравнение стабилизаторов TTR

Стабилизатор	K_d (нМ)	Параметры ГС (ккал/моль)			% Занятости TTR в Буфере (отношение 1:1) ¹	% Занятости TTR в Сыворотке (отношение 2:1) ²	% Стабилизации TTR в Сыворотке (отношение 2:1) ³
		ΔG	ΔH	$T\Delta S$			
AG10	4.8 ± 1.9	-11.34	-13.6	-2.26	79.1 ± 1.2	98.8 ± 2.9	95.4 ± 2.9
Тафамидис	4.4 ± 1.3	-11.39	-5.0	6.39	49.9 ± 3.3	49 ± 3.3	41.5 ± 4.6
Дифлунизал	407 ± 35	-8.72	-8.36	0.34	28.7 ± 0.6	16.2 ± 3.2	24.2 ± 2.3
Толкапон	20.6 ± 3.7	-10.5	-10.1	0.4	71.7 ± 2.5	71.1 ± 2.9	68.4 ± 5.1
1	90 ± 14	-9.61	-9.82	-0.21	58.3 ± 0.9	75.9 ± 3.1	86.7 ± 2.3
2	258 ± 17	-8.99	-6.49	2.5	38.5 ± 0.8	63.2 ± 2.5	70.4 ± 2.2
3	251 ± 12	-9.0	-4.73	4.27	29.7 ± 0.7	43 ± 0.6	32.1 ± 4.9
4	1253 ± 79	-8.1	-2.1	6.0	17.2 ± 0.9	20.8 ± 3.3	23.2 ± 1.1

Энтальпическая сила предсказывает эффективность стабилизаторов TTR в буфере и эффективность в сыворотке крови человека. Недавнее исследование дифлунизала и других нестероидных противовоспалительных средств (НПВС) показало, что лиганды с благоприятным (т.е. более отрицательным значением) ΔH имели пропорционально более высокую селективность TTR по сравнению с лигандами с меньшим влиянием ΔH . Хотя в этом исследовании описана корреляция между энтальпическими силами и селективностью стабилизаторов TTR, пока не сообщалось о корреляции между энтальпией связывания лигандов и эффективностью стабилизации TTR или, насколько нам известно, каких-либо других мультимерных белков. Чтобы оценить эффективность стабилизаторов в захвате и стабилизации TTR в буфере, мы использовали анализ исключения флуоресцентного зонда (FPE). В анализе FPE используется флуорогенный зонд (зонд FPE), который сам по себе не является флуоресцентным, однако после соединения с сайтом связывания T_4 TTR он ковалентно модифицирует лизин 15 (K15), создавая флуоресцентный конъюгат. Лиганды, которые связываются с сайтом T_4 TTR, будут снижать связывание зонда FPE, что наблюдается по более низкой флуоресценции. Сообщалось о линейной корреляции между степенью флуоресценции в анализе FPE и стабилизацией TTR. Поэтому мы сначала использовали анализ FPE для измерения эффективности стабилизаторов в отношении связывания и стабилизации TTR в буфере (тестировали при отношении стабилизатора к тетрамеру TTR 1:1; фиг. 16b, 16с и табл. 5). Порядок эффективности стабилизаторов TTR в буфере был AG10>толкапон>тафамидис>дифлунизал.

Затем мы использовали анализы FPE и вестерн-блоттинг для оценки эффективности (представляющих как активность, так и селективность) стабилизаторов (10 мкМ) в захвате и стабилизации TTR в сыворотке человека (концентрация TTR 5 мкМ) (табл. 5). Вестерн-блоттинг измеряет количество интактного тетрамера TTR после 72 ч кислотной обработки в присутствии и при отсутствии стабилизаторов. Порядок эффективности стабилизаторов в сыворотке человека был аналогичен тому, который мы наблюдали для эффективности с TTR в буфере (AG10>толкапон>тафамидис>дифлунизал; табл. 5). Активность и эффективность дифлунизала были самыми низкими, что прогнозируется на основании его значительно более низкой аффинности связывания с TTR ($K_d=407\pm 35$ нМ) по сравнению со всеми другими стабилизаторами (аффинность в 20-80 раз ниже, чем у других стабилизаторов). Удивительно, но не было корреляции между значениями K_d трех других стабилизаторов, и их активностью и эффективностью в захвате и стабилизации TTR как в буфере, так и в человеческой сыворотке. Например, активность и эффективность толкапона были выше, чем у тафамидиса, несмотря на тот факт, что аффинность связывания толкапона с TTR ($K_d=20,6\pm 3,7$ нМ) немного ниже, чем аффинность связывания тафамидиса с TTR ($K_d=4,4\pm 1,3$ нМ). Интересно отметить, что активность и эффективность этих стабилизаторов для TTR в буфере и сыворотке очень хорошо коррелировали ($R_2=0,98$) с их энтальпией связывания ($\Delta H=-13,6$; $-10,1$ и $-5,0$ ккал/моль; для AG10, толкапона и тафамидиса, соответственно). Эти данные показывают, что энтальпийное связы-

вание AG10 и толкапона с TTR (подробно обсуждается ниже) является основным фактором эффективной стабилизации ими TTR по сравнению с другими стабилизаторами.

Затем мы использовали вестерн-блоттинг для сравнения эффективности AG10 (10 мкМ) с другими стабилизаторами при их заявленных средних максимальных концентрациях в плазме у человека (C_{\max} 20 мкМ для 80 мг тафамидиса 1 раз в сутки; 200 мкМ для дифлунизала 250 мг 2 раза в сутки, и 20 мкМ для толкапона, 100 мг три раза в сутки). AG10 в концентрации 10 мкМ полностью стабилизировал TTR в сыворотке человека (% стабилизации TTR: $95,4 \pm 4,8\%$); другие соединения стабилизировали ~50-75% тетрамерного TTR при их сообщенной клинической C_{\max} (фиг. 17a, b). Значения pKa для AG10 (pKa=4,13) и тафамидиса (pKa=3,73) выше, чем для дифлунизала (pKa=2,94). Следовательно, процент ионизации групп карбоновых кислот стабилизаторов может варьировать при pH 4. Это может повлиять на силу электростатического взаимодействия между группами карбоновых кислот и ϵ -аминогруппами лизина 15 (K15) и K15' наверху сайтов связывания T₄, которые могут влиять на эффективность стабилизатора. Чтобы решить эту проблему, мы провели вестерн-блоттинг с использованием буфера из мочевины (pH 7,4). Данные стабилизации TTR в буфере из мочевины аналогичны данным, полученным из вестерн-блоттинга при кислом pH и из анализа FPE при физиологическом pH. В соответствии с данными анализа стабилизации TTR от вестерн-блоттинга, занятость сайта связывания T₄ 10 мкМ AG10 в анализе FPE была практически полной (% связывания TTR $96,6 \pm 2,1\%$) и была выше, чем у всех стабилизаторов при их сообщенной клинической C_{\max} . Занятость мишени для толкапона при 20 мкМ (% связывания TTR $86 \pm 3,2\%$) была выше, чем у тафамидиса и дифлунизала (% связывания TTR ~65% при 20 мкМ и 200 мкМ, соответственно) (фиг. 17c, d).

Связывающие взаимодействия между AG10 и S117/S117' TTR имитируют молекулярные взаимодействия в рамках защищающей от болезни мутации T119M. Мы исследовали корреляцию между энтальпией связывания и стабилизацией TTR, сравнивая сообщенные сокристаллические структуры стабилизаторов с TTR с кристаллическими структурами стабилизирующих вариантов TTR (T119M и R104H). Мы предположили, что это может позволить нам идентифицировать функциональные группы аминокислот в сайтах связывания T₄ TTR, которые важны для связывания и стабилизации TTR. Карбоновокислотные компоненты AG10, тафамидиса, дифлунизала и гидроксильная группа на толкапоне участвуют в электростатических взаимодействиях с ϵ -аминогруппами лизина 15 (K15) и K15' на вершине сайтов связывания T₄. Энтальпийное связывание AG10 и толкапона с TTR происходит за счет дополнительных водородных связей, которые обе молекулы образуют в сайте связывания T₄. Карбонильная группа толкапона образует одну водородную связь с гидроксильной боковой цепью T119 TTRwt (расстояние ~2,6 Å; идеальное расстояние для водородной связи <3 Å). Более длинное расстояние между карбонильной группой толкапона и гидроксильной боковой цепью T119' на соседнем мономере (расстояние ~7,6 Å) препятствует образованию второй водородной связи. Интересно, что это взаимодействие слабее между толкапоном и V122I-TTR (расстояние между карбонильной группой толкапона и гидроксильными боковыми цепями T119 и T119' V122I-TTR составляет ~5,5 Å и ~9,6 Å, соответственно), что может объяснить более низкую аффинность связывания ($K_d=56$ нМ) и активность толкапона в отношении V122I-TTR по сравнению с TTRwt. В случае тафамидиса водородная связь у основания кармана T₄ отсутствует; вместо этого атомы хлора 3,5-дихлоро - кольца также помещаются в карман связывания галогена (HBP) 3 и 3', где они взаимодействуют с TTR посредством преимущественно гидрофобных взаимодействий. В дополнение к электростатическим взаимодействиям между карбоновокислотным компонентом AG10 и K15/K15', AG10 также образует две водородные связи с серином 117 (S117) и S117' (расстояние ~2,8 Å) гидроксильной боковой цепи соседних мономеров в низкодиелектрической макромолекулярной внутренней части сайта связывания T₄ (фиг. 18a). Эти дополнительные водородные связи, вероятно, ответственны за движущую силу доминирующего энтальпийного связывания AG10 с TTR. Примечательно, что аналогичные водородные связи были зарегистрированы во внутренней полости кинетически стабилизирующего транс-супрессорного варианта T119M-TTR (фиг. 18b).

Две гидроксильные группы боковой цепи S117 мономеров A и B в варианте TTR T119M образуют прямые водородные связи на расстоянии 2,8 Å, которые не наблюдаются в TTRwt (расстояние между двумя остатками S117 ~6,0 Å) (фиг. 18c). Эти уникальные водородные связи приводят к более тесным контактам между двумя димерами (~4,8 Å) в тетрамере TTR и подчеркивают потенциальную важность этих водородных связей в противоамилоидозных и защитных эффектах варианта T119M в отношении тетрамеров TTR. Роль S117 в стабилизации TTR была также подтверждена связыванием флавоноидов, которые способны формировать одинарную водородную связь с одним S117. Интересно, что расстояние между остатками S117 и S117' в термодинамически стабилизированном варианте R104H, который не включает кинетическую стабилизацию тетрамерного TTR, аналогично таковому для TTRwt (среднее расстояние димер-димер составляет ~5,6 Å, фиг. 18c, 18d). Отсутствие водородных связей между гидроксильными группами S117 и S117' в варианте R104H (который является менее мощным транс-супрессорным мутантом, чем T119M) подчеркивает важность этих водородных связей в антиамилоидогенном и подавляющем болезнь эффектах кинетической стабилизации тетрамера TTR в варианте T119M. Путем образования двух прямых водородных связей с S117 и S117' в тетрамере TTR, AG10 создает элек-

тростатический мостик, аналогичный тому, который обнаружен в защитном варианте T119M. Эти данные подтверждаются анализом 40 описанных кристаллических структур, который выявил более близкие димер-димерные контакты в кристаллических структурах как T119M-TTR (расстояние $\sim 4,8$ Å), так и AG10-V122I-TTR (расстояние $\sim 4,66$ Å), по сравнению с TTRwt или TTRm (расстояние $\sim 5,5$ Å) (дополнительная табл. 1). Важно отметить, что другие известные стабилизаторы TTR не взаимодействуют с S117/S117' TTR.

Характеристика ключевых функциональных групп AG10, важных для стабилизации TTR. Чтобы исследовать энтальпийный вклад каждой из функциональных групп AG10 в связывание и стабилизацию TTR, мы синтезировали и протестировали четыре аналога AG10 (соединения 1, 2, 3 и 4; фиг. 15) и оценили их способность связывать и стабилизировать TTR (фиг. 19). AG10 связывает TTR с неблагоприятной энтропией ($T\Delta S = -2,26$ ккал/моль). Атом фтора AG10 помещен в HBP1 TTR, и поэтому мы предположили, что энтропийное связывание AG10 с TTR может быть оптимизировано путем замены атома фтора AG10 на йод (соединение 1a). Исследования моделирования предполагают, что йод 1 соответствует HBP1 TTR (где связывается йод T₄), что может улучшить энтропийное связывание за счет вытеснения большего количества молекул воды из HBP1 (фиг. 19a). Соединение 1a показало значительно более низкую аффинность связывания ($K_d = 90 \pm 14$ нМ) с TTR в буфере по сравнению с AG10 ($K_d = 4,8 \pm 1,9$ нМ). Анализ ИТС показал, что, хотя энтропийное взаимодействие 1 с TTR было более благоприятным по сравнению с AG10 ($T\Delta S = -0,21$ ккал/моль и $-2,26$ ккал/моль, соответственно), наблюдалось значительное снижение энтальпического вклада в связывание ($\Delta H = -9,82$ ккал/моль и $-13,6$ ккал/моль, соответственно) (фиг. 19b). Согласно моделированию, уменьшение энтальпии связывания можно объяснить уменьшением прочности солевого мостика между карбоновокислотным компонентом 1 и K15/K15' (расстояние $\sim 4,7$ Å по сравнению с $\sim 2,8$ Å для AG10). Соединение 1a также показало сниженную активность в отношении TTR в буфере ($58,3 \pm 0,98\%$) и сыворотке человека ($75,9 \pm 3,1\%$) по сравнению с AG10 (фиг. 19c-19e и табл. 5).

Карбоновокислотный компонент AG10 образует два солевых мостика непосредственно с ε-аминогруппами K15 и K15' на периферии сайта связывания T₄, которые служат для закрытия кармана T₄ вокруг AG10 и частичной защиты его от растворителя. Мы синтезировали метил-эфирный аналог AG10 (соединение 2, фиг. 19a), чтобы проверить эффект модификации двух солевых мостиков, которые AG10 образует на периферии сайта связывания T₄. Соединение 2 показало значительно более низкую аффинность ($K_d = 258 \pm 17$ нМ) к TTR в буфере по сравнению с AG10 ($K_d = 4,8 \pm 1,9$ нМ), что можно объяснить более низкой прочностью потенциальных водородных связей между сложноэфирной группой 2 и K15/K15' ($\Delta H = -6,49$ ккал/моль) по сравнению с солевым мостиком в AG10 (фиг. 19b). Соединение 2 также показало сниженную активность в отношении TTR в буфере и сыворотке человека по сравнению с AG10 и соединением 1a (фиг. 19c-19e и табл. 5).

3,5-диметил-1H-пиразольное кольцо AG10 находится глубоко во внутренней полости T₄-связывающего сайта и образует две водородные связи с S117 и S117' соседних субъединиц. Блокируя эти взаимодействия, мы можем эффективно наблюдать за их энтальпийным вкладом с помощью ИТС и FPE анализа, соответственно. Таким образом, мы синтезировали соединение 3, которое имеет N-метилпиразол. N-метильная группа будет ограничивать пиразольное кольцо 3 с образованием только одной водородной связи с одной из соседних субъединиц TTR (фиг. 19a). Мы также синтезировали соединение 4, в котором диметилпиразол AG10 был заменен диэтилпиразолом. Исследования с моделированием показали, что большая часть диэтильных групп будет препятствовать проникновению молекул глубоко в сайт связывания T₄, тем самым уменьшая его способность потенциально формировать любые водородные связи с S117/S117' (фиг. 19a). Как предсказывалось путем моделирования, как 3 ($K_d = 251 \pm 12$ нМ), так и 4 ($K_d = 1253 \pm 79$ нМ) показали значительно сниженную аффинность связывания с TTR в буфере. Эта сниженная аффинность выражалась в значительном снижении активности TTR в буфере и сыворотке человека, особенно для соединения 4. Порядок активности для стабилизации TTR был одинаковым как в буфере, так и в сыворотке ($1 > 2 > 3 > 4$; фиг. 19c-19e и табл. 5). Как мы наблюдали с клиническими стабилизаторами ATTR, активность AG10 и соединений 1, 2, 3 и 4 в захвате и стабилизации TTR очень хорошо коррелировала ($R_2 = 0,98$) с энтальпией связывания этих молекул ($\Delta H = -13,6$; $-9,82$; $-6,49$; $-4,73$ и $-2,1$ ккал/моль, соответственно). Интересно, что, несмотря на схожую аффинность связывания 2 и 3, их активность значительно различалась (табл. 5). Более высокая активность 2 по сравнению с 3 может быть объяснена его благоприятным энтальпическим связыванием ($\Delta H = -6,49$ ккал/моль и $-4,73$ ккал/моль, соответственно) (фиг. 19b). Это наблюдение аналогично данным, полученным для AG10 и тафамидиса (т.е. аналогичные значения K_d , но значительно различающаяся активность) (табл. 5). Эти результаты подчеркивают решающую роль, которую играет пиразольное кольцо, и важность водородных связей, которые оно формирует с двумя димерами TTR, имитируя взаимодействия в защитной мутации T119M-TTR и повышая кинетическую стабильность тетрамера TTR.

Изучение влияния энтальпии на селективность AG10 к TTR. Чтобы изучить роль энтальпии в селективности AG10 в отношении TTR по сравнению с другими широко распространенными белками сыворотки, мы проверили взаимосвязь концентрация-эффект AG10 и тафамидиса в анализе FPE в цельной

сыворотке человека. Мы протестировали AG10 и тафамидис, поскольку их аффинности связывания с TTR в буфере очень похожи ($K_d=4,8\pm 1,9$ нМ и $4,4\pm 1,3$ нМ, соответственно), но их термодинамика для связывания TTR, особенно энтальпийный компонент, значительно отличается. Следовательно, данные, полученные в сыворотке крови, в значительной степени отражают селективность. AG10 демонстрировал прогрессивный захват, зависящий от концентрации, при этом полный захват достигается при концентрациях $AG10 \geq 10$ мкМ. Даже при субстехиометрических концентрациях AG10 был способен захватывать и стабилизировать большую часть TTR (при 5 мкМ занятость TTR составила 69,2% по FPE, стабилизация -74,5% по вестерн-блоттингу). Напротив, наблюдалось более умеренное увеличение либо занятости, либо стабилизирующей активности тафамидиса при концентрациях выше 20 мкМ. Хорошая корреляция ($R_2=1,0$) между занятостью TTR (FPE) и стабилизацией TTR (вестерн-блоттинг) наблюдалась при оценке активности AG10. Для тафамидиса наблюдалась хорошая корреляция ($R_2=0,87$) для концентраций до 10 мкМ, однако при более высоких концентрациях в анализе FPE наблюдалось плато.

Селективность AG10 и тафамидиса в отношении TTR дополнительно исследовали путем повторения этих анализов в буфере в присутствии или при отсутствии очищенных белков сыворотки. AG10 или тафамидис (30 мкМ) предварительно инкубировали с очищенным сывороточным альбумином человека (при его физиологической концентрации 600 мкМ), а затем подвергали гель-фильтрации с последующим диализом. В момент времени 0 (сразу после гель-фильтрации) с альбумином было связано меньше AG10 по сравнению с тафамидисом ($18,3\pm 0,98$ мкМ против $24,1\pm 1,1$ мкМ; фиг. 20a). После диализа против буфера в течение 24 ч концентрация AG10, связанного с HSA, была ниже, чем для тафамидиса ($7,8\pm 0,1$ мкМ против $18,8\pm 2,1$ мкМ). Эти данные показывают, что AG10 имеет более низкую аффинность связывания с альбумином по сравнению с тафамидисом. Параллельно связывание AG10 с TTR также исследовали в этом анализе гель-фильтрации/диализа. AG10 (10 мкМ) предварительно инкубировали с эквимолярным соотношением TTR (5 мкМ тетрамерного TTR, что составляет 10 мкМ сайтов связывания TTR T4). Диссоциация AG10 от TTR была медленной в течение первых шести часов (молярное соотношение AG10-TTR $\sim 1,2:1$), и поддерживалось молярное соотношение 1:1 в течение 24 ч инкубации (фиг. 20b).

Наконец, селективность AG10 и тафамидиса для связывания с TTR в сыворотке человека оценивали с использованием модифицированного анализа FPE, в котором сыворотку человека заменяли очищенным TTR человека в буфере (буфер ФБР, pH 7,4). В дополнение к очищенному TTR (5 мкМ), в анализе FPE в буфере добавляли четыре отдельных репрезентативных и обильных белка плазмы. Добавление альбумина, трансферрина, фибриногена или иммуноглобулина (IgG) не влияло на захват TTR AG10 (>97% захват TTR при отсутствии или в присутствии любого из этих белков, фиг. 20c, 20d). Альбумин, но не другие протестированные белки сыворотки, влиял на захват TTR тафамидисом ($41,5\pm 0,9\%$ против $68,2\pm 0,1\%$ при отсутствии альбумина; фиг. 20e, 20f). Добавление всех тестируемых белков плазмы одновременно дало идентичные результаты для AG10. Более высокая селективность AG10 в отношении TTR может быть объяснена рядом свойств, включая энтальпическое связывание и большую гидрофильность AG10 ($ClogP=2,78$) по сравнению с более липофильным тафамидисом ($ClogP=4,2$).

Здоровая собака породы бигль представляет собой подходящую экспериментальную модель для оценки эффективности стабилизаторов TTR. Затем мы исследовали, можно ли поддерживать *in vivo* высокую активность и селективность AG10 в отношении TTR. Трансгенные животные модели, достоверно воспроизводящие патологию человеческого ATTR-СМ, пока недоступны. Поэтому мы применили подход, аналогичный тому, который в настоящее время используется в клинике, для изучения эффективности AG10 по сравнению с другими кинетическими стабилизаторами TTR. Активность стабилизаторов TTR в захвате и стабилизации TTR обычно оценивают *ex vivo* в образцах крови, полученных от пациентов до и после введения стабилизатора. Чтобы изучить активность AG10 *in vivo*, тот же подход был использован на здоровых собаках породы бигль. Здоровые собаки породы бигль были выбраны в качестве экспериментальной модели по нескольким причинам. Все аминокислоты в сайтах связывания T₄ TTR, где связываются AG10 и другие стабилизаторы, консервативны между собакой и человеком. Мы также протестировали концентрацию TTR в сыворотке собак ($\sim 4,6$ мкМ) и обнаружили, что она аналогична концентрации у здоровых людей. Чтобы подтвердить пригодность анализов, используемых с человеческими реагентами для исследований на собаках, активность AG10 и тафамидиса оценивали в объединенной сыворотке собак с использованием тех же анализов FPE и вестерн-блоттинга, которые использовались для экспериментов, описанных выше. Эффект взаимодействия эффекта AG10 и тафамидиса в отношении связывания и стабилизации TTR в зависимости от концентрации *in vitro* в обоих анализах, повторенных с использованием собачьей сыворотки, были аналогичны тому, что наблюдалась в сыворотке крови человека (фиг. 21). Эти особенности сделали здоровых собак подходящей системой для последующих исследований.

