



УКРАЇНА

(19) UA (11) 87109 (13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 31/395

A61K 31/165

A61P 7/06 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ІНГІБІТОРА HIF ПРОЛІЛГІДРОКСИЛАЗИ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ АНЕМІЙ ТА ДЕФІЦИТУ ЗАЛІЗА

1

2

(21) a200600150

(22) 04.06.2004

(24) 25.06.2009

(86) PCT/US2004/017772, 04.06.2004

(31) 10/861,590

(32) 03.06.2004

(33) US

(31) 60/476,704

(32) 06.06.2003

(33) US

(31) 60/566,237

(32) 29.04.2004

(33) US

(31) 60/566,488

(32) 29.04.2004

(33) US

(31) 60/569,797

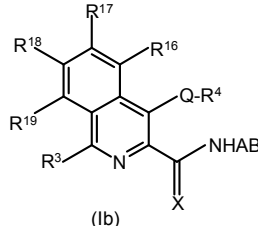
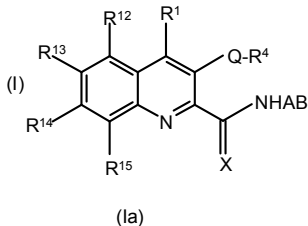
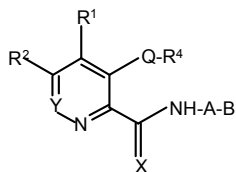
(32) 10.05.2004

(33) US

(46) 25.06.2009, Бюл.№ 12, 2009 р.

(72) КЛАУС СТЕФЕН ДЖ., US, МОЛІНО КРІСТО-
ФЕР ДЖ., US, НЕФФ ТОМАС Б., US, ГУЕНЦЛЕР-
ПУКАЛЛ ФОЛЬКМАР, US, ЛАНСЕТМО ПАРОБОК
ІНГРІД, US, СІЛІ ТОДД В., US, СТЕФЕНСОН РО-
БЕРТ С., US

(73) ФІБРОГЕН, ІНК., US

(56) AUCELLA, FILIPPO ET AL: "Synergistic effect of
desferrioxamine and recombinant erythropoietin on
erythroid precursor proliferation in chronic renal
failure" NEPHROLOGY, DIALYSIS,
TRANSPLANTATION, 14(5), 1171-1175 CODEN:
NDTREA; ISSN: 0931-0509, 1999SALVARANI C ET AL: "Effects of desferrioxamine
therapy on chronic disease anemia associated withrheumatoid arthritis" RHEUMATOLOGY
INTERNATIONAL, vol. 16, no. 2, 1996, pages 45-48
WO 00/74725 A, 14.12.2000GOCH ET AL: "Treatment of erythropoietin-resistant
anaemia with desferrioxamine in patients on
haemofiltration" EUR J HAEMATOL, vol. 55, no. 2,
1995, pages 73-77 (реферат)(57) 1. Спосіб лікування анемії, викликаній хроніч-
ним захворюванням у суб'єкта, що включає вве-
дження суб'єктові ефективної кількості інгібітора HIF
пролілгидроксилази, що являє собою структурний
міметик 2-оксоглутарату, здійснюючи, тим самим,
лікування анемії, викликаній хронічним захворю-
ванням у суб'єкта.2. Спосіб за п. 1, призначений для збільшення кі-
лькості заліза, доступного для вироблення черво-
них кров'яних тілець.3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому анемія, викликана
хронічним захворюванням, пов'язана із хронічним
захворюванням, яке вибране із групи, що склада-
ється з ревматоїдного артрити, ревматизму, запал-
ьного захворювання кишечника, системного чер-
воного вовчка, васкуліту, неопластичного
захворювання, хронічної інфекції й хронічного за-
палення.4. Спосіб за будь-яким з пп. 1-3, в якому суб'єкт
характеризується підвищеною продукцією запаль-
них цитокінів.5. Спосіб за п. 4, в якому запальні цитокіни вклю-
чають фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлей-
кін-1 β (IL-1 β) і інтерферон- γ (IFN- γ).6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому інгібітор
HIF пролілгидроксилази, що являє собою структур-
ний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним
карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

(13) C2

(11) 87109

(19) UA

7. Спосіб за будь-яким з пп. 1-6, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.

8. Спосіб за будь-яким з пп. 1-7, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, в якому суб'єкт є людиною.

10. Спосіб лікування або профілактики дефіциту заліза в суб'єкта, що включає введення суб'єктові ефективної кількості інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, здійснюючи, тим самим, лікування або профілактику дефіциту заліза в суб'єкта.

11. Спосіб за п. 10, в якому дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза; дефіцит заліза, пов'язаний з анемією; дефіцит заліза, пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекції, імунодефіцитного порушення й неопластичних захворювань; або пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що складається з анемії, викликані хронічним захворюванням, залізодефіцитної анемії (IDA) і мікроцитарної анемії.

12. Спосіб за п. 10 або 11, в якому суб'єкт має рівень феритину в сироватці нижче 50 нг/мл або вище 200 нг/мл або, якщо суб'єкт є дорослим, процентне насичення трансферину менше 16 %.

13. Спосіб за будь-яким з пп. 10-12, де суб'єкт має дефіцит заліза.

14. Спосіб за п. 13, де суб'єкт має функціональний дефіцит заліза.

15. Спосіб за п. 14, в якому у суб'єкта виявляється більше 5 % гіпохромних червоних кров'яних тілець.

16. Спосіб за будь-яким з пп. 13-15, який призначений для збільшення кількості ретикулоцитів; для збільшення гематокриту; для збільшення гемоглобіну; для збільшення кількості червоних кров'яних тілець; для збільшення середнього корпускулярного об'єму; для збільшення середнього корпускулярного гемоглобіну; для збільшення вмісту заліза в сироватці; або для збільшення насичення трансферину в суб'єкта.

17. Спосіб за будь-яким з пп. 10-16, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

18. Спосіб за будь-яким з пп. 10-17, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.

19. Спосіб за будь-яким з пп. 10-18, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

20. Спосіб за будь-яким з пп. 10-19, в якому суб'єкт є людиною.

21. Спосіб лікування або профілактики мікроцитозу або мікроцитарної анемії в суб'єкта, що включає введення суб'єктові ефективної кількості інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, здійснюючи, тим самим, лікування або профілактику мікроцитозу або мікроцитарної анемії в суб'єкта.

22. Спосіб за п. 21, в якому мікроцитоз пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що складається із хронічного захворювання, анемії, викликані хронічним захворюванням, дефіциту заліза, функціонального дефіциту заліза й анемії, викликані дефіцитом заліза.

23. Спосіб за п. 22, в якому порушення являє собою анемію, викликану хронічним захворюванням.

24. Спосіб за будь-яким з пп. 21-23, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

25. Спосіб за будь-яким з пп. 21-24, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.

26. Спосіб за будь-яким з пп. 21-25, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

27. Спосіб за будь-яким з пп. 21-26, в якому суб'єкт є людиною.

28. Спосіб лікування або профілактики анемії, пов'язаної з активністю цитокінів у суб'єкта, що включає введення суб'єктові ефективної кількості інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, здійснюючи, тим самим, лікування або профілактику анемії, пов'язаної з активністю цитокінів у суб'єкта, де анемія пов'язана зі станом, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекції, імунодефіциту й неопластичних захворювань.

29. Спосіб за п. 28, в якому станом є запалення.

30. Спосіб за п. 29, призначений для зменшення первинних явищ судинного запалення.

31. Спосіб за будь-яким з пп. 28-30, в якому цитокін являє собою запальний цитокін.
32. Спосіб за будь-яким з пп. 28-30, в якому цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .
33. Спосіб за будь-яким з пп. 28-32, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.
34. Спосіб за будь-яким з пп. 28-33, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:
[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й
3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.
35. Спосіб за будь-яким з пп. 28-34, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.
36. Спосіб за будь-яким з пп. 28-35, в якому суб'єкт є людиною.
37. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням у суб'єкта.
38. Застосування за п. 37, де лікарський засіб призначений для збільшення кількості заліза, доступного для вироблення червоних кров'яних тілець.
39. Застосування за п. 37 або 38, де анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана із хронічним захворюванням, яке вибране із групи, що складається з ревматоїдного артриту, ревматизму, запального захворювання кишечника, системного червоного вовчака, васкуліту, неопластичного захворювання, хронічної інфекції й хронічного запалення.
40. Застосування за будь-яким з пп. 37-39, в якому суб'єкт характеризується підвищеною продукцією запальних цитокінів.
41. Застосування за п. 40, в якому запальні цитокіни включають фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкін-1 β (IL-1 β) і інтерферон- γ (IFN- γ).
42. Застосування за будь-яким з пп. 37-41, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.
43. Застосування за будь-яким з пп. 37-42, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:
[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

- 3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.
44. Застосування за будь-яким з пп. 37-43, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.
45. Застосування за будь-яким з пп. 37-44, в якому суб'єкт є людиною.
46. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для лікування анемії, яка із труднощами піддається лікуванню еритропоєтином (ЕРО), що екзогенно вводиться, у суб'єкта.
47. Застосування за п. 46, в якому анемія викликана хронічним запальним або аутоімунним порушенням.
48. Застосування за п. 47, в якому порушення вибране із групи, що складається із хронічного бактеріального ендокартиту, остеомієліту, ревматоїдного артриту, ревматизму, хвороби Крона й виразкового коліту.
49. Застосування за будь-яким з пп. 46-48, в якому лікарський засіб призначений для посилення реактивності кісткового мозку до ЕРО.
50. Застосування за будь-яким з пп. 46-48, в якому лікарський засіб призначений для інгібування супресії ЕРО, викликаній TNF- α або IL-1 β .
51. Застосування за будь-яким з пп. 46-48, в якому лікарський засіб призначений для посилення реактивності гематопоетичних клітин-попередників до ЕРО.
52. Застосування за будь-яким з пп. 46-51, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.
53. Застосування за будь-яким з пп. 46-52, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:
[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й
3-{[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.
54. Застосування за будь-яким з пп. 46-53, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.
55. Застосування за будь-яким з пп. 46-54, в якому суб'єкт є людиною.
56. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для лікування або профілактики дефіциту заліза в суб'єкта.
57. Застосування за п. 56, в якому дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза; дефіцит заліза, пов'язаний з анемією; дефіцит заліза, пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що

складається із запалення, інфекції, імунодефіцитного порушення й неопластичних захворювань; або пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що складається з анемії, викликаної хронічним захворюванням, залізодефіцитної анемії (IDA) і мікроцитарної анемії.

58. Застосування за п. 56 або 57, в якому суб'єкт має рівень феритину в сироватці нижче 50 нг/мл або вище 200 нг/мл або, якщо суб'єкт є дорослим, процентне насичення трансферину менше 16 %.

59. Застосування за будь-яким з пп. 56-58, де суб'єкт має дефіцит заліза.

60. Застосування за п. 59, де суб'єкт має функціональний дефіцит заліза.

61. Застосування за п. 60, в якому у суб'єкта виявляється більше 5 % гіпохромних червоних кров'яних тілець.

62. Застосування за будь-яким з пп. 59-61, де лікарський засіб призначений для збільшення кількості ретикулоцитів; для збільшення гематокриту; для збільшення гемоглобіну; для збільшення кількості червоних кров'яних тілець; для збільшення середнього корпускулярного об'єму; для збільшення середнього корпускулярного гемоглобіну; для збільшення вмісту заліза в сироватці; або для збільшення насичення трансферину у суб'єкта.

63. Застосування за будь-яким з пп. 56-62, де лікарський засіб призначений для зменшення експресії гепсидину в суб'єкта.

64. Застосування за п. 63, де лікарський засіб призначений для збільшення абсорбції заліза в кишечнику й зниження гіпоферемії.

65. Застосування за будь-яким з пп. 56-64, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

66. Застосування за будь-яким з пп. 56-65, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-[[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-2-(4-метоксифеніл)етил]аміно]-N-гідроксипропіонамід.

67. Застосування за будь-яким з пп. 56-66, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

68. Застосування за будь-яким з пп. 56-67, в якому суб'єкт є людиною.

69. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для підвищення продукції фактора, необхідного для поглинання, транспорту й використання заліза в суб'єкта, з підвищенням у такий спосіб доступності заліза й забезпеченням корисної дії в пацієнтів з анемією, викликану хронічним захворюванням, із залізодефіцитною анемією й з функціональним дефіцитом заліза.

70. Застосування за п. 69, де фактор вибраний із групи, що складається з еритроїд-амінолевулінат-синтази, трансферину, рецептора трансферину й церулоплазміну.

71. Застосування за п. 69 або 70, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

72. Застосування за будь-яким з пп. 69-71, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-[[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-2-(4-метоксифеніл)етил]аміно]-N-гідроксипропіонамід.

73. Застосування за будь-яким з пп. 69-72, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

74. Застосування за будь-яким з пп. 69-73, в якому суб'єкт є людиною.

75. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для лікування або профілактики мікроцитозу або мікроцитарної анемії в суб'єкта.

76. Застосування за п. 75, в якому мікроцитоз пов'язаний з порушенням, вибраним із групи, що складається із хронічного захворювання, анемії, викликаної хронічним захворюванням, дефіциту заліза, функціонального дефіциту заліза й анемії, викликаної дефіцитом заліза.

77. Застосування за п. 76, в якому порушення являє собою анемію, викликану хронічним захворюванням.

78. Застосування за будь-яким з пп. 75-77, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

79. Застосування за будь-яким з пп. 75-78, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;
[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-[[4-(3,3-добензилуреїдо)бензолсульфоніл]-2-(4-метоксифеніл)етил]аміно]-N-гідроксипропіонамід.

80. Застосування за будь-яким з пп. 75-79, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

81. Застосування за будь-яким з пп. 75-80, в якому суб'єкт є людиною.

82. Застосування інгібітора HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, у виробництві лікарського засобу для лікування або профілактики анемії, пов'язаної з активністю цитокінів у суб'єкта, де анемія пов'язана зі станом, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекції, імунодефіциту й неопластичних захворювань.

83. Застосування за п. 82, в якому станом є запалення.

84. Застосування за п. 83, де лікарський засіб призначений для зменшення первинних явищ судинного запалення.

85. Застосування за будь-яким з пп. 82-84, в якому цитокін являє собою запальний цитокін.

86. Застосування за будь-яким з пп. 82-85, в якому цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

87. Застосування за будь-яким з пп. 82-86, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, є гетероциклічним карбоніловмісним гліцином формул I, Ia або Ib.

88. Застосування за будь-яким з пп. 82-87, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, вибраний із групи, що складається з:

[(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти;

[(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтової кислоти й

3-{[4-(3,3-дибензилуреїдо)бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)етил]аміно}-N-гідроксипропіонамід.

89. Застосування за будь-яким з пп. 82-88, в якому інгібітор HIF пролілгідроксилази, що є структурним міметиком 2-оксоглутарату, являє собою [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)аміно]оцтову кислоту.

90. Застосування за будь-яким з пп. 82-89, в якому суб'єкт є людиною.

91. Набір, призначений для лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням; лікування або профілактики дефіциту заліза; лікування або профілактики мікроцитозу або мікроцитарної анемії; лікування або профілактики анемії, пов'язаної з активністю цитокінів; лікування анемії, яка із труднощами піддається лікуванню еритропоетином (ЕРО), що екзогенно вводиться; підвищення продукції фактора, необхідного для поглинання, транспорту й використання заліза, зменшення експресії гепсидину, з підвищенням у такий спосіб доступності заліза й забезпечення корисної дії в пацієнтів з анемією, викликану хронічним захворюванням, із залізодефіцитною анемією й з функціональним дефіцитом заліза, що включає інгібітор HIF пролілгідроксилази, який являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, і щонайменше одну домішку, вибрану із групи, яка складається з еритропоетину, заліза й вітамінів групи В.

92. Фармацевтична композиція для лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням; лікування або профілактики дефіциту заліза; лікування або профілактики мікроцитозу або мікроцитарної анемії; лікування або профілактики анемії, пов'язаної з активністю цитокінів; лікування анемії, яка із труднощами піддається лікуванню еритропоетином (ЕРО), що екзогенно вводиться; лікування або профілактики дефіциту заліза, підвищення продукції фактора, необхідного для поглинання, транспорту й використання заліза, зменшення експресії гепсидину, з підвищенням у такий спосіб доступності заліза й забезпечення корисної дії в пацієнтів з анемією, викликану хронічним захворюванням, із залізодефіцитною анемією й з функціональним дефіцитом заліза, що містить інгібітор HIF пролілгідроксилази, що являє собою структурний міметик 2-оксоглутарату, і щонайменше одну домішку, вибрану із групи, яка складається з еритропоетину, заліза й вітамінів групи В.

Для даної заявки запитується пріоритет за попередньою патентною заявкою США реєстраційний №60/476704, поданою 6 червня 2003 року; за попередньою патентною заявкою США реєстраційний №60/566488, поданою 29 квітня 2004 року; за попередньою патентною заявкою США реєстраційний №60/566237, поданою 29 квітня 2004 року; а також за попередньою патентною заявкою США реєстраційний №60/569797, поданою 10 травня 2004 року, причому кожна із цих заявок включена у всій повноті у даний документ за допомогою посилання.

Даний винахід належить до способів і сполук, призначених для регулювання або посилення еритропоезу й метаболізму заліза, а також для лікування або профілактики дефіциту заліза та анемії, викликаній хронічними захворюваннями.

Термін анемія, як правило, належить до будь-якої аномалії гемоглобіну або еритроцитів, яка призводить до зниження рівня кисню в крові. Крім

цього, анемія розвивається у зв'язку із хронічними захворюваннями, наприклад, хронічними інфекціями, неопластичними розладами, хронічними запальними розладами, включаючи розлади з наступним запальним пригніченням діяльності кісткового мозку й т.п. Анемія, викликана хронічними захворюваннями (ACD), являє собою один з найбільш звичайних синдромів у медицині.

Анемія, викликана хронічними захворюваннями (ACD), часто пов'язана з дефіцитом заліза. ACD може розвиватися через наявність недостатньої кількості заліза (наприклад, анемія через дефіцит заліза) або, у тому випадку, коли загальний вміст заліза в організмі знаходиться на достатньому рівні, але не задовольняється потреба в утворенні гемоглобіну (наприклад, функціональний дефіцит заліза). Залізо необхідно для утворення гемоглобіну червоних кров'яних тілець в еритропоетичних клітинах-попередниках кісткового мозку.

В організмі пацієнтів з анемією, викликаною хронічними захворюваннями, спостерігаються численні дефіцити, включаючи знижене вироблення еритропоєтину (ЕРО), знижену реактивність кісткового мозку щодо ЕРО й знижений метаболізм заліза, включаючи знижену абсорбцію заліза з кишечника, знижений транспорт заліза через ентероцити, знижене окиснення заліза в тривалентний стан гефестином або церулоплазміном, знижене зв'язування заліза й поглинання трансферином і рецептором трансферину, а також знижений транспорт заліза до кісткового мозку, при використанні заліза, включаючи синтез гемму. Окремо й спільно, ці фізіологічні дефіцити роблять внесок у неефективний або ослаблений еритропоєз, що може призводити до мікроцитарної анемії й гіпохромних червоних кров'яних тілець, пов'язаних зі зниженим виробленням гемоглобіну й зменшеним транспортом кисню.

Анемія, викликана хронічними захворюваннями, пов'язана зі збільшеним виробленням запальних цитокінів [Means (1995) *Stem cells* 13:32-37 і Means (1999) *Int J Hematol* 70:7-12], включаючи, наприклад, фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкін-1 β (IL-1 β), IL-6 і інтерферон- γ (IFN- γ). У декількох *in vitro* і *in vivo* модельних тваринних системах, запальні цитокіни негативно впливають на здатність опосередковувати вироблення ЕРО, реактивність ЕРО й узгоджене регулювання метаболізму заліза [Roodman et al. (1989) *Adv Exp Med Biol* 271:185-196; Fuchs et al. (1991) *Eur J Hematol* 46:65-70; Jelkmann et al. (1994) *Ann NY Acad Sci* 718:300-311; Vannucchi et al. (1994) *Br J Hematol* 87:18-23; and Oldenburg et al. (2001) *Aliment Pharmacol Ther* 15:429-438]. Введення еритропоєтину не здатне звернути назад розвиток анемії в мишей, яких безперервно піддають впливу TNF- α [Clibon et al. (1990) *Exp Hematol* 18:438-441]. Підвищені рівні запальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β і IFN- γ , роблять внесок у порушення вироблення ЕРО й стійкості ЕРО, яка спостерігається у пацієнтів з анемією, викликаною хронічним захворюванням [Jelkmann et al. (1991) *Ann NY Acad Sci* 718:300-311 і Macdougall і Cooper (2002) *Nephrol Dial Transplant* 17(11):39-43]. Отже, різні цитокіни, наприклад запальні цитокіни, пов'язані із запаленням, залучені в численні аспекти патогенезу анемії, викликаної хронічним захворюванням, включаючи інгібування еритроїдних попередників, інгібування вироблення ЕРО, а також погіршення вивільнення заліза й доступності заліза для еритропоєзу.

Отже, у даній області існує потреба в способах лікування або профілактики анемії, викликаної хронічними захворюваннями. У даній області існує потреба в способах подолання дефіциту рекомбінантного ЕРО при його потоковому застосуванні для лікування анемії, викликаної хронічним захворюванням. Зокрема, зберігається необхідність розробки способів і сполук, ефективних з погляду подолання зниженого вироблення ЕРО й зменшеної реактивності ЕРО, які пов'язані з анемією, викликаною хронічним захворюванням, способів і сполук, ефективних з погляду поліпшення регулювання метаболізму заліза й подолання недовіків зміненого або аномального метаболізму й викори-

стання заліза, а також способів і сполук, ефективних з погляду поліпшення загального або повного еритропоєзу за рахунок поліпшення шляхів метаболізму, що мають відношення до вироблення ЕРО, реактивності ЕРО й передачі сигналів, а також доступності, використання, поглинання, транспорту, процесингу заліза й т.д. У техніці існує потреба в способах подолання або поліпшення наслідків ефектів, викликаних цитокінами, у суб'єктів, у яких спостерігається анемія, викликана хронічним захворюванням.

Дефіцит заліза являє собою одну з найбільш звичайних різновидів дефіциту харчування в усьому світі, і цей дефіцит є головною причиною анемії на глобальному рівні. Баланс заліза, по суті, регулюється швидкістю еритропоєзу й розміром запасів заліза. Дефіцит заліза може спостерігатися при анемії або за її відсутності, причому він пов'язаний з погіршеним розвитком пізнавальних здатностей.