AG10 активно и избирательно связывается с TTR собаки после перорального применения. Для изучения фармакокинетико-фармакодинамической (ФК-ФД) взаимосвязи *in vivo*, AG10 вводили здоровым собакам породы бигль ежедневно через желудочный зонд в течение 7 дней. Всего 16 самцов (M) и 16 самок (F) собак породы бигль составили четыре группы лечения: (i) 6M/6F при 0 мг/кг/сутки (контроль-

ный носитель); (ii) 2M/2F при 50 мг/кг/сутки; (iii) 2M/2F при 100 мг/кг/сутки; и (iv) 6M/6F при 200 мг/кг/сутки. Образцы сыворотки, собранные в определенное время, собирали перед введением дозы в 1 день исследования (исходный уровень), перед введением дозы в 7 день исследования (представляя минимальные концентрации или C_{\min} в равновесном состоянии) и через 1 ч после введения дозы в сутки исследования 7 (представляя пиковые концентрации, или C_{\max} , в равновесном состоянии). Участие TTR в связывании с AG10 оценивали с помощью анализа FPE (фиг. 22a, 22b). Все образцы от собак, получавших только носитель, и образцы, собранные из групп активного лечения до воздействия AG10, показали нулевой захват TTR. Сыворотка от собак, получавших AG10, показала пропорциональный дозе ответ в отношении участия в связывании при минимуме в равновесном состоянии (день 7, до введения дозы; ~81-94% занятость TTR), и все группы, получавшие AG10, показали полный (>97%) захват TTR в равновесном состоянии C_{\max} (день 7, после введения дозы). Впоследствии были протестированы более низкие дозы AG10 для дальнейшего изучения взаимосвязи ФК-ФД (воздействие-эффект), чтобы определить минимально эффективную дозу AG10, которая все еще может эффективно связываться и стабилизировать TTR. Восемь собак, разделенных на две группы активного лечения, получали либо 5, либо 20 мг/кг AG10 HCl в виде однократной пероральной дозы. Эти результаты показали увеличенный захват TTR в группах с дозой 20 мг/кг по сравнению с 5 мг/кг (фиг. 22c, 22d). Процент связывания TTR при C_{\max} был значительно выше ($p \leq 0,001$), чем при C_{\min} для обеих доз. Был значительно более высокий ($p \leq 0,001$) захват TTR для дозы 20 мг/кг по сравнению с дозой 5 мг/кг при C_{\min} . Данные также показали, что концентрация AG10 в плазме крови хорошо коррелирует с процентом захвата TTR.

Таким образом, собаки породы бигль продемонстрировали, что AG10 доступен перорально при определенных уровнях дозировки и достигает дозозависимых концентраций в плазме, которые эффективно и избирательно связывают и стабилизируют тетрамерный TTR.

Пример 5: Исследование с применением однократной дозы на макаках, которым вводили AG10 HCl внутривенно или через желудочный зонд AG10 HCl вводили в дозах 1 мг/кг внутривенно или 5 мг/кг перорально 3 самцам макаки-крабоеда. Между двумя фазами был двухнедельный период вымывания. Образцы крови собирали до введения дозы и приблизительно через 0,083 (только внутривенно), 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8; 12; 24; 48; 72 и 96 ч после введения дозы. Образцы плазмы анализировали на AG10 и ацилглюкурониды AG10, а сыворотку тестировали в анализе FPE. Как показано на фиг. 23, результаты анализа FPE демонстрируют, что перорально введенный AG10 эффективно связывается с TTR в сыворотке макака.

Анализ FPE также продемонстрировал, что перорально введенный AG10 стабилизировал TTR дозозависимым образом (фиг. 24).

Пример 6. Повышение концентрации TTR в сыворотке крови у здоровых индивидуумов, получавших дозу AG10.

Для измерения концентраций TTR в сыворотке крови использовали набор ИФА для преальбумина (человека) от Aviva Systems Biology, кат. № OKIA00081-96W, серия № KC0699.

Исследование выполняли согласно протоколу, предоставленному производителем набора для ИФА. Метод был изменен путем добавления трех стандартных концентраций к калибровочной кривой, рекомендованной производителем. Прилагаемый калибратор TTR растворяли в 1 мл дистиллированной воды, получая концентрацию 8,85 мкг/мл. Первый дополнительный стандарт представлял 1000 нг/мл, который был приготовлен добавлением 178,4 мкл калибратора к 1400 мкл 1× разбавителя. Второй дополнительный стандарт представлял 200 нг/мл, который получали добавлением 32,4 мкл калибратора к 1400 мкл 1× разбавителя. Третий дополнительный стандарт представлял 0,78125 нг/мл, который получали добавлением 600 мкл стандарта 1,5625 нг/мл к 600 мкл 1× разбавителя. В наборе ИФА используются козы поликлональные антитела против TTR для улавливания и детекции. Антитела были получены против натурального белка TTR человека. Объединенная человеческая сыворотка была приобретена у Innovative Research Inc. (кат. № IPLA-SER, серия № 24453).

Объединенные образцы человеческой сыворотки, и образцы сыворотки от испытания MAD размораживали при 37°C на водяной бане в течение 10 мин. Все образцы разводили 1:10 000 в два этапа. Первые 5 мкл сыворотки смешивали с 995 мкл 1× разбавителя, входящего в комплект для ИФА. Во-вторых, 5 мкл смеси добавляли к 245 мкл 1× разбавителя в микропланшете с низким связыванием. 100 мкл каждого окончательно разбавленного образца добавляли в каждую лунку планшета для ИФА. Все стандарты и образцы были протестированы в двух повторях. С этого момента исследование TTR следует протоколу производителя без каких-либо дополнительных изменений. Вкратце, стандарты и образцы сыворотки инкубировали в планшете для ИФА в течение одного часа при комнатной температуре. Планшет для ИФА промывали четыре раза 1× промывочным буфером, затем инкубировали с 1× конъюгатом пероксидазы хрена в течение 30 мин при комнатной температуре в защищенном от света месте. Затем планшет для ИФА промывали четыре раза. Добавляли субстрат ТМВ и проявляли в течение 10 мин перед добавлением останавливающего раствора. Наконец, для каждой лунки измеряли оптическую плотность при 450 нм.

Измерения оптической плотности корректировали путем получения среднего значения оптической

плотности при 450 нм от дублированных лунок с 0 нг/мл и его вычитания из общей оптической плотности при 450 нм для каждой лунки.

Стандартная кривая была построена для каждого планшета ИФА с использованием программного обеспечения GraphPad PRISM. Логарифм (нг/мл) стандартов наносили на ось X, а значения оптической плотности при 450 нм с поправкой на эталон наносили на ось Y. Данные были подобраны с использованием сигмоидальной 4-параметрической кривой. Логарифм (нг/мл) объединенных образцов человеческой сыворотки и образцов сыворотки от испытания MAD интерполировали по стандартным кривым. Значения log (нг/мл) были преобразованы в концентрации TTR в сыворотке в мг/л и скорректированы с учетом разведения образца. Стандартные кривые, полученные с использованием поставляемого калибранта, были воспроизводимыми (фиг. 25), и набор успешно дифференцировал объединенные образцы сыворотки человека при увеличивающихся соотношениях разведения от 1:5000 до 1:20000. Таким образом, для тестирования использовали ИФА набор Aviva.

Образцы от нормальных добровольцев из трех групп исследования MAD (при введении 100, 300, 800 мг AG10 HCl два раза в сутки в течение двенадцати дней подряд), а также группы плацебо тестировали с использованием ИФА набора Aviva. Относительное изменение концентрации TTR во времени для каждой группы рассчитывали путем нормализации относительно исходных значений (фиг. 26). Фиг. 27 показывает среднее процентное изменение концентрации TTR в сыворотке крови от исходного уровня до дня 12 во всех когортах, получавших плацебо и AG10. Фиг. 28 и фиг. 29 показывают исходный уровень и концентрацию TTR в сыворотке крови на 12-й день во всех группах, получавших плацебо и AG10 HCl (общее количество получавших дозу здоровых добровольцев=24; плацебо: активное соединение=1:3; группа MAD1=100 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD2=300 мг каждые 12 ч в течение 12 дней; группа MAD3=800 мг каждые 12 ч в течение 12 дней).

Анализ преальбумина ARUP (иммунотурбидиметрический анализ).

Анализ преальбумина ARUP также использовали для анализа концентрации TTR в сыворотке крови в группах испытания MAD. ARUP анализирует образцы на преальбумин с помощью набора реагентов преальбумина, предоставленного Roche Diagnostics, и запускает модуль Roche Diagnostics c702. Самый низкий регистрируемый предел составляет 3 мг/дл.

Табл. 6 суммирует исходную и постдозовую (через 24 ч) концентрацию TTR в сыворотке крови, измеренную для каждой группы. В каждой тестируемой группе наблюдается заметное увеличение концентрации TTR в течение 24-часового периода измерения.

Таблица 6

Группы MAD 1-3 ФК-параметры - концентрация TTR в сыворотке крови

Лечение	Базовый уровень (мг/дл)	После приема дозы (мг/дл)	Изменение от базового уровня (мг/дл)
100 мг AG10 HCl (натошак)	25,1 (17,2) [n=6]	28,0 (14,5) [n=6]	2,63 (38,9) [n=6]
300 мг AG10 HCl (натошак)	21,8 (22,9) [n=6]	23,7 (16,4) [n=6]	2,64 (38,7) [n=6]
800 мг AG10 HCl (натошак)	26,8 (15,2) [n=6]	29,0 (13,0) [n=6]	2,71 (28,4) [n=6]
Плацебо (объединенная плазма, собранная натошак)	24,5 (12,5) [n=6]	23,5 (13,9) [n=6]	.
<p>100 мг AG10 HCl (натошак): прием нескольких пероральных доз 100 мг AG10 HCl после 8-часового голодания. 300 мг AG10 HCl (натошак): прием нескольких пероральных доз 300 мг AG10 HCl после 8-часового голодания. 800 мг AG10 HCl (натошак): прием нескольких пероральных доз 800 мг AG10 HCl после 8-часового голодания. Плацебо (объединенная сыворотка, взятая натошак): прием плацебо после 8-часового голодания. Изменение среднего геометрического показателя по сравнению с исходным уровнем для плацебо было установлено как отсутствующее, поскольку только 1/6 субъектов имели положительные значения и были включены в расчет. Остальные пациенты (5/6) были исключены из-за отрицательного изменения исходных результатов. . = Значение отсутствует или не подлежит отчету Исходные, постдозовые значения и отклонения от исходных значений представлены в виде среднего геометрического значения и геометрического КВ%.</p>			

Пример 7. Результаты клинических испытаний 2 фазы - субъекты с ATTR-СМ.

Клинические испытания 2 фазы были проведены в основном, как описано в примере 3. Всего было включено 49 пациентов вместо 45: 16 получали 400 мг два раза в сутки; 16 получали 800 мг 2 раза в сутки и 17 получали плацебо.

Исходные характеристики людей, участвующих в исследовании, показаны в табл. 7 ниже.

Таблица 7

Базовые характеристики				
Характеристика	Плацебо	AG10 HCl 400 мг	AG10 HCl 800 мг	Всего
	N = 17	N = 16	N = 16	N = 49
Возраст, среднее значение (диапазон)	73,2 (60-85)	73,8 (60-83)	75,4 (67-86)	74,1 (60-86)
Мужчины, n (%)	17 (100%)	14 (88%)	14 (88%)	45 (92%)
ATTRm, n (%)	3 (18%)	6 (37%)	5 (31%)	14 (29%)
ATTRwt, n (%)	14 (82%)	10 (63%)	11 (69%)	35 (71%)
Раса, n (%)				
Европеоиды	13 (76%)	10 (63%)	12 (75%)	35 (72%)
Негроиды	3 (18%)	4 (25%)	3 (19%)	10 (20%)
Другие	1 (6%)	2 (12%)	1 (6%)	4 (8%)
NT-proBNP (пг/мл) ¹	3151 ± 3705	3589 ± 3020	3377 ± 2806	3368 ± 2789
Тропонин I (нг/мл) ²	0,17 ± 0,30	0,22 ± 0,24	0,10 ± 0,06	0,16 ± 0,22
TTR (мг/дл) ³	23,4 ± 5,5	23,2 ± 5,7	19,5 ± 4,2	22,0 ± 5,4

Результаты.

Стабилизацию TTR измеряли *ex vivo* с использованием анализов FPE и вестерн-блоттинга, описанных в начале раздела примеров. Стабилизацию TTR измеряли *in vivo* путем мониторинга концентраций TTR в сыворотке у участников испытания.

Фиг. 30 иллюстрирует изменение дозы-ответа в уровнях TTR в сыворотке для субъектов в каждой группе лечения. Данные представлены как процентное изменение от исходного уровня до 28 дня. У лиц, получавших 400 мг AG10 HCl два раза в сутки, среднее повышение уровня TTR в сыворотке составляло 36%, а у лиц, получавших 800 мг AG10 HCl два раза в сутки, среднее повышение уровня TTR в сыворотке составило 50%. Для сравнения, в группе лечения плацебо среднее снижение уровней TTR в сыворотке составляло 7%.

Увеличение уровней TTR в сыворотке в группах, получавших дозу AG10 HCl (как 400 мг, так и 800 мг два раза в сутки) отслеживает ранее сообщенное наблюдение для ранее протестированных стабилизаторов TTR. Фиг. 31 представляет собой график среднего процентного изменения от исходного уровня до 28-го дня применения для каждой экспериментальной группы в этом исследовании. Также на графике показано процентное изменение уровней TTR в сыворотке крови, сообщенное для испытаний 2 фазы для тафамидиса (справочный пакет заседания Консультативного комитета FDA CDER) и наблюдательного исследования дифлунизала (Hanson, J.L.S. et al., *Circ Heart Fail* 2018 11: e004000). Как видно на чертеже, AG10, тафамидис и дифлунизал повышали уровни TTR в сыворотке.

До лечения 40% субъектов в группе, принимавшей 400 мг два раза в сутки, и 56% субъектов в группе, принимавшей 800 мг два раза в сутки, имели уровни TTR в сыворотке ниже нормальных уровней TTR (нормальные уровни TTR составляют 20-40 мг/дл (3,6-7,3 мкМ)). После 28 дней лечения 100% каждой группы, принимавшей активное соединение, имели концентрации TTR в сыворотке в пределах нормального диапазона (т.е. все пациенты, получавшие лечение, имели нормальные уровни TTR в сыворотке к концу 28-дневного режима лечения). Для сравнения, у 18% лиц, принимавших плацебо, уровень TTR в сыворотке был ниже нормального уровня TTR до лечения. После 28 дней лечения это число увеличилось до 31% у лиц, принимавших плацебо, у которых не было нормального уровня концентрации TTR в сыворотке; см. фиг. 32. Исходное распределение концентраций TTR в сыворотке для индивидуумов в исследовании показано на фиг. 33.

Вестерн-блоттинг *ex vivo* подтверждает, что каждый из уровней дозирования AG10 HCl, 400 мг два раза в сутки и 800 мг два раза в сутки эффективно стабилизировал TTR; см. фиг. 34, показывающую высокие уровни стабилизации TTR в моменты времени минимума (h0) и пика (h1) 14 и 28 дня по сравнению с низкими уровнями стабилизации в момент времени перед введением дозы (D1 h0). Приведенные планки погрешностей представляют собой стандартную ошибку среднего.

Этот результат вестерн-блоттинга дополнительно подтверждается анализом флуоресцентного зонда, который показывает высокие уровни стабилизации TTR на 28-й день (до введения дозы) и на пике 28-го дня (через 1 ч после введения дозы) у лиц с TTR дикого типа и мутантным TTR; см. фиг. 35.

При построении графика взаимосвязи между концентрацией AG10 в плазме циркулирующей крови

и занятостью AG10 в кармане связывания тироксина тетрамерного TTR было определено, что значительное связывание с мишенью (захват AG10) происходит при концентрации в плазме крови около 5 мкМ, а полное связывание с мишенью происходит примерно при 7,5 мкМ; см. фиг. 36.

Фиг. 37 и фиг. 38 представляют график относительных единиц флуоресценции, измеренных на 1-й день перед введением дозы, на 14-й день до введения дозы (минимальная), на 14-й день через 1 ч после введения дозы (пик), на 28-й день до введения дозы (минимум) и на 28 день через 1 ч после введения (пик) для группы, принимавшей 400 мг два раза в сутки (фиг. 37) и группы, принимавшей 800 мг два раза в сутки (фиг. 38) в анализе флуоресцентного зонда. Как видно на обеих фигурах, анализ флуоресцентного зонда показывает, что к 14 дню наблюдается почти полное связывание с мишенью в обеих группа при приеме 400 мг два раза в сутки и 800 мг два раза в сутки в моменты времени как для минимальных, так и для пиковых концентраций. Для сравнения, фиг. 39 представляет собой график относительных единиц флуоресценции, измеренных в каждый из указанных выше моментов времени в контрольной группе плацебо. Этот график демонстрирует отсутствие связывания с мишенью для контрольной группы плацебо.

В совокупности данные, представленные в настоящей заявке, показали, что AG10 хорошо переносился симптоматическими пациентами с ATTR-СМ в течение 28 дней, AG10 увеличивает концентрации TTR в сыворотке дозозависимым образом, AG10 восстанавливает низкие уровни TTR до нормальных уровней, и AG10 полностью стабилизирует TTR для обоих протестированных уровней дозирования.

При рассмотрении популяций TTR дикого типа и конкретных мутантных популяций TTR в тестируемых группах каждая группа, принимавшая активное вещество, независимо от генотипа TTR показывала увеличение концентраций TTR в сыворотке крови в конце приема препарата по сравнению с начальными уровнями. Данные TTR сыворотки крови анализировали с использованием определения преальбумина ARUP, описанного в примере 6 и показанного в табл. 8 ниже.

Таблица 8

Концентрация TTR в сыворотке крови в группах испытания фазы II

Генотип	N	Среднее изменение	Стандартное отклонение
400 мг	16	36%	21%
T60A	2	42%	20%
V122I	4	51%	13%
WT	10	32%	22%
800 мг	16	50%	38%
V122I	4	90%	57%
V30M	1	61%	NA
WT	11	35%	18%
Плацебо	17	-7%	15%
V122I	3	-17%	34%
WT	14	-4%	7%

Конкретно при рассмотрении данных для индивидуумов с мутацией V30M TTR (широко распространенная мутация, связанная с семейной полинейропатией ATTR (ATTRm-PN), наблюдалась почти полное связывание с мишенью на 14 день и почти полная стабилизация TTR на 28 день лечения для этой популяции пациентов с использованием анализа FPE и вестерн-блоттинга, соответственно (см. фиг. 40 и 41).

Пример 8. Обычно используемые диуретики не влияют на экспозицию AG10.

Пациенты с ATTR-СМ с клиническими признаками сердечной недостаточности часто проявляют признаки и симптомы перегрузки объемом или повышенного внутрисердечного давления. Это требует лечения диуретиками (Ruberg & Berk Circulation 2012 126: 1286-300). Диуретики, такие как фуросемид или торсемид, были наиболее распространенными лекарствами, которые использовались в испытании 2 фазы AG10-201 у пациентов с ATTR-СМ; см. табл. 9.

Таблица 9

Краткое описание субъектов, получающих лечение диуретиками

Доза	Число субъектов	Субъекты, получающие фуросемид/торсемид
Плацебо	17	14
400 мг 2 раза в сутки AG10	16	14
800 мг 2 раза в сутки AG10	16	11

Для анализа ФК популяции использовали формальный трехэтапный процесс ковариантного отбора для исследования их влияния на фармакокинетику AG10. В то время как множественные ковариаты были определены как значимые при прямом добавлении, только патологическое состояние на центральном объеме распределения оказалось незначимым при обратном исключении на уровне значимости $\alpha=0,01$. Таким образом, окончательная модель сохранила патологическое состояние в центральном объеме распределения.

Популяционный ФК анализ использовали для определения того, оказывает ли совместное введение диуретиков, таких как фуросемид, какое-либо влияние на фармакокинетику AG10. Из 32 субъектов фазы 2, которым вводили дозу AG10, 25 получали фуросемид или торсемид. Из 17 субъектов, принимавших плацебо, 14 принимали фуросемид или торсемид.

Не наблюдали разницы в клиренсе AG10 между здоровыми взрослыми добровольцами в фазе 1 и субъектами в фазе 2 в зависимости от статуса пациента или диуретиков (фуросемид/торсемид) (фиг. 42A, B).

Как было указано ранее, на центральный объем распределения влияло патологическое состояние ATTR-СМ. Меньший объем (фиг. 42C, D) наблюдался у:

- a) пациентов с ATTR-СМ в фазе 2 по сравнению со здоровыми взрослыми добровольцами в фазе 1;
- b) пациентов с ATTR-СМ, получавших фуросемид или торсемид, по сравнению с не получавшими фуросемид или торсемид.

Таким образом, объем распределения был ниже у субъектов, получавших фуросемид/торсемид, по сравнению со здоровыми взрослыми добровольцами. Невозможно было определить различие между взаимодействием лекарственного средства и заболевания (т.е. влияние хронической сердечной недостаточности на объем распределения) и взаимодействием лекарственных средств (влияние диуретиков на объем распределения). Изменение объема распределения в основном влияет на пиковую концентрацию лекарственного средства в плазме. Как испытание 1 фазы (AG10-001) у здоровых взрослых добровольцев (MAD 3, 800 мг каждые 12 ч), так и испытание 2 фазы у пациентов с ATTR-СМ (AG10-201) продемонстрировали, что минимальная циркулирующая концентрация ~8 мкМ AG10 является подходящей целью на основе стабилизации ТТР. Как показано на фиг. 43, прием 800 мг AG10 два раза в сутки позволяет достичь подходящей концентрации как у пациентов, получавших фуросемид или торсемид, так и у пациентов, которые не принимают сопутствующие диуретики.