Дефіцит заліза визначається як недостатнє забезпечення залізом (рівні або резерви) або як недостатня доступність, або недостатнє використання заліза в організмі. Причиною цього може бути недостатність харчування, наприклад, нестача заліза в раціоні харчування; недостатнє поглинання заліза, через, наприклад, хірургічне втручання (наслідки гастроентеромії) або захворювання (хвороба Крона); виснаження запасів заліза або зростання втрат заліза, через хронічну або гостру втрату крові внаслідок травми, менструації, донорства крові, флеботомії (як і внаслідок різних процедур і хірургічних втручань); зросла потреба в залізі, наприклад, через швидкий ріст у ранньому дитинстві або юнацтві, вагітності, еритропоєтинової терапії і т.д.

Крім цього дефіцит заліза може являти собою функціональний дефіцит заліза, наприклад, дефіцит заліза, що характеризується ослабленою здатністю суб'єкта одержувати доступ до запасів заліза й використовувати їх. Залізо не надходить зі швидкістю, достатньою для забезпечення нормальної насиченості еритроцитів гемоглобіном, що веде до зниженого клітинного вмісту гемоглобіну в ретикулоцитах і еритроцитах. Функціональний дефіцит заліза часто спостерігається у здорових індивідуумів з явно нормальними або навіть підвищеними запасами заліза, але з погіршеною доступністю заліза, що визначають, наприклад, по низьких процентних рівнях насичення трансферину. Даний тип дефіциту заліза часто пов'язаний з гострим або хронічним запаленням.

Дефіцит заліза будь-якого виду може призвести до залізодефіцитного еритропоєзу або еритропоєзу при обмеженій кількості заліза, при якому зменшується число червоних кров'яних тілець, причому циркулюючі червоні кров'яні тілця менше нормальних (мікроцитарні) і відрізняються нестачею нормального гемоглобіну, внаслідок чого вони мають бліді кольори (гіпохромні).

У суб'єктів з дефіцитом заліза, включаючи функціональний дефіцит заліза, може розвинути погіршений синтез гемоглобіну, зменшене процентне насичення трансферину й знижені рівні гемоглобіну й гематокриту, що призводить до залізодефіцитної анемії. Залізодефіцитна анемія являє собою найбільш звичайний різновид анемії у світі. Залізо

є основним компонентом гемоглобіну; під час відсутності заліза кістковий мозок не здатний ефективно виробляти гемоглобін. Залізодефіцитна анемія може спостерігатися у суб'єктів з виснаженнями або зменшеними запасами заліза, або ж вона може мати місце у суб'єктів, що мають функціональний дефіцит заліза, коли є запас заліза, але воно не доступно, наприклад, при виробленні гемоглобіну.

Як очевидно із викладеного вище, у даній галузі є потреба в способах лікування або профілактики розладів, пов'язаних з метаболізмом заліза, крім цього, у даній галузі є потреба в способах поліпшення метаболізму заліза. Існує необхідність у розробці способів лікування або профілактики дефіциту заліза, включаючи функціональний дефіцит заліза, а також лікування або профілактики супутніх станів, таких як мікроцитоз і залізодефіцитна анемія.

Даний винахід представляє способи й сполуки, призначені для поліпшення метаболічних і фізіологічних шляхів, які роблять внесок у повний і ефективний еритропоез і, зокрема, для лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням. Крім цього представлені способи й сполуки для подолання пригнічувального/інгібуючого впливу запальних цитокінів на вироблення й реактивність ЕРО. Додатково даний винахід представляє способи й сполуки для поліпшення метаболізму заліза, а також для лікування або профілактики станів, пов'язаних зі зниженням метаболізмом заліза, таких як дефіцит заліза, включаючи функціональний дефіцит заліза, залізодефіцитну анемію, мікроцитоз, залізодефіцитний еритропоез і т.д.

Даний винахід належить до способів і сполук, призначених для індукції посиленого або повного еритропоезу у суб'єкта. Зокрема, способи включають індукцію посиленого або повного еритропоезу шляхом стабілізації HIF α у суб'єкта. Конкретно розглядаються способи індукції посиленого еритропоезу за рахунок інгібування HIF-пролілігдроксилази. У конкретних варіантах здійснення способи включають введення суб'єктові сполуки за даним винаходом. У різних варіантах здійснення суб'єкт може являти собою клітину, тканину, орган, систему органів або весь організм.

У різних варіантах здійснення суб'єкт являє собою клітину, тканину, орган, систему органів або весь організм. В окремих варіантах здійснення організм являє собою ссавця, переважно людину.

В одному з аспектів спосіб збільшує вироблення факторів, необхідних для диференціювання еритроцитів від гемопоетичних клітин-попередників, що включають, наприклад, лінії гемопоетичних клітин (HSCs), клітини CFU-GEMM (колонієутворюючі одиниці гранулоцит/еритроїд/моноцит/мегакаріоцит) і т.д. Фактори, які стимулюють еритропоез, включають, не обмежуючись цим, еритропоетин. В іншому аспекті, способи збільшують вироблення факторів, необхідних для поглинання, транспорту й використання заліза. Такі фактори включають, не обмежуючись перерахованим, еритроїд-амінолевулінатсинтазу, трансферин, рецептор трансферину, церулоплазмін і т.д. У ще одному аспекті спосіб збільшує вироблення факторів, необхідних для диференцію-

вання еритроцитів і додаткових факторів, необхідних для поглинання, транспорту й використання заліза.

В іншому втіленні способи за даним винаходом поліпшують реактивність гемопоетичних клітин-попередників у відношенні еритропоетину. Як згадувалося вище, ці клітини-попередники включають HSCs, CFU-GEMMs і т.д. Реактивність клітин-попередників може бути збільшена, наприклад, за рахунок зміни експресії рецепторів еритропоетину, внутрішньоклітинних факторів, залучених у передачу сигналів еритропоетину, і секретованих факторів, які полегшують взаємодію еритропоетину з рецепторами.

В іншому аспекті способи можуть застосовуватися для подолання інгібування еритропоезу, викликаного запальними цитокінами, такими як фактор- α некрозу пухлин (TNF- α), інтерлейкін- β (IL-1 β) і т.п. В окремих аспектах способи можуть застосовуватися для лікування анемії, що складно піддається лікуванню еритропоетином, що вводиться екзогенно. Подібна анемія може бути викликана, наприклад, хронічними запальними або аутоімунними розладами, які включають, не обмежуючись перерахованим, хронічний бактеріальний ендокардит, остеомієліт, ревматоїдний артрит, ревматизм, хворобу Крона й виразковий коліт.

У певних втіленнях способи за даним винаходом можуть бути застосовані для лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням. Зокрема, розроблені способи індукції посиленого або повного еритропоезу у пацієнтів з анемією, викликану хронічним захворюванням. В окремих варіантах здійснення способи збільшують кількість заліза, доступного для утворення нових червоних кров'яних тілець.

В іншому аспекті даний винахід представляє способи посилення реактивності ЕРО кісткового мозку.

Зокрема, розроблені способи інгібування супресії ЕРО TNF- α , а також розроблені способи інгібування супресії ЕРО IL-1 β .

Даний винахід належить до способів лікування/профілактики анемії, викликаній хронічними захворюваннями, а також до способів регулювання процесингу заліза й лікування/профілактики станів, пов'язаних з дефіцитом заліза й/або процесингу заліза.

В одному з аспектів винахід представляє спосіб лікування у суб'єкта анемії, викликаній хронічним захворюванням, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує альфа-субодиницю індукованого при гіпоксії фактора (HIF), здійснюючи, тим самим, лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням. Крім цього розроблені способи досягнення конкретних фізіологічних результатів у суб'єкта з анемією, викликану хронічним захворюванням; зокрема, представляє способи підвищення ретикул опитів, збільшення середнього корпускулярного об'єму клітини, підвищення середнього корпускулярного гемоглобіну, збільшення гематокриту, підвищення гемоглобіну, збільшення кількості червоних кров'яних тілець і т.д. у суб'єкта з анемією, викликану хронічним захворюванням, причому будь-який зі способів включає введення суб'єктові

ефективної кількості сполуки, що стабілізує альфа-субодинацію індукованого при гіпоксії фактора (HIF), досягаючи, тим самим, бажаного фізіологічного результату. У різних аспектах анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана, наприклад, із запаленням, аутоімунним захворюванням, нестачею заліза, мікроцитозом, злоякісними пухлинними захворюваннями й т.д.

У різних варіантах здійснення суб'єкт являє собою клітину, тканину або орган. В інших варіантах здійснення суб'єкт являє собою тварину, переважно ссавця, найбільш переважно - людину. Якщо суб'єкт є клітиною, даний винахід, зокрема, припускає, що клітина може бути відособленою клітиною, як прокаріотичною, так і еукаріотичною. У випадку, якщо суб'єкт являє собою тканину, винахід, зокрема, розглядає як ендогенні тканини, так і тканини *in vitro*, наприклад тканини, вирощені в культурі. У переважних варіантах здійснення суб'єкт є твариною, зокрема, одним з видів ссавців, включаючи щура, кролика, корову, вівцю, свиню, мишу, коня й різні види приматів. У найбільш переважному варіанті здійснення суб'єкт являє собою людину.

Стабілізація HIF α може здійснюватися кожним зі способів, які доступні й відомі фахівцям в даній галузі техніки, і може включати застосування будь-якого засобу, що взаємодіє з HIF α , зв'язується з HIF α або модифікує HIF α , або факторів, які взаємодіють із HIF α , включаючи, наприклад, ферменти, для яких HIF α є субстратом. У певних аспектах даний винахід передбачає одержання конститутивно стабільного варіанта HIF α , наприклад стабільних мутантів HIF і т.д. або полінуклеотиду, що кодує такий варіант. В інших аспектах даний винахід передбачає, що стабілізація HIF α включає введення засобу, що стабілізує HIF α . Такий засіб може складатися з полінуклеотидів, наприклад, антисмислових послідовностей; антитіл; інших білків; вуглеводів; жирів; ліпідів; а також органічних і неорганічних речовин, наприклад, невеликих молекул і т.д. У переважному втіленні, даний винахід передбачає стабілізацію HIF α у суб'єкті, наприклад, за рахунок введення суб'єктові засобу, що стабілізує HIF α , причому засіб являє собою сполуку, наприклад, сполуку з невеликими молекулами й т.д., яка стабілізує HIF α .

У різних аспектах HIF α являє собою HIF1 α , HIF2 α або HIF3 α . У переважному аспекті стабілізація HIF α включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що інгібує активність HIF-гідроксилази. У певних аспектах HIF-гідроксилаза вибрана із групи, що складається з EGLN1, EGLN2 і EGLN3.

В одному з варіантів здійснення винахід представляє спосіб збільшення середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). У додатковому варіанті здійснення винахід представляє спосіб підвищення середніх рівнів корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпо-

ксією (HIF). В іншому варіанті здійснення даний винахід охоплює спосіб зменшення мікроцитозу у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF).

Винахід додатково представляє спосіб лікування або профілактики мікроцитарної анемії, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF).

В одному з аспектів, даний винахід належить до способу лікування або профілактики станів, пов'язаних з дефіцитом заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). В окремому аспекті винахід представляє спосіб поліпшення процесингу заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується при гіпоксії (HIF). Крім цього розроблений спосіб лікування або профілактики станів, пов'язаних з порушенням доступності заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF).

В інших варіантах здійснення винахід належить до способу подолання ефектів, індукованих цитокінами у суб'єкта. Зокрема, в одному аспекті винахід представляє спосіб подолання викликаного цитокінами інгібування вироблення EPO у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). Крім цього винахід представляє спосіб подолання викликаного цитокінами інгібування доступності заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). В іншому аспекті даний винахід охоплює спосіб лікування або профілактики пов'язаної з цитокінами анемії у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). Крім цього розроблені способи збільшення вироблення EPO в присутності цитокінів у суб'єкта, причому способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). У конкретних варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α і IL-1 β .

В одному з аспектів винахід представляє спосіб зниження індукованої цитокінами експресії VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule) у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодинацію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). У конкретному аспекті, цитокін являє собою TNF- α або IL-1 β . В одному з аспектів спосіб застосовують для зниження індукованої цитокінами експресії VCAM в ендотеліальних клітинах суб'єкта. В

іншому аспекті суб'єкт перебуває в стані, вибраному із групи, що складається із запального захворювання, аутоімунного захворювання й анемії, викликаній хронічним захворюванням.

В іншому аспекті винахід представляє спосіб зниження індукованої цитокінами експресії Е-селектину у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією. У конкретному аспекті цитокін являє собою TNF- α або IL-1 β . В одному з аспектів спосіб застосовують для зниження індукованої цитокінами експресії Е-селектину в ендотеліальних клітинах суб'єкта. В іншому аспекті суб'єкт перебуває в стані, вибраному із групи, що складається із запального захворювання, аутоімунного захворювання й анемії, викликаній хронічним захворюванням.

Винахід представляє різні способи регулювання/поліпшення процесингу й метаболізму заліза. В одному аспекті винахід представляє способи поліпшення транспорту, поглинання, використання й абсорбції заліза у суб'єкта, причому будь-який зі способів включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). В окремих варіантах здійснення винахід представляє способи збільшення експресії трансферину, експресії рецептора трансферину, експресії IRP-2, експресії феритину, експресії церулоплазміну, експресії NRAMP2, експресії спрутину й експресії ALAS-2 у суб'єкта, причому будь-який зі способів включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). В інших варіантах здійснення винахід представляє способи зменшення експресії гепсидину, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). Крім цього, розроблені способи збільшення синтезу гему у суб'єкта за рахунок введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF).

У певних аспектах винахід розглядає способи підвищення вмісту заліза в сироватці суб'єкта, включаючи насичення трансферином, підвищення рівнів розчинного рецептора трансферину й збільшення рівнів вмісту феритину, причому будь-який зі способів включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF). У додатковому аспекті винахід представляє спосіб для збільшення транспорту заліза в кістковий мозок суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує альфа-субодініцію фактора, що індукується гіпоксією (HIF).

В одному з аспектів представлені способи застосовують до лікування або виробництва лікарського засобу для суб'єкта, переважно людини, у якого є будь-який з розладів або станів, обговорюваних у даному описі. Варто розуміти, що різні параметри, пов'язані із клінічними станами, змінюються відповідно до віку, статі й т.д. В одному

аспекті рівень феритину в сироватці суб'єкта нижче нормальних меж, наприклад нижче 50-200мкг/л; отже, суб'єкт, що має рівень феритину в сироватці нижче 200нг/мл, нижче 150нг/мл, нижче 100нг/мл, нижче 75нг/мл і нижче 50нг/мл, міг би бути прийнятним суб'єктом для лікування способами за даним винаходом або для застосування медикаментів, розроблених у даному винаході. З іншого боку, прийнятний суб'єкт міг би бути ідентифікований завдяки тому, що його загальна здатність до зв'язування заліза (TIBS) нижче нормальних меж, наприклад TIBS менше 300-360мкг/дл.

В іншому варіанті здійснення рівень заліза в сироватці суб'єкта нижче нормальних меж, наприклад рівні заліза менше 50-150мкг/дл. Інші прийнятні параметри для ідентифікації прийнятних суб'єктів включають наступні результати вимірювань: насичення трансферину нижче 30-50%, сидеробласти кісткового мозку нижче 40-60% і рівні гемоглобіну нижче приблизно 10-11г/дл. Будь-який з наведених вище параметрів вимірюють, наприклад, у стандартних гематологічних тестах, при хімічному аналізі крові й повному клінічному аналізі крові (CBC), результати яких, як правило, представляють у вигляді вимірювань декількох параметрів крові й одержують, наприклад, шляхом аналізу крові за допомогою автоматичного пристрою, що вимірює, наприклад, кількість червоних кров'яних тілець, кількість білих кров'яних тілець, кількість тромбоцитів і показники червоних кров'яних тілець. Вимірювання можуть проводитися будь-якими стандартними засобами вимірювань, які застосовуються в гематологічному й/або біохімічному аналізі крові, включаючи, наприклад, автоматизовані системи, такі як аналізатор CELL DYN 4000 (Abbott Laboratories, Abbott Park IL), аналізатор Coulter GenS (Beckman Coulter, Inc., Fullerton CA), аналізатор Bayer ADVIA (Bayer Healthcare AG, Leverkusen, Germany) і т.д.

В одному з аспектів винахід охоплює спосіб лікування або профілактики дефіциту заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, яка стабілізує HIF α , і здійснення, тим самим, лікування або профілактики дефіциту заліза у суб'єкта. У додаткових аспектах дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза; дефіцит заліза, пов'язаний з анемією; дефіцит заліза, пов'язаний з розладом, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, розладу, пов'язаного з імунodefіцитом, неопластичного розладу; або ж дефіцит заліза, пов'язаний з розладом, вибраним із групи, що складає з анемії, викликаній хронічним захворюванням, залізодефіцитної анемії (IDA) або мікроцитарної анемії.

Суб'єкт за даним винаходом може бути суб'єктом, у якого будь-який стандартний, прийнятний з клінічної точки зору спосіб виміру свідчить про дефіцит заліза або про підвищений ризик розвитку дефіциту заліза. Наприклад, у певних варіантах здійснення у суб'єкта є низькі рівні феритину в сироватці (<20нг/мл) або знижений відсоток насичення трансферину, наприклад менше 16% (у дорослих). Конкретно, розглядаються рівні феритину в сироватці нижче 50нг/мл, нижче 40нг/мл, нижче 30нг/мл і нижче 20нг/мл. Відзначено, що якщо у

суб'єкта є підвищений ризик виникнення дефіциту заліза або дефіцит заліза, що являє собою функціональний дефіцит заліза, рівні феритину в сироватці можуть підвищуватися вище нормальних меж, наприклад 200нг/мл і вище. Дефіцит заліза може спостерігатися завдяки початку протікання еритропоезу при обмеженій кількості/дефіциті заліза (погіршення синтезу гемоглобіну, що, як правило, спостерігається, коли відсоток насичення трансферину падає нижче 15-20%). Зазначені параметри, які мають відношення до заліза, можуть бути виміряні із застосуванням будь-якого описаного вище стандартного аналізу CBC або біохімічного аналізу й/або із застосуванням автоматичних приладів, більш конкретно, призначених для аналізу заліза, наприклад Unimate 5 Iron і комплексу Unimate 7 UBC (Roshe, Switzerland).

Суб'єкт, який міг би одержати користь від представлених способів лікування й профілактики, міг би являти собою суб'єкт, у якого є залізодефіцитна анемія або підвищений ризик її виникнення; наприклад суб'єкт, що має відсоток насичення трансферину 10-15% або нижче 10%.

В одному аспекті суб'єкт, який має дефіцит заліза або підвищений ризик його виникнення, має функціональний дефіцит заліза або ризик його виникнення. Вміст гемоглобіну ретикулоцитів менше 28 пікограм/клітина могло б служити індикатором подібного стану. В іншому аспекті суб'єкт, який має функціональний дефіцит заліза або підвищений ризик його виникнення, показує більш ніж 5%-ний вміст гіпохромних червоних тілець.

У певних варіантах здійснення у суб'єкта є анемія, викликана хронічним захворюванням, або підвищений ризик її виникнення. У подібного суб'єкта могла б проявлятися анемія легкого або помірного ступеня, наприклад, рівні гемоглобіну близько 10-13г/дл або, більш конкретно, 10-11г/дл. В інших варіантах здійснення проявляється більш гостра анемія, наприклад, рівні гемоглобіну становлять менше 10г/дл, включаючи рівні менше 5г/дл і рівні менше 3г/дл. У деяких варіантах здійснення суб'єкт, у якого є анемія, викликана хронічним захворюванням, або підвищений ризик її виникнення, демонструє аномалії в розподілі заліза. Такими аномаліями можуть бути, наприклад, рівні заліза в сироватці, наприклад, нижче приблизно 60мг/дл, або рівні феритину вище нормальних меж, наприклад, вище 200нг/мл, вище 300нг/мл або вище 400нг/мл.

У певних аспектах у суб'єкта може бути мікроцитарна анемія або підвищений ризик її виникнення. Подібний суб'єкт може, наприклад, демонструвати виміряний середній корпускулярний об'єм менше 80 фемтолітрів, наприклад як одну із частин повного клінічного аналізу крові. В інших аспектах суб'єкт має середній корпускулярний об'єм менше нормального значення 90 ± 8 фемтолітрів. У різних аспектах суб'єкт може мати знижену середню кількість гемоглобіну в клітинах, наприклад, середня кількість гемоглобіну в клітині менше ніж 30 ± 3 пікограми гемоглобін/клітина; або знижену середню концентрацію гемоглобіну в клітині, наприклад, середню концентрацію гемоглобіну менше ніж 33+2%.

Крім цього представлений спосіб лікування або профілактики функціонального дефіциту заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і здійснення, тим самим, лікування або профілактики функціонального дефіциту заліза.

В одному з варіантів здійснення даний винахід представляє спосіб регулювання або поліпшення метаболізму заліза або процесів метаболізму заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, регулюючи або поліпшуючи метаболізм заліза або процеси метаболізму заліза у суб'єкта. В іншому варіанті здійснення винахід представляє спосіб регулювання й поліпшення процесів метаболізму заліза, вибраних із групи, яка складається з поглинання заліза, абсорбції заліза, транспорту заліза, накопичення заліза, процесингу заліза, мобілізації заліза й використання заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, регулюючи або поліпшуючи процеси метаболізму заліза у суб'єкта.

Крім цього в даній заявці представлений спосіб збільшення абсорбції заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, збільшуючи абсорбцію заліза у суб'єкта. У певних аспектах абсорбція заліза являє собою абсорбцію, що відбувається в кишечнику; абсорбцію заліза, яке надходить із їжею; або абсорбцію в дуоденальних ентероцитах.

Крім перерахованого, в даній заявці також розглядаються наступні способи: спосіб збільшення транспорту заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, транспорту заліза у суб'єкта; спосіб збільшення накопичення заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, накопичення заліза у суб'єкта; спосіб збільшення поглинання заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, поглинання заліза у суб'єкта; спосіб збільшення процесингу заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, процесингу заліза у суб'єкта; спосіб збільшення мобілізації заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, мобілізації заліза у суб'єкта; спосіб збільшення використання заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, використання заліза у суб'єкта.

В одному варіанті здійснення винахід розглядає спосіб збільшення доступності заліза для еритропоезу у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, доступності заліза для еритропоезу у суб'єкта. У різних варіантах здійснення зростаюча доступність заліза

для еритропоезу збільшує доступність заліза для синтезу гемоглобіну; збільшує доступність заліза для вироблення гемоглобіну; або збільшує доступність заліза для вироблення червоних кров'яних тілець.