Средние коэффициенты накопления для C_{max} AG10 в плазме при повторных дозах у здоровых добровольцев находились в диапазоне от 1,3 до 1,6. Коэффициент накопления использовали для прогнозирования фармакокинетического профиля дозирования таблеток AG10 400 мг в стабильном состоянии. Фиг. 44 сравнивает уровень AG10 в плазме через 12 ч после приема одной таблетки 400 мг AG10, прогнозируемую минимальную концентрацию AG10 в циркуляции в равновесном состоянии, предполагая коэффициент накопления 1,45 (после повторного приема таблеток 400 мг), и фактические концентрации AG10 в кровотоке пациентов с ATTR-СМ, получавших дозу AG10 400 мг BID в фазе 2. Аналогично результатам, полученным при ежедневной дозе 800 мг BID (4 таблетки AG10 по 200 мг два раза в сутки), прогнозируемые минимальные уровни для таблетки с более высокой дозой (400 мг) также совпадали с минимальным профилем группы испытаний 2 фазы с более низкой суточной дозой 400 мг BID (2 таблетки AG10 по 200 мг два раза в сутки).

Таким образом, обычно используемые диуретики не влияют на экспозицию AG10.

Пример 9. Клинические испытания 3 фазы - ATTR-СМ.

Это проспективное рандомизированное многоцентровое исследование с параллельными группами будет оценивать эффективность и безопасность AG10 у субъектов с симптомами по сравнению с плацебо, вводимым на фоне терапии стабильной сердечной недостаточности. За скринингом и рандомизацией последуют в общей сложности 30 месяцев слепого плацебо-контролируемого лечения. По истечении 12 месяцев лечения (часть A) эффективность AG10 будет оцениваться путем анализа функциональных (6MWT) и связанных со здоровьем конечных точек QoL (измеряемых с помощью специфического для сердечной недостаточности инструмента KCCQ). По истечении 30 месяцев лечения (часть B) эффективность AG10 будет дополнительно оценена путем анализа общей смертности и госпитализации в связи с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

В настоящее время нет одобренных методов лечения, показанных для лечения ATTR-СМ. Никакие другие исследуемые методы лечения или терапии, используемые не по назначению или в качестве добавок без рецепта для лечения ATTR-СМ, не будут разрешены. Однако в случае, если другие методы лечения получают одобрение регулирующих органов с конкретными показаниями для лечения ATTR-СМ в одном или нескольких регионах во время проведения испытания, существует несколько потенциальных путей для субъектов исследования:

Субъектам будет рекомендовано оставаться в испытании в течение как минимум 12 месяцев слепой исследуемой терапии независимо от наличия каких-либо одобренных, назначенных продуктов. Если субъект решит выйти из исследования в любое время, ему будет предложено завершить посещение для досрочного прекращения и связанных с ним процедур.

Любому субъекту исследования, который уже завершил не менее 24 месяцев слепой исследуемой терапии и впоследствии получил доступ к одобренному, указанному продукту, будет предложено остаться в исследовании и продолжить слепое лечение испытания даже после начала терапии этим продуктом. Субъекты, начинающие терапию утвержденным назначенным продуктом и остающиеся в исследовании, должны совершить внеплановый визит с оценкой исследования до начала сопутствующей терапии.

Все субъекты, завершившие 30 месяцев слепого лечения испытания и прошедшие окончательную оценку периода двойного слепого лечения, могут быть приняты для участия в открытом расширенном исследовании длительного лечения AG10.

Подходящие субъекты будут произвольно распределены в соотношении 2:1 в группы AG10 800 мг или соответствующего плацебо, вводимого перорально BID. Субъекты будут стратифицированы при рандомизации в зависимости от того, имеют ли они ATTR-СМ дикого типа (ATTRwt-СМ) или мутантный ATTR-СМ (ATTRm-СМ) с целевым минимумом 20% субъектов с ATTRm-СМ. Будут приложены все усилия для подтверждения статуса TTR (дикий тип или вариант) путем генотипирования. В исключительных случаях (когда субъект отказывается пройти генетическое тестирование) может быть запрошено разрешение от медицинского наблюдателя или уполномоченного лица на регистрацию субъекта без задокументированного генотипирования. В случае одобрения и включения субъекта в исследование, такой субъект с неизвестным статусом TTR будет стратифицирован в страте "TTR дикого типа". Субъекты также будут стратифицированы в соответствии с уровнем NT-proBNP (≤ 3000 пг/мл против >3000 пг/мл) и функцией почек, определяемой рСКФ (≥ 45 против <45 мл/мин/1,73 м²) при скрининге.

Образцы плазмы для ФК и сыворотки/плазмы для ФД будут собраны в субисследовании PopPK-PD.

Информация о НЯ и сопутствующих лекарствах будет собираться на протяжении всего исследования. Безопасность и проведение исследования будет контролироваться независимым комитетом по мониторингу данных (КМД).

Краткое изложение дизайна испытания показано на фиг. 45.

В части А этого исследования будет определяться эффективность AG10 в лечении субъектов с симптоматической транстиретиновой амилоидной кардиомиопатией (ATTR-СМ) путем оценки разницы между группами AG10 и плацебо в изменении от исходного уровня в тесте 6-минутной ходьбы (6MWT) через 12 месяцев лечения.

В части В этого исследования будет определяться эффективность AG10 при лечении субъектов с симптоматической ATTR-СМ путем оценки разницы между группой AG10 и плацебо в комбинированной конечной точке смертности от всех причин и совокупной частоте госпитализации, связанной с сердечно-сосудистыми (CV) заболеваниями в течение 30 месяцев.

Популяция и стратификация субъектов.

Приблизительно 510 мужчин и женщин в возрасте ≤ 18 и ≥ 90 лет с хронической, стабильной симптоматической (класс I-III по NYHA) ATTR-СМ будут рандомизированы в соотношении 2:1 (340 субъектов с активным лечением, 170 в группе соответствующего плацебо) в исследовании. Субъекты будут стратифицированы при рандомизации в зависимости от наличия у них ATTRm-СМ или ATTRwt-СМ с целевым минимумом 20% субъектов с ATTRm-СМ. Будут приложены все усилия для подтверждения статуса TTR (дикий тип или вариант) путем генотипирования. В исключительных обстоятельствах (когда субъект отказывается проходить генетическое тестирование) может быть запрошено разрешение от медицинского наблюдателя или уполномоченного лица на регистрацию субъекта без задокументированного генотипирования. В случае одобрения и включения субъекта в исследование, такой субъект с неизвестным статусом TTR будет стратифицирован в страте "TTR дикого типа". Субъекты также будут стратифицированы в соответствии с уровнем NT-proBNP (≤ 3000 пг/мл против >3000 пг/мл) и функцией почек, определяемой рСКФ (≥ 45 против <45 мл/мин/1,73 м²) при скрининге.

Продолжительность лечения.

Субъектов будут лечить исследуемым лекарственным средством (AG10 или плацебо) в течение 30 месяцев, если оно будет хорошо переноситься. Подходящие субъекты, завершившие 30 месяцев лечения, могут продолжить курс ОРИ для получения AG10 по усмотрению исследователя.

Часть А, часть В и ОРИ будут регистрироваться отдельно. Испытание завершается после того, как данные по всем субъектам, завершившим заключительный визит после лечения, будут включены в окончательную базу данных и завершен окончательный отчет об испытании.

Проведенное лечение.

Субъекты, отвечающие критериям отбора, будут рандомизированы в соотношении 2:1 (AG10: плацебо) для получения следующих групп лечения двойным слепым методом: 800 мг AG10 BID, перорально (две таблетки AG10 по 400 мг, BID) Соответствующее плацебо BID, перорально (две одинаковые таблетки плацебо, BID).

В случае, если исследователь определяет, что корректировка дозы оправдана, на основании отчета субъекта о побочных эффектах, которые могут указывать на плохую переносимость исследуемого лекарства, доза при слепом испытании может быть уменьшена до 400 мг AG10 или соответствующего плацебо, вводимого BID. Это будет достигнуто, если исследовательский персонал проинструктирует субъекта принять одну таблетку исследуемого лекарства BID вместо двух. Любая корректировка дозы будет задокументирована в базе данных.

Запрещенные медикаменты.

1. Использование патисирана, инотерсена, тафамидиса [см. примечание ниже] или любого другого исследуемого агента для лечения ATTR-СМ запрещено во время исследования.

2. Использование дифлунизала, доксициклина, натуральных продуктов или производных, используемых в качестве непроверенных методов лечения ATTR-СМ (например, экстракта зеленого чая, тауроурсодезоксихолевой кислоты [TUDCA]/урсодиола) запрещено.

3. Использование блокаторов кальциевых каналов (например, верапамила, дилтиазема) или наперстянки запрещено.

Примечание: если во время участия в исследовании тафамидис станет коммерчески доступным и субъекты получат к нему доступ, субъектам будет разрешено начать терапию тафамидисом в качестве сопутствующего лекарства, если они завершили не менее 24 месяцев терапии слепого исследования.

Процедуры исследования.

Календарь оценок.

Описание процедур, которые должны выполняться в ходе исследования, предоставлено ниже.

Скрининг (35-й день - 1-й день).

Скрининг будет проводиться в течение 35 дней перед применением первой дозы ИЛП. При скрининге будут выполнены следующие процедуры:

применение информированного согласия;

просмотр критериев включения/исключения, чтобы подтвердить, что объект соответствует критериям;

представление исходных документов, необходимых для Комитета по диагностическому подтверждению, должно быть завершено как можно раньше в течение периода скрининга и должно включать:

1) отчет о эндомикардиальной биопсии или

2) планарные изображения позитивного ^{99m}Tc-пирофосфатного или бисфосфонатного сканирования, И клинические лабораторные данные, исключающие диагноз AL амилоидоза (основанные как на электрофорезе с иммунной фиксацией (ИЭФ) сыворотки и/или мочи, так и на анализе свободных легких цепей (sFLC) в сыворотке));

примечание: субъектам с сопутствующей моноклональной гаммопатией неопределенной значимости (MGUS) может потребоваться подтверждение диагноза ATTR-СМ с помощью эндомикардиальной биопсии с масс-спектрометрическим анализом,

оценка медицинского и хирургического анамнеза,

оценка класса NYHA,

физическое обследование, включая измерение массы тела и роста,

оценка жизненно важных функций,

ЭКГ покоя в 12 отведениях,

трансторакальная эхокардиограмма в покое (ЕСНО), если толщина стенки ЛЖ (межжелудочковой перегородки или задней стенки ЛЖ) не задокументирована в истории болезни на основании эхокардиограммы или КМР,

тест с шестиминутной ходьбой (6MWT), две оценки с интервалом от >24 ч до ≥2 недель,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

сбор образцов крови для исследовательских тестов сыворотки и плазмы,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

предварительная оценка использования лекарств.

Дни лечения.

Процедуры исследования перечислены ниже по дням исследования, в идеале выполняются в порядке, указанном ниже, для каждого дня. День 1 и каждые 3 месяца (± 7 дней).

Эти оценки будут осуществляться в день 1 и месяцы 3, 6, 9, 15, 18, 21, 24 и 27:

просмотр критериев включения/исключения, чтобы подтвердить, что объект соответствует критериям (день 1),

рандомизация группы лечения и присвоение номера рандомизации (день 1),

оценка класса NYHA,

физический осмотр, включая измерение массы тела,

оценка жизненно важных функций,

ЭКГ покоя в 12 отведениях,

опрос по анкете Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ),

параметры EuroQoL-5 (EQ-5D-5L),

тест на шестиминутную ходьбу (6MWT) в 6, 9, 18, 24 месяца,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

сбор образцов крови ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD

сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),

выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),

оценка использования сопутствующих лекарств,

НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации, оценка соответствия ИЛП (все посещения, кроме дня 1).

День 28 (± 3 дня):

оценка класса NYHA,

физический осмотр, включая измерение массы тела,

оценка жизненно важных функций,

ЭКГ в покое в 12 отведениях перед дозой и через 1 ч после приема,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы и через 1 ч после приема) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы и через 1 ч после приема) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови на преальбумин (перед приемом дозы),

выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),

оценка использования сопутствующих лекарств,

НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,

оценка соблюдения режима ИЛП.

Месяц 12 (± 7 дней):

оценка класса NYHA,

физический осмотр, включая измерение массы тела,

оценка жизненно важных функций,

ЭКГ покоя в 12 отведениях,

опрос по анкете Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ),

параметры EuroQoL-5 (EQ-5D-5L),

тест шестиминутной ходьбы (6MWT),

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),

выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),

оценка использования сопутствующих лекарств,

НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,

оценка соблюдения режима ИЛП.

Ежемесячный телефонный контакт (± 7 дней)

Эти телефонные контакты будут происходить во 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23, 25, 26, 28 и 29 месяцы:

оценка использования сопутствующих лекарств,

НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,

оценка соблюдения режима ИЛП. Если субъект прекращает прием исследуемого лекарственного средства и оценку исследования, необходимо приложить все усилия, чтобы продолжить наблюдение за субъектом в ходе исследования, выполняя ежемесячный контакт для определения жизненного статуса или до отзыва согласия.

Месяц 30 (± 7 дней) и начало открытого расширенного испытания Субъекты, завершившие 30-месячный период двойного слепого лечения, будут продолжать ОРИ для приема AG10.

Оценка класса NYHA,

физический осмотр, включая измерение массы тела,

оценка жизненно важных функций,

ЭКГ покоя в 12 отведениях,

опрос по анкете Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ),

параметры EuroQoL-5 (EQ-5D-5L),

тест шестиминутной ходьбы (6MWT),

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста, сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),
выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),
оценка использования сопутствующих лекарств,
НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,
оценка соблюдения режима ИЛП.

Месяц 1 после начала открытого расширенного испытания (± 3 дня):

оценка класса NYHA,
физический осмотр, включая измерение массы тела,
оценка жизненно важных функций,
ЭКГ покоя в 12 отведениях,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

сбор образцов крови ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови на преальбумин (перед приемом дозы),
выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),
оценка использования сопутствующих лекарств,
НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,
оценка соблюдения режима ИЛП.

Каждые 3 месяца после начала открытого расширенного испытания (± 7 дней):

оценка класса NYHA,
физический осмотр, включая измерение массы тела,
оценка жизненно важных функций,
ЭКГ покоя в 12 отведениях,
опрос по анкете Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ),
параметры EuroQoL-5 (EQ-5D-5L),
тест шестиминутной ходьбы (6MWT), каждые 6 месяцев,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста,

сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед дозой) в субисследовании PopPK-PD,

сбор образцов крови для ФК (перед дозой) в субисследовании PopPK-PD,

сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),
выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),
оценка использования сопутствующих лекарств,
НЯ/оценка жизненного статуса/выявление случаев госпитализации,
оценка соблюдения режима ИЛП.

Измерения концентрации лекарств.

График взятия крови для ФК.

В подгруппе субъектов в участвующих центрах образцы для ФК будут собираться в следующие моменты времени для определения концентраций AG10 в плазме:

день 1 и каждые 3 месяца визитов для испытания: перед приемом дозы,
день 28: перед приемом дозы и через 1 ч после приема,
месяц 1 после начала ОРИ и каждые 3 месяца ОРИ: перед приемом дозы,
при досрочном завершении исследования.

График забора крови для ФД.

В подгруппе субъектов на участках испытания ФД свойства AG10 будут оцениваться с помощью установленных анализов стабилизации TTR, включая анализ исключения флуоресцентного зонда (FPE) и вестерн-блоттинг. Отбор проб будет производиться в следующие периоды для проведения этих анализов ФД:

день 1 и каждые 3 месяца визитов исследования: перед приемом дозы,
день 28: перед приемом дозы и через 1 ч после приема,
месяц 1 после начала ОРИ и каждые 3 месяца ОРИ: перед приемом дозы,
преждевременное прекращение исследования.

Процедуры забора крови на преальбумин.

Отбор проб для измерения концентраций преальбумина будет производиться в следующее время:

дни 1, 28 и каждые 3 месяца визитов при испытании: перед приемом дозы, месяц 1 после начала ОРИ и каждые 3 месяца ОРИ: перед приемом дозы, преждевременное прекращение испытания.

Тест шестиминутной ходьбы (6MWT).

Перед рандомизацией будут проведены два 6MWT с интервалом от >24 ч до ≥ 2 недель. Расстояние ходьбы должно составлять ≤ 150 м, а пройденное расстояние должно быть в пределах 15% при двух последовательных тестах в разные дни. Если результаты двух тестов не находятся в пределах 15%, необходимо повторить дополнительные 6MWT в течение от 24 ч до 2 недель после одного из 6MWT. Если последняя попытка все еще находится за пределами 15% от одного из 6MWT, субъект не будет участвовать в испытании.

Тест 6MWT следует проводить после завершения KCCQ и EQ-5D-5L во время посещений, где это необходимо.

Тест 6MWT по шкале Борга будет проводиться в соответствии с рекомендациями Американского торакального общества. Полная информация о процедурах для 6MWT представлена в Руководстве по процедурам исследования.

Опросник по кардиомиопатии Канзас-Сити (KCCQ).

KCCQ - это опросник из 23 пунктов, разработанный для оценки состояния здоровья и связанного со здоровьем качества жизни у субъектов с сердечной недостаточностью. Пункты включают симптомы сердечной недостаточности, влияние на физические и социальные функции, а также то, как сердечная недостаточность влияет на качество их жизни (QoL). Он должен быть заполнен субъектом перед приемом препарата. Полная информация представлена в Руководстве по процедурам исследования.

Параметры EuroQoL-5 (EQ-5D-5L).

EQ-5D-5L представляет собой краткий, универсальный инструмент самостоятельно оценки состояния здоровья, для завершения которого требуется около 5 мин и который следует проводить после завершения KCCQ. Анкета состоит из двух частей. В первой части респондентов просят оценить их текущее состояние здоровья по 5 параметрам (мобильность, уход за собой, обычная деятельность, боль или дискомфорт, тревога или депрессия), причем каждое измерение имеет пять уровней функций (1 - нет проблем, 2 - небольшая проблема, 3 - средняя проблема, 4 - серьезная проблема и 5 - экстремальная проблема). Вторая часть представляет собой самооценку респондентами текущего состояния здоровья по визуальной аналоговой шкале (EQ VAS) с конечными точками, помеченными как "наилучшее воображаемое состояние здоровья" (100 баллов) и "наихудшее воображаемое состояние здоровья" (0 баллов). Баллы по 5 параметрам могут использоваться для расчета единственного значения индекса, также известного как индекс оценки общего состояния здоровья. Подробная информация о применении и выставлении оценок представлена в Руководстве по процедурам исследования.

Клинические лабораторные определения.

Будут собраны образцы крови и мочи для клинических лабораторных исследований. Во время скрининга исследователь оценивает клиническую значимость любых значений, выходящих за пределы референсных диапазонов, предоставленных лабораторией, и субъекты с отклонениями, признанными клинически значимыми, будут исключены из исследования.

Будут выполнены следующие клинические лабораторные анализы.

Гематология	Гемоглобин, гематокрит, количество лейкоцитов (WBC), количество тромбоцитов, общий анализ крови (CBC) и дифференциальный
Химия	Натрий, калий, хлорид, углекислый газ (бикарбонат), глюкоза, азот мочевины крови (BUN), креатинин, аспаратаминотрансфераза (AST), аланинаминотрансфераза (ALT), общий белок, альбумин, преальбумин, ретинол-связывающий белок (RBP), свободный тироксин (FT4), щелочная фосфатаза, кальций, фосфор, общий и фракционированный (непрямой или прямой) билирубин, мочевиная кислота, тиреотропный гормон (TSH), тропонин I, креатинкиназа (СК), СК-МВ и NT-проBNP
Общий анализ мочи	Полный анализ мочи (удельный вес, pH, глюкоза, белок, гемоглобин, лейкоцитарная эстераза и нитрит). Кроме того, для каждого образца будет проведено определение соотношения альбумина к креатинину и микроскопический анализ мочи, в частности, на наличие цилиндров, бактерий, лейкоцитов, эпителиальных клеток и красных кровяных телец
Прочее	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) только для подтверждения постменопаузального статуса при скрининге у женщин, у которых нет менструаций в течение как минимум 12 месяцев, и они не используют гормональные контрацептивы или заместительную гормональную терапию. Состояние постменопаузы определяется как отсутствие менструаций в течение 12 месяцев без альтернативной медицинской причины.
Тест на беременность	Высокочувствительный анализ мочи во время всех посещений, как указано в Графике обследований (только женщины с детородным потенциалом).

Жизненно важные признаки.

Персонал исследовательского центра будет оценивать жизненно важные показатели до и после приема дозы после 5-минутного отдыха. Любое отклонение от нормы жизненно важных функций, которое считается клинически значимым (т.е. связано с симптомами и/или требует медицинского вмешательства), будет зарегистрировано как НЯ.

Электрокардиограммы.

Будет оцениваться стандартная ЭКГ в 12 отведениях. ЭКГ будет проводиться в положении лежа на спине после 5-минутного отдыха перед дозой. ЭКГ через 1 ч после введения дозы на 28 день будет проводиться до тех пор, пока не будут собраны и проанализированы дополнительные данные фазы 1 о взаимосвязи ФК-ФД с QTc. Основываясь на результатах данных ФК-ФД, 1-часовая ЭКГ после приема дозы на 28-й день может больше не требоваться для уменьшения нагрузки на пациента. Все исследователи будут проинформированы об этом изменении в обычном порядке.

Исследователь или квалифицированный субисследователь проверяет все интерпретации ЭКГ и измерения длительности интервалов на предмет клинической значимости. Любая интерпретация ЭКГ, которая считается клинически значимой (т.е. связана с симптомами и/или требует медицинского вмешательства), будет считаться НЯ.

Физические осмотры.

Субъекты проходят полное физическое обследование (ФО), включая измерения массы тела и роста, которое должно выполняться врачом или соответствующим образом обученным медицинским работником. Любое отклонение от нормы, обнаруженное при физикальном обследовании, которое считается клинически значимым (т.е. связано с симптомами и/или требует медицинского вмешательства), будет зарегистрировано как НЯ.

Выявление случаев госпитализации в связи с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Госпитализация, связанная с сердечно-сосудистыми заболеваниями, определяется как неизбежная госпитализация в отделение неотложной помощи для проведения медикаментозной терапии, результатом которой является пребывание не менее 24 ч (или изменение даты, если время госпитализации/выписки недоступно), или пребывание в больнице менее 24 ч, если диагноз при выписке и вмешательства указывают на то, что цель пребывания в больнице заключалась в внутривенной диуретической терапии для лечения декомпенсированной сердечной недостаточности. Исследователь несет ответственность за обеспечение сбора и документирования потенциальных конечных точек исследования, включая даты поступления и выписки; предоставление исследователем оценки того, связана ли госпитализация с сердечно-сосудистыми заболеваниями; и отправку уведомления о нежелательном явлении для всех НЯ, приведших к смерти или госпитализации.