Додатково винахід представляє способи регулювання експресії регуляторних факторів заліза у суб'єкта, причому способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , регулюючи, тим самим, експресію факторів метаболізму заліза у суб'єкта.

Даною заявкою охоплені способи регулювання експресії певних регуляторних факторів заліза, включаючи: спосіб збільшення експресії рецептора трансферину у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії рецептора трансферину у суб'єкта; спосіб збільшення експресії трансферину у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії трансферину у суб'єкта; спосіб збільшення експресії церулоплазміну у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії церулоплазміну у суб'єкта; спосіб збільшення експресії NRAMP2 (slc11a2) у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії NRAMP2 у суб'єкта; спосіб збільшення експресії дуоденальної цитохром b редуктази 1 у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії дуоденальної цитохром b редуктази 1 у суб'єкта; а також спосіб збільшення експресії 5-амінолевулінатсинтази у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, експресії 5-амінолевулінатсинтази у суб'єкта.

В одному з варіантів здійснення даний винахід представляє спосіб збільшення вмісту заліза в сироватці суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, вмісту заліза в сироватці суб'єкта. У певних варіантах здійснення суб'єкт є людиною, і рівні заліза в сироватці підвищуються до величини від 50 до 150 мг/дл.

В іншому аспекті даний винахід представляє способи збільшення загальної ємності зв'язування заліза (TIBC) у суб'єкта. Спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, TIBC у суб'єкта. У кращому аспекті суб'єкт являє собою людину, і загальна ємність зв'язування заліза підвищується до величини від 300 до 360 мг/дл.

Представлені способи й сполуки, призначені для коректування рівнів феритину в сироватці суб'єкта. У певному варіанті здійснення суб'єкт являє собою людину, і рівні феритину в сироватці підвищуються вище 15 мкг/л. У додатковому варіанті здійснення суб'єкт являє собою дорослу людину чоловічої статі, і рівень феритину в сироватці під-

вищується до величини близько 100 мкг/л. В іншому варіанті здійснення суб'єкт являє собою дорослу жінку, і рівень феритину в сироватці підвищується до величини близько 30 мкг/л.

В одному з аспектів винахід включає спосіб збільшення насичення трансферину у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, насичення трансферину у суб'єкта. В одному з аспектів, насичення трансферину зростає вище рівня, вибраного із групи, що складається з 10%, 15%, 20%, 30%, 40% і 50%. Даний винахід охоплює способи збільшення процентного насичення трансферину у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення суб'єкт являє собою людину, і процентне насичення трансферину зростає вище величини приблизно 18%. В іншому варіанті здійснення процентне насичення трансферину збільшується до величини від 25 до 50%. Процентне насичення трансферину, як правило, обчислюють, застосовуючи формулу: $(\text{залізо в сироватці})/(100)/(\text{TIBC})$.

Крім перерахованого, представлені способи збільшення у суб'єкта рівнів розчинного рецептора трансферину, причому способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, рівнів вмісту розчинного рецептора трансферину у суб'єкта. Даний винахід додатково представляє способи збільшення загальної маси еритроїдів кісткового мозку, яка виміряна, наприклад, по рівнях рецептора трансферину в сироватці. В одному з аспектів суб'єкт являє собою людину, і рівень рецептора трансферину в сироватці зростає до 4-9 мкг/л, що визначають за допомогою імунного аналізу.

Розроблено спосіб зменшення експресії гепсидину у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , зменшуючи, тим самим, експресію гепсидину у суб'єкта.

В одному з варіантів здійснення винахід представляє спосіб лікування або профілактики розладів, пов'язаних з дефіцитом заліза у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, здійснюючи лікування або профілактику розладів, пов'язаних з дефіцитом заліза у суб'єкта. В одному з варіантів здійснення дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза. У різних варіантах здійснення розлад вибраний із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, розладів, пов'язаних з імунodefіцитом, і неопластичних розладів; або ж розлад вибраний із групи, що складається з анемії, викликаній хронічним захворюванням, залізодефіцитної анемії й мікроцитарної анемії.

Винахід представляє спосіб поліпшення еритропоезу у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза або підвищений ризик його виникнення, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , поліпшуючи, тим самим, еритропоез у суб'єкта. У певному аспекті передбачається, що дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза.

Далі даний винахід представляє спосіб поліпшення еритропоезу у суб'єкта, відповідно до якого у суб'єкта є функціональний дефіцит заліза або підвищений ризик його виникнення, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і поліпшення, тим самим, еритропоезу у суб'єкта. У різних аспектах хронічне захворювання вибрано із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, розладів, пов'язаних з імунodefіцитом, і неопластичних розладів.

Додатково представлений спосіб поліпшення еритропоезу у суб'єкта, відповідно до якого у суб'єкта є анемія, викликана хронічним захворюванням, або підвищений ризик її виникнення, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і поліпшення, тим самим, еритропоезу у суб'єкта.

В одному з варіантів здійснення винахід охоплює спосіб поліпшення еритропоезу у суб'єкта, у якому суб'єкт не піддається лікуванню ЕРО-терапією, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, поліпшуючи, тим самим, еритропоез у суб'єкта.

Крім цього, представлений спосіб лікування або профілактики анемії, викликаної хронічним захворюванням у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і здійснення, тим самим, лікування або профілактики анемії, викликаної хронічним захворюванням, у суб'єкта. У певних аспектах передбачається, що анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана зі станом, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, розладу, пов'язаного з імунodefіцитом, або неопластичного розладу.

У винаході конкретно розглядаються наступні способи: спосіб збільшення числа ретикулоцитів у суб'єкта, у якого є хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, числа ретикулоцитів у суб'єкта; спосіб підвищення гематокриту у суб'єкта, у якого є хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і підвищення, тим самим, гематокриту у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту гемоглобіну у суб'єкта, у якого спостерігається хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і підвищення, тим самим, вмісту гемоглобіну у суб'єкта; спосіб збільшення кількості червоних кров'яних тілець у суб'єкта, у якого спостерігається хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта, у якого спостерігається хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта; спосіб збільшення середнього корпускулярного гемогло-

біну у суб'єкта, у якого є хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту заліза в сироватці суб'єкта, у якого спостерігається хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, вмісту заліза в сироватці суб'єкта; а також спосіб збільшення насичення трансферину у суб'єкта, у якого є хронічне захворювання, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, насичення трансферину у суб'єкта. У кожному з перерахованих способів у конкретних варіантах здійснення хронічне захворювання вибрано із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, розладу, пов'язаного з імунodefіцитом, і неопластичного розладу; або хронічне захворювання вибрано із групи, що складається з анемії, викликаної хронічним захворюванням, анемії, викликаної дефіцитом заліза, дефіциту заліза, функціонального дефіциту заліза й мікроцитарної анемії.

Крім цього розроблені наступні способи: спосіб збільшення числа ретикулоцитів у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, числа ретикулоцитів у суб'єкта, спосіб підвищення гематокриту у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і підвищення, тим самим, гематокриту у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту гемоглобіну у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і підвищення, тим самим, вмісту гемоглобіну у суб'єкта; спосіб збільшення кількості червоних кров'яних тілець у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, кількості червоних кров'яних тілець у суб'єкта; спосіб збільшення середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта; спосіб збільшення середнього корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту заліза в сироватці у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, вмісту заліза в сироватці у суб'єкта; а також спосіб збільшення насичення трансферину у суб'єкта, у якого є дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує $HIF\alpha$, і збільшення, тим самим, насичення

трансферину у суб'єкта. У кожному з перерахованих способів у певних варіантах здійснення дефіцит заліза являє собою функціональний дефіцит заліза.

Крім перерахованого розглянуті наступні способи: спосіб збільшення числа ретикулоцитів у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, числа ретикулоцитів у суб'єкта; спосіб підвищення гематокриту у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і підвищення, тим самим, гематокриту у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту гемоглобіну у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і підвищення, тим самим, вмісту гемоглобіну у суб'єкта; спосіб збільшення кількості червоних кров'яних тілець у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, кількості червоних кров'яних тілець у суб'єкта; спосіб збільшення середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного об'єму у суб'єкта; спосіб збільшення середнього корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, середнього корпускулярного гемоглобіну у суб'єкта; спосіб підвищення вмісту заліза в сироватці у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, вмісту заліза в сироватці у суб'єкта; а також спосіб збільшення насичення трансферину у суб'єкта, у якого є функціональний дефіцит заліза, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, насичення трансферину у суб'єкта.

В одному з аспектів, винахід включає спосіб подолання або полегшення наслідків індукованого цитокінами погіршення еритропоезу у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, переборюючи або полегшуючи наслідки індукованого цитокінами погіршення еритропоезу у суб'єкта. У різних аспектах індуковане цитокінами погіршення еритропоезу являє собою інгібування вироблення ЕРО; або погіршення метаболізму заліза. У кожному з описаних вище способів цитокін являє собою запальний цитокін. У додаткових варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

Також представлені способи зменшення індукції цитокіном експресії VCAM-1 і/або Е-селектину, причому способи включають введення суб'єктові

за необхідності ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , знижуючи, таким чином, індукцію цитокіном експресії VCAM-1 і/або Е-селектину.

У кожному з описаних вище способів цитокін являє собою запальний цитокін. У додаткових варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

У даному винаході представлені способи лікування або профілактики розладів, пов'язаних з активністю цитокіну у суб'єкта, згідно з якими розлад вибраний із групи, що складається з дефіциту заліза, функціонального дефіциту заліза, залізо-дефіцитної анемії, анемії, викликаній хронічним захворюванням, і мікроцитарної анемії, причому способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , здійснюючи, тим самим, лікування або профілактику розладів, пов'язаних з активністю цитокіну. В кожному з описаних вище способів цитокін являє собою запальний цитокін. У додаткових варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

Також представлені способи лікування або профілактики розладів, пов'язаних з активністю цитокіну у суб'єкта, у яких розлад пов'язаний зі станом, вибраним із групи, що складається із запалення, інфекційного захворювання, імунодефіциту і неопластичного розладу, причому способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , здійснюючи, тим самим, лікування або профілактику розладів, пов'язаних з активністю цитокіну. У кожному з описаних вище способів цитокін являє собою запальний цитокін. У додаткових варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

В одному з аспектів винахід охоплює спосіб збільшення вироблення ЕРО в присутності цитокінів у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , і збільшення, тим самим, вироблення ЕРО у суб'єкта. Крім цього в даному винаході розроблений спосіб лікування або профілактики мікроцитозу у суб'єкта, причому спосіб включає введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α , тим самим, здійснюючи лікування або профілактику мікроцитозу у суб'єкта. У додаткових аспектах мікроцитоз пов'язаний з розладом, вибраним із групи, що складається із хронічного захворювання, анемії, викликаній хронічним захворюванням, дефіциту заліза, функціонального дефіциту заліза й анемії, викликаній дефіцитом заліза. У кожному з описаних вище способів цитокін являє собою запальний цитокін. У додаткових варіантах здійснення цитокін вибраний із групи, що складається з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

У кожному із представлених способів лікування або профілактики передбачається, що сполука за даним винаходом може вводитися як частина комбінованої терапії, що додатково включає введення іншого терапевтичного засобу, наприклад, ЕРО, заліза й вітамінів, наприклад, вітамінів групи В і т.д.

У даному винаході запропонований комплект, який включає сполуку, що стабілізує HIF α , і при-

наймні ще одну добавку. В одному з аспектів даним винаходом представлена добавка, вибрана із групи, що складається з еритропоетину, заліза й вітамінів групи В, а також фармацевтична композиція, що містить сполуку, що стабілізує HIF α , і принаймні одну добавку, вибрану із групи, що складається з еритропоетину, заліза й вітамінів групи В.

Даний винахід представляє сполуки й способи, призначені для лікування або профілактики анемії, викликані хронічними захворюваннями, причому анемія, викликана хронічними захворюваннями, пов'язана з підвищеними рівнями вмісту цитокінів. Зокрема, винахід належить до способів і сполук, призначених для подолання або ослаблення наслідків індукованих цитокінами ефектів у суб'єкта, у якого є підвищені рівні цитокінів, наприклад, для подолання або ослаблення інгібування вироблення ЕРО, пов'язаного із цитокінами, індукованої цитокінами експресії різних факторів неспецифічної адгезії клітин і т.п.

В одному з варіантів здійснення винахід представляє способи й сполуки, призначені для подолання інгібування вироблення ЕРО, пов'язаного із цитокінами. Ці способи й сполуки застосовні для подолання інгібування вироблення ЕРО, пов'язаного з TNF- α і/або IL-1 β , що виміряні, наприклад, за допомогою здатності переборювати інгібування вироблення ЕРО під дією TNF- α і/або IL-1 β у культивованих клітинах Нер3В.

В одному з варіантів здійснення винахід належить до способів і сполук, призначених для зменшення індукованого цитокінами збільшення експресії різних факторів неспецифічної адгезії клітин. Ці способи й сполуки можуть застосовуватися для подолання індукованого TNF- α , IL-1 β і IFN- γ росту експресії ендотеліальних факторів адгезії клітин, наприклад, VCAM-1 і Е-селектину, що встановлено, наприклад, при вимірюванні зменшення рівнів експресії VCAM-1 і Е-селектину в ендотеліальних клітинах (HUVEC і т.д.)

Винахід представляє способи й сполуки, призначені для лікування або профілактики дефіциту заліза у суб'єкта. Зокрема, представлені способи й сполуки можуть застосовуватися для поліпшення метаболізму заліза або для лікування й профілактики захворювань і розладів, пов'язаних з погіршеним метаболізмом заліза, наприклад, погіршеним поглинанням, накопиченням, процесингом, транспортом, мобілізацією й використанням заліза й т.д.

В одному з аспектів запропоновані способи й сполуки коректують експресію факторів, залучених у метаболізм заліза, наприклад, у процеси транспорту, використання, накопичення й т.д. Наприклад, дані способи й сполуки збільшують експресію рецептора трансферину, що визначено, наприклад, за допомогою вимірювання підвищеної експресії рецептора трансферину в клітинах печінки (наприклад, Нер3В, НерG2), клітинах нирок (наприклад, НК-2) або лімфоцитах (наприклад, ТНР-1), або за допомогою вимірювання підвищених рівнів розчинного рецептора трансферину у людей. Представлені способи й сполуки збільшують експресію гена церулоплазміну, що встановлено, наприклад, при вимірюванні збільшеної експресії гена в мишачих нирках і в клітинах Нер3В. В од-

ному з аспектів винахід належить до способів і сполук, які знижують експресію гена гепсидину в печінці мишей. У додатковому аспекті способи й сполуки за даним винаходом застосовуються для збільшення експресії факторів, що включають NRAMP2, дуоденальну цитохром b редуктазу 1 і т.д., що встановлено, наприклад, за допомогою вимірювання збільшеної експресії гена в кишечнику миші. Представлені способи й сполуки збільшують експресію 5-амінолевулінасинтази, тобто першого ферменту в шляху синтезу гемму, а також ферменту, що визначає швидкість синтезу гемму, що встановлено, наприклад, шляхом вимірювання зрослої експресії гена в кишечнику миші.

Представлені способи й сполуки можуть застосовуватися для поліпшення метаболізму заліза. Зокрема, представлені способи й сполуки поліпшують метаболізм заліза, що встановлено, наприклад, шляхом вимірювання збільшених рівнів вмісту заліза в сироватці, збільшеного процентного насичення трансферину й зменшеного мікроцитозу у щурячій моделі погіршеного метаболізму заліза.

Даний винахід представляє способи й сполуки, призначені для індукції посиленого еритропоєзу. Зокрема, представлені способи й сполуки підсилюють еритропоєз, що встановлено, наприклад, при вимірюванні росту кількості ретикулоцитів, гематокриту й кількості червоних кров'яних тілець у модельного щура з погіршеним еритропоєзом, а також у людей, або ж, що встановлено, наприклад, шляхом вимірювання підвищених рівнів гемоглобіну у щурячій моделі погіршеного еритропоєзу.

Представлені способи й сполуки знижують мікроцитоз, що встановлено, наприклад, при вимірюванні збільшених середніх корпускулярних рівнів гемоглобіну й збільшеного середнього корпускулярного об'єму у щурячій моделі погіршеного еритропоєзу.

Представлені способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α .

Подібна стабілізація може відбуватися за рахунок, наприклад, інгібування активності HIF-гідроксилази. Переважна сполука за даним винаходом являє собою сполуку, що інгібує активність HIF-пролілгідроксилази. Інгібування може бути прямим або непрямим, конкурентним або неконкурентним і т.д. У різних варіантах здійснення сполука за даним винаходом вибрана із групи, що складається з речовин, що імітують 2-оксоглутарат, сполук, що утворюють хелатні комплекси із залізом (хелаторів заліза) і аналогів проліну. В одному з аспектів сполука, що імітує 2-оксоглутарат, являє собою гетероциклічний карбонільмісний гліцин формул I, Ia або Ib. В іншому аспекті хелатор заліза являє собою гідроксамову кислоту формули III. В окремих втіленнях, як показано на прикладах у даній заявці, сполука являє собою сполуку D.

Типові сполуки за даним винаходом включають [(1-хлор-4-гідроксізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука А), [(4-гідрокси-7-феноксізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука В), [(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука С) і 3-[[4-(3,3-

дибензилуреїдо)-бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)-етил]-аміно)-N-гідроксипропіонамід (сполука D). Нижче розкриті додаткові сполуки за даним винаходом, а також способи ідентифікації додаткових сполук даного винаходу.

Фіг.1A і 1B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом переборюють інгібуючий вплив TNF- α на вироблення EPO.

Фіг.2A і 2B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом переборюють інгібуючий вплив TNF- α на вироблення EPO в клітинах, попередньо оброблених TNF- α .

Фіг.3A і 3B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом переборюють інгібуючий вплив IL-1 β на вироблення EPO.

Фіг.4A і 4B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом переборюють інгібуючий вплив IL-1 β на вироблення EPO в клітинах, попередньо оброблених IL-1 β .

Фіг.5 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом знижують експресію VCAM-1, пов'язану з TNF- α .

Фіг.6A, 6B і 6C представляють дані, які показують збільшену експресію рецептора трансферину й переносника заліза (Фіг.6A), кишкового білка, що переносить залізо (Фіг.6B) і 5-амінолевулінатсинтази (Фіг.6C), причому відзначені зміни виникають після впливу на мишу сполуками за даним винаходом.

Фіг.7 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують кількість ретикулоцитів у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.8 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують гематокрит у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.9 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують рівні гемоглобіну у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.10 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують кількість червоних кров'яних тілець у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.11 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом зменшують мікроцитоз у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.12 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують середній корпускулярний гемоглобін і виправляють гіпохромію у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.13 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують гематокрит у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг. 14 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують рівні гемоглобіну у нормальних тварин і у тва-

ринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.15 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують кількості червоних кров'яних тілець у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.16 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом поліпшують середній корпускулярний об'єм у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.17 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом поліпшують середні рівні корпускулярного гемоглобіну у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.18A і 18B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують рівні вмісту заліза в сироватці (Фіг.18A) і рівні насичення трансферину (Фіг.18B) у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.19 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом збільшують експресію гена NRAMP2 (s1c11a2) і спROUTину (CYBRD1, дуоденальної цитохром b редуктази 1) у нормальних тварин і у тваринній моделі з анемією, викликаною хронічним захворюванням.

Фіг.20 представляє дані, які показують збільшення числа ретикулоцитів після введення здоровим людям сполуки за даним винаходом.

Фіг.21 представляє дані, які показують збільшене число червоних кров'яних тілець у здорових людей, яким уведено сполуки за даним винаходом.

Фіг.22 представляє дані, які показують збільшення рівнів розчинного рецептора трансферину, що йде за введенням сполуки за даним винаходом здоровим людям.

Фіг.23 представляє дані, які показують зменшення рівнів вмісту феритину в сироватці здорових людей, яким уведено сполуки за даним винаходом.

Фіг.24A і 24B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом зменшують експресію VCAM-1 і E-селектину, пов'язану з TNF- α .

Фіг.25 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом зменшують експресію VCAM-1, пов'язану з TNF- α і IL-1 β .

Фіг.26 представляє дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом зменшують експресію E-селектину, пов'язану з TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

Фіг.27A і 27B представляють дані, які показують, що способи й сполуки за даним винаходом й IL-6 спільно збільшують рівні EPO в гепатоцитах.

Перед тим, як будуть описані композиції й способи за даним винаходом, варто зрозуміти, що винахід не обмежений описаними окремими методиками, описами експериментів, лініями клітин і реагентами, оскільки все це може змінюватися. Крім цього варто зрозуміти, що термінологія, використовувана в даній заявці, направлена на опис окремих варіантів здійснення даного винаходу і жодним чином не має на меті обмежити сферу дії

даного винаходу, що визначена в доданій формулі винаходу.

Варто помітити, що в рамках даної заявки й у доданій формулі винаходу форми однини належать також і до множини, якщо контекст явно не вказує на протилежне. Таким чином, наприклад, згадування про «фрагмент» ("a fragment") включає велику кількість таких фрагментів; згадування про «сполуку» ("a compound") являє собою згадування про одну або декілька сполук, а також про їх еквіваленти, відповідно до того, що описано в даній заявці, і думкою фахівців у даній галузі техніки, і т.д.

Якщо не зазначене інше, всі технічні й наукові терміни, використані в даному описі, мають ті значення, у яких вони, як правило, розуміються звичайним фахівцем у тій галузі техніки, до якої належить винахід. Хоча при практичному здійсненні або тестуванні даного винаходу можуть застосовуватися будь-які способи й речовини, аналогічні або еквівалентні описаним у даній заявці, переважні способи, прилади й речовини описані в тексті.

Всі публікації, які цитуються в даній заявці, включені в заявку у всій повноті за допомогою посилань, для цілей опису й розкриття методик, реагентів і інструментальних засобів, описаних у публікаціях, які могли б бути застосовані у зв'язку з даним винаходом. Ніщо в даній заявці не повинно бути зрозуміло як визнання того, що винахід не дає права датувати такі розкриття заднім числом на підставі попереднього винаходу.

Практичне втілення даного винаходу має на увазі, якщо не визначено інше, застосування звичайних методик хімії, біохімії, молекулярної біології, клітинної біології, генетики, імунології й фармакології, за участі фахівця в даній галузі техніки. Зазначені методики повністю роз'яснені в літературі. [Див., наприклад, Gennaro, A.R., ed. (1990) Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed., Mack Publishing Co.; Hardman, J.G., Limbird, L.E., and Oilman, A.G., eds. (2001) The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill Co.; Colowick, S. et al., eds., Methods In Enzymology, Academic Press, Inc.; Weir, D.M., and Blackwell, C.C., eds. (1986) Handbook of Experimental Immunology, Vols. I-IV, Blackwell Scientific Publications; Maniatis, T. et al., eds. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd edition, Vols. I-III, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel, F.M. et al., eds. (1999) Short Protocols in Molecular Biology, 4th edition, John Wiley & Sons; Ream et al., eds. (1998) Molecular Biology Techniques: An Intensive Laboratory Course, Academic Press; Newton, C.R., and Graham, A., eds. (1997) PCR (Introduction to Biotechniques Series), 2nd ed., Springer Verlag].

Визначення

Термін «анемія, викликана хронічним захворюванням», належить до будь-якої анемії, що розвивається в результаті, наприклад, тривалого інфекційного захворювання, запалення, неопластичного розладу й т.д. Анемія, що розвивається в таких ситуаціях, часто характеризується зменшеною тривалістю життя червоних кров'яних тілець і секвестрацією заліза в макрофагах, що призводить до зниження кількості заліза, доступного для створення нових червоних кров'яних ті-

лець. Стани, пов'язані з анемією, викликаною хронічним захворюванням, включають, не обмежуючись перерахунком, хронічний бактеріальний ендокардит, остеомієліт, ревматизм, виразковий коліт і неопластичні розлади. Додаткові стани включають інші захворювання й розлади, пов'язані з інфекційним захворюванням, запаленням і новоутвореннями, включаючи, наприклад, запальні інфекції (наприклад, легеневий абсцес, туберкульоз, остеомієліт і т.д.), неінфекційні запальні розлади (наприклад, ревматоїдний артрит, загальний вовчаковий еритремадоз, хвороба Крона, гепатит, запальні захворювання кишечника й т.д.), різні види раку, пухлин і злоякісних новоутворень (наприклад, карциному, саркому, лімфому й т.д.)

Терміни «розлади», «захворювання» і «стани» включені один до одного й належать до будь-якого стану, що відхиляється від нормального.

Термін «еритропоетин» належить до будь-якого рекомбінантного або існуючого у природі еритропоетину, включаючи, наприклад, людський еритропоетин (GenBank Accession No. AAA52400; Lin et al. (1985) Proc Natl Acad Sci USA 82:7580-7584), EPOETIN - рекомбінантний людський еритропоетин (Amgen Inc., Thousand Oaks CA), ARANESP - рекомбінантний людський еритропоетин (Amgen), PROCRT - рекомбінантний людський еритропоетин (Ortho Biotech Products, L.P., Raritan NJ), і т.д.

Термін «HIF α » належить до альфа-субодиниці білка фактора, індукованого гіпоксією. HIF α може бути будь-яким білком людини або іншого ссавця, або фрагментом цього білка, включаючи людські HIF-1 α (GenBank Accession No. Q16665), HIF-2 α (GenBank Accession No. AAB41495) і HIF-3 α (GenBank Accession No. AAD22668), мишачі HIF-1 α (GenBank Accession No. Q61221), HIF-2 α (GenBank Accession No. BAA20130 і AAB41496) і HIF-3 α (GenBank Accession No. AAC72734); щурячі HIF-1 α (GenBank Accession No. CAA70701), HIF-2 α (GenBank Accession No. CAB96612) і HIF-3 α (GenBank Accession No. CAB96611); і бичачий HIF-1 α (GenBank Accession No. BAA78675). HIF α також може бути білком тварин, які не належать до ссавців, або фрагментом такого білка, включаючи HIF-1 α *Xenopus laevis* (африканських шпорцевих жаб) (GenBank Accession No. CAB96628), HIF-1 α *Drosophila melanogaster* (GenBank Accession No. JC4851) і HIF-1 α курчати (GenBank Accession No. BAA34234). Послідовність гена HIF α також може бути одержана шляхом звичайних методик клонування, наприклад, при використанні повної послідовності гена HIF α або її частини, описаної вище, як зразок для відновлення й визначення послідовності гена HIF α в інших видів.

Фрагменти HIF α включають області, визначені людським HIF-1 α від амінокислоти 401 до 603 [Huang et al., вище], від 531 до 575 [Jiang et al. (1997) J Biol Chem 272:19253-19260], амінокислоти від 556 до 575 [Tanimoto et al., вище], амінокислоти від 557 до 571 [Srinivas et al. (1999) Biochem Biophys Res Commun 260:557-561] і амінокислоти з 556 по 575 [Ivan і Kaelin (2001) Science 292:464-468]. Далі, фрагмент HIF α включає будь-який із

фрагментів, у якому щонайменше один раз зустрічається послідовність LXXLAP, що має місце, наприклад, у нативній послідовності HIF α при L397TLLAP і L559EMLAP. Крім цього, фрагмент HIF α включає будь-який фрагмент, що зберігає, принаймні, одну з функціональних або структурних особливостей HIF α .

Терміни «HIF-пролілгідроксилаза» і «HIF PH» належать до будь-якого ферменту здатного гідроксильовати залишок проліну в білку HIF. Переважно залишок проліну, гідроксильований за допомогою HIF PH, включає пролін, що входить до складу фрагмента LXXLAP, що має місце, наприклад у нативній послідовності людського HIF-1 α при L₃₉₇TLLAP і L₅₅₉EMLAP. HIF PH включає члени сімейства генів Eg1-дев'ять (EGLN), які описані Тейлором (Taylor) [2001, Gene 275:125-132] і охарактеризовані Aravind і Koonin [2001, Genome Biol 2:RESEARCH0007], Epstein et al. [2001, Cell 107:43-54], а також Bruick і McKnight [2001, Science 294:1337-1340]. Приклади, ферментів, які проявляють активність HIF-пролілгідроксилази, включають людські SM-20 (EGLN1) (GenBank Accession No. AAG33965; Dupuy et al. (2000) Genomics 69:348-54), EGLN2 ізоформу 1 (GenBank Accession No. CAC42510; Taylor див. вище), EGLN2 ізоформу 2 (GenBank Accession No. NP_060025) і EGLN3 (GenBank Accession No. CAC42511; Taylor див. вище); мишачі EGLN1 (GenBank Accession No. CAC42515), EGLN2 (GenBank Accession No. CAC42511) і EGLN3 (SM-20) (GenBank Accession No. CAC42517); і щурячий SM-20 (GenBank Accession No. AAA19321). Додатково HIF PH можуть включати EGL-9 *Caenorhabditis elegans* (GenBank Accession No. AAD56365) і продукт гена CG1114 *Drosophila melanogaster* (GenBank Accession No. AAF52050). Крім цього HIF-пролілгідроксилаза включає будь-який із фрагментів згаданих вище повнорозмірних білків, який зберігає щонайменше одну структурну або функціональну особливість.

Термін «інгібітор пролілгідроксилази» або «PHI» у межах даного винаходу належить до будь-якої сполуки, що знижує або іншим чином коректує активність ферменту, гідроксильуючого амінокислотні залишки. Хоча ферментативна активність, що забезпечує гідроксильовання залишків проліну, є переважною, також розглядається гідроксильовання й інших амінокислотних залишків, включаючи, але не обмежуючись цим, гідроксильовання аргініну. Сполуки, які можуть бути застосовані в способах за даним винаходом, включають, наприклад, хелатори заліза, сполуки, що імітують 2-оксоглутарат, і модифіковані амінокислоти, наприклад, аналоги проліну.

В окремих варіантах здійснення даний винахід передбачає застосування сполук, що імітують структуру 2-оксоглутарату. Такі сполуки можуть конкурентно інгібувати активність членів сімейства ферментів 2-оксоглутаратдіоксигенази у відношенні 2-оксоглутарату й не конкурентно відносно заліза. [Majamaa et al. (1984) Eur J Biochem 138:239-245; і Majamaa et al. (1985) Biochem J 229:127-133]. PHIs, конкретно розглянуті для застосування в способах за даним винаходом, описані, наприклад, в [Majamaa et al., див. вище;

Kivirikko і Myllyharju (1998) Matrix Biol 16:357-368; Bickel et al. (1998) Hepatology 28:404-411; Friedman et al. (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:4736-4741; Franklin (1991) Biochem Soc Trans 190:812-815; Franklin et al. (2001) Biochem J 353:333-338; а також Міжнародні публікації №№ WO 03/053977 і WO 03/049686, причому кожне з джерел повністю включено у дану заявку]. Типові PHIs, що включають [(1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука А), [(4-гідрокси-7-феноксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука В), [(4-гідрокси-7-фенілсульфанілізохінолін-3-карбоніл)-аміно]оцтову кислоту (сполука С) і 3-[[4-(3,3-дибензилуреїдо)-бензолсульфоніл]-2-(4-метоксифеніл)-етил]-аміно]-N-гідроксипропіонамід (сполука D), використовуються у прикладах даного опису для демонстрації способів за описаним тут винаходом.

Даний винахід належить до способів і сполук, призначених для стимулювання посиленого або повного еритропоезу у суб'єкта. Зокрема, способи включають стимулювання поліпшеного або повного еритропоезу шляхом стабілізації HIF α у суб'єкта. Зокрема розглянуті способи індукції посиленого еритропоезу за рахунок інгібування HIF-пролілгідроксилази. У конкретних варіантах здійснення способи включають введення суб'єктові сполуки за даним винаходом. У різних варіантах здійснення, суб'єкт може являти собою клітину, тканину, орган, систему органів або організм у цілому.

Анемія, викликана хронічним захворюванням, являє собою найбільш звичайну форму анемії у пацієнтів, поміщених у лікарню. Анемія, викликана хронічним захворюванням, зустрічається у пацієнтів із запальними розладами або злоякісними захворюваннями, включаючи запальні інфекційні захворювання (наприклад, легеневий абсцес, туберкульоз, остеомієліт і т.д.), неінфекційні запальні розлади (наприклад, ревматоїдний артрит, загальний вовчаковий еритрематоз, хвороба Крона, гепатит, запальні захворювання кишечника й т.д.), різні види раку, пухлин і злоякісних новоутворень (наприклад, карциному, саркому, лімфому і т.д.), хронічний бактеріальний ендокардит, остеомієліт, ревматизм, виразковий коліт і неопластичні розлади.

В одному з аспектів винахід представляє способи, призначені для індукції посиленого або повного еритропоезу з метою лікування анемії, викликаної хронічним захворюванням. Анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана із численними розладами хронічного характеру, включаючи, наприклад, ревматоїдний артрит, ревматизм, запальні захворювання кишечника, виразковий коліт, загальний вовчаковий еритрематоз, васкуліт, неопластичні розлади і т.д., а також хронічні інфекційні захворювання й хронічні запалення. Причиною зниження еритропоезу або неефективного еритропоезу можуть бути різні метаболічні аномалії в шляхах еритропоезу, що включають, наприклад, інгібування вироблення ЕРО, зменшену реактивність ЕРО в кістковому мозку, а також аномальний процесинг заліза, що включає, напри-

клад, аномальне або неефективне поглинання, мобілізацію, накопичення й абсорбцію заліза.

Фізіологічною особливістю розладів, які пов'язані з анемією, викликану хронічним захворюванням, є підвищене вироблення запальних цитокінів [Means (1995) *Stem Cells* 13:32-37 і Means (1999) *Int J Hematol* 70:7-12], включаючи, наприклад, фактор некрозу пухлин α (TNF- α), інтерлейкин-1 β (IL-1 β) і інтерферон γ (IFN- γ), які впливають на здатність опосередковувати вироблення ЕРО, на реактивність ЕРО й на узгоджене регулювання метаболізму заліза. [Див., наприклад, Roodman et al. (1989) *Adv Exp Med Biol* 271:185-196; Fuchs et al. (1991) *Eur J Hematol* 46:65-70; Jelkmann et al. (1991) *Ann NY Acad Sci* 718:300-311; Vannucchi et al. (1994) *Br J Hematol* 87:18-23; і Oldenburg et al. (2001) *Aliment Pharmacol Ther* 15:429-438]. Даний винахід представляє способи поліпшення метаболічних і фізіологічних шляхів, пов'язаних з виробленням ЕРО, передачею сигналів ЕРО й використанням заліза, причому згадане поліпшення приводить до повного або поліпшеного еритропоезу, а також до ослаблення або поліпшення перебігу анемії, викликану хронічним захворюванням.

Даний винахід забезпечує різні переваги перед існуючими способами лікування анемії, викликану хронічним захворюванням, наприклад, такими як введення рекомбінантного ЕРО. Зниження вироблення ЕРО є тільки одним з аспектів ослабленого еритропоезу й очевидно, що введення рекомбінантного ЕРО не направлене проти інших недоліків, пов'язаних з ослабленим еритропоезом, які є у пацієнтів з анемією, викликану хронічним захворюванням. [Див. наприклад, Clibon et al. (1990) *Exp Hematol* 18:438-441, а також Macdougall і Cooper (2002) *Nephrol Dial Transplant* 17 (11):39-43]. Зазначені недоліки включають, наприклад, знижену реактивність ЕРО кісткового мозку, а також численні аспекти метаболізму заліза, які роблять внесок у повний або цілковитий еритропоез, включаючи абсорбцію заліза з кишечника, транспорт через кишечник, окиснення заліза в тривалентний стан гефестином або церулоплазміном, зв'язування й поглинання заліза трансферином або рецептором трансферину, а також транспорт заліза в кістковий мозок, де відбувається використання заліза, включаючи синтез гему. Багато пацієнтів, у яких знижена або відсутня реакція на введення рекомбінантного ЕРО, навіть при застосуванні високих доз останнього, не піддаються лікуванню введенням рекомбінантного ЕРО за описаними вище причинами.

Переважаючі запальні цитокіни при анемії, викликану хронічним захворюванням, веде, наприклад, до знижених рівнів заліза в сироватці й збільшеного накопичення заліза, переважно в макрофагах, тобто в клітинних компартментах, важкодоступних для еритроїдних попередників, що з'являються яким потрібне залізо для нормального синтезу гему. Винахід представляє способи для поліпшення метаболічних шляхів, які роблять внесок у повний і цілковитий еритропоез. В одному з варіантів здійснення, терапевтичний засіб уводять у сполученні з добавками, які додатково підсилюють його ефективність, наприклад, залізом і вітамінами групи В.

Анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана з підвищеними рівнями феритину. Незважаючи на високі рівні феритину, суб'єкти з анемією, викликану хронічним захворюванням, не здатні ефективно використати залізо. Високі рівні феритину вказують на знижене повторне повернення заліза в кістковий мозок і поліпшене накопичення заліза, тобто на функціональний дефіцит заліза, що часто пов'язаний з анемією, викликану хронічним захворюванням, і псевдозапальним станом, що часто зустрічається у пацієнтів з уремичним захворюванням нирок хронічного характеру. Знижуючи рівні феритину, способи й сполуки за даним винаходом зменшують кількість накопиченого заліза й збільшують повторне використання заліза за допомогою трансферину й рецептора трансферину. Знижені рівні феритину в сироватці могли б служити показником поліпшеного використання заліза й поліпшеного повторного надходження заліза в кістковий мозок, і, отже, збільшеної доступності заліза для вироблення гему й еритропоезу.

Геномний відгук на гіпоксію включає зміни в експресії генів і клітинної фізіології з метою ослаблення гострого й хронічного впливу відсутності кисню. Індукований при гіпоксії фактор (HIF) являє собою транскрипційний фактор, що складається з регульованої киснем альфа-субодиниці (HIF α) і конститутивно експресованої бета-субодиниці (HIF β). HIF α дестабілізується в середовищі з нормальним вмістом кисню через гідроксилювання певних залишків проліну HIF-специфічними пролілгідроксилазами (HIF-PHs). Однак коли кількість кисню стає обмежуючою, наприклад, у гіпоксичному навколишньому середовищі, HIF-PH не може гідроксилювати HIF α , альфа-субодиниця не розпадається, і активні HIF-комплекси утворюються, переносяться на ядро й активують транскрипцію гена.

У певних аспектах даний винахід представляє способи лікування анемії, викликану хронічним захворюванням, завдяки гіпоксії, що імітується фармацевтичним шляхом. У певних аспектах способи за даним винаходом поліпшують вироблення ЕРО способом, що стійкий до інгібуючого впливу запальних цитокінів. Вироблення ЕРО, як правило, індукується гіпоксією або низьким рівнем кисню, але експресія й секреція залишаються зниженими в присутності запальних цитокінів, таких як TNF- α , IL-1 β і IFN- γ , які переважають у пацієнтів із хронічними захворюваннями. [Див., наприклад, Means (1995) *Stem Cells* 13:32-37; Means (1999) *Int J Hematol* 70:7-12; Roodman et al. (1989) *Adv Exp Med Biol* 271:185-196; Fuchs et al. (1991) *Eur J Hematol* 46:65-70; Jelkmann et al. (1991) *Ann NY Acad Sci* 718:300-311; і Vannucchi et al. (1994) *Br J Hematol* 87:18-23]. Інгібітори пролілгідроксилази, принаймні частково, переборюють інгібуючий вплив запальних цитокінів на вироблення ЕРО, що доведено здатністю клітин Нер3В секретувати ЕРО аж до рівнів, що перевершують ті, які спостерігалися в присутності запальних цитокінів (Див. наприклад, Фіг. 1А, 1В, 2А, 2В, 3А, 3В, 4А і 4В). Такі засоби, як хелатори заліза й десферіоксамін, також продемонстрували певну ефективність у дослідженнях еритропоетинстійкої анемії, наприклад,

анемії, викликані хронічним захворюванням. [Див., наприклад, Salvarani et al. (1996) *Rheumatol Int* 16:45-48 і Goch et al. (1995) *Eur J Hematol* 55:73-77].

В інших аспектах, даний винахід належить до способів поліпшення передачі сигналів рецептора EPO в присутності запальних цитокінів. Переважання запальних цитокінів у пацієнтів із хронічними захворюваннями призводить до зменшення ефективності передачі сигналів EPO, що очевидно з нездатності багатьох пацієнтів реагувати покращенням еритропоезу на введення рекомбінантного EPO. Як вважають, такий результат є наслідком зменшеної чутливості до біологічної активності EPO, а також недоліків у будові кісткового мозку й/або мікросередовища [Див., наприклад, Clibon et al. (1990) *Exp Hematol* 18:438-441, а також Macdougall і Cooper (2002) *Nephrol Dial Transplant* 17 (11):39-43]. У певних варіантах здійснення, даний винахід представляє способи стимулювання цілкового й повного еритропоезу за рахунок відновлення чутливості відповідних клітин до сигнальної трансдукції через рецептор EPO.

Дефіцит заліза являє собою один з найбільш звичайних дефіцитів харчування в усьому світі і є важливою причиною анемії у світовому масштабі. З фундаментальної точки зору баланс заліза регулюється швидкістю еритропоезу й кількістю накопиченого заліза. Дефіцит заліза може спостерігатися в сполученні з анемією або без неї, причому він пов'язаний з погіршеним розвитком пізнавальних здатностей.

Під дефіцитом заліза розуміють неадекватне постачання залізом (рівні або накопичення) або ж неадекватну доступність або використання заліза в організмі. Це може відбуватися через недостатність харчування, наприклад, внаслідок нестачі заліза в раціоні; через недостатню абсорбцію заліза внаслідок, наприклад, хірургічного втручання (після гастректомії) або захворювання (хвороба Крона); або ж через виснаження надходження заліза або збільшених втрат заліза внаслідок хронічної або гострої втрати крові від ушкодження або травми, менструації, донорства крові, флеботомії (а також через різні процедури або хірургічне втручання); через збільшену потребу в залізі, наприклад, внаслідок швидкого росту в дитинстві або підлітковому віці, вагітності, еритропоетинової терапії й т.д.

Крім цього дефіцит заліза може являти собою функціональний дефіцит заліза, наприклад, дефіцит заліза, який відрізняється, тим, що суб'єкт має знижений доступ до запасів заліза й знижену здатність їх використання. Залізо не доступно зі швидкістю, достатньою для нормального насичення еритроцитів гемоглобіном, що веде до зменшеного клітинного вмісту гемоглобіну в ретикулоцитах і еритроцитах.

Функціональний дефіцит заліза часто спостерігається у здорових людей з явно нормальними або навіть підвищеним запасами заліза, але з погіршеною доступністю заліза, що визначено, наприклад, вимірюванням низьких рівнів процентного насичення трансферину. Даний тип дефіциту заліза часто пов'язаний з гострим або хронічним запаленням.

Дефіцит заліза будь-якого виду може вести до залізодефіцитного еритропоезу або еритропоезу при обмеженому вмісті заліза, при яких зменшується число червоних кров'яних тілець, циркулюючі червоні кров'яні тілця менше нормальних (мікроцитарні) і містять недостатню кількість нормального гемоглобіну, у результаті чого мають бліді кольори (гіпохромні).

У суб'єктів з дефіцитом заліза, включаючи функціональний дефіцит заліза, може розвиватися погіршений синтез гемоглобіну, знижений відсоток насичення трансферину, знижені рівні гемоглобіну й гематокриту, що призводять до залізодефіцитної анемії. Залізодефіцитна анемія є найбільш звичайним різновидом анемії у світі. Залізо являє собою найважливіший компонент гемоглобіну; під час відсутності заліза кістковий мозок не здатний ефективно виробляти гемоглобін. Залізодефіцитна анемія може спостерігатися у суб'єктів з виснаженим або погіршеним надходженням заліза або ж у суб'єктів, що мають функціональний дефіцит заліза, коли присутні запаси заліза, але вони недоступні, наприклад, для вироблення гемоглобіну.

Метаболізм заліза в основному охоплює процеси, за допомогою яких клітина, тканина, орган, система органів або весь організм підтримують гомеостаз заліза шляхом зміни, наприклад збільшення або скорочення специфічних процесів метаболізму заліза. Метаболізм заліза або процеси метаболізму заліза охоплюють процеси, що включають процесинг, транспорт, поглинання, використання, накопичення, мобілізацію, абсорбцію заліза й т.д. Конкретні аспекти метаболізму й процесингу заліза включають експресію транспортерів заліза й ферментів, які полегшують переміщення заліза через клітинні мембрани й утримання або виділення заліза клітиною; зміна в експресії білків, залучених у транспорт заліза в кров; зміна в експресії трансферину й рецепторів трансферину; зміна в експресії й/або активності білків, залучених в абсорбцію заліза; зміна в експресії й/або активності транскрипційних або трансляційних регуляторних білків, пов'язаних із залізом; а також зміна розподілу заліза в рідинах організму або культуральних рідинах, включаючи, наприклад, інтерстиціальні (тобто позаклітинні), внутрішньоклітинні, кров, кістковий мозок і т.п.