Пример 10. Фаза 3 клинического испытания - ATTR-PN.

В этом проспективном рандомизированном многоцентровом исследовании с параллельными группами будет оцениваться безопасность и эффективность AG10 у субъектов с симптомами с ATTR-PN по сравнению с плацебо. За скринингом и рандомизацией последует 18-месячный период двойного слепого плацебо-контролируемого лечения.

Подходящие субъекты будут рандомизированы в соотношении 1:1 к AG10 800 мг или соответствующему плацебо, вводимому перорально BID. Субъекты будут стратифицированы при рандомизации на основе отсечения при скрининге по шкале невропатических нарушений (NIS) от <30 до ≥30 баллов, и в зависимости от того, принимают ли они в настоящее время тафамидис (Vyndaqel®, Pfizer) или нет (в тех странах или регионах, где он доступен).

Информация о НЯ и сопутствующих лекарствах будет собираться на протяжении всего исследования. Безопасность и проведение исследования будет контролироваться независимым комитетом по мониторингу данных (КМД).

Краткое изложение дизайна испытания показано на фиг. 46.

Популяция и стратификация субъектов.

Документация о положительном генотипе требуется для подтверждения установленного диагноза ATTR-PN. Ключевые критерии отбора были выбраны для выявления популяции субъектов с заболеванием, достаточно развитым, чтобы показать прогрессирование в группе плацебо, но не настолько развитым, чтобы исключить обнаружение изменения статуса заболевания (например, оценка PND ≤IIIa и оценка по шкале эффективности Карновского ≥60%). Поскольку многие пациенты с ATTR-PN также имеют поражение сердца, пациенты с симптомами класса IV по NYHA исключаются из-за высокой смертности, связанной с этой степенью кардиомиопатии. Сопутствующее использование других методов лечения, которые модулируют выработку или стабильность транстиретина, исключается (с возможным исключением тафамидиса 20 мг/сутки, если он доступен), чтобы лучше прояснить сигналы эффективности и безопасности, связанные с AG10.

Шкала невропатических нарушений (NIS) представляет собой неврологическую оценку, которую относительно легко проводить, и которая представляет собой суммирование клинических нарушений (слабость, снижение рефлексов и потеря чувствительности) с использованием стандартных групп мышц,

рефлексов и сенсорных модальностей и конкретных участков. Баллы рассчитывают по шкале от 0 до 244, причем более высокие баллы указывают на обострение болезни. Поскольку было показано, что NIS коррелирует с другими показателями тяжести заболевания и прогноза, а также поскольку средние значения ~30 были зарегистрированы в больших когортах пациентов с ATTR-PN, стратификация баллов NIS при скрининге (<30 и ≥30) включена для смягчения потенциальных дисбалансов тяжести невропатии в группах лечения (Adams, 2015). Субъекты также будут разделены на группы в зависимости от того, принимают ли они тафамидис в дозе 20 мг/сутки, как указано для лечения ATTR-PN в некоторых странах или регионах, где он доступен.

Продолжительность лечения.

Субъекты будут лечиться исследуемым препаратом (AG10 или плацебо) в течение 18 месяцев.

На основе динамической оценки, наблюдаемой в нескольких опубликованных группах, ожидается, что скорость прогрессирования в этой популяции субъектов на 18-м месяце составит от ~12,5 до 17 баллов по шкале mNIS+7 (Adams 2017, Berk 2013). Поскольку прогрессирование заболевания у субъектов плацебо, измеряемое с помощью mNIS+7, является постепенным, ожидается ухудшение по крайней мере на 12 баллов в течение 18 месяцев испытания (Adams 2017, Berk 2013). Поскольку ожидается, что AG10 остановит прогрессирование заболевания, предотвратив продолжающийся амилоидогенез, 18 месяцев, вероятно, будут достаточно продолжительными, чтобы обнаружить клинически значимое изменение с поправкой на плацебо в баллах mNIS+7.

Проведенное лечение.

Субъекты будут рандомизированы 1:1 (AG10: плацебо) для получения следующих групп лечения двойным слепым методом:

800 мг AG10 BID, перорально (две таблетки AG10 по 400 мг, BID), соответствующее плацебо BID, перорально (две одинаковые таблетки плацебо, BID).

В случае, если исследователь определяет, что корректировка дозы оправдана, на основании отчета субъекта о побочных эффектах, которые могут указывать на плохую переносимость исследуемого лекарства, доза при слепом испытании может быть уменьшена до 400 мг AG10 или соответствующего плацебо, вводимого два раза в сутки. Это будет достигнуто, если исследовательский персонал проинструктирует субъекта принять одну таблетку исследуемого лекарства BID вместо двух. Любая корректировка дозы будет задокументирована в базе данных.

Запрещенные лекарства.

1. Использование патисирана, инотерсена или любого другого одобренного или исследуемого агента для лечения ATTR-PN (кроме дозы тафамидиса 20 мг) запрещено во время исследования.

2. Использование одобренных продуктов без показаний для лечения ATTR (например, дифлунизала, доксициклина) или натуральных продуктов или производных, используемых в качестве недоказанных методов лечения ATTR (например, экстракта зеленого чая, тауроурсодезоксихолевой кислоты [TUDCA]/урсодиола), запрещено во время исследования.

Процедуры исследования. График оценок.

Описание процедур, которые должны выполняться в ходе исследования, предоставлено ниже.

Скрининг (28-й день - 1-й день)

Скрининг будет проводиться в течение 28 дней перед применением первой дозы ИЛП. При скрининге будут выполнены следующие процедуры:

получение информированного согласия,

просмотр критериев включения/исключения, чтобы подтвердить, что субъект соответствует критериям,

оценка медицинского и хирургического анамнеза, оценка класса NYHA,

оценка общего состояния пациента по шкале Карновского, физическое обследование, включая мИМТ, оценка жизненно важных функций, ЭКГ покоя в 12 отведениях,

оценка по шкале PND (шкале инвалидности при полинейропатии), NIS, mNIS+7,

тест на ходьбу на 10 м (10MWT), две оценки с интервалом от >24 ч до <1 недели,

сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,

сбор образцов крови для исследовательских тестов сыворотки и плазмы, анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста, предварительная оценка использования лекарств.

Дни лечения.

Процедуры исследования перечислены ниже по дням исследования, в идеале выполняются в порядке, указанном ниже, для каждого дня. День 1 и каждые 3 месяца (± 7 дней) Эти оценки будут осуществлены в день 1 и месяцы 3, 6, 9, 15:

проверка критериев включения/исключения, чтобы подтвердить, что объект соответствует критериям (день 1),

рандомизация субъектов для лечения и присвоение номера рандомизации (день 1),

оценка класса NYHA,

физическое обследование, включая МИМТ,
 оценка жизненно важных функций,
 ЭКГ покоя в 12 отведениях,
 оценка по шкале PND,
 оценка по шкале Дайка/Рэнкина,
 mNIS+7,
 Норфолк QOL-DN,
 COMPASS-31,
 тест на ходьбу на 10 м (10MWT),
 сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,
 анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста, сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы),
 сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы),
 сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),
 выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),
 оценка использования сопутствующих лекарств,
 НЯ/оценка жизненного статуса,
 оценка режима применения ИЛП (все посещения, кроме Дня 1). Месяц 18 (± 7 дней):
 оценка класса NYHA,
 физическое обследование, включая МИМТ,
 оценка жизненно важных функций,
 ЭКГ покоя в 12 отведениях,
 оценка по шкале PND,
 оценка по шкале Дайка/Рэнкина,
 mNIS+7,
 Норфолк QOL-DN,
 COMPASS-31,
 тест на ходьбу на 10 м (10MWT),
 сбор образцов крови для гематологии, химического анализа сыворотки (включая биомаркеры циркуляции), образцов для анализа мочи,
 анализ мочи на беременность, только для женщин детородного возраста, сбор образцов крови для ФД для анализа стабилизации TTR (перед приемом дозы),
 сбор образцов крови для ФК (перед приемом дозы), сбор пробы крови на преальбумин (перед приемом дозы),
 выдача/сбор и применение ИЛП с назначенным свидетелем (т.е. персоналом объекта),
 оценка использования сопутствующих лекарств, НЯ/оценка жизненного статуса, оценка режима применения ИЛП. Ежемесячный телефонный контакт (± 7 дней)
 Эти телефонные контакты будут происходить во 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17 месяцы:
 оценка использования сопутствующих лекарств, НЯ/оценка жизненного статуса, оценка режима применения ИЛП. Если субъект прекращает прием исследуемого лекарственного средства и оценку исследования, необходимо приложить все усилия, чтобы продолжить наблюдение за субъектом в ходе исследования, выполняя ежемесячный контакт для определения жизненного статуса или до отзыва согласия.

Измерения концентрации лекарств.
 График взятия крови для ФК.
 В подгруппе субъектов в участвующих центрах образцы для ФК будут собираться в следующие моменты времени для определения концентраций AG10 в плазме:
 день 1 и каждые 3 месяца визитов для исследования: перед приемом дозы.
 График взятия крови для ФД.
 В подгруппе субъектов на участках исследования ФД свойства AG10 будут оцениваться с помощью установленных анализов стабилизации TTR, включая анализ исключения флуоресцентного зонда (FPE) и вестерн-блоттинг. Отбор проб будет производиться в следующие периоды для проведения этих анализов ФД:
 день 1 и каждые 3 месяца визитов для исследования: перед приемом дозы.
 Процедуры забора крови на преальбумин.
 Отбор проб для измерения концентраций преальбумина будет производиться в следующие периоды:
 дни 1, 28 и каждые 3 месяца визитов для исследования: перед приемом дозы.
 Оценки.
 Будут выполнены следующие оценки: тест на ходьбу на 10 м (10MWT), шкала невропатических на-

рушений (NIS),

модифицированная шкала невропатических нарушений (mNIS + 7), COMPASS-31, шкала Дайка/Рэнкина, алиментарный статус (рассчитывается на основе МИМТ).

Тест на 10-метровую ходьбу (10MWT).

10MWT - это показатель эффективности, используемый для оценки скорости ходьбы в метрах в секунду на коротком расстоянии. Он используется для определения функциональной подвижности, скорости ходьбы и вестибулярной функции. Перед рандомизацией будут проведены два испытания 10MWT с интервалом от >24 ч до <1 недели.

Шкала невропатических нарушений (NIS).

NIS является неврологической оценкой, которая представляет собой совокупность клинических нарушений (слабость, снижение рефлексов и потерю чувствительности) с использованием стандартных групп мышц, рефлексов и сенсорных модальностей, и конкретных участков.

Модифицированная шкала невропатических нарушений (mNIS + 7).

Тест невропатических нарушений mNIS+7 представляет собой комбинированную шкалу для частичной оценки мышечной слабости, потери чувствительности и снижения рефлексов растяжения мышц.

Комбинированная шкала оценки вегетативных симптомов-31 (COMPASS-31).

COMPASS-31 используется для количественной оценки воздействия TTR амилоидоза на вегетативные симптомы каждого субъекта.

Шкала Дайка/Рэнкина.

Качество жизни будет оцениваться с использованием шкалы Дайка/Рэнкина.

Алиментарный статус.

Алиментарный статус будет оцениваться на основании изменений МИМТ.

Клинические лабораторные анализы.

Будут собраны образцы крови и мочи для клинических лабораторных исследований. Во время скрининга исследователь оценивает клиническую значимость любых значений, выходящих за пределы референсных диапазонов, предоставленных лабораторией, и субъекты с отклонениями, признанными клинически значимыми, будут исключены из исследования.

Будут выполнены следующие клинические лабораторные анализы.

Гематология	Гемоглобин, гематокрит, количество лейкоцитов (WBC), количество тромбоцитов, общий анализ крови (CBC) и дифференциальный
Химия	Натрий, калий, хлорид, углекислый газ (бикарбонат), глюкоза, азот мочевины крови (BUN), креатинин, аспаратаминотрансфераза (AST), аланинаминотрансфераза (ALT), общий белок, альбумин, преальбумин, ретинол-связывающий белок (RBP), свободный тироксин (FT4), щелочная фосфатаза, кальций, фосфор, общий и фракционированный (непрямой или прямой) билирубин, мочева кислота, тиреотропный гормон (TSH), тропонин I, креатинкиназа (СК), СК-МВ и NT-proBNP
Общий анализ мочи	Полный анализ мочи (удельный вес, pH, глюкоза, белок, гемоглобин, лейкоцитарная эстераза и нитрит). Кроме того, для каждого образца будет проведено определение соотношения альбумина к креатинину и микроскопический анализ мочи, в частности, на наличие цилиндров, бактерий, лейкоцитов, эпителиальных клеток и красных кровяных телец
Прочее	Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) только для подтверждения постменопаузального статуса при скрининге у женщин, у которых нет менструаций в течение как минимум 12 месяцев, и они не используют гормональные контрацептивы или заместительную гормональную терапию. Состояние постменопаузы определяется как отсутствие менструаций в течение 12 месяцев без альтернативной медицинской причины.
Тест на беременность	Высокочувствительный анализ мочи во время всех посещений, как указано в Графике обследований (только женщины с детородным потенциалом).

Жизненно важные признаки.

Персонал исследовательского центра будет оценивать показатели жизненно важных функций до и после приема дозы после 5-минутного отдыха. Любое отклонение от нормы жизненно важных функций, которое считается клинически значимым (т.е. связано с симптомами и/или требует медицинского вмешательства), будет зарегистрировано как НЯ.

Электрокардиограммы.

Будет оцениваться стандартная ЭКГ в 12 отведениях. ЭКГ будет проводиться в положении лежа на спине после 5-минутного отдыха перед дозой. Исследователь или квалифицированный субисследователь проверяет все интерпретации ЭКГ и измерения длительности интервалов на предмет клинической значимости. Любая интерпретация ЭКГ, которая считается клинически значимой (т.е. связана с симптомами

и/или требует медицинского вмешательства), будет считаться НЯ.

Физические осмотры.

Субъекты будут проходить полное физическое обследование (ФО), включая МИМТ, которое должно выполняться врачом или соответствующим образом подготовленным медицинским работником. Любое отклонение от нормы, обнаруженное при физикальном обследовании, которое считается клинически значимым (т.е. связано с симптомами и/или требует медицинского вмешательства), будет зарегистрировано как НЯ.

Шкала Карновского

Способен вести нормальную деятельность и работать; особого ухода не требуется.	1100	Практически здоров, жалоб нет, признаков заболевания нет.
	990	Сохранена нормальная активность; незначительные признаки или симптомы заболевания.
	880	Нормальная активность поддерживается с усилием; некоторые признаки или симптомы заболевания.
Утрата трудоспособности; может жить в домашних условиях и большей частью способен себя обслужить; требуется уход в различном объеме.	770	Способен себя обслужить; не способен поддерживать нормальную ежедневную активность или выполнять активную работу.
	660	Время от времени нуждается в уходе, но большей частью способен себя обслужить.
	550	Требуется существенный уход и частая медицинская помощь.
Не способен себя обслужить; требуется госпитальная помощь; возможна быстрая прогрессия заболевания.	440	Не способен себя обслуживать; требуется специальный уход и медицинская помощь
	330	Тяжелая инвалидность; показана госпитализация, хотя непосредственная угроза для жизни отсутствует.
	220	Тяжелое заболевание; необходима госпитализация; необходима активная поддерживающая терапия.
	110	Терминальный период; быстро прогрессирующие фатальные процессы.
	0	Мертв.

Шкала инвалидности при полинейропатии (шкала PND)

Стадия	Описание
0	Нет симптомов
I	Сенсорные расстройства, но сохраненная способность ходить
II	Нарушение способности ходить, но способность ходить без палки или костылей
IIIА	Ходьба с использованием одной палки или костыля.
IIIВ	Ходьба на двух палках или костылях.
IV	Прикован к инвалидной коляске или прикован к постели.

Хотя вышеизложенное изобретение было описано довольно подробно посредством иллюстрации и примера с целью ясности понимания, специалист в данной области техники поймет, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены на практике в пределах объема прилагаемой формулы изобретения. Кроме того, каждая ссылка, представленная в настоящей заявке, полностью включена посредством отссылки в той же мере, как если бы каждая ссылка была включена посредством ссылки отдельно. Если существует конфликт между настоящей заявкой и ссылкой, приведенной в настоящей заявке, настоящая заявка имеет преимущественную силу.

Последовательности

<210> SEQ ID NO: 1

<211> ДЛИНА: 127

<212> ТИП: БЕЛОК

<213> ОРГАНИЗМ: Homo sapiens

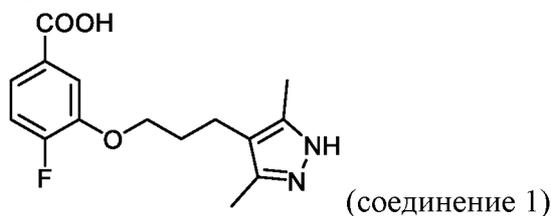
Yoshikazu et al. J. Biol. Chem. (1974) 249(21):6796-805

<400> ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ: 1

GPTGTGESKCPMLVKVLDVARGSPA	25
INVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTS	50
ESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDT	75
KSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDS	100
GPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNP	125
KE	127

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий применение у субъекта, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу



или его фармацевтически приемлемой соли, где указанное терапевтически эффективное количество представляет собой общую суточную дозу примерно 1600 мг соединения 1 в форме соли HCl или эквивалентное количество соединения 1 в виде свободного основания или в форме другой соли.

2. Способ по п.1, где указанное соединение 1 применяют перорально.

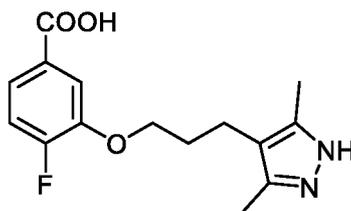
3. Способ по п.1 или 2, где указанное соединение 1 применяют один раз в сутки.

4. Способ по п.1 или 2, где указанное соединение 1 применяют два раза в сутки.

5. Способ по п.1 или 2, где указанное соединение 1 применяют три раза в сутки.

6. Способ по п.1 или 2, где указанное соединение 1 применяют четыре раза в сутки.

7. Способ лечения транстиретинового (TTR) амилоидоза у субъекта, нуждающегося в этом, включающий применение у субъекта, который в этом нуждается, терапевтически эффективного количества соединения 1, имеющего формулу



или его фармацевтически приемлемой соли, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 5 мкМ.

8. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 6 мкМ.

9. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 7,5 мкМ.

10. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови по меньшей мере 8 мкМ.

11. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 5 до 30 мкМ.

12. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 5 до 25 мкМ.

13. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 6 до 20 мкМ.

14. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 7,5 до 15 мкМ.
15. Способ по п.7, где терапевтически эффективное количество соединения 1 поддерживает минимальную концентрацию соединения 1 в плазме крови от 7,5 до 10 мкМ.
16. Способ по любому из пп.1-15, где указанный амилоидоз TTR представляет собой заболевание или состояние, выбранное из группы, состоящей из семейной амилоидной полинейропатии, семейной амилоидной кардиомиопатии, сенильного системного амилоидоза, центрального амилоидоза, глазного амилоидоза, лептоменингеального амилоидоза, окулолептоменингеального амилоидоза, амилоидоза стекловидного тела, амилоидоза желудочно-кишечного тракта, нейропатического амилоидоза, не-нейропатического амилоидоза, ненаследственного амилоидоза, реактивного/вторичного амилоидоза, церебрального амилоидоза.
17. Способ по п.16, где указанный TTR амилоидоз представляет собой лептоменингеальный амилоидоз.
18. Способ по п.17, где указанный лептоменингеальный амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию аспарагиновой кислоты на глицин в положении 18 (D18G).
19. Способ по п.17, где указанный лептоменингеальный амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию глицина на аргинин в положении 53 (G53R).
20. Способ по п.17, где указанный лептоменингеальный амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C).
21. Способ по п.17, где указанный лептоменингеальный амилоидоз характеризуется белком TTR, который включает мутацию треонина на пролин в положении 49 (T49P).
22. Способ по любому из пп.1-15, где указанный TTR амилоидоз представляет собой транстретиновую амилоидную (ATTR) кардиомиопатию или транстретиновую амилоидную (ATTR) полинейропатию.
23. Способ по п.22, где указанный TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию треонина на аланин в положении 60 (T60A).
24. Способ по п.22, где указанный TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию пролина на серин в положении 24 (P24S).
25. Способ по п.22, где указанный TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию аспарагиновой кислоты на аланин в положении 38 (D38A).
26. Способ по п.22, где указанный TTR амилоидоз характеризуется белком TTR, который содержит мутацию лейцина на гистидин в положении 58 (L58H).
27. Способ по любому из пп.1-15, где указанный TTR амилоидоз представляет собой транстретиновую амилоидную (ATTR) кардиомиопатию.
28. Способ по п.27, где указанная ATTR кардиомиопатия представляет собой ATTR кардиомиопатию дикого типа (ATTRwt-CM).
29. Способ по п.27, где указанная ATTR-кардиомиопатия представляет собой семейную ATTR кардиомиопатию (ATTRm-CM).
30. Способ по п.29, где указанная ATTRm-CM характеризуется белком TTR, который содержит мутацию валина на изолейцин в положении 122 (V122I).
31. Способ по п.29, где указанная ATTRm-CM характеризуется белком TTR, который содержит мутацию треонина на пролин в положении 49 (T49P).
32. Способ по любому из пп.1-15, где указанный TTR амилоидоз представляет собой транстретиновую амилоидную (ATTR) полинейропатию.
33. Способ по п.32, где указанная ATTR полинейропатия представляет собой ATTR полинейропатию дикого типа (ATTRwt-PN).
34. Способ по п.32, в котором указанная ATTR полинейропатия представляет собой семейную ATTR полинейропатию (ATTRm-PN).
35. Способ по п.34, где указанная ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который содержит мутацию валина на метионин в положении 30 (V30M).
36. Способ по п.34, где указанная ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который содержит мутацию фенилаланина на лейцин в положении 64 (F64L).
37. Способ по п.34, где указанная ATTRm-PN характеризуется белком TTR, который содержит мутацию тирозина на цистеин в положении 114 (Y114C).
38. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией улучшает, стабилизирует или задерживает ухудшение у субъекта по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).
39. Способ по п.38, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 снижает у субъекта показатель по функциональной классификации Нью-Йоркской кардиологической ассоциации (NYHA).
40. Способ по п.39, где показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса IV до класса III, с класса IV до класса II или с класса IV до класса I.