У певних аспектах даний винахід належить до способів поліпшення поглинання, транспорту, процесингу й використання заліза. Анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана з недоліками у використанні заліза, які негативно впливають на синтез гему й утворення гемоглобіну, призводячи до зниженого еритропоезу. [Див., наприклад, Oldenburg et al. (2001) *Aliment Pharmacol Ther* 15:429-438]. Знижені рівні заліза в сироватці, мобілізація заліза, а також будь-яке пов'язане із цим збільшення накопичення заліза у пацієнтів із хронічними захворюваннями можуть належати до механізмів мікробного захисту макрофага в умовах тривалого запалення. [Див. Fuchs et al. (1991) *Eur J Hematol* 46:65-70]. У деяких аспектах даний винахід представляє способи збільшення ефективного метаболізму заліза шляхом стабілізації HIF α .

Багато білків опосередковують метаболізм заліза, включаючи такі білки, як синтаза 5-

амінолевулінової кислоти еритроїду (ALAS) (перша й швидкість визначальна стадія в синтезі гему) [Bottomley i Muller-Eberhard (1988) *Semin Hematol* 25:282-302, а також Yin et al. (1998) *Blood, Cells, Molecules, and Diseases* 24 (3):41-533], трансферин, рецептор трансферину, транспортери заліза (залучені у транспорт заліза), церулоплазмін і т.д. Збільшення експресії трансферину й рецептора трансферину стимулює поглинання заліза еритроїдними попередниками, а також сприяє поглинанню заліза макрофагами й транспорту до кісткового мозку [Goswami et al. (2002) *Biochem Cell Biol* 80:679-689]. Церулоплазмін збільшує окиснення двовалентного заліза в тривалентне, внаслідок чого здійснюється зв'язування із трансферином. [Goswami et al. (2002) *Biochem Cell Biol* 80:679-689]. У певних аспектах способи за даним винаходом збільшують метаболізм заліза шляхом збільшення експресії або активності білків, залучених у метаболізм заліза, включаючи 5-амінолевулінатсинтазу еритроїду, трансферин, рецептор трансферину, NRAMP2, спрутин (дуоденальну цитохром b редуктазу 1) і церулоплазмін. В інших аспектах способи за даним винаходом збільшують метаболізм заліза за рахунок зменшення експресії або активності гепсидину або за рахунок коректування експресії феритину.

В одному з варіантів здійснення, винахід належить до способів і сполук, призначених для збільшення експресії генів, продукти яких залучені в метаболізм і процесинг заліза, включаючи поглинання, накопичення, транспорт, абсорбцію заліза й т.д. Такі гени включають, не обмежуючись перерахованим, гени рецептора трансферину, церулоплазмину, NRAMP-2, 5-амінолевулінатсинтази, спрутину (CYBRD1) і т.д. Терапевтична регуляція, направлена на підвищення експресії генів, включених у метаболізм і процесинг заліза, ефективно збільшує доступність заліза й, за рахунок цього, здійснює благотворний вплив на пацієнтів з анемією, викликаною хронічними захворюваннями, анемією, пов'язаною з дефіцитом заліза, функціональним дефіцитом заліза й т.д. В іншому варіанті здійснення винахід представляє способи й сполуки, призначені для зниження експресії гепсидину, тобто білка, пов'язаного з регуляцією заліза.

Належний метаболізм заліза частково регулюється залізо-регуляторними білками (IRPs), які зв'язуються з елементами, чутливими до заліза (IREs), виявленими в 5' і/або 3' UTRs (нетрансльованих областей) мРНК, які кодують, наприклад, феритин (накопичення заліза), мітохондріальну аконітазу (енергетичний обмін), еритроїд-амінолевулінатсинтазу й рецептор трансферину. Зв'язування IRP з 5'IRE, що має місце, наприклад, у транскрипті феритину, інгібує трансляцію мРНК, у той час як зв'язування з 3'IRE, що має місце, наприклад, у транскрипті трансферину, захищає мРНК від руйнування. IRP-2 конститутивно виробляється в клітинах, але в умовах надлишку заліза розпадається, і, отже, інактивується. Проте, IRP-2 зберігає стабільність в умовах нестачі заліза й/або в умовах гіпоксії. [Hanson et al. (1999) *J Biol Chem* 274:5047-5052]. Оскільки IRP-2 зменшує експресію феритину, що відповідає за довгострокове накопичення заліза, і збільшує експресію трансферину й

рецептора трансферину, то IRP-2 полегшує поглинання, транспорт і використання заліза, поліпшуючи, таким чином, еритропоез [Klausner et al. (1993) *Cell* 72:19-28]. Останнім часом були описані IREs в інших генах, які також необхідні для еритропоезу, включаючи 5-амінолевулінатсинтазу, транспортер заліза NRAMP2 (крім цього відомий як S1c11a2, DCT1, DMT1, mk (локус гена мікроцитарної анемії в мишей)), а також транспортер заліза, що опосередковує абсорбцію заліза з харчових джерел у дванадцятипалій кишці [Haie (1999) *Am J Med Sci* 318:230-240 і GunShin et al. (2001) *FEBS Lett* 509:309-316].

Способи за даним винаходом, за допомогою імітації умов гіпоксії, потенційно стабілізують IRP-2 на додаток до HIF α , забезпечуючи, таким чином, синергічний ефект, що охоплює як ендогенне вироблення ЕРО, так і поліпшення поглинання, транспорту й використання заліза при виробленні функціональних еритроцитів.

Серед дорослого населення поглинання заліза, що надходить із їжею, становить у середньому, приблизно 6% для чоловіків і 13% для не вагітних жінок. NRAMP2 (також відомий як DMT1, DCT1, S1c11a2) являє собою повсюдно експресований транспортер двовалентних металів, залучений в трансмембранний транспорт заліза, яке не пов'язане із трансферином. NRAMP2 являє собою транспортує залізо білок, пов'язаний із транспортом заліза зі шлунково-кишкової порожнини в ентероцити дванадцятипалої кишки й з ендосом еритробластів у цитоплазму. У тварин, що перенесли харчове, залізодефіцитне голодування, різко зросла експресія NRAMP2 (S1c11a2) у верхівковій частині ентероцитів ворсинкового усмоктувального епітелію проксимальної частини дванадцятипалої кишки. [Див., наприклад, Cannone-Hergaux et al. (1999) *Blood* 93:4406-4417]. Генетичні моделі гризунів зв'язували ці гени з різними видами анемії, які викликані дефіцитом заліза, включаючи гіпохромну й мікроцитарну анемію мишей (мишей mk), у яких був мутований ген NRAMP2. Миші МК демонстрували серйозні порушення в абсорбції заліза й використанні еритроїдного заліза.

У певних аспектах, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення абсорбції заліза з харчових джерел. Даний винахід належить до способів і сполук, призначених для збільшення експресії генів, пов'язаних із транспортом і абсорбцією заліза. Зокрема, сполуки за даним винаходом є ефективними при збільшенні експресії NRAMP2 у кишечнику. Збільшена експресія NRAMP2 (S1c11a2) була б бажана для збільшення абсорбції заліза, наприклад, харчового заліза, з кишечнику.

Даний винахід додатково представляє дані, які показують збільшення експресії гена спрутину в кишечнику тварин, які зазнали впливу сполукою за даним винаходом. Спрутин, тобто кишкова редуктаза заліза, відома також як Dcytb і Cybrd1 (CYBRD1, дуоденальна цитохром b редуктаза 1), являє собою редуктазу тривалентного заліза, причому вона каталізує відновлення позаклітинних іонів тривалентного заліза в іони двовалентного заліза, які пов'язані з абсорбцією заліза. Спрутин експресується разом з NRAMP2 у тварин, що за-

знають гострої нестачі заліза, у верхній області ворсинок дванадцятипалої кишки [Див., наприклад, McKie et al. (2001) *Science* 291:1755-1759].

Способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення експресії гена церулоплазміну. Церулоплазмін, відомий також як фероксидаз-1, перетворює відновлене залізо, виділене з місць накопичення (таких як феритин), в окиснену форму. Окиснене залізо здатне зв'язуватися з його транспортним білком плазми, тобто трансферином. Недолік церулоплазміну пов'язаний з акумулюванням заліза в печінці й інших тканинах. Існують дані, які показують, що церулоплазмін сприяє відтоку заліза з печінки й припливу заліза в залізодефіцитні клітки [Див., наприклад, Tran et al. (2002) *J Nutr* 132:351-356].

Сполуки за даним винаходом зменшують експресію мРНК гепсидину в печінці мишей. Запалення призводить до вироблення IL-1 β , що діє на гепатоцити, щоб викликати виділення гепсидину. Гепсидин інгібує виділення заліза макрофагами й абсорбцію заліза в кишечнику, зменшуючи доступність заліза й викликаючи, наприклад, гіпоферемію (зниження вмісту заліза у крові). Зменшена експресія гепсидину пов'язана зі збільшеним виділенням заліза з ретикулоендотеліальних клітин і збільшеною абсорбцією заліза в кишечнику. Отже, способи й сполуки за даним винаходом придатні для зменшення експресії гепсидину, збільшення абсорбції заліза в кишечнику й зниження гіпоферемії.

Особливо розглянуті способи лікування анемії, пов'язаної з інфекцією вірусу гепатиту С (HCV). Наявні в цей час способи лікування HCV-інфекції включають поєднання інтерферону- α й рибавіріну. Ця комбінована терапія пов'язана зі зменшенням концентрації гемоглобіну й анемією. В одному з аспектів способи й сполуки за даним винаходом розроблені для лікування анемії, пов'язаної з HCV-інфекцією. В іншому аспекті представлені способи й сполуки, призначені для лікування анемії, пов'язаної з інтерферон- α терапією при HCV-інфекції. В іншому аспекті, даний винахід належить до сполук і способів, придатних для лікування анемії, пов'язаної з рибавіриною терапією при HCV-інфекції.

Крім цього розглянуті способи збільшення вироблення факторів, необхідних для диференціювання еритроцитів, від гематопоетичних клітин-попередників, включаючи, наприклад, гематопоетичні стовбурні клітини (HSCs), клітини CFU-GEMM (колонієутворюючі гранулоцит/еритроїд/моноцит/мегакаріоцит), і т.д. Фактори, які стимулюють еритропоез, включають, не обмежуючись ним, еритропоетин. В іншому аспекті способи збільшують вироблення факторів, необхідних для поглинання, транспорту й використання заліза. Такі фактори включають, не обмежуючись перерахованим, еритроїд-амінолевулінатсинтазу, трансферин, рецептор трансферину, церулоплазмін, феритин і т.д. У ще одному аспекті спосіб збільшує вироблення факторів, необхідних для диференціювання еритроцитів і, крім цього, факторів, необхідних для поглинання, транспорту й використання заліза.

Також розглянуті способи поліпшення реактивності гематопоетичних попередників еритропое-

тину. Як було зазначено вище, ці попередники включають HSCs, CFU-GEMMs і т.д. Реактивність клітин-попередників може бути збільшена за рахунок, наприклад, зміни експресії рецепторів еритропоетину, внутрішньоклітинних факторів, залучених у передачу сигналів еритропоетину й секретованих факторів, які полегшують взаємодію еритропоетину з рецепторами. Даний винахід належить до способів поліпшення реактивності ЕРО кісткового мозку, наприклад, за рахунок збільшення експресії рецептора ЕРО.

Способи

У даному винаході розроблені різні способи. В одному з аспектів, способи включають введення суб'єктові засобу, що стабілізує HIF α .

Стабілізація HIF α може здійснюватися кожним зі способів, доступних і відомих фахівцеві в даній галузі техніки, і може включати застосування будь-якого засобу, що взаємодіє з HIF α , зв'язується з HIF α або змінює HIF α , або факторів, які взаємодіють із HIF α , включаючи, наприклад, ферменти, для яких HIF α є субстратом. У певних аспектах даний винахід розглядає застосування конститутивно стабільного варіанта HIF α , наприклад, стабільних мутантів HIF і т.д., або полінуклеотиду, що кодує такий варіант [див., наприклад, Патенти США №№ 6562799 і 6124131 і патент США №6432927]. В інших аспектах даний винахід передбачає, що стабілізація HIF α включає введення засобу, що стабілізує HIF α . Цей засіб може складатися з полінуклеотидів, наприклад, антисмислових послідовностей [див., наприклад, міжнародну публікацію №WO03/045440]; поліпептидів; антитіл; інших білків; вуглеводів; жирів; ліпідів; а також органічних і неорганічних речовин, наприклад, невеликих молекул, і т.д. У кращому варіанті здійснення даний винахід передбачає стабілізацію HIF α , наприклад, у суб'єкта, введенням суб'єктові засобу, що стабілізує HIF α , причому засіб являє собою сполуку, наприклад сполуку з невеликою молекулою й т.д., що стабілізує HIF α .

В інших варіантах здійснення способи за даним винаходом включають стабілізацію HIF α за рахунок інгібування активності щонайменше одного з ферментів, вибраного із сімейства 2-оксоглутаратдіоксигеназ. У переважному втіленні фермент являє собою фермент із числа HIF-гідроксилаз, наприклад, EGLN-1, EGLN-2, EGLN-3 і т.д. [Див., наприклад, Taylor (2001) *Gene* 275:125-132; Epstein et al. (2001) *Cell* 107:43-54; а також Bruick і McKnight (2001) *Science* 294:1337-1340]. Однак конкретно передбачається, що фермент є будь-яким ферментом, вибраним із сімейства ферментів 2-оксоглутаратдіоксигенази, включаючи, наприклад, проколагенлізильдігдроксилазу, проколагенпроліл 3-гідроксилазу, проколагенпроліл 4-гідроксилазу α (I) і α (II), тимін 7-гідроксилазу, аспартил(аспарагініл) β -гідроксилазу, ϵ -N-триметиллізин гідроксилазу й γ -бутиробетайнігдроксилазу й т.д. [Див., наприклад Majamaa et al. (1985) *Biochem J* 229:127-133; Mullyharju і Kivirikko (1997) *EMBO J* 16:1173-1180; Thomburg et al. (1993) 32:14023-14033; а також Jia et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7227-7231].

У певних варіантах здійснення способи включають лікування анемії, викликаній хронічним захворюванням, або регулювання метаболізму заліза введенням суб'єктові ефективної кількості засоби, що стабілізує HIF α . У кращих варіантах здійснення засіб являє собою сполуку за даним винаходом. В одному з аспектів сполука стабілізує HIF α за рахунок інгібування гідроксилювання певних залишків HIF α , наприклад, залишків проліну, залишків аспарагіну, і т.д. У кращому варіанті здійснення залишки являють собою залишки проліну. У конкретних варіантах здійснення залишки можуть являти собою: залишок P₅₆₄ в HIF-1 α або гомологічний пролін в іншій ізоформі HIF α , або залишок P₄₀₂ в HIF-1 α або гомологічний пролін в іншій ізоформі HIF α і т.д. В інших варіантах здійснення представлені способи можуть охоплювати інгібування гідроксилювання аспарагінових залишків HIF α , наприклад, залишку N₆₀₃ в HIF-1 α або гомологічного аспарагінового залишку в іншій ізоформі HIF α .

Сполуки

У переважних варіантах здійснення представлені способи включають введення суб'єктові ефективної кількості сполуки, що стабілізує HIF α . Типові сполуки розкриті, наприклад, у [Міжнародній публікації № WO 03/049686 і Міжнародній публікації № WO 03/053997, які у всій повноті включені в дану заявку]. Конкретно, сполуки за даним винаходом, включають наступні сполуки.

У певних варіантах здійснення; сполука за даним винаходом є сполукою, що інгібує активність HIF-гідроксилаз. У різних варіантах здійснення ця активність виникає завдяки HIF-пролілгідроксилазам, таким як, наприклад, EGLN1, EGLN2 або EGLN3 і т.д. В інших варіантах здійснення, активність виникає завдяки HIF-аспарагінілгідроксилазі, наприклад, такий як FIH, не обмежуючись лише даним прикладом. Переважна сполука за даним винаходом являє собою сполуку, що інгібує активність HIF-пролілгідроксилази. Інгібування може бути прямим або опосередкованим, конкурентним або неконкурентним і т.д.

В одному з аспектів, сполука за даним винаходом являє собою будь-яку сполуку, що інгібує або іншим чином коректує активність ферментів сімейства 2-оксоглутаратдіоксигенази. Ферменти сімейства 2-оксоглутаратдіоксигенази включають, не обмежуючись зазначеним прикладом, ферменти сімейства гідроксилаз. Ферменти сімейства гідроксилаз гідроксильють залишки, що входять до складу цільового субстрату, і в їх число входять, наприклад, проліл-, лізил-, аспарагініл- (аспарагіл, аспартил) гідроксилази й т.д. Гідроксилази часто характеризують по цільовому субстрату, наприклад, HIF-гідроксилази, проколагенгідроксилази й т.д., і/або по цільовому залишку в субстраті, наприклад, пролілгідроксилази, лізилгідроксилази й т.д., або ж по обом зазначеним ознакам, наприклад, HIF-пролілгідроксилази, проколагенпролілгідроксилази й т.д. Представники сімейства ферментів 2-оксоглутаратдіоксигенази включають, не обмежуючись перерахованим, HIF-гідроксилази, включаючи HIF-пролілгідроксилази, наприклад, EGLN1, EGLN2 і EGLN3, HIF-

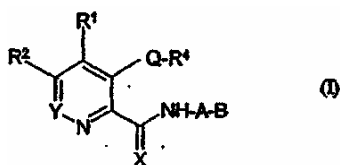
аспарагінілгідроксилази, наприклад, фактор, інгібуючий HIF(FIH) і т.д.; проколагенгідроксилази, наприклад, проколагенлізілгідроксилази, проколагенпролілгідроксилази, наприклад проколагенпроліл 3-гідроксилазу, проколагенпроліл 4-гідроксилазу α (I) і α (II) і т.д.; тимін 7-гідроксилазу; аспартил(аспарагініл) β -гідроксилазу; ϵ -N-триметиллізингідроксилазу; γ -бутиробетаїнгідроксилазу й т.д. Хоча ферментативна активність може включати будь-яку активність, пов'язану з будь-якою 2-оксоглутаратдіоксигеназою, конкретно розглядається гідроксилювання амінокислотних залишків у субстраті. Хоча конкретно включено гідроксилювання залишків проліну й/або аспарагіну в субстраті, крім цього передбачається гідроксилювання інших амінокислот.

В одному з аспектів сполука за даним винаходом, яка проявляє інгібіторну активність у відношенні одного або декількох ферментів із сімейства 2-оксоглутаратдіоксигеназ, може також демонструвати інгібіторну активність у відношенні ще одного або декількох ферментів з того ж сімейства, наприклад, сполука, яка інгібує активність HIF-гідроксилази, може додатково інгібувати активність колагенпролілгідроксилази, а сполука, що інгібує активність HIF-пролілгідроксилази може додатково інгібувати активність HIF-аспарагінілгідроксилази й т.д.

Оскільки HIF α модифікується за рахунок гідроксилювання проліну, тобто реакції, що вимагає наявності кисню й Fe²⁺, даний винахід в одному з аспектів передбачає, що фермент, відповідальний за гідроксилювання HIF α входить у сімейство 2-оксоглутаратдіоксигенази. Такі ферменти включають, не обмежуючись перерахованим, проколагенлізілгідроксилазу, проколагенпроліл 3-гідроксилазу, проколагенпроліл 4-гідроксилазу α (I) і α (II), тимін 7-гідроксилазу, аспартил(аспарагініл) β -гідроксилазу, ϵ -N-триметиллізингідроксилазу й γ -бутиробетаїнгідроксилазу й т.д. Для виявлення гідроксилазної активності перерахованих ферментів їм потрібен кисень, Fe²⁺, 2-оксоглутарат і аскорбінова кислота. [Див., наприклад Majamaa et al. (1985) *Biochem J* 229:127-133; Mullyharju і Kivirikko (1997) *EMBO J* 16:1173-1180; Thornburg et al. (1993) 32:14023-14033; а також Jia et al. (1994) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:7227-7231].

В одному з аспектів сполука за даним винаходом являє собою сполуку, що стабілізує HIF α . Переважно, сполука стабілізує HIF α за рахунок інгібування активності HIF-гідроксилази. Конкретно передбачається, що сполука за даним винаходом вибрана з раніше ідентифікованих регуляторів активності гідроксилази. Наприклад, були ідентифіковані низькомолекулярні інгібітори проліл 4-гідроксилази. [Див., наприклад, Majamaa et al. (1984) *Eur J Biochem* 138:239-245; Majamaa et al. (1985) *Biochem J* 229:127-133; Kivirikko and Mullyharju (1998) *Matrix Biol* 16:357-368; Bickel et al. (1998) *Hepatology* 28:404-411; Friedman et al. (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97:4736-4741; and Franklin et al. (2001) *Biochem J* 353:333-338; всі джерела включені в дану заявку у всій повноті за допомогою посилання]. Даний винахід передбачає

У певних варіантах здійснення сполуки, застосовувані в способах за даним винаходом, вибрані із сполук формули (I)



В являє собою $-\text{CO}_2\text{H}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHSO}_2\text{CF}_3$, тетразоліл, імідазоліл, 3-гідроксіізоксазоліл, $-\text{CONHCOR}^{\text{'''}}$, $-\text{CONHSOR}^{\text{'''}}$, $\text{CONHSO}_2\text{R}^{\text{'''}}$, де $\text{R}^{\text{'''}}$ являє собою арил, гетероарил, $(\text{C}_3\text{--C}_7)$ -циклоалкіл або $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -алкіл, необов'язково монозаміщений $(\text{C}_6\text{--C}_{12})$ -арилом, гетероарилом, OH , SH , $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -алкілом, $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -алкокси, $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -тіоалкілом, $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -сульфінілом, $(\text{C}_1\text{--C}_4)$ -сульфонілом, CF_3 , Cl , Br ,

F, I, NO₂, -COOH, (C₂-C₅)-алкоксикарбонілом, NH₂, моно-(C₁-C₄-алкіл)-аміно, ді-(C₁-C₄-алкіл)-аміно або (C₁-C₄)-перфторалкілом; або де В являє собою карбоксильний залишок CO₂-G, де G являє собою залишок спирту G-OH, у якому G вибраний з алкільного залишку (C₁-C₂₀), циклоалкільного залишку (C₃-C₈), алкенільного залишку (C₂-C₂₀), циклоалкенільного залишку (C₃-C₈), ретинільного залишку, алкінільного залишку (C₂-C₂₀), алкенільного залишку (C₄-C₂₀), де алкенільний, циклоалкенільний, алкінільний і алкенільний залишки містять один або кілька кратних зв'язків; карбоциклічного арильного залишку (C₆-C₁₆), карбоциклічного аралкільного залишку (C₇-C₁₆), гетероарильного залишку або гетероаралкільного залишку, причому гетероарильний залишок або гетероарильний фрагмент гетероаралкільного залишку містить 5 або 6 кільцевих атомів; і де залишки, позначені буквою G, заміщені одним або декількома групами із числа наступних: гідроксил, галоген, ціано, трифторметил, нітро, карбоксил, (C₁-C₁₂)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл, (C₅-C₈)-циклоалкеніл, (C₆-C₁₂)-арил, (C₇-C₁₆)-аралкіл, (C₂-C₁₂)-алкеніл, (C₂-C₁₂)-алкініл, (C₁-C₁₂)-алкокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₆-C₁₂)-арилокси, (C₇-C₁₆)-аралкілокси, (C₁-C₈)-гідроксисалкіл, -O-[CH₂]_x-C_iH_(2f+1-9)F_g, OCF₂Cl, -O-CF₂-CHFCI, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніл, цинамоїл, (C₂-C₁₂)-алкенілкарбоніл, (C₂-C₁₂)-алкінілкарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбоніл, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбоніл, ацилокси, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкілоксикарбонілокси, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбонілокси, алкінілоксикарбонілокси, карбамоїл, N-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїл, N-(C₆-C₁₆)-арилкарбамоїл, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₆)-арилкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїлокси, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїлокси, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїлокси, N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїлокси, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-ар

алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, аміно, (C₁-C₁₂)-алкіламіно, ді-(C₁-C₁₂)-алкіламіно, (C₃-C₈)-циклоалкіламіно, (C₂-C₁₂)-алкеніламіно, (C₂-C₁₂)-алкініламіно, N-(C₆-C₁₂)-ариламіно, N-(C₇-C₁₁)-аралкіламіно, N-алкіларалкіламіно, N-алкілариламіно, (C₁-C₁₂)-алкоксиаміно, (C₁-C₁₂)-алкокси-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніламіно, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніламіно, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніламіно, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₇-C₁₁)-аралкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл аміно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-C₁₂)-аралкілкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, аміно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N,N-ді-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкілмеркапто, (C₁-C₁₂)-алкілсульфініл, (C₁-C₁₂)-алкілсульфоніл, (C₆-C₁₆)-арилмеркапто, (C₆-C₁₆)-арилсульфініл, (C₆-C₁₂)-арилсульфоніл, (C₇-C₁₆)-аралкілмеркапто, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфініл, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфоніл, сульфамойл, N-(C₁-C₁₀)-алкілсульфамойл, N,N-ді-(C₁-C₁₀)-алкілсульфамойл, (C₃-C₈)-циклоалкілсульфамойл, N-(C₆-C₁₂)-арилсульфамойл, N-(C₇-C₁₆)-аралкілсульфамойл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-арилсульфамойл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілсульфамойл, N-((C₁-C₁₀)-алкілсульфонамідо, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-(C₁-C₁₀)-алкілсульфонамідо, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфонамідо або N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-(C₇-C₁₆)-аралкілсульфонамідо; де органічні залишки, які є арилами або містять арильний фрагмент, можуть бути заміщені по арильному фрагменту однаковими або різними замісниками, у кількості від одного до п'яти із числа наступних: гідроксил, галоген, ціано, трифторметил, нітро, карбоксил, (C₁-C₁₂)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл, (C₆-C₁₂)-арил, (C₇-C₁₆)-аралкіл, (C₁-C₁₂)-алкокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₆-C₁₂)-арилокси, (C₇-C₁₆)-аралкілокси, (C₁-C₈)-гідроксіалкіл, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбоніл, (C₂-C₁₂)-алкенілоксикарбоніл, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкілкарбонілокси, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбонілокси, (C₆-C₁₂)-арилкарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкенілкарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкінілкарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкілоксикарбонілокси, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкенілоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбонілокси, карбамоїл, N-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N-

(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїл, N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїл, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїлокси, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїлокси, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїлокси, N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїлокси, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, аміно, (C₁-C₁₂)-алкіламіно, ді-(C₁-C₁₂)-алкіламіно, (C₃-C₈)-циклоалкіламіно, (C₂-C₁₂)-алкеніламіно, (C₂-C₁₂)-алкініламіно, N-(C₆-C₁₂)-ариламіно, N-(C₇-C₁₁)-аралкіламіно, N-алкіларалкіламіно, N-алкілариламіно, (C₁-C₁₂)-алкоксиаміно, (C₁-C₁₂)-алкокси-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніламіно, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніламіно, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніламіно, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₇-C₁₁)-аралкілкарбоніл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алкілкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніламіно-(C₁-C₈)-алкіл, аміно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N,N-ді-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкілмеркапто, (C₁-C₁₂)-алкілсульфініл, (C₁-C₁₂)-алкілсульфоніл, (C₆-C₁₂)-арилмеркапто, (C₆-C₁₂)-арилсульфініл, (C₆-C₁₂)-арилсульфоніл, (C₇-C₁₆)-аралкілмеркапто, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфініл або (C₇-C₁₆)-аралкілсульфоніл;

X являє собою O або S;

Q являє собою O, S, NR' або зв'язок;

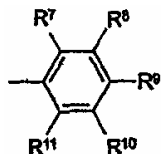
причому, якщо Q являє собою зв'язок, R⁴ являє собою галоген, нітрil або трифторметил;

або якщо Q являє собою O, S або NR¹, R⁴ являє собою водень, (C₁-C₁₀)-алкільний залишок, (C₂-C₁₀)-алкенільний залишок, (C₂-C₁₀)-алкінільний залишок, причому алкенільний або алкінільний залишки містять одну або два кратні зв'язки C-C; незаміщений трифторалкільний залишок формули -O-[CH₂]_x-C₁H_(2f+1-g)F_g, залишок (C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, залишок (C₁-C₆)-алкокси-(C₁-C₄)-алкокси-(C₁-C₄)-алкіл, арильний залишок, гетероарильний залишок, (C₇-C₁₁)-аралкільний залишок або залишок формули Z



у якій:

Е являє собою гетероарильний залишок, циклоалкільний залишок (C₃-C₈)- або фенільний залишок формули F



(F)

v являє собою 0-6;

w являє собою 0 або 1;

t являє собою 0-3; i

R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰ і R¹¹ являють собою однакові

або відмінні замісники із числа наступних: водень, галоген, ціано, нітро, трифторметил, (C₁-C₆)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл, (C₁-C₆)-алкокси, -O-[CH₂]_x-C₆H_(2f+1-g)F_g, OCF₂-Cl, -O-CF₂-CHFCl, (C₁-C₆)-алкілмеркапто, (C₁-C₆)-гідроксіалкіл, (C₁-C₆)-алкокси-(C₁-C₆)-алкокси, (C₁-C₆)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₁-C₆)-алкілсульфініл, (C₁-C₆)-алкілсульфоніл, (C₁-C₆)-алкілкарбоніл, (C₁-C₈)-алкоксикарбоніл, карбамоїл, N-(C₁-C₈)-алкілкарбамоїл, N,N-ді-(C₁-C₈)-алкілкарбамоїл або (C₇-C₁₁)-аралкілкарбамоїл, необов'язково заміщені фтором, хлором, бромом, трифторметилом, (C₁-C₆)-алкокси, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїлом, N-(C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₄)-алкілкарбамоїлом, (C₁-C₆)-алкілкарбонілокси, фенілом, бензилом, фенокси, бензилокси, NR^yR^z, де R^y і R^z незалежно вибрані з водню, (C₁-C₁₂)-алкілу, (C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкілу, (C₇-C₁₂)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкілу, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₈)-алкілу, (C₃-C₁₀)-циклоалкілу, (C₃-C₁₂)-алкенілу, (C₃-C₁₂)-алкінілу, (C₆-C₁₂)-арилу, (C₇-C₁₁)-аралкілу, (C₁-C₁₂)-алкокси, (C₇-C₁₂)-аралкокси, (C₁-C₁₂)-алкілкарбонілу, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбонілу, (C₆-C₁₂)-арилкарбонілу, (C₇-C₁₂)-аралкілкарбонілу; або де, додатково, R^y і R^z спільно являють собою -[CH₂]_n, де група CH₂ може бути заміщена O, S, N-(C₁-C₄)-алкілкарбоніліміно або N-(C₁-C₄)-алкоксикарбоніліміно; фенілмеркапто, фенілсульфоніл, фенілсульфініл, сульфоаміол, N-(C₁-C₈)-алкілсульфоаміол або N,N-ді-(C₁-C₈)-алкілсульфоаміол; або, з іншого боку, R⁷ і R⁸, R⁹ і R¹⁰ або R¹⁰ і R¹¹ спільно являють собою ланцюг, вибраний з -[CH₂]_n або -CH=CH-CH=CH-, де група CH₂ у ланцюзі необов'язково заміщена O, S, SO, SO₂ або NR^y; і n являє собою 3, 4 або 5; і якщо Е є гетероарильним залишком, цей залишок може нести 1-3 замісники, вибраних із замісників, перерахованих для R⁷-R¹¹, або, якщо Е являє собою циклоалкільний залишок, то цей залишок може нести один замісник, вибраний із замісників, перерахованих для R⁷-R¹¹, або де, якщо Q являє собою NR⁴, навпаки, являє собою R⁴, де R⁴ або R⁴ є однаковими або відмінними замісниками і являють собою водень, (C₆-C₁₂)-арил, (C₇-C₁₁)-аралкіл, (C₁-C₈)-алкіл, (C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-C₁₂)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₁-C₁₀)-алкілкарбоніл, необов'язково заміщений (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніл або необов'язково заміщений (C₆-C₁₂)-

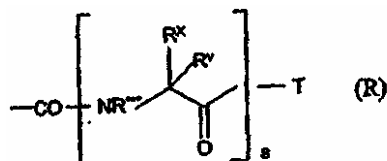
(Z)

арилкарбоніл; або R⁴ і R⁴ спільно являють собою -[CH₂]_n, де група CH₂ може бути заміщена O, S, N-ациліміно, або N-(C₁-C₁₀)-алкоксикарбоніліміно і h дорівнює 3-7.

Y являє собою N або CR³;

R¹, R² і R³ є однаковими або відмінними замісниками і являють собою водень, гідроксил, галоген, ціано, трифторметил, нітро, карбоксил, (C₁-C₂₀)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкокси, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₃-C₈)-циклоалкілокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкілокси-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₈)-алкіл-(C₁-C₆)-алкокси, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкілокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалкокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкокси, (C₆-C₁₂)-арил, (C₇-C₁₆)-аралкіл, (C₇-C₁₆)-аралкеніл, (C₇-C₁₆)-аралкініл, (C₂-C₂₀)-алкеніл, (C₂-C₂₀)-алкініл, (C₂-C₂₀)-алкокси, (C₂-C₂₀)-алкенілокси, (C₂-C₂₀)-алкінілокси, ретинілокси, (C₁-C₂₀)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилокси, (C₇-C₁₆)-аралкілокси, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₆)-алкокси, (C₇-C₁₆)-аралкокси-(C₁-C₆)-алкокси, (C₁-C₁₆)-гідроксіалкіл, (C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-C₁₆)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₇-C₁₂)-аралкілокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₂-C₂₀)-алкенілокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₂-C₂₀)-алкінілокси-(C₁-C₆)-алкіл, ретинілокси-(C₁-C₆)-алкіл, -O-[CH₂]_x-C₆H_(2f+1-g)F_g, OCF₂Cl, -O-CF₂-CHFCl, (C₁-C₂₀)-алкілкарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніл, цинамоїл, (C₂-C₂₀)-алкенілкарбоніл, (C₂-C₂₀)-алкінілкарбоніл, (C₁-C₂₀)-алкоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбоніл, (C₂-C₂₀)-алкенілоксикарбоніл, ретинілоксикарбоніл, (C₂-C₂₀)-алкінілоксикарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-циклоалкокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкілкарбонілокси, (C₃-C₈)-циклоалкілкарбонілокси, (C₆-C₁₂)-арилкарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбонілокси, цинамоїлокси, (C₂-C₁₂)-алкенілкарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкінілкарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбонілокси, (C₆-C₁₂)-арилоксикарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкіл оксикарбонілокси, (C₃-C₈)-циклоалкоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкенілоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбонілокси, карбамоїл, N-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїл, N,N-дицикло-(C₃-C₈)-алкілкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїл, N-((C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₆)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₆)-алкіл-N-((C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₆)-алкіл)-карбамоїл, N-(+)-дегідроабіетілкарбамоїл, N-(C₁-C₆)-алкіл-N-(+)-дегідроабіетілкарбамоїл, N-(C₆-C₁₂)-арилкарбамоїл, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₆)-арилкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-((C₁-C₁₈)-

алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₆-C₁₆)-
арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-
алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл,
N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-
алкіл)-карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїл; CON(CH₂)_n,
де група CH₂ може бути замінена на O, S, N-(C₁-
C₈)-алкіліміно, N-(C₃-C₈)-циклоалкіліміно, N-(C₃-
C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₄)-алкіліміно, N-(C₆-C₁₂)-
ариліміно, N-(C₇-C₁₆)-аралкіліміно, N-(C₁-C₄)-
алкокси-(C₁-C₆)-алкіліміно й значення n становить
3-7; карбамоїльний залишок формули R



у якій:

кожний з R^X і R^Y незалежно вибраний з водню,
(C₁-C₆)-алкілу, (C₃-C₇)-циклоалкілу, арилу або за-
місника біля α-вуглецю α-амінокислоти, до якої
належать L- і D-амінокислоти,

s являє собою 1-5,

T являє собою OH або NR*R**, і R*, R** і R***

являють собою однакові або відмінні замісники,
причому вони вибрані з водню, (C₆-C₁₂)-арилу, (C₇-
C₁₁)-аралкілу, (C₁-C₈)-алкілу, (C₃-C₈)-циклоалкілу,
(+)-дегідроабіетілу, (C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкілу,
(C₇-C₁₂)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкілу, (C₆-C₁₂)-арилокси-
(C₁-C₈)-алкілу, (C₁-C₁₀)-алканоїлу, необов'язково
заміщеного (C₇-C₁₆)-аралканоїлу, необов'язково
заміщеного (C₆-C₁₂)-ароїлу; або R* і R** спільно
являють собою -[CH₂]_n, де група CH₂ може бути
замінена O, S, SO, SO₂, N-ациламіно, N-(C₁-C₁₀)-
алкоксикарбоніліміно, N-(C₁-C₈)-алкіліміно, N-(C₃-
C₈)-циклоалкіліміно, N-(C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₄)-
алкіліміно, N-(C₆-C₁₂)-ариліміно, N-(C₇-C₁₆)-
аралкіліміно, N-(C₁-C₄)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіліміно й
значення n становить від 3 до 7; карбамоїлокси, N-
(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїлокси, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-
алкілкарбамоїлокси, N-(C₃-C₈)-
циклоалкілкарбамоїлокси, N-(C₆-C₁₂)-
арилкарбамоїлокси, N-(C₇-C₁₆)-
аралкілкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-
арилкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-
аралкілкарбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-
карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-
карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-C₁₀)-
алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-C₁₀)-
алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-
алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-
карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)-карбамоїлоксиаміно, (C₁-
C₁₂)-алкіламіно, ді-(C₁-C₁₂)-алкіламіно, (C₃-C₈)-
циклоалкіламіно, (C₃-C₁₂)-алкеніламіно, (C₃-C₁₂)-
алкініламіно, N-(C₆-C₁₂)-ариламіно, N-(C₇-C₁₆)-
аралкіламіно, N-алкіларалкіламіно, N-
алкілариламіно, (C₁-C₁₂)-алкоксиаміно, (C₁-C₁₂)-
алкокси-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-
алканоїламіно, (C₃-C₈)-циклоалканоїламіно, (C₆-
C₁₂)-ароїламіно, (C₇-C₁₆)-аралканоїламіно, (C₁-C₁₂)-

алканоїл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₃-C₈)-
циклоалканоїл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₆-C₁₂)-
ароїл-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₇-C₁₁)-аралканоїл-N-
(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алканоїламіно-(C₁-
C₁₈)-алкіл, (C₃-C₈)-циклоалканоїламіно-(C₁-C₈)-
алкіл, (C₆-C₁₂)-ароїламіно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-C₁₆)-
аралканоїламіно-(C₁-C₈)-алкіл, аміно-(C₁-C₁₀)-
алкіл, N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N,N-ді-
(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₃-C₈)-
циклоалкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₁-C₂₀)-
алкілмеркапто, (C₁-C₂₀)-алкілсульфініл, (C₁-C₂₀)-
алкілсульфоніл, (C₆-C₁₂)-арилмеркапто, (C₆-C₁₂)-
арилсульфініл, (C₆-C₁₂)-арилсульфоніл, (C₇-C₁₆)-
аралкілмеркапто, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфініл, (C₇-
C₁₆)-аралкілсульфоніл, (C₁-C₁₂)-алкілмеркапто-(C₁-
C₆)-алкіл, (C₁-C₁₂)-алкілсульфініл-(C₁-C₆)-алкіл,
(C₁-C₁₂)-алкілсульфоніл-(C₁-C₆)-алкіл, (C₆-C₁₂)-
арилмеркапто-(C₁-C₆)-алкіл, (C₆-C₁₂)-
арилсульфініл-(C₁-C₆)-алкіл, (C₆-C₁₂)-
арилсульфоніл-(C₁-C₆)-алкіл, (C₇-C₁₆)-
аралкілмеркапто-(C₁-C₆)-алкіл, (C₇-C₁₆)-
аралкілсульфініл-(C₁-C₆)-алкіл, (C₇-C₁₆)-
аралкілсульфоніл-(C₁-C₆)-алкіл, сульфамойл, N-
(C₁-C₁₀)-алкілсульфамойл, N,N-ді-(C₁-C₁₀)-
алкілсульфамойл, (C₃-C₈)-циклоалкілсульфамойл,
N-(C₆-C₁₂)-арилсульфамойл, N-(C₇-C₁₆)-
аралкілсульфамойл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₂)-
арилсульфамойл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-
аралкілсульфамойл, (C₁-C₁₀)-алкілсульфонамідо,
N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-(C₁-C₁₀)-алкілсульфонамідо, (C₇-
C₁₆)-аралкілсульфонамідо й N-((C₁-C₁₀)-алкіл)-(C₇-
C₁₆)-аралкілсульфонамідо; де арильний залишок
може бути замінений 1-5 замісниками, вибраними
із числа наступних: гідроксил, галоген, ціано, три-
фторметил, нітро, карбоксил, (C₂-C₁₆)-алкіл, (C₃-
C₈)-циклоалкіл, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₁₂)-алкіл,
(C₃-C₈)-циклоалкокси, (C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₁₂)-
алкокси, (C₃-C₈)-циклоалкілокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₃-
C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₈)-алкіл-(C₁-C₆)-алкокси, (C₃-C₈)-
циклоалкіл-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₃-C₈)-
циклоалкілокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₃-
C₈)-циклоалкокси-(C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкокси,
(C₆-C₁₂)-арил, (C₇-C₁₆)-аралкіл, (C₂-C₁₆)-алкеніл,
(C₂-C₁₂)-алкініл, (C₁-C₁₆)-алкокси, (C₂-C₁₆)-
алкенілокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкіл, (C₁-
C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-
C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилокси, (C₇-
C₁₆)-аралкілокси, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₆)-алкокси,
(C₇-C₁₆)-аралкокси-(C₁-C₆)-алкокси, (C₁-C₈)-
гідроксіалкіл, (C₆-C₁₆)-арилокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-
C₁₆)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-
C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, (C₇-C₁₂)-аралкілокси-(C₁-
C₈)-алкокси-(C₁-C₆)-алкіл, -O-[CH₂]_x-C₄H_(2f+1-g)F_g,
OCF₂Cl, -O-CF₂-CHFCl, (C₁-C₁₂)-алкіл карбоніл, (C₃-
C₈)-циклоалкілкарбоніл, (C₆-C₁₂)-арилкарбоніл,
(C₇-C₁₆)-аралкілкарбоніл, (C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл,
(C₁-C₁₂)-алкокси-(C₁-C₁₂)-алкоксикарбоніл, (C₆-C₁₂)-
арилоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-аралкоксикарбоніл, (C₃-
C₈)-циклоалкоксикарбоніл, (C₂-C₁₂)-
алкенілоксикарбоніл, (C₂-C₁₂)-алкінілоксикарбоніл,
(C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₇-C₁₆)-
аралкокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-
циклоалкіл-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₃-C₈)-
циклоалкокси-(C₁-C₆)-алкоксикарбоніл, (C₁-C₁₂)-
алкілкарбонілокси, (C₃-C₈)-