41. Способ по п.39, где показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса III до класса II.
42. Способ по п.39, где показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса III до класса I.
43. Способ по п.39, где показатель по функциональной классификации NYHA снижен с класса II до класса I.
44. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией улучшает, стабилизирует или задерживает ухудшение у субъекта по классификации по опроснику Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ).
45. Способ по п.44, где субъекты имеют среднее улучшение по меньшей мере на один уровень по классификации субъектов по опроснику Канзас-Сити по кардиомиопатии (KCCQ).
46. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией улучшает, стабилизирует или задерживает ухудшение у субъектов по классификации Европейского опросника по оценке качества жизни в пяти категориях (EQ-5D-5L).
47. Способ по п.46, где субъекты имеют среднее улучшение по меньшей мере на пять баллов по классификации Европейского опросника по оценке качества жизни в пяти категориях (EQ-5D-5L).
48. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией улучшает работоспособность субъекта в тесте с шестиминутной ходьбой.
49. Способ по п.48, где субъект проходит по меньшей мере на 25 м больше базового расстояния, измеренного до лечения соединением 1.
50. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией снижает уровни натрийуретического пептида головного мозга (BNP) в сыворотке крови.
51. Способ по п.50, где уровни BNP в сыворотке крови указанного субъекта уменьшаются по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем BNP у указанного субъекта до лечения соединением 1.
52. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией снижает уровни в сыворотке крови N-концевого фрагмента мозгового натрийуретического пептида (N-концевого про-BNP).
53. Способ по п.52, где уровни в сыворотке крови N-концевого про-BNP у указанного субъекта снижаются по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем N-концевого про-BNP у указанного субъекта до лечения соединением 1.
54. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией снижает частоту госпитализаций, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, по сравнению с субъектами, не получающими лечения.
55. Способ по любому из пп.27-31, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR кардиомиопатией снижает смертность по сравнению с субъектами, не получающими лечения.
56. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR полинейропатией улучшает показатель по шкале невропатических нарушений (NIS) у указанного субъекта.
57. Способ по п.56, где показатель NIS снижен по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.
58. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR полинейропатией улучшает показатель по модифицированной шкале невропатических нарушений +7 (mNIS+7) у указанного субъекта.
59. Способ по п.58, где показатель mNIS+7 снижен по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.
60. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR полинейропатией улучшает показатель по Норфолкскому опроснику качества жизни при диабетической невропатии (QOL-DN) у субъекта.
61. Способ по п.60, где показатель по Norfolk QOL-DN улучшается по меньшей мере на 10% по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.
62. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR полинейропатией улучшает показатель по комбинированной шкале оценки вегетативных симптомов (COMPASS-31) у субъекта.
63. Способ по п.62, где показатель COMPASS-31 улучшается по меньшей мере на 0,5 балла по сравнению с исходным уровнем, измеренным до лечения соединением 1.
64. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с ATTR полинейропатией улучшает модифицированный ИМТ (МИМТ) субъекта.

65. Способ по любому из пп.32-35, где применение терапевтически эффективного количества соединения 1 у субъекта с АТТН полинейропатией улучшает скорость в тесте 10-метровой ходьбы субъекта.

66. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют длговременно.

67. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют в течение 28 дней.

68. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют в течение 56 дней.

69. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют в течение 84 дней.

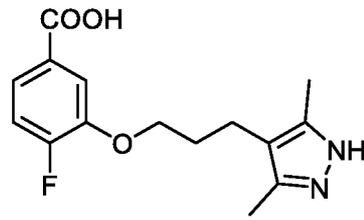
70. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют в течение 18 месяцев.

71. Способ по любому из пп.1-65, где соединение 1 применяют в течение 30 месяцев.

72. Способ по любому из пп.1-71, где субъект получает терапевтическое диуретическое средство.

73. Способ по п.72, где терапевтическое диуретическое средство представляет собой фуросемид или торсемид.

74. Способ замедления прогрессирования транстиретиновой амилоидной (АТТН) кардиомиопатии у субъекта, нуждающегося в этом, причем способ включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, общей суточной дозы около 1600 мг соединения 1, имеющего формулу



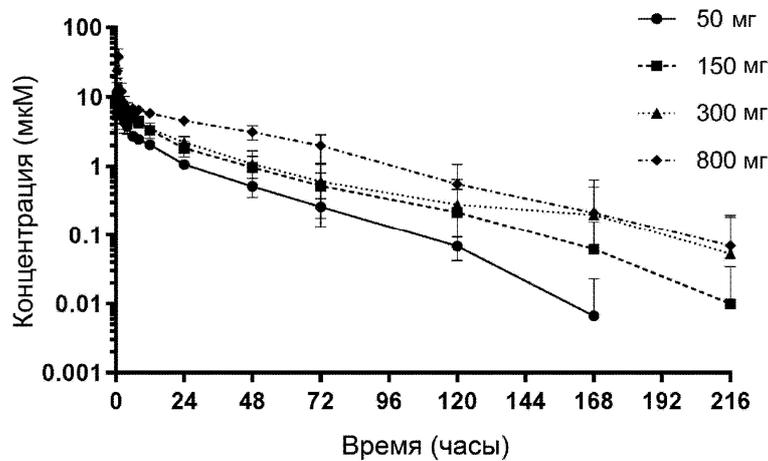
(соединение 1),

в форме соли HCl или эквивалентное количество соединения 1 в виде свободного основания или в форме другой соли.

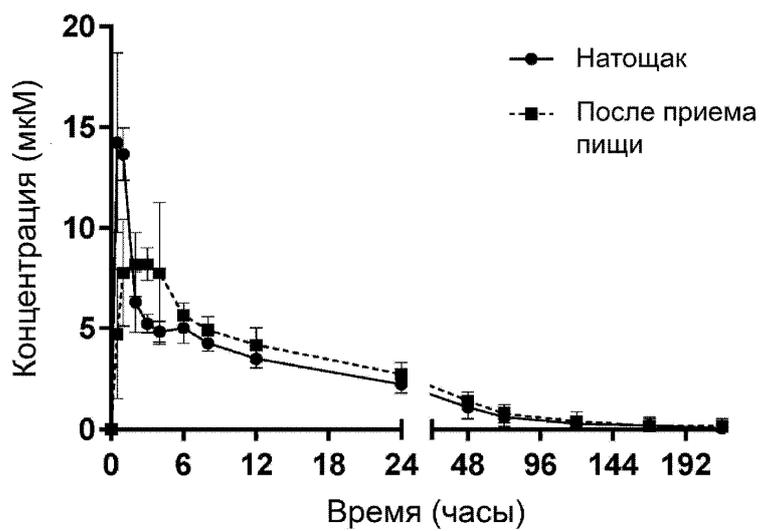
75. Способ по п.74, где указанное соединение 1 вводят перорально.

76. Способ по п.74 или 75, где указанное соединение 1 вводят один раз в день.

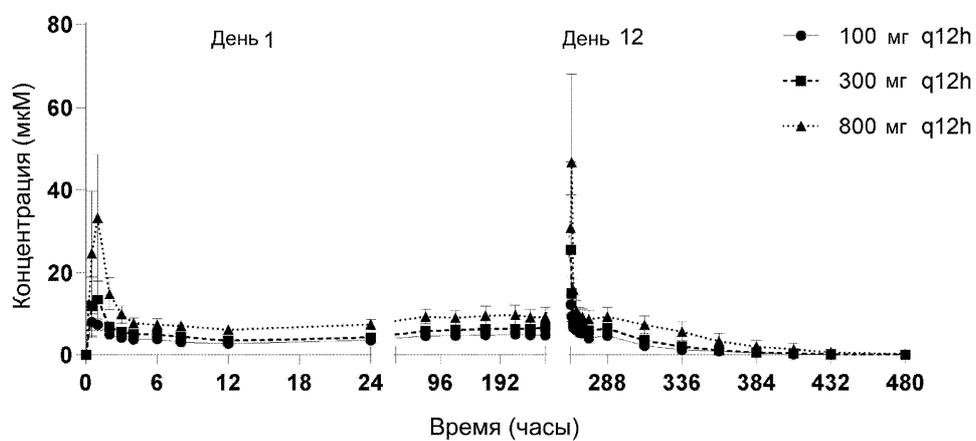
77. Способ по п.74 или 75, где указанное соединение 1 вводят два раза в день.



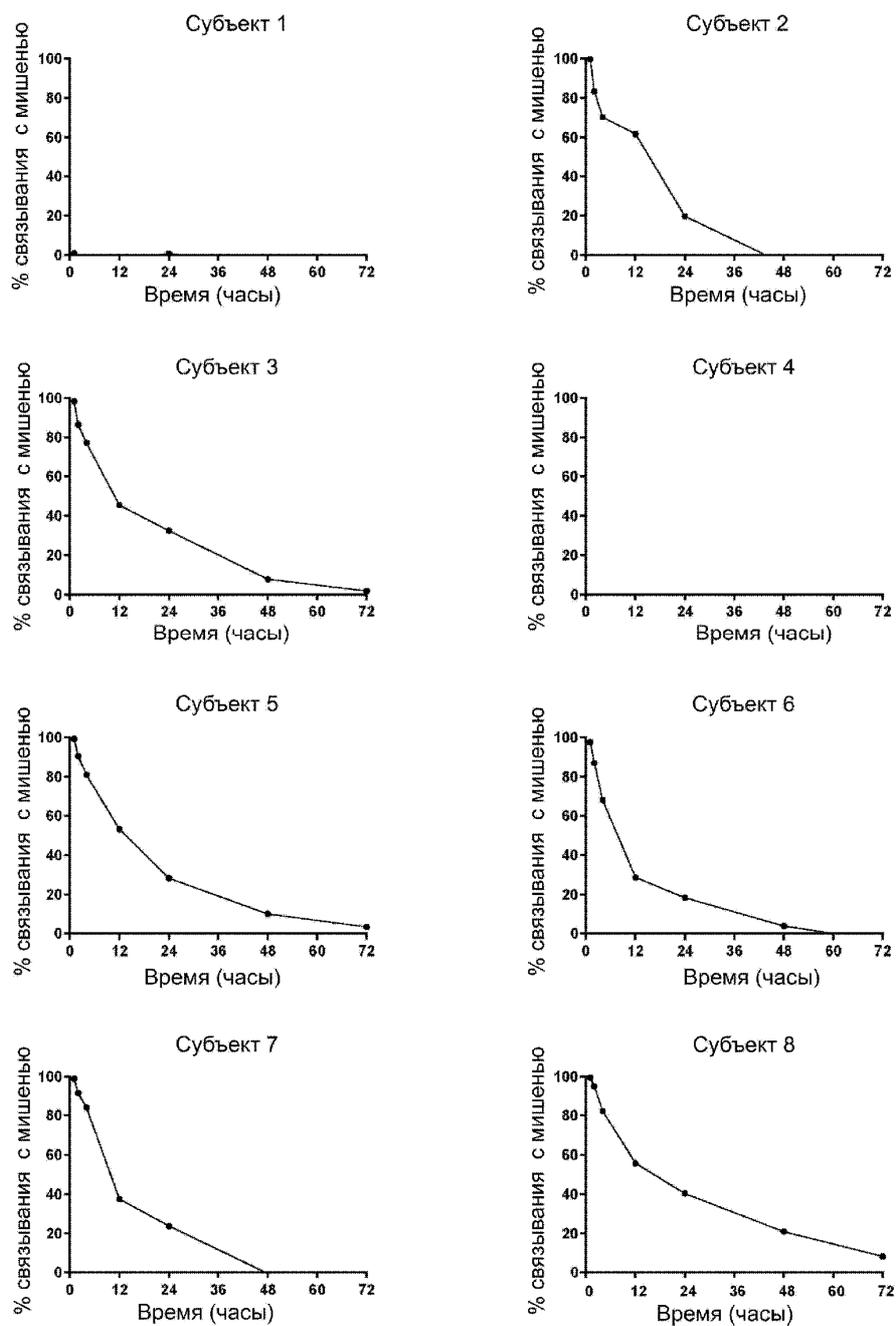
Фиг. 1



Фиг. 2

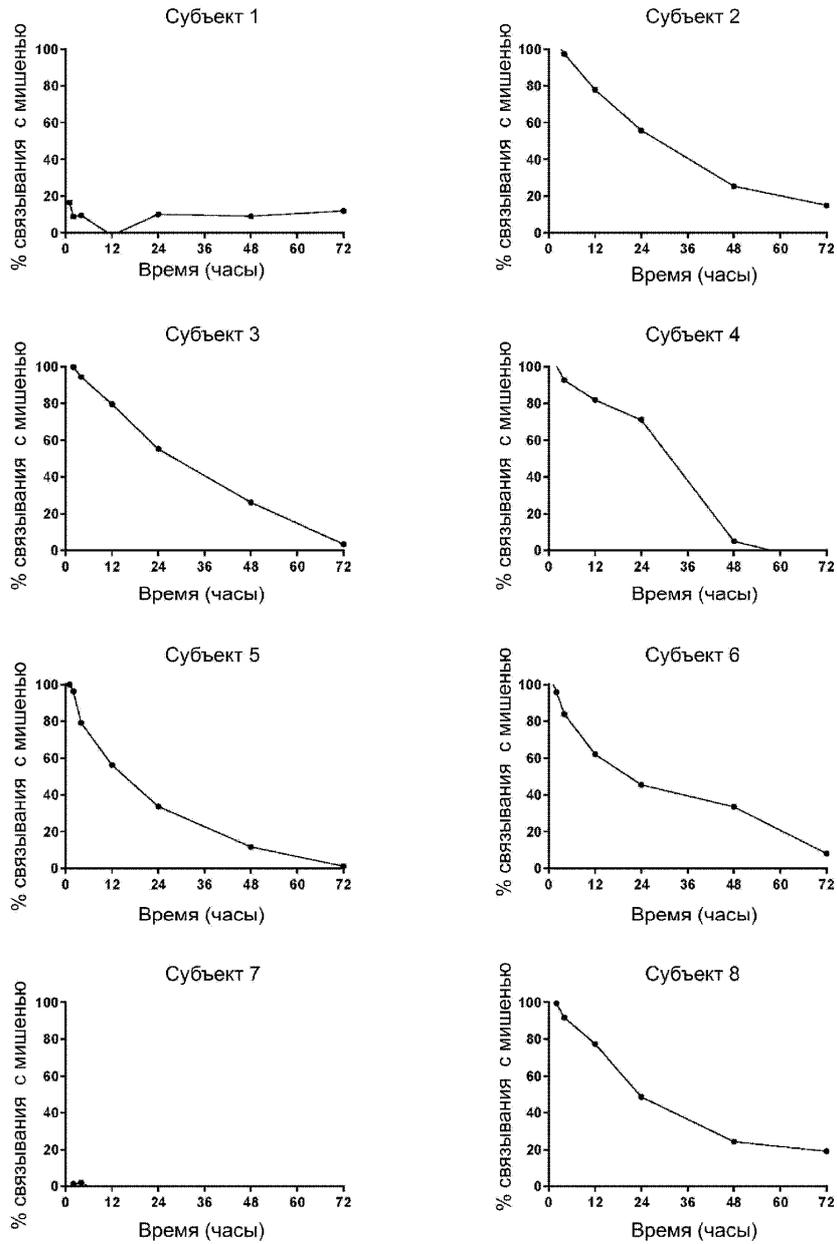


Фиг. 3

Единичная доза 300 мг

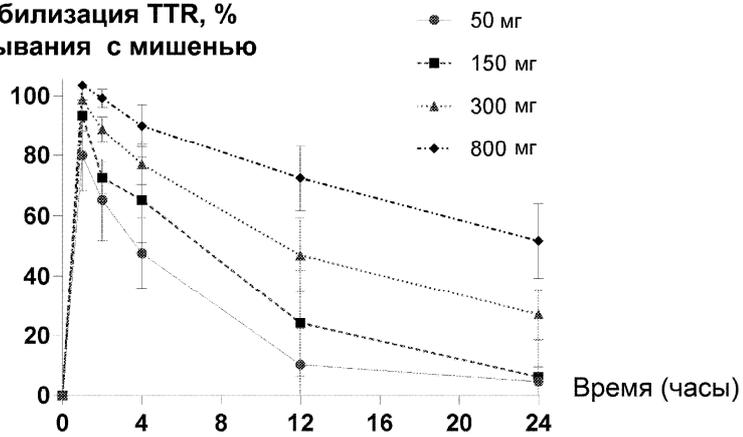
Фиг. 4

Единичная доза 800 мг

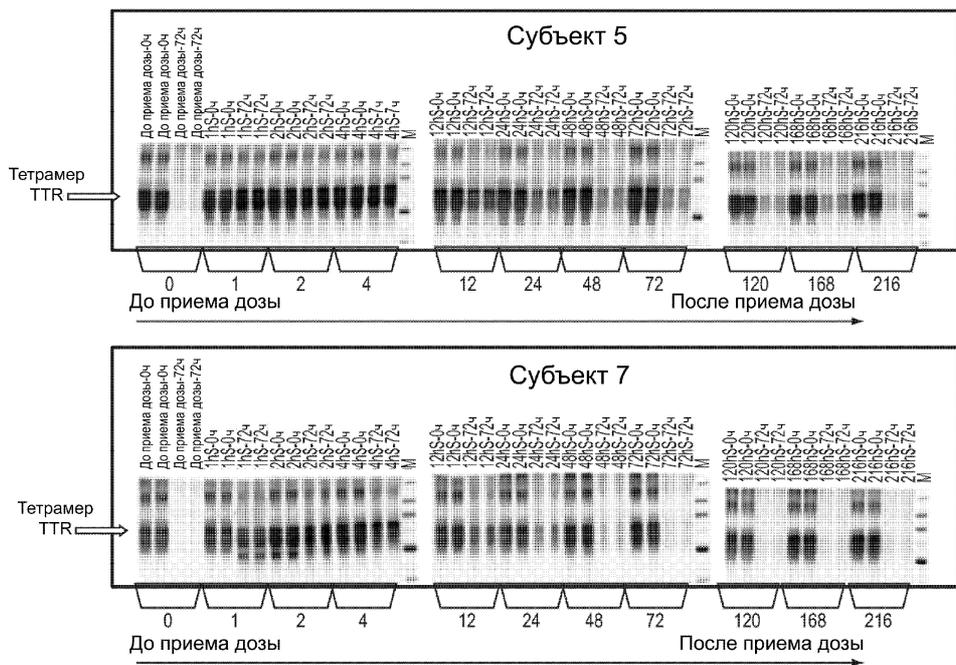


Фиг. 5

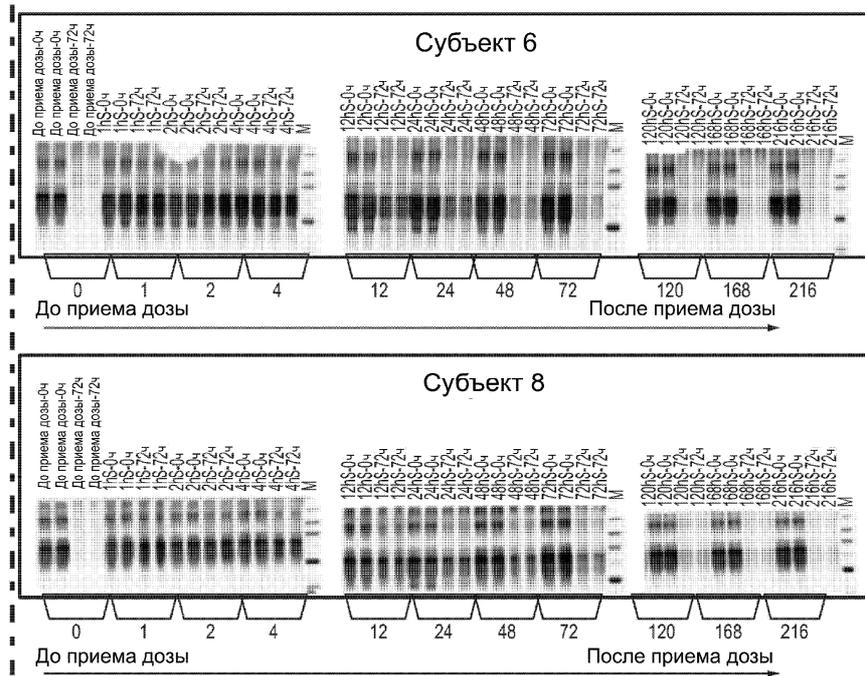
Стабилизация TTR, % связывания с мишенью



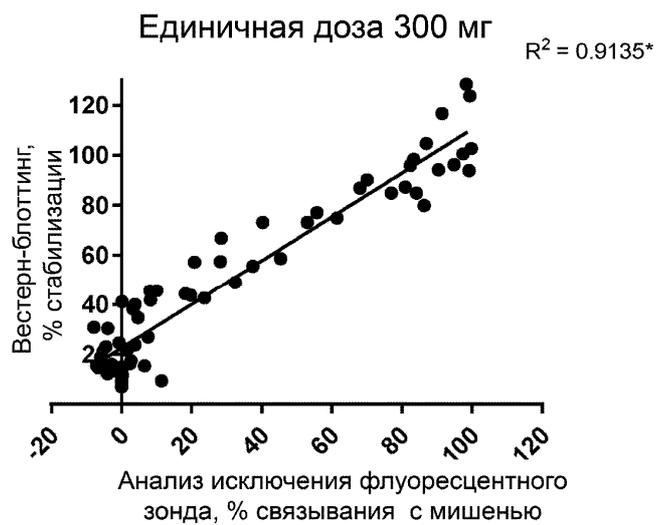
Фиг. 6



Фиг. 7С



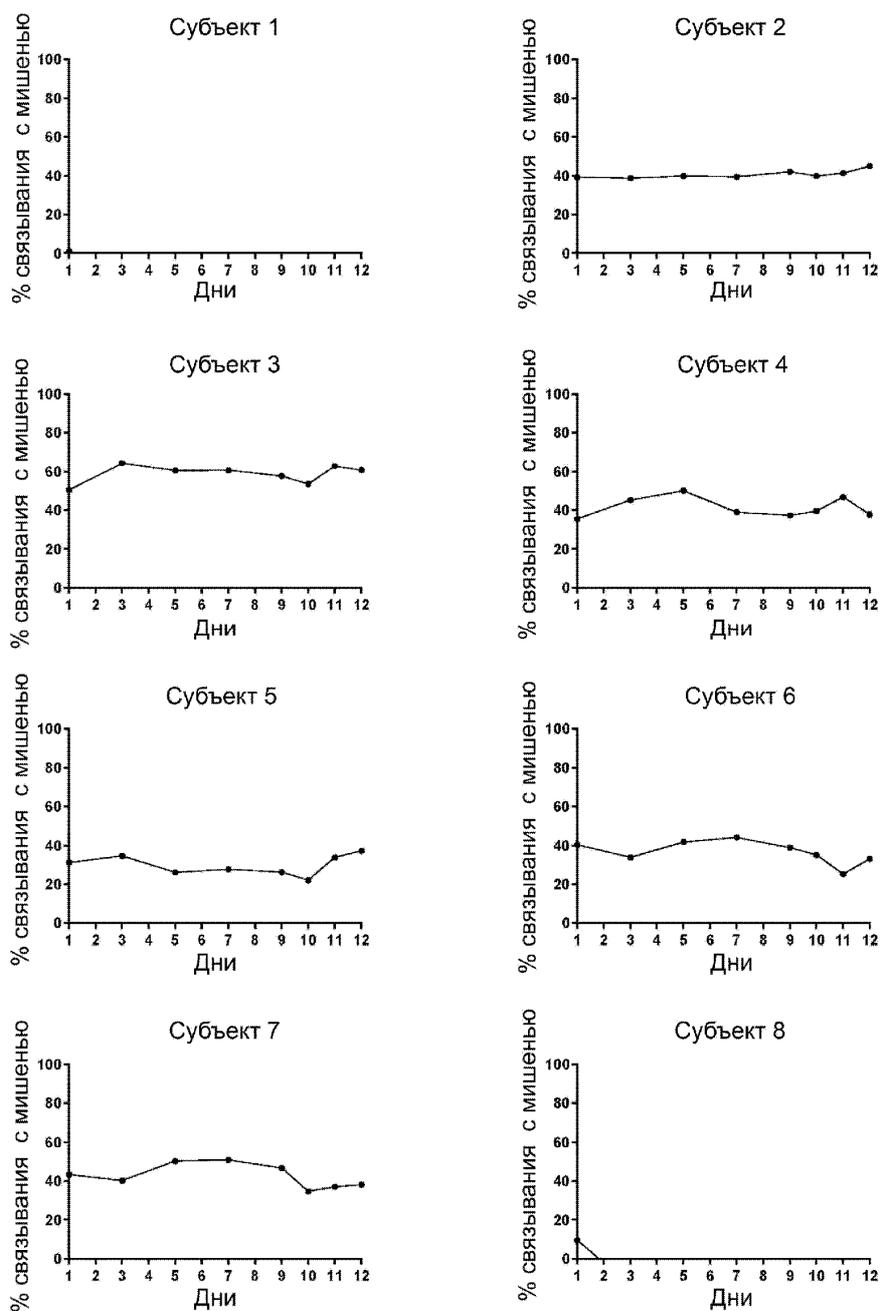
Фиг. 7D



Одна точка данных исключена

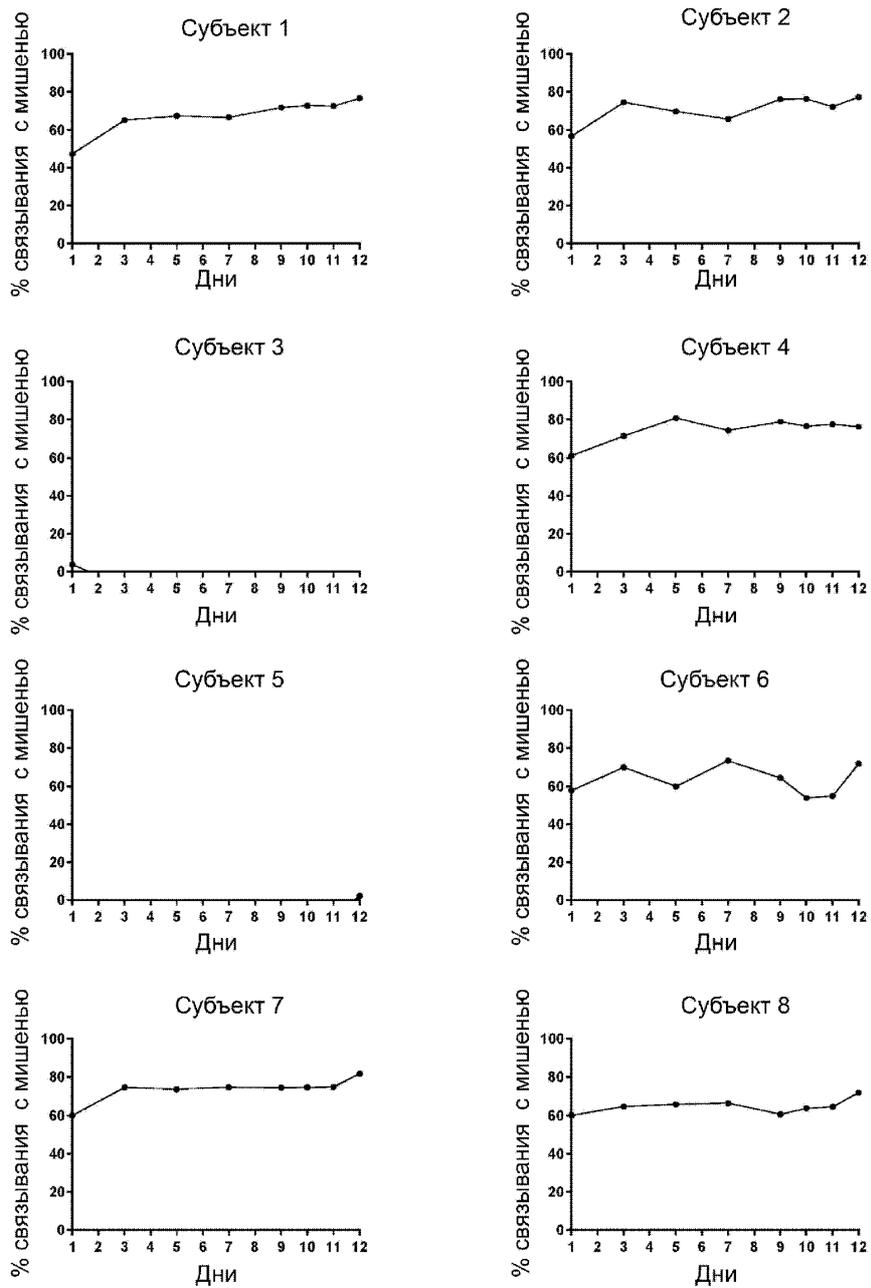
Фиг. 8

100 мг каждые 12 часов



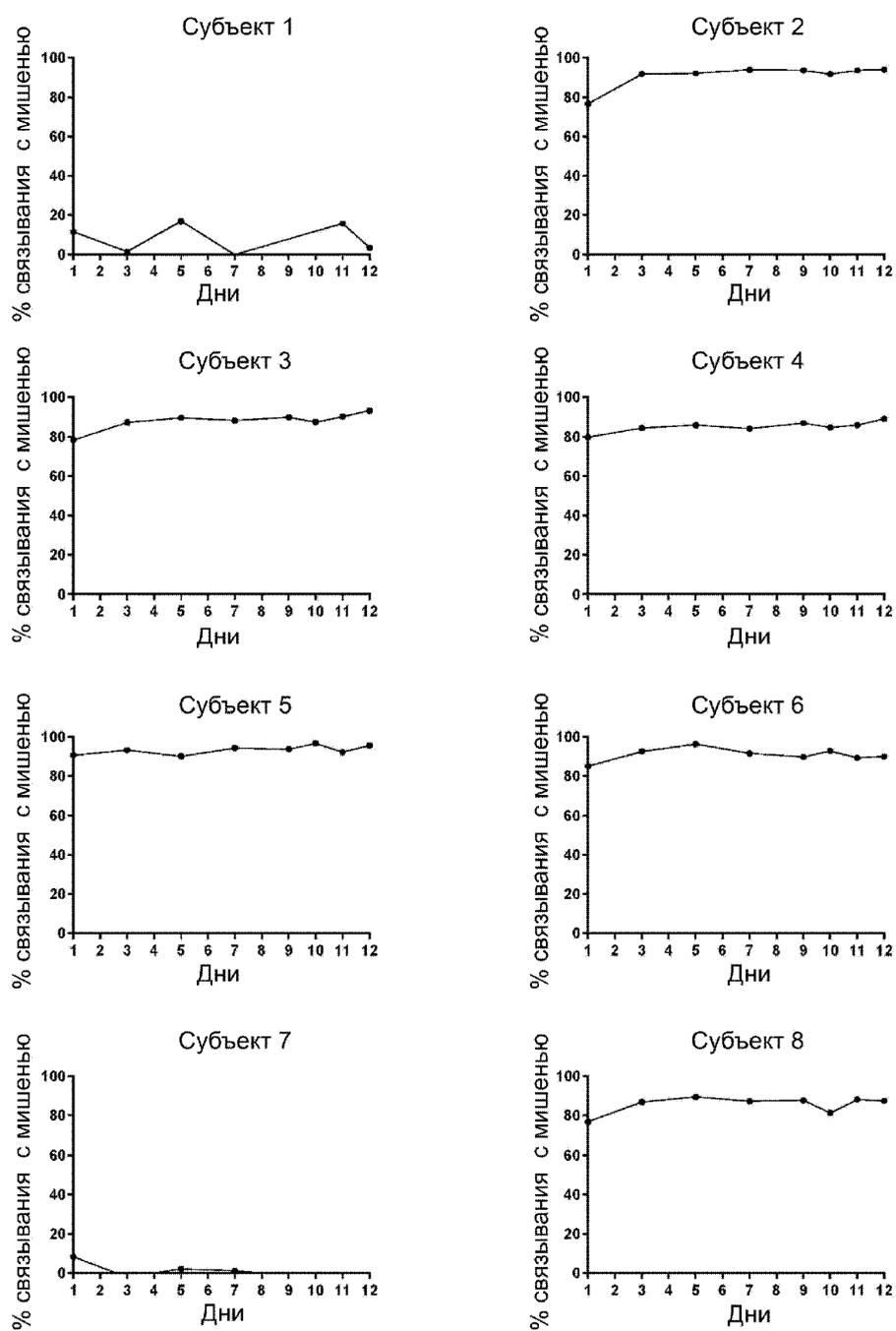
Фиг. 9

300 мг каждые 12 часов

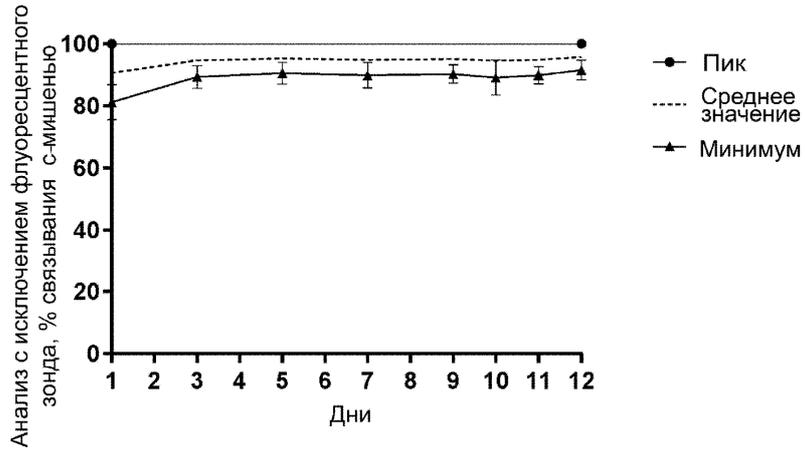


Фиг. 10

800 мг каждые 12 часов

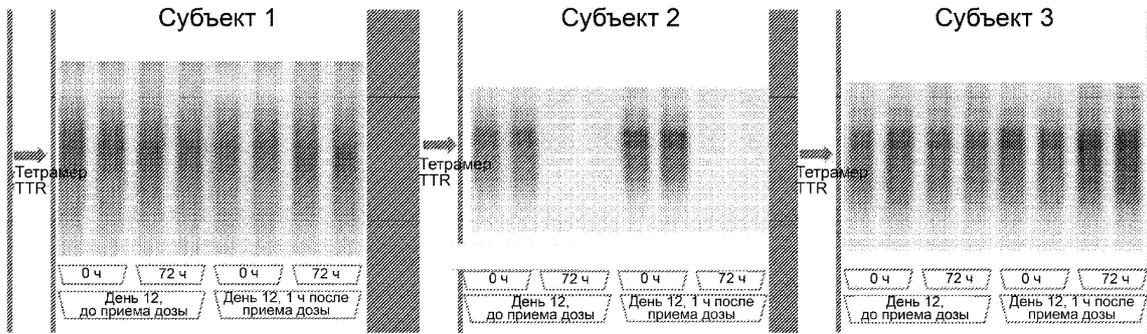


Фиг. 11

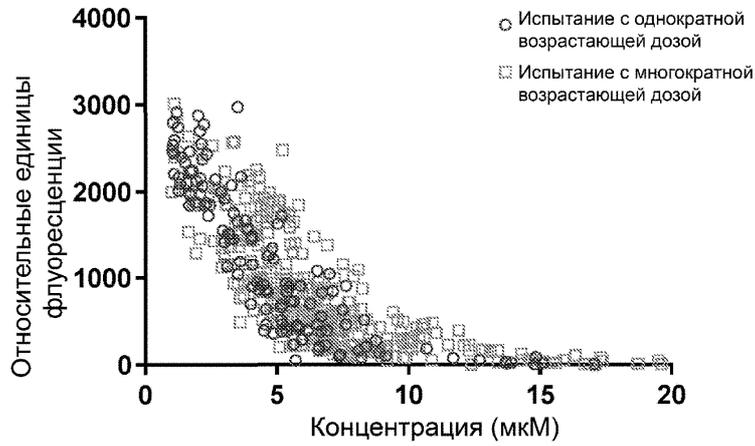


n = 6 субъектов

Фиг. 12

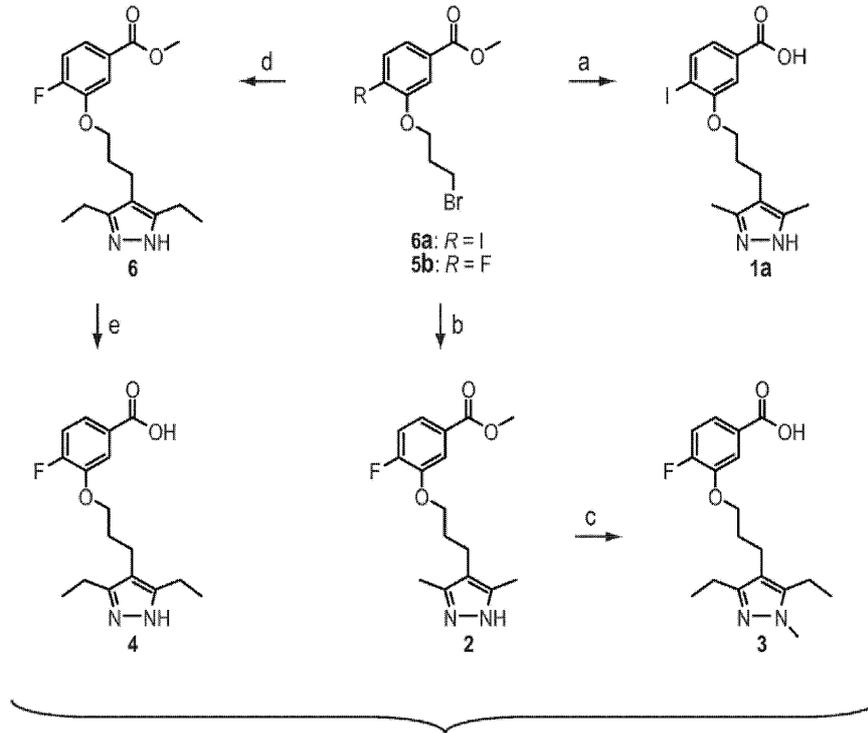


Фиг. 13

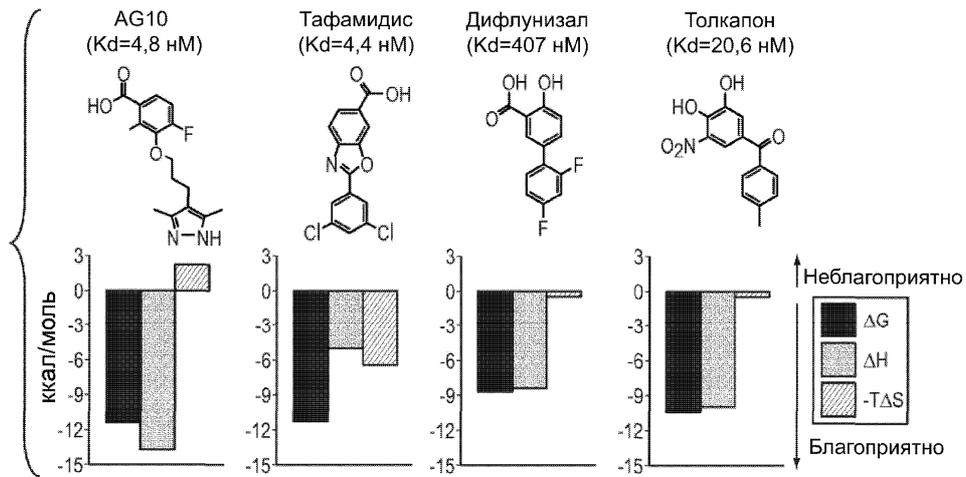


Не показаны субъекты, получавшие плацебо, и образцы сыворотки с менее 1 мкМ и более 20 мкМ AG10