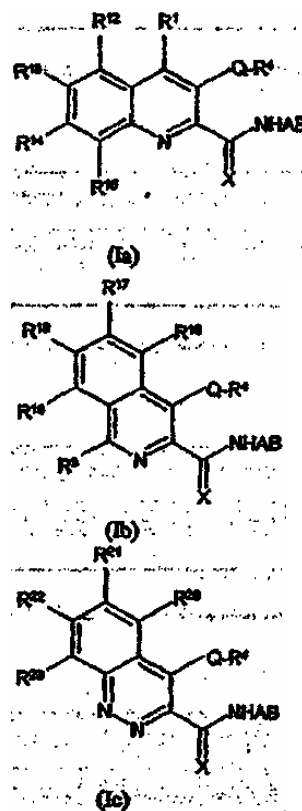
циклоалкілкарбонілокси, (C₆-C₁₂)-
арилкарбонілокси, (C₇-C₁₆)-аралкілкарбонілокси,
цинамоїлокси, (C₂-C₁₂)-алкенілкарбонілокси, (C₂-
C₁₂)-алкінілкарбонілокси, (C₁-C₁₂)-
алкоксикарбонілокси, (C₁-C₁₂)-алкокси-
алкоксикарбонілокси, (C₆-C₁₂)-
арилоксикарбонілокси, (C₇-C₁₆)-
аралкілоксикарбонілокси, (C₃-C₈)-
циклоалкоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-
алкенілоксикарбонілокси, (C₂-C₁₂)-
алкінілоксикарбонілокси, карбамоїл, N-(C₁-C₁₂)-
алкілкарбамоїл, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-алкілкарбамоїл, N-
(C₃-C₈)-циклоалкілкарбамоїл, N,N-дицикло-(C₃-C₈)-
алкілкарбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₃-C₈)-
циклоалкілкарбамоїл, N-((C₃-C₈)-циклоалкіл-(C₁-
C₆)-алкіл)карбамоїл, N-(C₁-C₆)-алкіл-N-(C₃-C₈)-
циклоалкіл-(C₁-C₆)-алкіл)карбамоїл, N-
(+)-дегідроабіетилкарбамоїл, N-(C₁-C₆)-алкіл-N-
(+)-дегідроабіетилкарбамоїл, N-(C₆-C₁₂)-
арилкарбамоїл, N-(C₇-C₁₆)-аралкілкарбамоїл, N-
(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-C₁₆)-арилкарбамоїл, N-(C₁-
C₁₀)-алкіл-N-(C₇-C₁₆)-аралкіл карбамоїл, N-((C₁-
C₁₆)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїл, N-((C₆-C₁₆)-
арилокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїл, N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-
алкіл-N-((C₁-C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїл,
N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-
алкіл)карбамоїл, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїл, CON(CH₂)_n,
де група CH₂ може бути заміщена на O, S, N-(C₁-
C₈)-алкіліміно, N-(C₁-C₈)-циклоалкіліміно, N-(C₃-
C₈)-циклоалкіл-(C₁-C₄)-алкіліміно, N-(C₆-C₁₂)-
ариліміно, N-(C₇-C₁₆)-аралкіліміно, N-(C₁-C₄)-
алкокси-N-(C₁-C₆)-алкіліміно, і значення n стано-
вить від 3 до 7; карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₂)-
алкілкарбамоїлокси, N,N-ді-(C₁-C₁₂)-
алкілкарбамоїлокси, N-(C₃-C₈)-циклоалкілкарба-
моїлокси, N-(C₆-C₁₆)-арилкарбамоїлокси, N-(C₇-
C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₆-
C₁₂)-арилкарбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-(C₇-
C₁₆)-аралкілкарбамоїлокси, N-((C₁-C₁₀)-
алкіл)карбамоїлокси, N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-
алкіл)карбамоїлокси, N-((C₇-C₁₆)-аралкілокси-(C₁-
C₁₀)-алкіл)карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₁-
C₁₀)-алкокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїлокси, N-(C₁-
C₁₀)-алкіл-N-((C₆-C₁₂)-арилокси-(C₁-C₁₀)-
алкіл)карбамоїлокси, N-(C₁-C₁₀)-алкіл-N-((C₇-C₁₆)-
аралкілокси-(C₁-C₁₀)-алкіл)карбамоїлокси, аміно,
(C₁-C₁₂)-алкіламіно, ді-(C₁-C₁₂)-алкіламіно, (C₃-C₈)-
циклоалкіламіно, (C₃-C₁₂)-алкеніламіно, (C₃-C₁₂)-
алкініламіно, N-(C₆-C₁₂)-ариламіно, N-(C₇-C₁₁)-
аралкіламіно, N-алкіларалкіламіно, N-
алкілариламіно, (C₁-C₁₂)-алкоксиаміно, (C₁-C₁₂)-
алкокси-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-
алканоліаміно, (C₃-C₈)-циклоалканоліаміно, (C₆-
C₁₂)-ароліаміно, (C₇-C₁₆)-аралканоліаміно, (C₁-C₁₂)-
алканолі-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₃-C₈)-
циклоалканолі-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₆-C₁₂)-
аролі-N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₇-C₁₁)-аралканолі-N-
(C₁-C₁₀)-алкіламіно, (C₁-C₁₂)-алканоліаміно-(C₁-C₈)-
алкіл, (C₃-C₈)-циклоалканоліаміно-(C₁-C₈)-алкіл,
(C₆-C₁₂)-ароліаміно-(C₁-C₈)-алкіл, (C₇-C₁₆)-
аралканоліаміно-(C₁-C₈)-алкіл, аміно-(C₁-C₁₀)-
алкіл, N-(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, N,N-ді-
(C₁-C₁₀)-алкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₃-C₈)-
циклоалкіламіно-(C₁-C₁₀)-алкіл, (C₁-C₁₂)-

алкілмеркапто, (C₁-C₁₂)-алкілсульфініл, (C₁-C₁₂)-
алкілсульфоніл, (C₆-C₁₆)-арилмеркапто, (C₆-C₁₆)-
арилсульфініл, (C₆-C₁₆)-арилсульфоніл, (C₇-C₁₆)-
аралкілмеркапто, (C₇-C₁₆)-аралкілсульфініл або
(C₇-C₁₆)-аралкілсульфоніл; або де R¹ і R² або R² і
R³ утворюють ланцюг [CH₂]_n, що є насиченим або
ненасиченим за рахунок подвійного зв'язку ОС, і в
якому 1 або 2 групи CH₂ необов'язково заміщені на
O, S, SO, SO₂ або NR', і R' являє собою водень,
(C₆-C₁₂)-арил, (C₁-C₈)-алкіл, (C₁-C₈)-алкокси-(C₁-C₈)-
алкіл, (C₇-C₁₂)-аралкокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₆-C₁₂)-
арилокси-(C₁-C₈)-алкіл, (C₁-C₁₀)-алканолі, необов'я-
зково заміщений (C₇-C₁₆)-аралканолі або необов'я-
зково заміщений (C₆-C₁₂)-аролі; і о являє собою 3,
4 або 5;

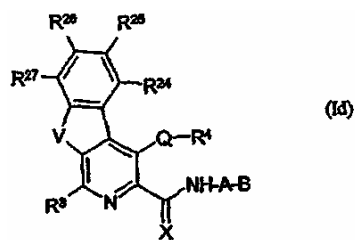
або де замісники R¹ і R² або R² і R³ разом з пі-
ридином або піридазином, до якого вони прикріп-
лені, утворюють 5,6,7,8-тетрагідроізохіноліновий
цикл, 5,6,7,8-тетрагідрохіноліновий цикл, 5,6,7,8-
тетрагідропіридинний цикл;

або де R¹ і R² або R² і R³ утворюють карбоциклі-
чний або гетероциклічний 5-або 6-членний аро-
матичний цикл;

або де R¹ і R² або R² і R³ разом з піридином
або піридазином, до якого вони прикріплені, утво-
рюють необов'язково заміщені гетероциклічні сис-
теми, вибрані з тієнопіридинів, фуранопіридинів,
піридопіридинів, піримідинопіридинів, імідазопіри-
динів, тiazолпіридинів, оксазолпіридинів, хіноліну,
ізохіноліну й циноліну; причому хінолін, ізохінолін
або цинолін переважно відповідають формулам Ia,
Ib, Ic:



або де замісники R^1 і R^2 , разом з піридином, до якого вони приєднані, утворюють сполуку формули Id:



де V являє собою S, O або NR^k , і R^k вибраний з водню, (C_1-C_6) -алкілу, арилу або бензилу; причому арильний залишок може бути необов'язково заміщений замісниками, визначеними вище, у кількості від 1 до 5; і

R^{24} , R^{25} , R^{26} , R^{27} у кожному з випадків, незалежно один від одного, є тими ж замісниками, які розуміються під R^1 , R^2 і R^3 ;

значення f становить від 1 до 8;

g являє собою 0 або від 1 до $(2f+1)$

значення x становить від 0 до 3; і

значення h становить від 3 до 7;

включаючи фізіологічно активні солі й проліки, які є похідними зазначених сполук.

Типові сполуки формули (I) описані в Європейських патентах №№ EP0650960 і EP0650961. Всі сполуки, перераховані в EP0650960 і EP0650961, зокрема, ті з них, які перераховані в списку сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання. Типові сполуки формули (I) включають, не обмежуючись перерахунком, [(3-гідроксипіридин-2-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту й [(3-метоксипіридин-2-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту.

Крім цього, типові сполуки формули (I) описані в патенті США №5658933. Всі сполуки, перераховані в патенті США №5658933, зокрема ті з них, які перераховані в списку сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання. Типові сполуки формули (I) включають, не обмежуючись перерахунком, гідрохлорид N-((гексадецилокси)-карбоніл)-метил-аміду 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((октилокси)-карбоніл)-метил)-амід 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((гексиллокси)-карбоніл)-метил)-амід 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((бутилокси)-карбоніл)-метил)-амід 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, рацемат N-(((2-нонілокси)-карбоніл)-метил)-аміду 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((гептилокси)-карбоніл)-метил)-амід 3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((октилокси)-карбоніл)-метил)-амід 3-бензилоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((бутилоксикарбоніл)-метил)-амід 3-бензилоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((бензилоксикарбоніл)-метил)-амід 5-(((3-(1-бутилокси)-пропіл)-аміно)-карбоніл)-3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти, N-(((1-бутилокси)-карбоніл)-метил)-амід 5-(((3-(1-

бутилокси)-пропіл)-аміно)-карбоніл)-3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти й N-(((бензилокси)-карбоніл)-метил)-амід 5-(((3-лаурилокси)-пропіл)-аміно)-карбоніл)-3-метоксипіридин-2-карбонної кислоти.

Додаткові сполуки формули (I) являють собою заміщені гетероциклічні карбоксаміди, описані у патенті США №5620995; 3-гідроксипіридин-2-карбоксамідоєфіри, описані в патенті США №6020350; сульфонамідокарбонілпіридин-2-карбоксаміди, описані в патенті США №5607954; а також сульфонамідокарбонілпіридин-2-карбоксаміди й складні ефіри сульфонамідокарбонілпіридин-2-карбоксамідів, описані в патентах США №№ 5610172 і 5620996. Всі сполуки, перераховані в зазначених патентах, зокрема, ті з них, які наведені в списку сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання.

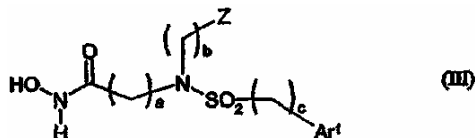
Типові сполуки формули (Ia) описані в патентах США №№ 5719164 і 5726305. Всі сполуки, перераховані в попередніх патентах, зокрема, ті з них, які перераховані в списках сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання. Типові сполуки формули (Ia) включають, не обмежуючись перерахунком, N-(((3-гідроксі-6-ізопропoxихінолін-2-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту, N-(((6-(1-бутилокси)-3-гідроксихінолін-2-іл)-карбоніл)-гліцин, [(3-гідроксі-6-трифторметоксихінолін-2-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту, N-(((6-хлор-3-гідроксихінолін-2-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((7-хлор-3-гідроксихінолін-2-іл)-карбоніл)-гліцин і [(6-хлор-3-гідроксихінолін-2-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту.

Типові сполуки формули (Ib) описані в патенті США №6093730. Всі сполуки, перераховані в патенті США №6093730, зокрема, ті з них, які наведені в списку сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання. Типові сполуки формули (Ib) включають, не обмежуючись перерахунком, N-(((1-хлор-4-гідрокси-7-(2-пропілокси)ізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((1-хлор-4-гідрокси-6-(2-пропілокси)ізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту (сполука A), N-(((1-хлор-4-гідрокси-7-метоксіізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((1-хлор-4-гідрокси-6-метоксіізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((7-бутилокси)-1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((6-бензилокси-1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту, метиловий ефір ((7-бензилокси-1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту, N-(((7-бензилокси-1-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту, N-(((8-хлор-4-гідроксіізохінолін-3-іл)-карбоніл)-гліцин, N-(((7-бутоксі-4-гідроксіізохінолін-3-карбоніл)-аміно)-оцтову кислоту.

Крім цього, сполуки, що належать до формули (I), які можуть бути застосовані в способах за даним винаходом, включають, не обмежуючись перерахунком, 6-циклогексил-1-гідрокси-4-метил-1H-піридин-2-он, 7-(4-метилпіперазин-1-ілметил)-5-фенілсульфанілметилхінолін-8-ол, 4-нітрохінолін-8-ол, 5-бутоксиметилхінолін-8-ол, [(4-

гідрокси-7-феноксізохінолін-3-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту (сполука В) і [(4-гідрокси-7-фенілсульфанізохінолін-3-карбоніл)-аміно]-оцтову кислоту (сполука С). Крім цього, даний винахід представляє додаткові типові сполуки, у яких, наприклад, А і В спільно можуть являти собою, наприклад, гексанову кислоту, ціанометил, 2-аміноетил, бензойну кислоту, 1Н-бензоімідазол-2-ілметил і т.д.

В інших варіантах здійснення сполуки, застосовувані в способах за даним винаходом, вибрані із сполук формули (III)



або їх фармацевтично прийнятних солей, де:

а являє собою ціле число від 1 до 4;

б являє собою ціле число від 0 до 4;

с являє собою ціле число від 0 до 4;

Z вибраний із групи, що складається з (C₃-C₁₀)-циклоалкілу, (C₃-C₁₀)-циклоалкілу, незалежно заміщеного одним або декількома Y¹, 3-10-членного гетероциклоалкілу й 3-10-членного гетероциклоалкілу, незалежно заміщеного одним або декількома Y¹; (C₅-C₂₀)-арилу, (C₅-C₂₀)-арилу, незалежно заміщеного одним або декількома Y¹; 5-20-членного гетероарилу й 5-20-членного гетероарилу, незалежно заміщеного одним або декількома Y¹;

Ar¹ вибраний із групи, що складається з (C₅-C₂₀)-арилу, (C₅-C₂₀)-арилу, незалежно заміщеного одним або декількома Y²; 5-20-членного гетероарилу й 5-20-членного гетероарилу, незалежно заміщеного одним або декількома Y²;

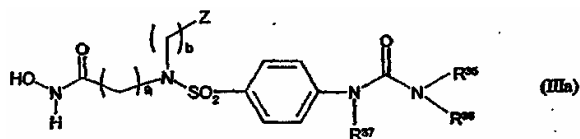
кожний з Y¹ незалежно вибраний із групи, що складається з ліпофільної функціональної групи, (C₅-C₂₀)-арилу, (C₆-C₂₆)-алкіларилу, 5-20-членного гетероарилу й 6-26-членного алкілгетероарилу;

кожний з Y² незалежно вибраний із групи, що складається з -R', -OR', -OR'', -SR', -SR'', -NR'R', -NO₂, -CN, -галогену, тригалогенметилу, тригалогенметокси, -C(O)R', -C(O)OR', -C(O)NR'R', -C(O)NR'OR', -C(NR'R')=NOR', -NR'-C(O)R', -SO₂R', -SO₂R'', -NR'-SO₂-R', -NR'-C(O)-NR'R', тетразол-5-илу, -NR'-C(O)-OR', -C(NR'R')=NR', -S(O)-R', -S(O)-R'' і NR'-C(S)-NR'R'; і

кожний з R' незалежно вибраний із групи, що складається з -H, (C₁-C₈)-алкілу, (C₂-C₈)-алкенілу й (C₂-C₈)-алкінілу; і

кожний з R'' незалежно вибраний із групи, що складається з (C₅-C₂₀)-арилу й (C₅-C₂₀)-арилу, незалежно заміщеного однією або декількома групами -OR', -SR', -NR'R', -NO₂, -CN, галогенами або тригалогенметильними групами, або

де с являє собою 0, Ar¹ являє собою N'-заміщений залишок арилсечовини, сполука має структурну формулу (IIIa):



або її фармацевтично прийнятна сіль, де:

а, b і Z визначені вище; і

кожний з R³⁵ і R³⁶ незалежно вибраний із групи, що складається з водню, (C₁-C₈)-алкілу, (C₂-C₈)-алкенілу, (C₂-C₈)-алкінілу, (C₃-C₁₀)-циклоалкілу, (C₅-C₂₀)-арилу, (C₅-C₂₀)-заміщеного арилу, (C₆-C₂₆)-алкарилу, (C₆-C₂₆)-заміщеного алкарилу, 5-20-членного гетероарилу, 5-20-членного заміщеного гетероарилу, 6-26-членного алкілгетероарилу й 6-26-членного заміщеного алкілгетероарилу; і

R³⁷ незалежно вибраний із групи, що складається з водню, (C₁-C₈)-алкілу, (C₂-C₈)-алкенілу й (C₂-C₈)-алкінілу.

Типові сполуки формули (III) описані в міжнародній публікації №WO00/50390. Всі сполуки, перераховані в WO00/50390, зокрема, ті з них, які наведені в списку сполук формули винаходу, і кінцеві продукти діючих зразків включені в дану заявку за допомогою посилання. Типові сполуки формули (III) включають 3-[[4-(3,3-добензилуреїдо)-бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)-етил]-аміно]-N-гідроксипропіонамід (сполука D), 3-[[4-[3-(4-хлорфеніл)-уреїдо]-бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)-етил]-аміно]-N-гідроксипропіонамід і 3-[[4-[3-(1,2-дифенілетил)-уреїдо]-бензолсульфоніл]-[2-(4-метоксифеніл)-етил]-аміно]-N-гідроксипропіонамід.

Крім цього розроблені способи ідентифікації сполук за даним винаходом. У певних аспектах сполука за даним винаходом являє собою таку сполуку, яка стабілізує HIFα. Здатність сполуки стабілізувати або активувати HIFα може бути встановлена, наприклад, прямим вимірюванням HIFα у зразку, непрямим вимірюванням HIFα, наприклад, зменшенням HIFα, зв'язаного з білком фон Гиппеля-Ліндау [див., наприклад, міжнародну публікацію №WO00/69908], або ж активацією HIF-чутливих цільових генів або репортерних конструкцій [див., наприклад, патент США №5942434]. Вимірювання і порівняння рівнів HIF і/або HIF-чутливого цільового білка під час відсутності й у присутності сполуки дасть можливість розпізнати сполуки, які стабілізують HIFα і/або активують HIF.

В інших аспектах сполука за даним винаходом являє собою таку сполуку, яка інгібує активність HIF-гідроксилази. Аналізи активності гідроксилази є стандартними в техніці. Подібні аналізи можуть прямо або побічно вимірювати активність гідроксилази. Наприклад, аналіз може виміряти вміст гідроксильованих залишків, наприклад, проліну, аспарагіну й т.д., які є в субстраті ферменту, наприклад, у цільовому білку, у синтетичному імітаційному пептиді або їх фрагментах. [Див., наприклад, Palmerini et al. (1985) J Chromatogr 339:285-292]. Зменшення кількості гідроксильованих залишків, наприклад проліну або аспарагіну, у присутності сполуки вказує на сполуку, яка інгібує активність гідроксилази. З іншого боку, аналізи можуть вимірювати інші продукти реакції гідроксилювання, наприклад, утворення сукцинату з 2-

оксоглутарату. [Див., наприклад, Cunliffe et al. (1986) *Biochem J* 240:617-619]. Kaule i Gunzler [1990; *Anal Biochem* 184:291-297] описують типову процедуру для вимірювань утворення сукцинату з 2-оксоглутарату.

Методики, подібні описаним вище, можуть бути застосовані для ідентифікації сполук, які регулюють активність HIF-гідроксилази. Цільовий білок може включати HIFα або його фрагмент, наприклад HIF (556-575). У число ферментів можуть входити, наприклад, HIF-пролілгідроксилаза (див., наприклад, GenBank Accession № AAG33965 і т.д.) або HIF-аспарагінілгідроксилаза (див., наприклад, GenBank Accession № AAL27308 і т.д.), одержані з будь-якого джерела. Фермент також може бути присутнім у формі неочищеного клітинного лізату або в частково очищеній формі. Методики, призначені для вимірювання активності HIF-гідроксилази, описані, наприклад, в Ivan et al. [2001, *Science* 292:464-468; і 2002, *Proc Natl Acad Sci USA* 99:13459-13464] і Hirsila et al. [2003, *J Biol Chem* 278:30772-30780]; додаткові способи описані в міжнародній публікації №WO03/049686. Вимірювання і порівняння активності ферментів під час відсутності й у присутності сполуки дозволить виявити сполуки, які інгібують гідроксилювання HIFα.

Сполукою за даним винаходом є така сполука, яка, крім того, дає вимірний результат, при вимірюваннях *in vitro* або *in vivo*, доказом чого служить посилення еритропоезу, поліпшений метаболізм заліза або терапевтичне поліпшення станів, у число яких входять, наприклад, дефіцит заліза, включаючи функціональний дефіцит заліза; анемія, викликана хронічним захворюванням, дефіцит заліза й мікроцитоз або мікроцитарна анемія; або ж станів, пов'язаних із запаленням, інфекційним захворюванням, імунодефіцитом або неопластичним розладом.

Вимірний результат може являти собою будь-який з наступних параметрів: підвищення гемоглобіну, гематокриту, ретикулоцитів, кількості червоних кров'яних тілець, ЕРО плазми й т.д.; поліпшення метаболізму заліза, що виявлено по зменшенню спостережуваних симптомів, включаючи, наприклад, зменшення хронічної втоми, блідості, запаморочення й т.д., або по збільшенню рівнів вмісту заліза в сироватці, рівням феритину в сироватці, що змінилися, % насичення трансферину, загальної здатності до зв'язування заліза, збільшенню числа ретикулоцитів, гемоглобіну, гематокриту, наприклад, всіх параметрів, вимірюваних при стандартному аналізі крові.

Фармацевтичні препарати й шляхи введення

Композиції за даним винаходом можуть доставлятися безпосередньо або в складі фармацевтичних композицій, які містять наповнювачі, що добре відомо в техніці. Представлені способи лікування можуть включати введення ефективної кількості сполуки за даним винаходом суб'єктові, у якого є розлад метаболізму або підвищений ризик його виникнення; зокрема, розлад, пов'язаний з регуляцією глюкози, наприклад, діабет, гіперглікемія і т.д. У переважному варіанті здійснення, суб'єкт являє собою ссавця, причому в найбільш переважному варіанті здійснення суб'єкт являє собою людину.

Ефективна кількість, наприклад, доза сполуки або ліків, легко може бути визначена за допомогою звичайних експериментальних досліджень, так само, як і ефективний і зручний шлях введення, і прийнятна рецептура. У техніці доступні різні види препаратів і системи доставки ліків. [Див., наприклад, Gennaro, ed. (2000) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, вище; і Hardman, Limbird і Gilman, eds. (2001) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, вище].