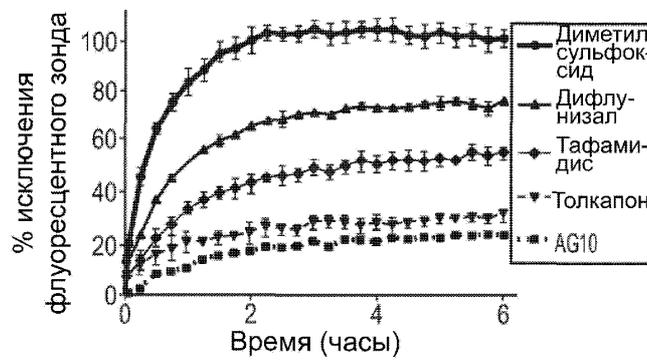
Фиг. 14



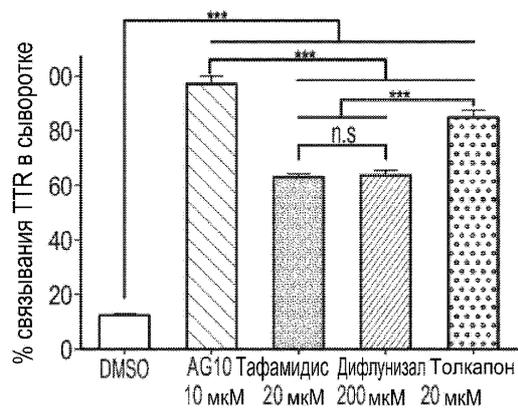
Фиг. 15



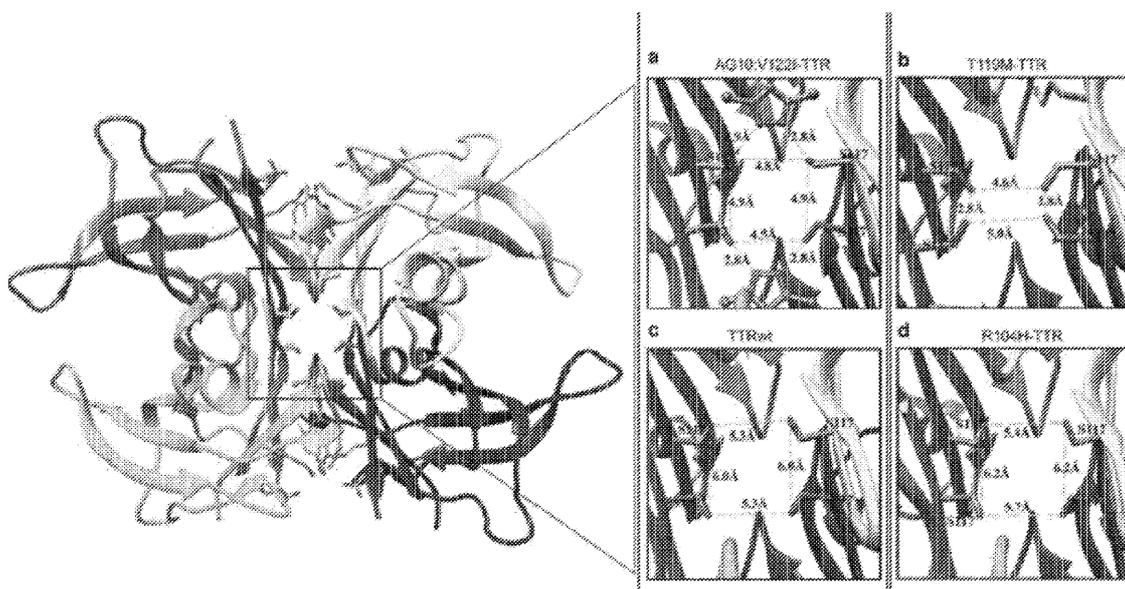
Фиг. 16А



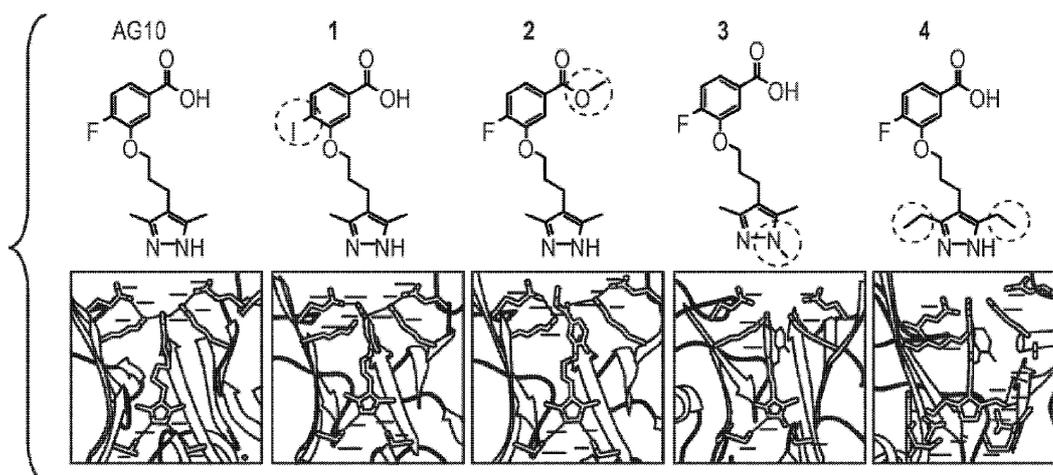
Фиг. 16В



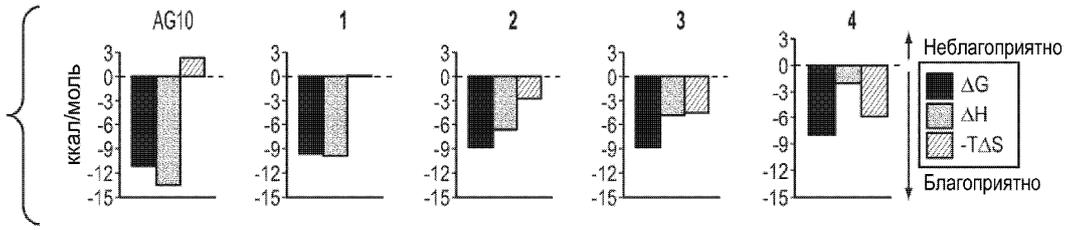
Фиг. 17D



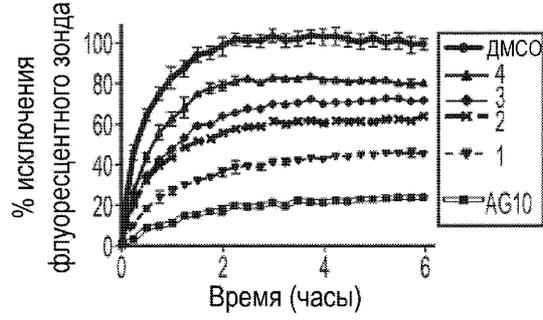
Фиг. 18



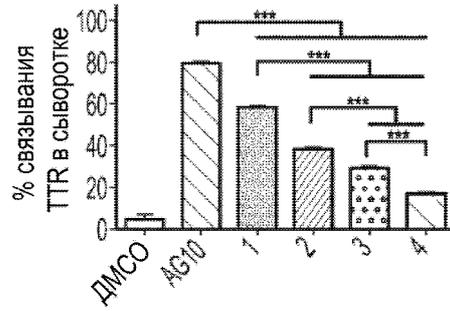
Фиг. 19A



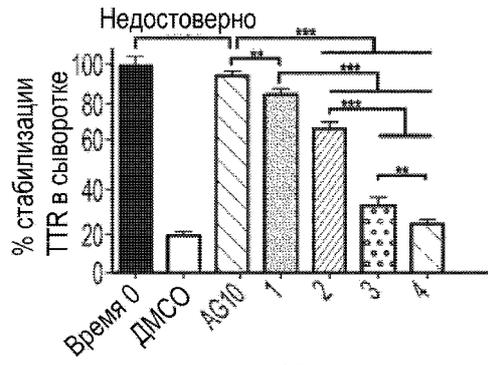
Фиг. 19B



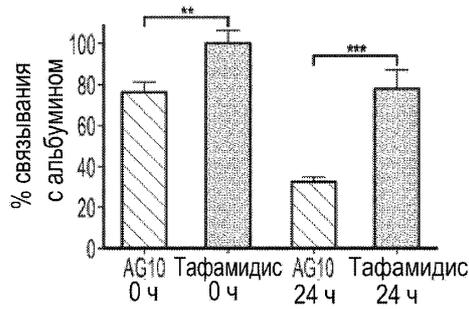
Фиг. 19C



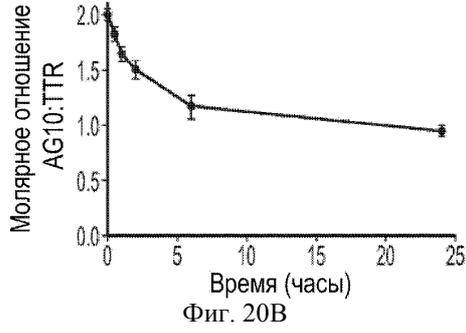
Фиг. 19D



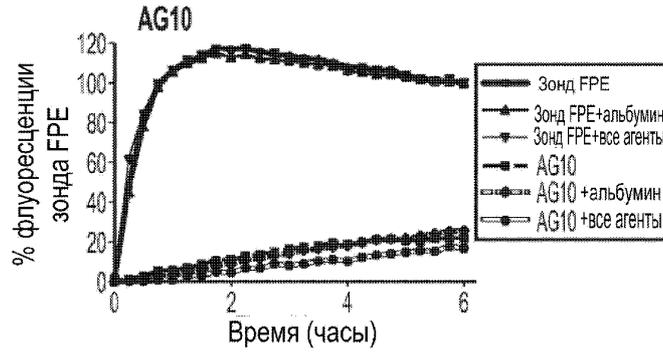
Фиг. 19E



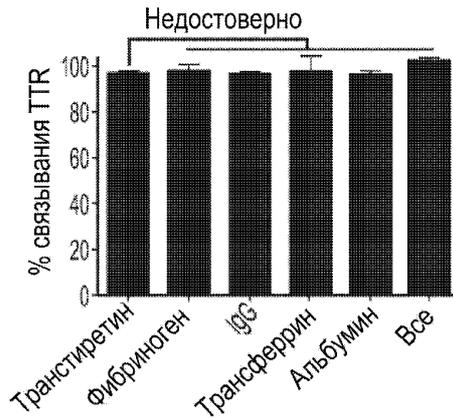
Фиг. 20A



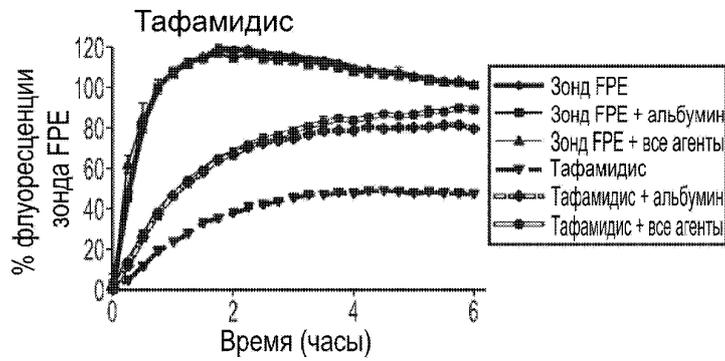
Фиг. 20B



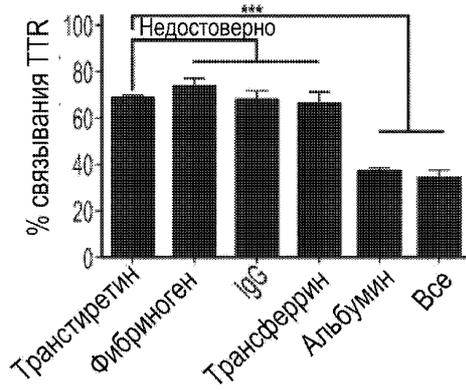
Фиг. 20C



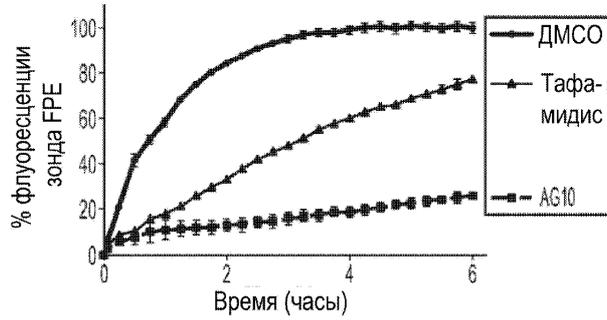
Фиг. 20D



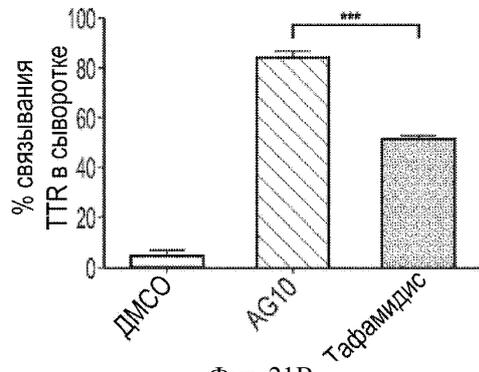
Фиг. 20E



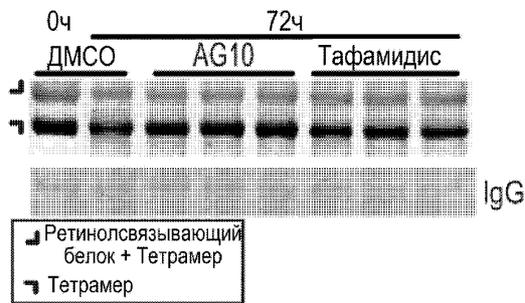
Фиг. 20F



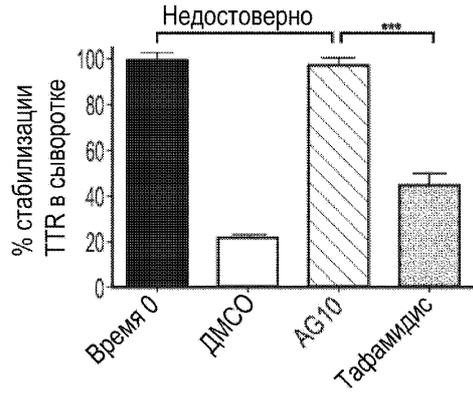
Фиг. 21А



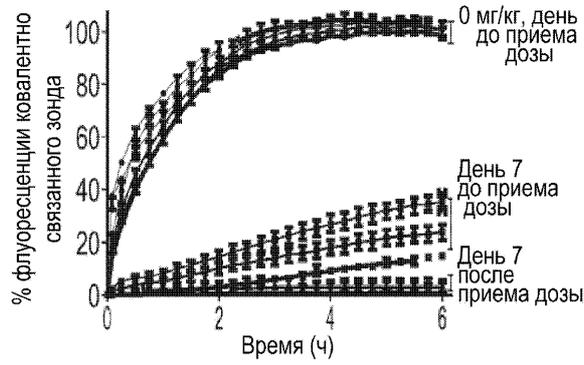
Фиг. 21В



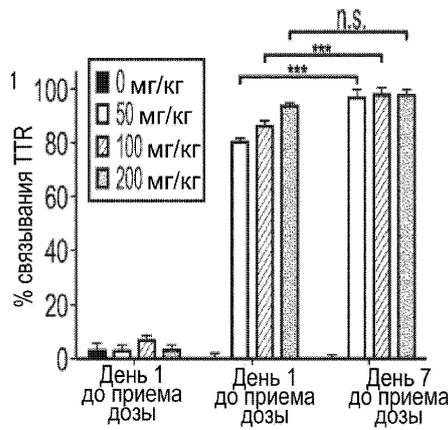
Фиг. 21С



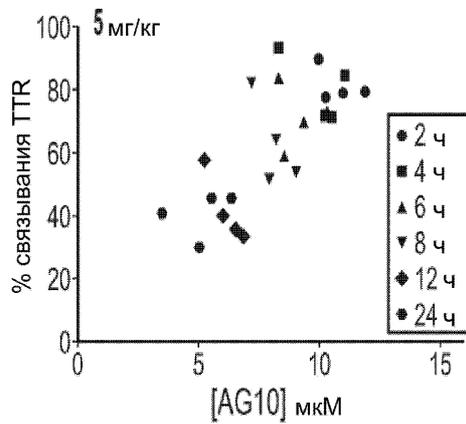
Фиг. 21D



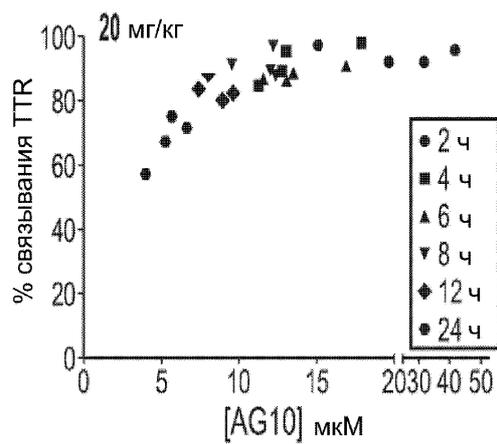
Фиг. 22А



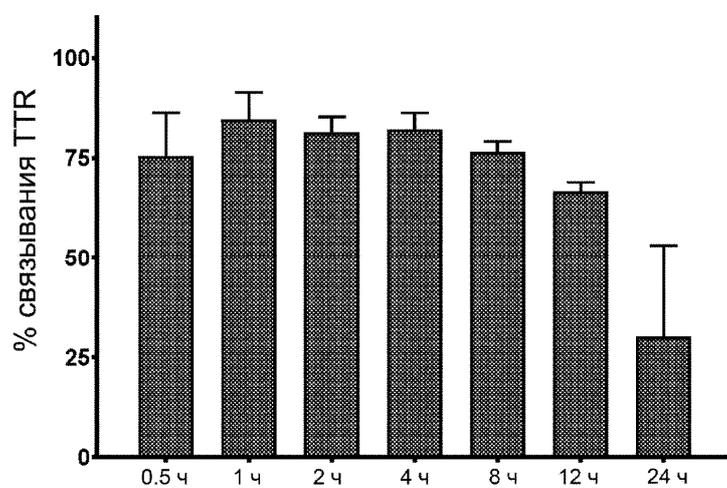
Фиг. 22В



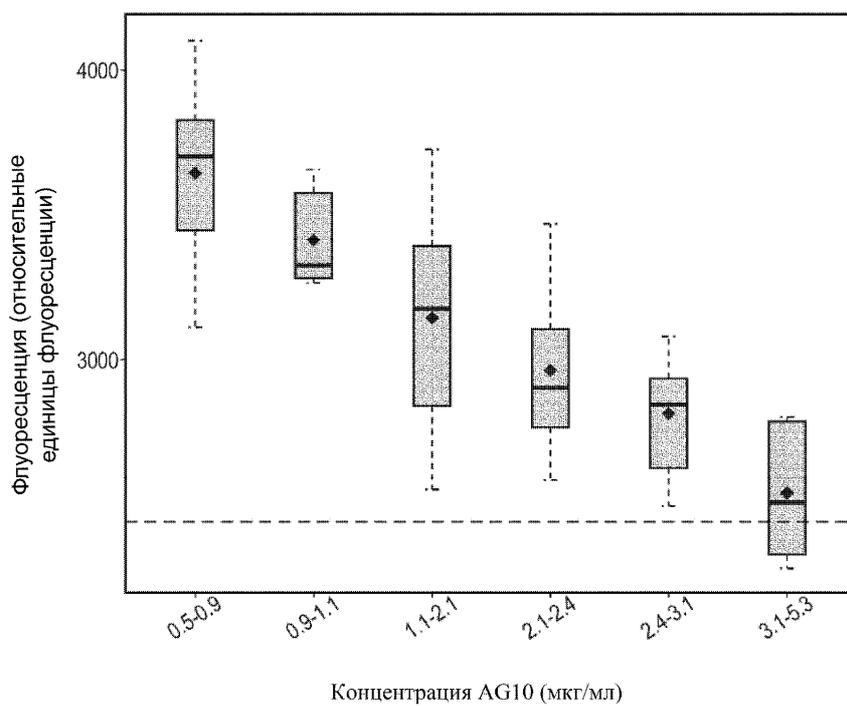
Фиг. 22С



Фиг. 22D

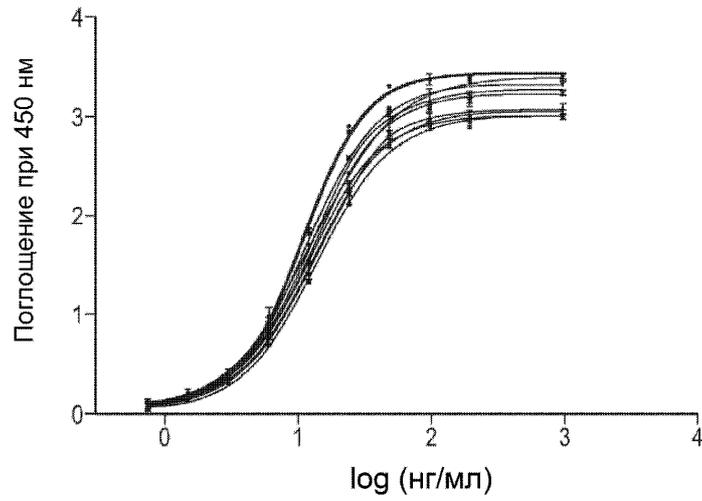


Фиг. 23



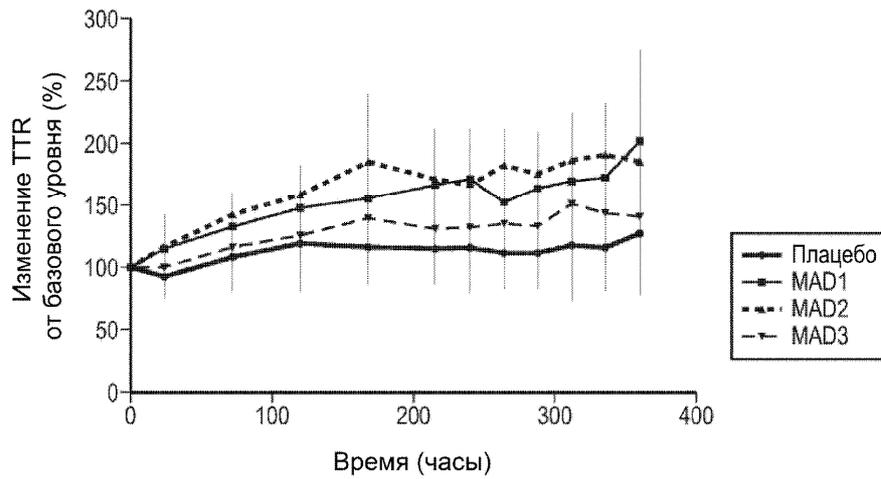
Фиг. 24

Стандартные кривые ИФА



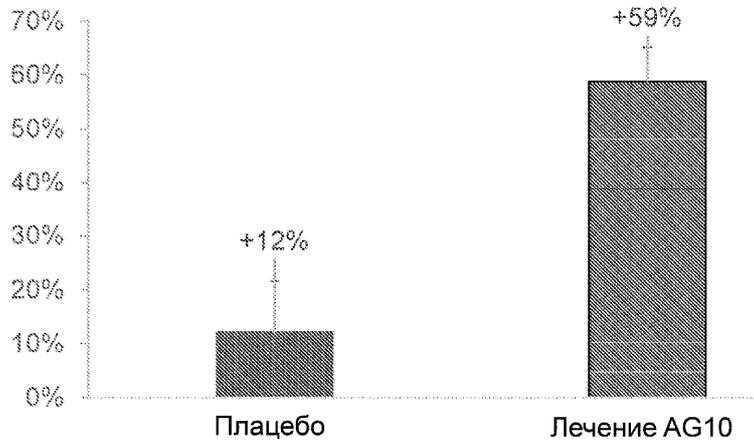
Фиг. 25

Общие данные – среднее значение ± стандартное отклонение

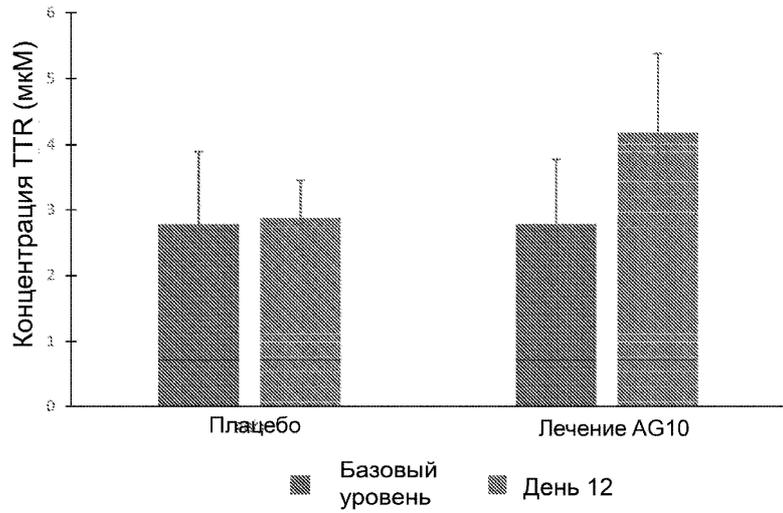


Фиг. 26

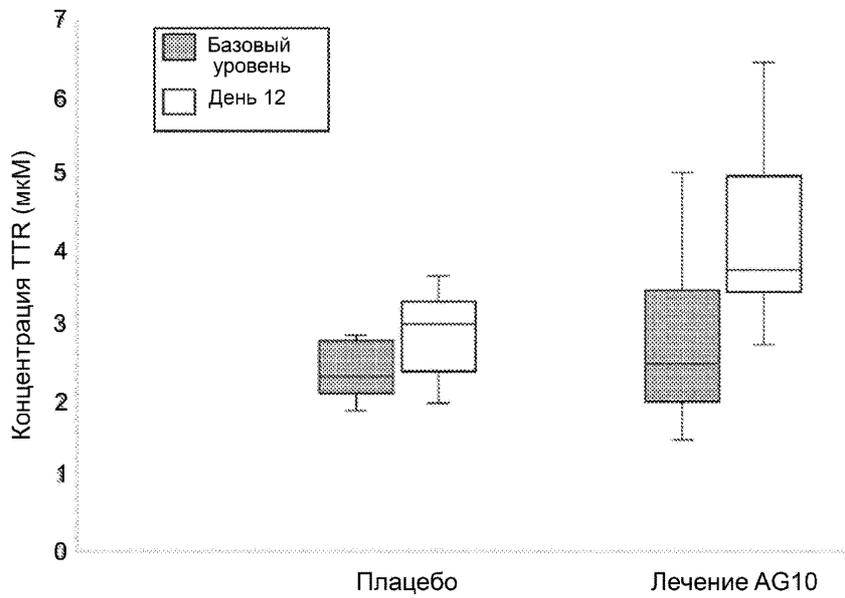
Концентрация TTR (средний % изменения от базового уровня до дня 12)



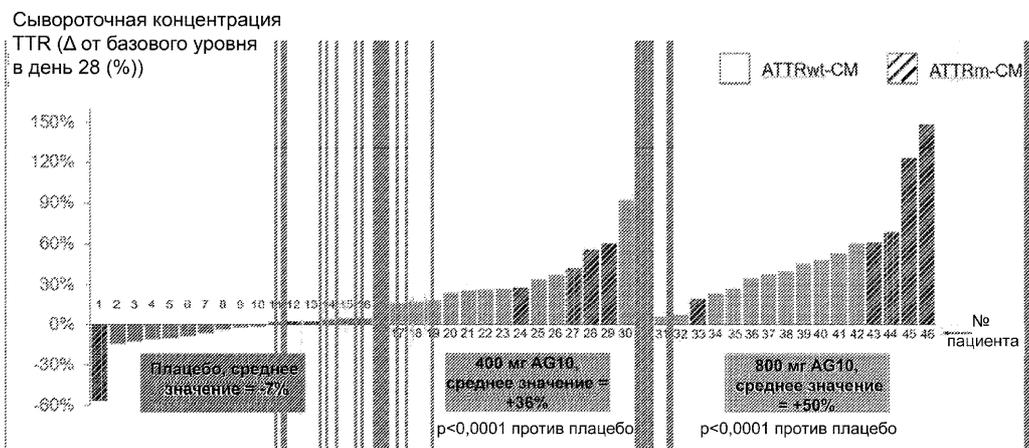
Фиг. 27



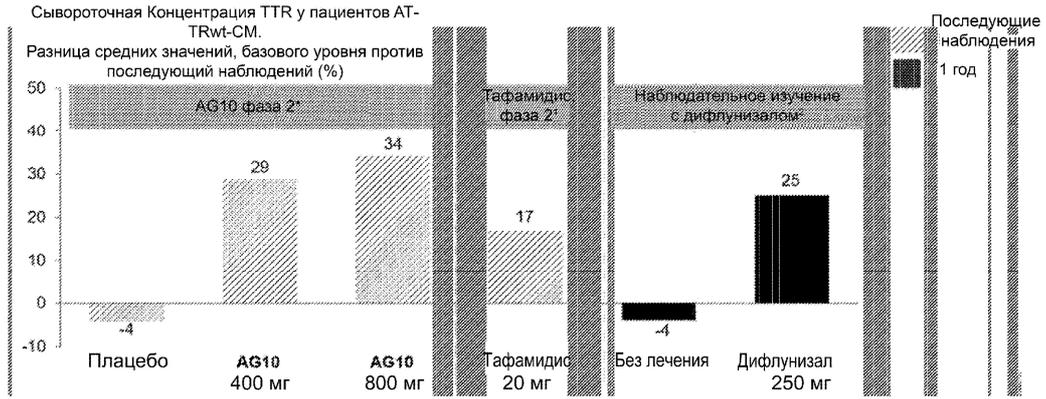
Фиг. 28



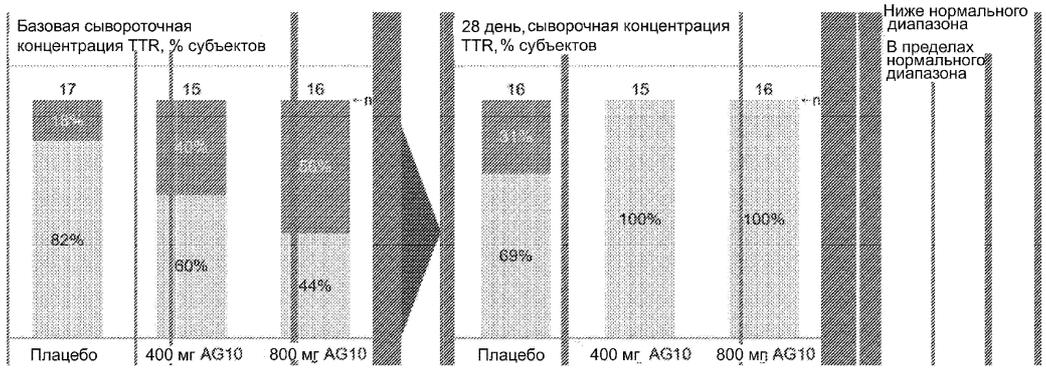
Фиг. 29



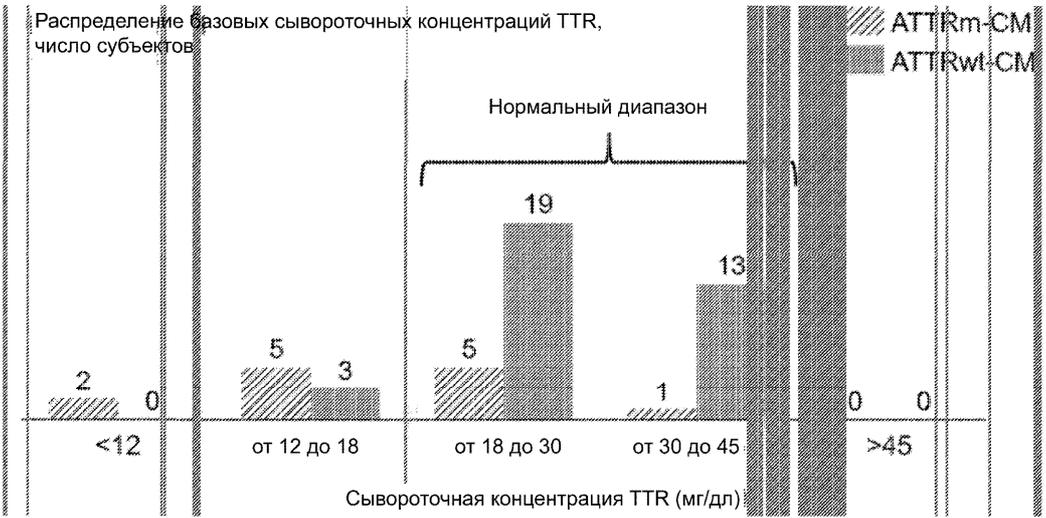
Фиг. 30



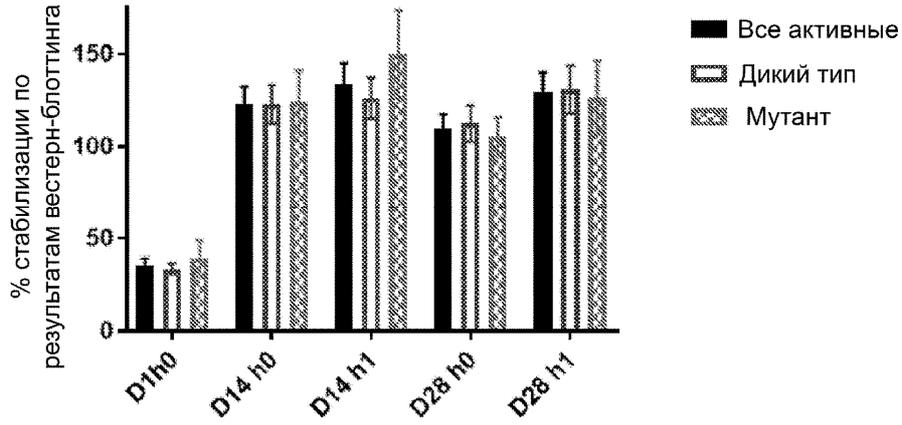
Фиг. 31



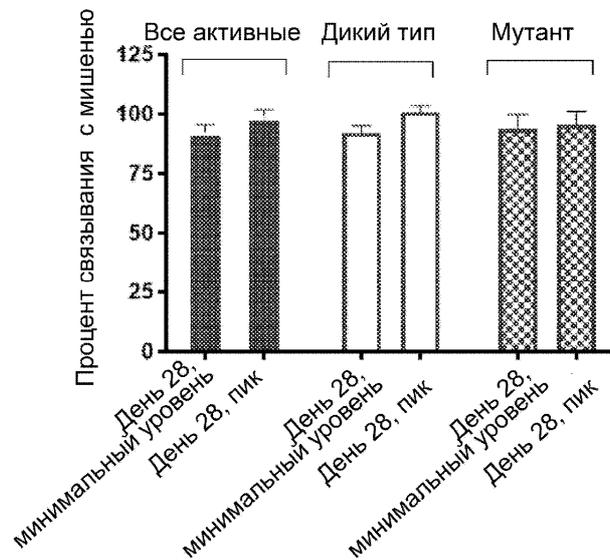
Фиг. 32



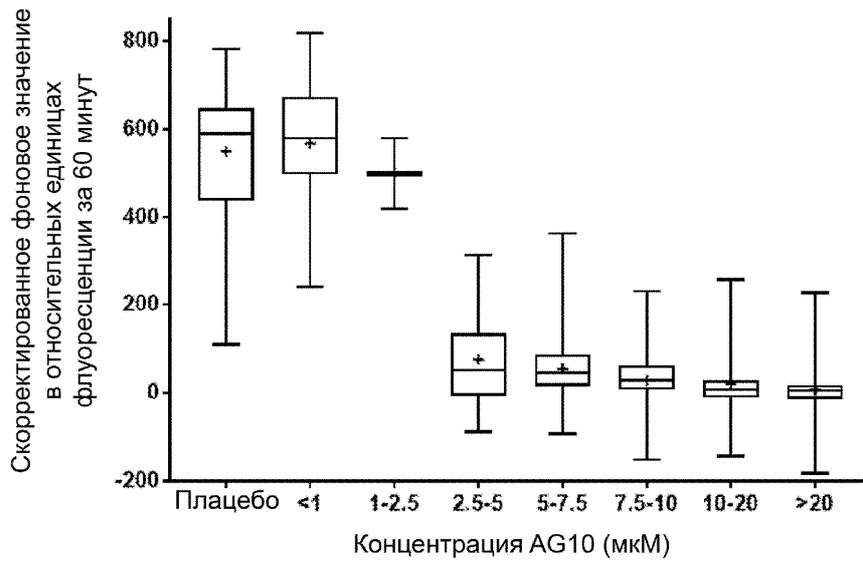
Фиг. 33



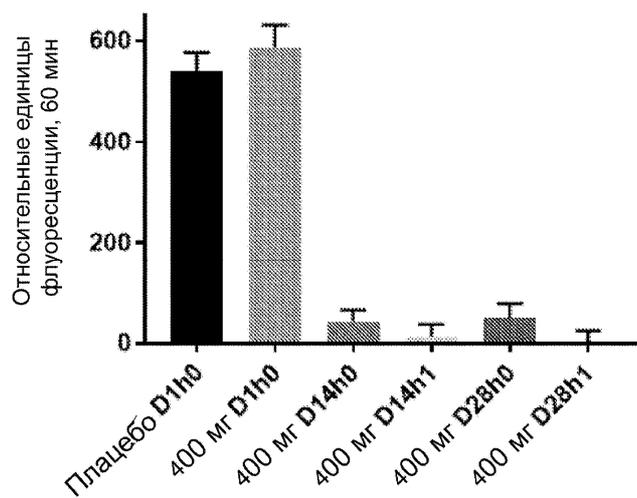
Фиг. 34



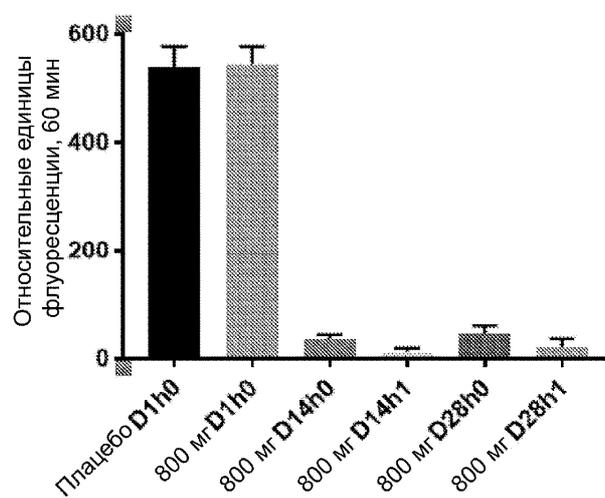
Фиг. 35



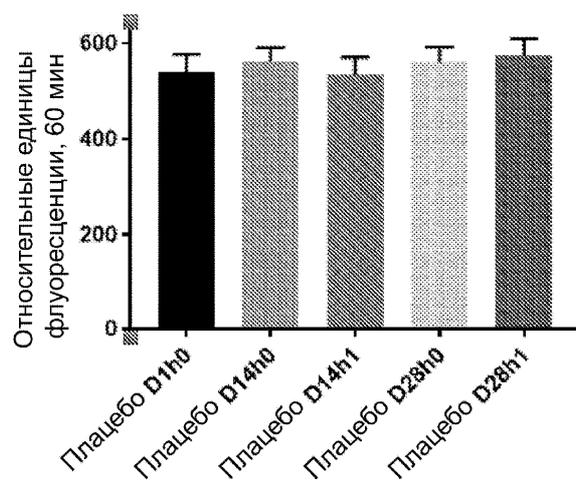
Фиг. 36



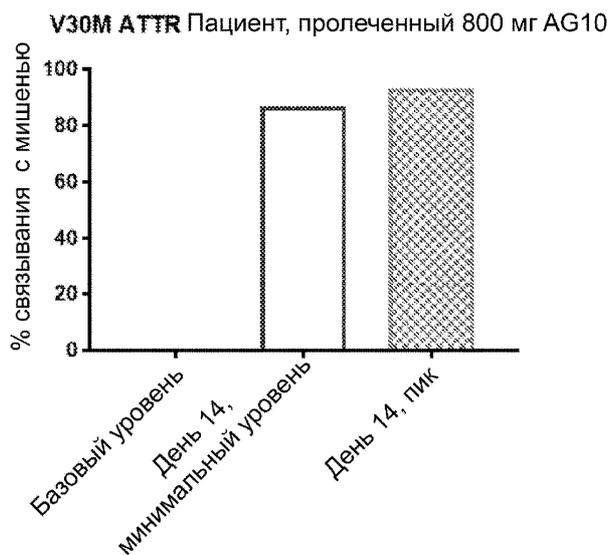
Фиг. 37



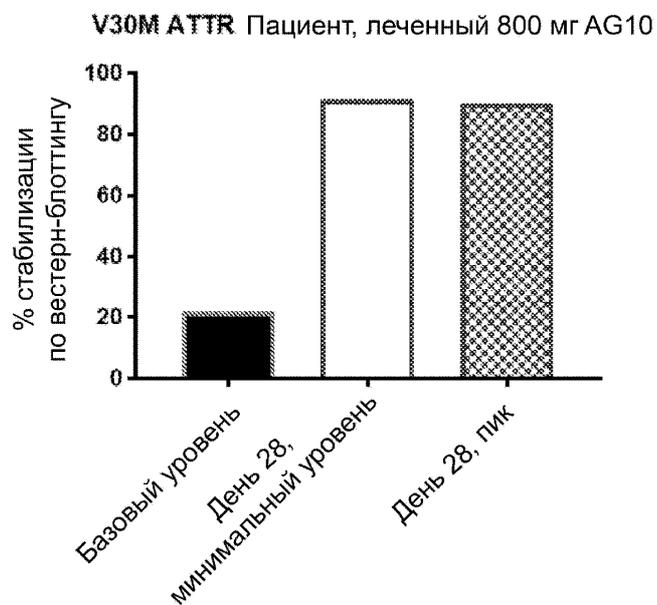
Фиг. 38



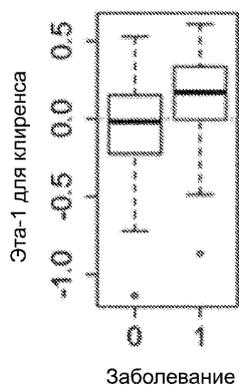
Фиг. 39



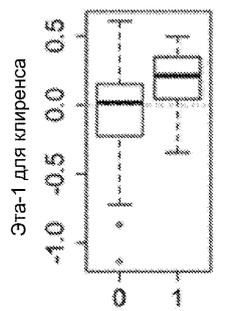
Фиг. 40



Фиг. 41

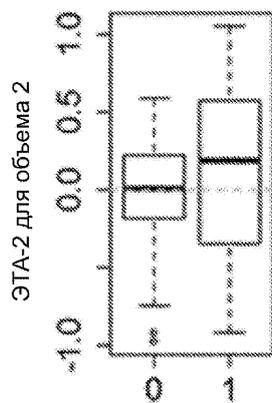


Фиг. 42А



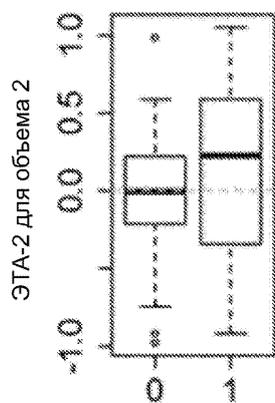
Сопутствующие
медикаменты 1

Фиг. 42В



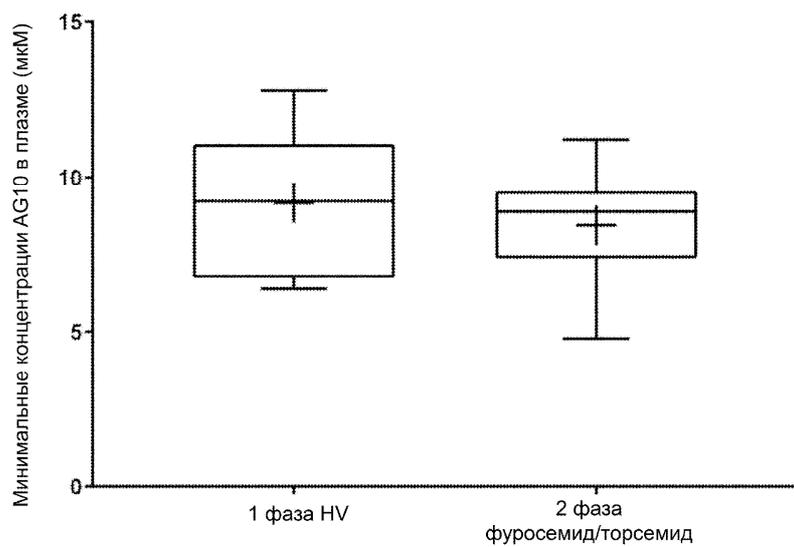
Заболевание

Фиг. 42С

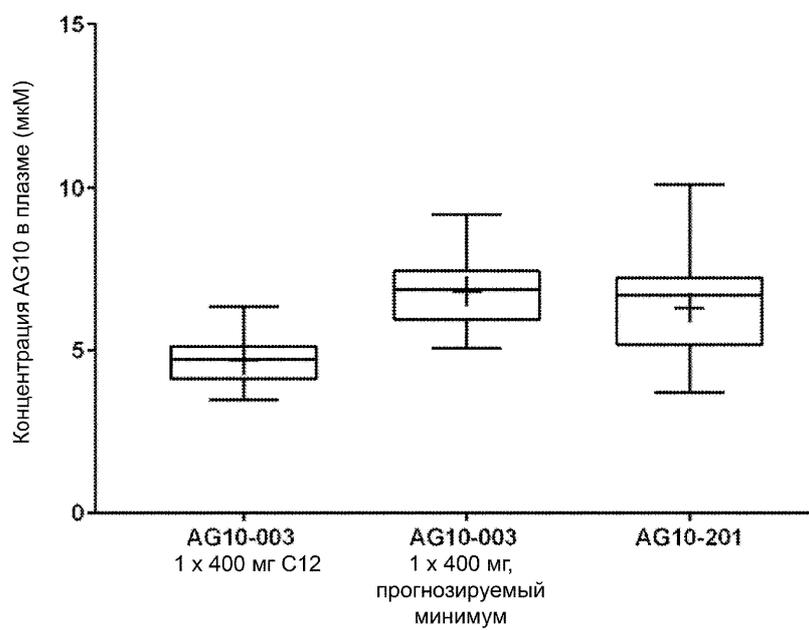


Сопутствующие
медикаменты 1

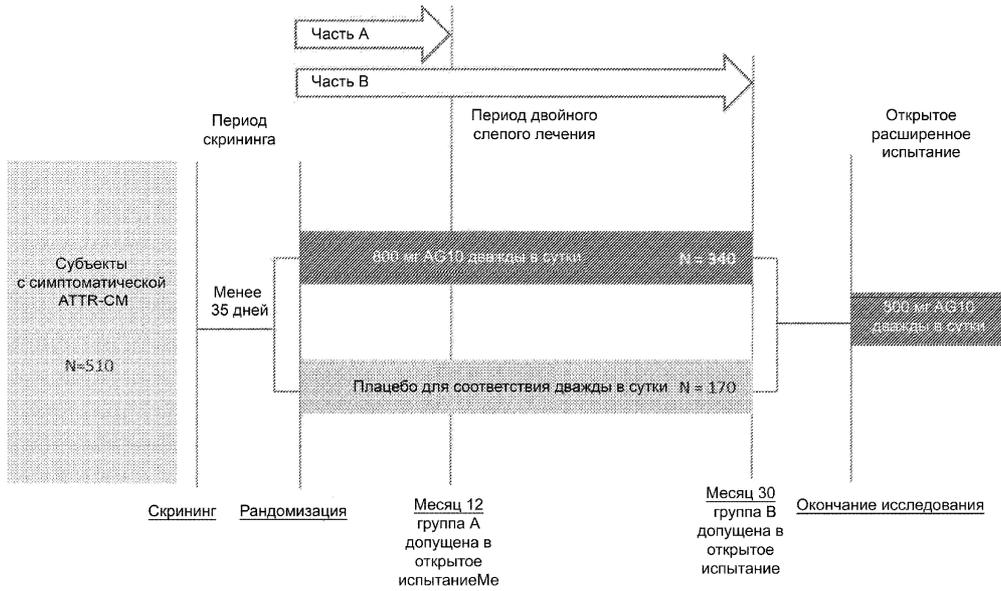
Фиг. 42D



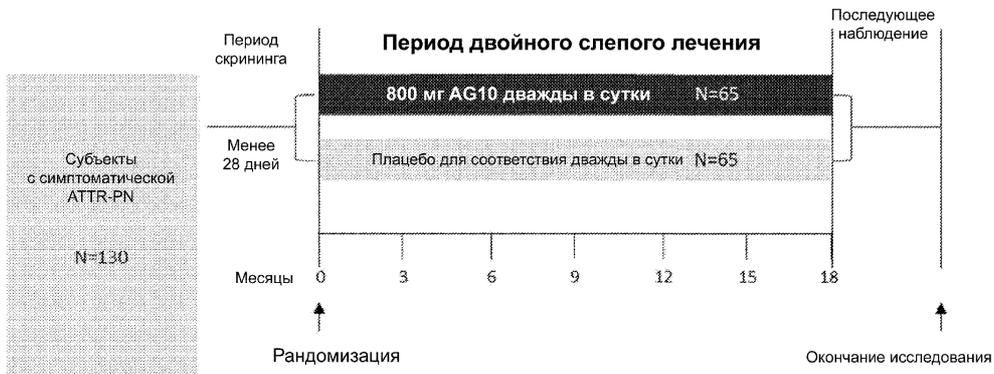
Фиг. 43



Фиг. 44



Фиг. 45



Фиг. 46