Прийнятні шляхи введення можуть включати, наприклад, пероральний, ректальний, місцевий, назальний, легеневий, очний, кишковий і парентеральний шляхи введення. Основні шляхи парентерального введення включають внутрішньовенне, внутрішньом'язове й підшкірне введення. Допоміжні шляхи введення включають інтраперитоніальний, внутрішньортеріальний, внутрішньосуглобовий, внутрішньосерцевий, інтрацистеріальний, внутрішньошкірний, усередину осередка ураження, внутрішньоочний, внутрішньоплевральний, інтратекальний, внутрішньоматковий і внутрішньошлункочковий. Симптоми, що мають бути вилікувані, а також фізичні, хімічні й біологічні властивості лікарського препарату диктують, який тип препарату й спосіб введення слід застосувати, а також який вид доставки варто вибрати - місцеву або системну.

Фармацевтичні лікарські форми сполук за даним винаходом можуть передбачати миттєве виділення діючого начала, кероване виділення, тривале виділення або бути цільовою системою доставки лікарського засобу. Звичайно застосовувані лікарські форми включають, наприклад, розчини й суспензії, (мікро)емульсії, мазі, гелі й пластири, ліпосоми, таблетки, драже, капсули із твердою й м'якою оболонкою, супозиторії, кульки, імплантати, аморфні або кристалічні порошки, аерозолі або ліофілізовані склади. Для застосування або введення лікарського засобу, залежно від вибраного способу введення, можуть знадобитися спеціальні пристрої, як, наприклад, шприци й голки, інгалятори, насоси, олівці для ін'єкцій, аплікатори або спеціальні колби. Фармацевтичні лікарські форми часто складаються з лікарського засобу, наповнювача (наповнювачів) і контейнера/системи ізоляції від зовнішніх впливів. Для поліпшення або полегшення виробництва, стабільності, введення й безпеки лікарського засобу до сполуки за даним винаходом можуть бути додані один або кілька наповнювачів, які також називаються інертними компонентами, причому вони можуть надати можливості для досягнення бажаних параметрів виділення лікарського засобу. Отже, тип наповнювача (наповнювачів), що додається до лікарського засобу, може залежати від різних факторів, таких як, наприклад, фізичні й хімічні властивості лікарського засобу, шлях введення й методика виробництва. Фармацевтично прийнятні наповнювачі доступні в техніці й включають наповнювачі, внесені в списки різних фармакопей. [Див., наприклад, вебсторінки USP, JP, EP і BP, FDA (www.fda.gov), *Inactive Ingredient Guide* 1996, і *Handbook of Pharmaceutical Additives*, ed. Ash; Synapse Information Resources, Inc. 2002].

Фармацевтичні лікарські форми сполук за даним винаходом можуть вироблятися одним із загальновідомих у техніці способів, таких як, наприклад, звичайне змішування, просівання, розчинення, плавлення, грануляція, виготовлення драже, таблетування, суспендування, екструдкування, розпилювальне сушіння, розтирання в порошок, емульгування, (нано/мікро)інкапсуляція, захоплювання або ліофілізація. Як було відзначено вище, композиції за даним винаходом можуть включати один або декілька фізіологічно прийнятних інертних компонентів, які полегшують перетворення діючої сполуки в препарат для фармацевтичного застосування.

Прийнятний вид препарату залежить від бажаного шляху введення. Наприклад, для внутрішньовенної ін'єкції, композиція може бути приготовлена у вигляді водяного розчину із застосуванням, якщо буде потреба, фізіологічно сумісних буферів, що включають, наприклад, фосфат, гістидин або цитрат для регулювання рН складу й тонічний реагент, як, наприклад, хлористий натрій або декстрозу. У випадку введення через слизову оболонку або назальне введення можуть бути переважні напіврідкі й рідкі складки або пластири, можливо такі, що містять засоби для поліпшення проникання. Подібні засоби для поліпшення проникання широко відомі в техніці. Для перорального введення сполуки можуть бути включені до складу рідких або твердих дозованих форм, а також до складу препаратів з миттєвим або керованим/тривалим виділенням діючого начала. Зручні дозовані форми для перорального прийому пацієнтом включають таблетки, пігулки, драже, капсули із твердою й м'якою оболонкою, рідини, гелі, сиропи, пастоподібні суміші, суспензії й емульсії. Крім цього сполуки за даним винаходом можуть включатися в складки композицій для ректального введення, таких як супозиторії або утримуючі клізми, наприклад такі, що містять звичайну основу для виготовлення супозиторіїв, таку як масло какао або інші гліцериди.

Тверді дозовані форми для перорального прийому можуть бути одержані із застосуванням наповнювачів, які можуть включати заповнювачі, дезінтегруючі засоби, зв'язувальні засоби (сухі й мокрі), засоби, що сповільнюють розчинення, змащувальні засоби, ковзні засоби, засоби проти прилипання, катіонообмінні смоли, зволожуючі засоби, антиоксиданти, консерванти, барвники й смакові добавки. Перераховані наповнювачі можуть бути синтетичного або природного походження. Приклади подібних наповнювачів включають похідні целюлози, лимонну кислоту, дикальційфосфат, желатин, карбонат магнію, лаурилсульфат магнію/натрію, маніт, поліетиленгліколь, полівінілпіролідон, силікати, діоксид кремнію, бензоат натрію, сорбіт, крохмалі, стеаринову кислоту або її солі, цукри (наприклад, декстрозу, сахарозу, лактозу й т.д.), тальк, рослинний клей трагаканту, рослинні олії (гідрогеновані) і воски. Етанол і вода можуть служити як засоби для грануляції. У певних прикладах бажане покриття таблеток, наприклад, плівкою для приховання смаку вмісту, плівкою, стійкою до шлункового соку, або плівкою, що сповільнює виділення. Для покри-

вання таблеток, що приводить до утворення драже, часто застосовують природні й синтетичні полімери в поєднанні з барвниками, цукрами й органічними розчинниками або водою. Якщо капсула є більш переважною в порівнянні з таблеткою, порошок, суспензія або розчин лікарського засобу може доставлятися в капсулі із сумісною твердою або м'якою оболонкою.

В одному з варіантів здійснення може здійснюватися місцеве введення сполук за даним винаходом, як наприклад, за допомогою шкірного пластиру, напіврідкого або рідкого складу, наприклад, гелю, (мікро)емульсії, мазі, розчину (нано/мікро)суспензії або піни. Проникнення лікарського засобу в шкіру й підшкірні тканини можна регулювати, наприклад, застосовуючи засоби, що поліпшують проникнення; за рахунок придатного вибору й сполучення ліпофільних, гідрофільних і амфіфільних наповнювачів, включаючи воду, органічні розчинники, воски, олії, синтетичні й природні полімери, поверхнево-активні речовини, емульгатори; за допомогою регулювання рН; і за рахунок застосування комплексують засобів. Для того, щоб регулювати проникнення через шкіру лікарських засобів за даним винаходом, можна застосовувати інші методики, як, наприклад, іонтофорез. Трансдермальне або місцеве введення було б переважно, наприклад, у ситуаціях, коли бажана місцева доставка лікарського засобу з мінімальним загальним впливом.

Для введення шляхом інгаляції або введення в ніс, сполуку, призначену для застосування за даним винаходом, як правило, доставляють у формі розчину, суспензії, емульсії або напівтвердого аерозолу з пакування під підвищеним тиском або розпилювача, звичайно із застосуванням пропеленту, наприклад, галогенованих вуглеводнів, похідних метану й етану, діоксиду вуглецю або будь-якого іншого придатного газу. Для аерозолів місцевої дії застосовують вуглеводні, такі як бутан, ізобутен і пентан. У випадку застосування аерозолів під тиском належна величина дозування може бути встановлена за рахунок введення клапана, що допускає виділення певної кількості вмісту. Для застосування в інгаляторах і інсуфляторах (вдувачах порошку) речовини за даним винаходом можна вводити в капсули й картриджі, наприклад, з желатину. Згадані капсули й картриджі, як правило, містять суміш порошку сполуки за даним винаходом й придатної порошкоподібної основи, як, наприклад, лактози або крохмалю.

Композиції, призначені для парентерального введення за допомогою ін'єкції, як правило, є стерильними й можуть бути представлені у вигляді форм для разового дозування, наприклад, в ампулах, шприцах, олівцях для ін'єкцій або в пакуваннях, що містять кілька доз, до складу останніх, як правило, входить консервант. Композиції можуть приймати такі форми, як суспензії, розчини або емульсії в маслянистих або водних носіях і можуть містити такі засоби, як буфери, тонічні засоби, засоби для поліпшення в'язкості, поверхнево-активні речовини, засоби для суспендування й диспергування, антиоксиданти, біосумісні полімери, хелатоутворювачі й консерванти. Залежно від місця ін'єкції носій може містити воду, синтетичне або

рослинне масло й/або додаткові органічні розчинники. У певних прикладах, таких як ліофілізований продукт або концентрат, парентеральний склад може бути відновлений або розведений перед введенням. Склади пролонгованої дії, які забезпечують регульоване або тривале виділення сполуки за даним винаходом, можуть включати призначені для ін'єкції суспензії нано/мікрочастинок або нано/мікро кристали, або кристали розміром більше 1мкм. Полімери, як, наприклад, полі(молочна) кислота, полі(гліколева) кислота або їх співполімери, можуть служити матрицями для забезпечення регульованого/тривалого виділення, на додаток до інших полімерів, добре відомих у техніці. Інші системи доставки пролонгованої дії можуть бути представлені у формі імплантатів і насосів, що вимагають надрізів.

Придатні носії для внутрішньовенної ін'єкції молекул за даним винаходом загальновідомі в техніці й включають розчини на основі води, що містять основу, таку як, наприклад, гідроксид натрію, для утворення іонізованої сполуки, цукор або хлорид натрію як тонічний засіб, наприклад, буфер містить фосфат або гістидин. Можуть бути додані додаткові розчинники, такі як, наприклад, поліетиленгліколь. Системи на основі води ефективні при розчиненні сполук за даним винаходом, і вони дають низьку токсичність при системному введенні. Співвідношення компонентів системи розчину може значно змінюватися без порушення розчинності й токсичних характеристик. Більше того, може змінюватися індивідуальність компонентів. Наприклад, можуть застосовуватися поверхнево-активні речовини з низькою токсичністю, такі як полісорбати й полуксамери, також може застосовуватися поліетиленгліколь і інші додаткові розчинники, можна додавати біосумісні полімери, такі як полівінілпіролідон, декстрозу можна замінити іншими цукрами й поліолами.

Для композицій, застосованих у рамках способів лікування за даним винаходом, терапевтично ефективне дозування може бути спочатку визначене за допомогою різноманітних методик, добре відомих у техніці. Початкові дозування, використовувані в дослідженнях на тваринах, можуть базуватися на ефективних концентраціях, установлених у ході випробувань на клітинних культурах. Діапазони дозувань, прийнятних для людини, можуть бути визначені, наприклад, при використанні даних, одержаних у процесі експериментів над тваринами й випробувань на клітинних культурах.

Під терапевтично ефективною дозою або кількістю сполуки, засобу або ліків за даним винаходом, розуміється кількість або доза сполуки, засобу або ліків за даним винаходом, що приводить до полегшення симптомів або продовження строків існування суб'єкта. Токсичність і терапевтична ефективність таких молекул може бути визначена у відповідності зі стандартними фармацевтичними методиками за допомогою клітинних культур або експериментальних тварин, наприклад, визначенням LD50 (тобто дози, летальної для 50% популяції) і ED50 (тобто дози, терапевтично ефективної для 50% популяції). Співвідношення токсичної дози й дози, що викликає терапевтичний ефект, являє собою терапевтичний коефіцієнт, що може

бути виражений, як LD50/ED50. Засоби, що демонструють високе значення терапевтичних коефіцієнтів, є кращими.

Ефективна кількість або терапевтично ефективна кількість являє собою кількість сполуки або фармацевтичної композиції, що здатна викликати біологічну або медичну реакцію тканини, системи, тварини або людини, якої прагне дослідник, ветеринар, лікар або інший клініцист, наприклад, регуляцію метаболізму глюкози, зменшення підвищених або збільшених рівнів глюкози в крові, лікування або профілактика розладу, пов'язаного зі зміненим метаболізмом глюкози, наприклад діабету, й т.д.

Дозування переважно знаходяться у діапазоні циркулюючих концентрацій, що включає ED50 з малою або відсутньою токсичністю. Дозування можуть змінюватися в межах цього діапазону залежно від застосованої лікарської форми й/або застосованого шляху введення. Точна рецептура, шлях введення, дозування й інтервал між введеннями повинні вибиратися у відповідності зі способами, відомими з рівня техніки, беручи до уваги індивідуальний стан пацієнта.

Величина дози й інтервал між прийомами можуть регулюватися індивідуально, щоб забезпечити рівні діючих речовин у плазмі, достатні для досягнення бажаних результатів, наприклад, регуляції метаболізму глюкози, зменшення рівнів глюкози в крові й т.д., тобто мінімальних ефективних концентрацій (МЕС). МЕС можуть змінюватися для кожної сполуки, але їх можна виміряти на основі, наприклад, даних *in vitro* і експериментів на тваринах. Дозування, необхідні для досягнення МЕС, будуть залежати від індивідуальних особливостей і шляху введення. У випадку місцевого введення або селективного поглинання ефективні локальні концентрації лікарського засобу можуть бути не пов'язані з концентраціями в плазмі.

Кількість уведеного засобу або композиції може залежати від різноманітних факторів, включаючи стать, вік і вагу суб'єкта, якого піддають лікуванню, тяжкість захворювання, спосіб введення й думка лікаря.

Композиції, представлені в даному винаході, можуть, якщо це бажано, випускатися в пакуванні або дозуючому пристрої, що містить одну або більшу кількість одиниць дозування лікарського засобу, що включає діючий інгредієнт. Такі пакування або пристрої можуть, наприклад, включати металеву або пластикову фольгу, як, наприклад, блістерне пакування, або скляна посудина з гумовою пробкою, як у флаконах. Пакування або дозуючий пристрій може комплектуватися інструкцією із застосування. Композиції, що містять сполуки за даним винаходом, можна також одержувати у формі складу, що включає сумісний фармацевтичний носій, поміщати в прийнятні ємності й прикріплювати етикетку із вказівкою умов лікування.

Наведені вище й інші варіанти здійснення даного винаходу легко придуть на розум звичайному фахівцеві в даній галузі техніки, беручи до уваги відомості, розкриті в даній заявці.

Приклади

Даний винахід буде додатково пояснено за допомогою посилання на наступні нижче приклади

ди, які, як мається на увазі, є тільки ілюстраціями винаходу. Ці приклади наведені тільки для ілюстрації формули даного винаходу. Область даного винаходу не обмежена типовими варіантами здійснення, які служать тільки для ілюстрації окремих аспектів винаходу. Будь-які функціонально еквівалентні способи знаходяться в межах даного винаходу. Різні модифікації винаходу, здійснені на додаток до того, що описано в даній заявці, будуть очевидні фахівцям у даній галузі техніки з попереднього опису й супровідних креслень. Мається на увазі, що такі модифікації попадають у межі додатної формули винаходу.

Приклад 1: Подолання інгібуючого впливу TNF- α на вироблення ЕРО Клітини Нер3В обробляють TNF- α у різних концентраціях (0, 0,4, 2, 10нг/мл) під час відсутності або в присутності сполуки А або сполуки В протягом 3 днів. Рівні секретованого ЕРО визначають, застосовуючи комерційний доступний комплект ELISA kit (R&D Systems, catalog no. DEP00). За відсутності сполук обробка клітин Нер3В TNF- α знижує вироблення ЕРО, причому зниження залежить від дози. Клітини Нер3В, оброблені або сполукою А (Фіг.1) або сполукою В (Фіг.2) у різних концентраціях під час відсутності TNF- α показують залежне від дози збільшення вироблення ЕРО. Додавання кожної із сполук у присутності TNF- α істотно знижує інгібуючий вплив TNF- α на вироблення ЕРО. Подолання інгібуючого впливу TNF- α на вироблення ЕРО за допомогою інгібування пролілгидроксилази спостерігають у присутності низьких (наприклад 0,4нг/мл) і високих (наприклад 10нг/мл) концентрацій TNF- α . Отже, інгібуючий вплив запального цитокіну TNF- α на вироблення ЕРО переборюється за рахунок інгібування активності пролілгидроксилази із застосуванням сполук і способів за даним винаходом. Одержані результати передбачають, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО в присутності запального цитокіну TNF- α . Далі, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО й, отже, для лікування анемії у суб'єкта, наприклад, у випадку, коли у суб'єкта є розлад, пов'язаний з TNF- α , такий як гостре або хронічне запалення або інший різновид анемії, викликаной хронічним захворюванням.

Для вивчення впливу сполук за даним винаходом на вироблення ЕРО після того, як клітини піддалися впливу запального цитокіну TNF- α (тобто, у клітинах, що вже піддалися впливу TNF- α) виконують серію експериментів. Отже, у цих експериментах передача сигналу TNF- α ініційована до додавання інгібітору пролілгидроксилази. Клітини Нер3В обробляють TNF- α у різних концентраціях (0, 0,4, 2, 10нг/мл) протягом 2 годин, після чого до клітинної культури додають сполуку А і сполуку В у різних концентраціях. Рівні секретованого ЕРО визначають, як описано вище, через три дні після додавання сполук.

Як показано на Фіг.2А і 2В, сполука А і сполука В дозволяють перебороти інгібуючий вплив TNF- α на вироблення ЕРО, що проявляється після 2-годинної попередньої обробки клітин Нер3В TNF- α . Ці дані показують, що сполуки й способи за да-

ним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО в клітинах, що піддалися впливу TNF- α . Ці результати також означають, що обробка сполуками за даним винаходом представляє корисний спосіб збільшення вироблення ЕРО й лікування анемії у суб'єкта, у якого вироблення ЕРО подавлене TNF- α .

Додавання сполук за даним винаходом істотно зменшує інгібуючий вплив TNF- α на вироблення ЕРО. Отже, сполуки й способи за даним винаходом застосовні для лікування або профілактики анемії, викликаной захворюваннями, які пов'язані з підвищеними рівнями TNF- α , наприклад, запальними розладами.

Приклад 2: Подолання інгібуючого впливу IL-1 β на вироблення ЕРО.

Клітини Нер3В протягом 3 днів обробляють IL-1 β у різних концентраціях (0, 0,4, 2, 10нг/мл) за відсутності або в присутності сполуки А або сполуки В. Рівні секретованого ЕРО визначають, застосовуючи комерційний доступний комплект ELISA kit (R&D Systems, catalog no. DEP00). За відсутності сполук обробка клітин Нер3В IL-1 β знижує вироблення ЕРО, причому зниження залежить від дози. Клітини Нер3В, оброблені або сполукою А (Фіг.3А), або сполукою В (Фіг.3В) у різних концентраціях за відсутності IL-1 β показують залежне від дози збільшення вироблення ЕРО. Додавання кожної із сполук за наявності IL-1 β істотно зменшує інгібуючий вплив IL-1 β на вироблення ЕРО. Подолання інгібуючого впливу IL-1 β на вироблення ЕРО за рахунок інгібування пролілгидроксилази спостерігається в присутності низької (наприклад, 0,4нг/мл) і високої (наприклад, 10нг/мл) концентрації IL-1 β . Отже, інгібуючий вплив запального цитокіну IL-1 β на вироблення ЕРО переборюється за рахунок інгібування активності пролілгидроксилази із застосуванням сполук і способів за даним винаходом. Одержані результати передбачають, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО в присутності запального цитокіну IL-1 β . Далі, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО й, отже, для лікування анемії у суб'єкта, наприклад, коли у суб'єкта є розлад, пов'язаний з IL-1 β , такий як гостре або хронічне запалення або інший різновид анемії, викликаной хронічним захворюванням.

Для вивчення впливу сполук за даним винаходом на вироблення ЕРО після того, як клітини піддалися впливу запального цитокіну IL-1 β (тобто в клітинах, що вже піддалися впливу IL-1 β), здійснюють серію експериментів. Отже, у цих експериментах передача сигналу IL-1 β ініційована до додавання інгібітору пролілгидроксилази. Клітини Нер3В протягом 2 годин обробляють IL-1 β у різних концентраціях (0, 0,4, 2, 10нг/мл), після чого до клітинної культури додають сполуку А і сполуку В у різних концентраціях. Рівні секретованого ЕРО визначають, як описано вище через три дні після додавання сполук.

Як показано на Фіг.4А і 4В, сполука А і сполука В дозволяють перебороти інгібуючий вплив IL-1 β на вироблення ЕРО, що проявляється після 2-годинної попередньої обробки клітин Нер3В IL-1 β .

Ці дані показують, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для збільшення вироблення ЕРО в клітинах, що піддалися впливу IL-1 β . Ці результати також означають, що обробка сполуками за даним винаходом представляє корисний спосіб збільшення вироблення ЕРО й лікування анемії у суб'єкта, у якого вироблення ЕРО подавлене IL-1 β .

Додавання сполук за даним винаходом істотно зменшує інгібуючий вплив IL-1 β на вироблення ЕРО. Отже, сполуки й способи за даним винаходом застосовні для лікування або профілактики анемії, пов'язаної з IL-1 β , наприклад, при запальних розладах.

Приклад 3: Інгібування експресії VCAM-1, індукованої TNF- α .

Адгезійна здатність ендотеліальних клітин відносно лімфоцитів виникає, зокрема, за рахунок експресії ендотеліальними клітинами молекул адгезії васкулярних клітин (VCAM-1). Експресія VCAM-1 в ендотеліальних клітинах викликана різними запальними цитокінами, як, наприклад, TNF- α . Для дослідження впливу інгібування HIF-пролілгідроксилази на експресію VCAM-1, індуковану TNF- α клітини HUVEC (ендотеліальні клітини пупкової вени людини) протягом 1 дня стимулюють TNF- α за відсутності або в присутності сполуки В або сполуки С у різних концентраціях. Потім вимірюють експресію VCAM.

Як показано на Фіг.5, TNF- α (1нг/мл) індукує експресію VCAM-1 у клітинах HUVEC. Однак додавання сполуки В або сполуки С до клітин, стимульованих TNF- α , приводить до залежного від дози інгібування експресії VCAM-1, індукованої TNF- α . Ці дані показують, що способи й сполуки за даним винаходом ефективні при зниженні експресії VCAM-1, пов'язаної із запальним цитокіном TNF- α . Далі цей результат означає, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для інгібування експресії VCAM-1, пов'язаної з різними запальними й аутоімунними захворюваннями, наприклад, такими як анемія, викликана хронічним захворюванням.

Приклад 4: Інгібування експресії VCAM-1, індукованої IL-1 β .

Експресія VCAM-1 в ендотеліальних клітинах також викликана запальним цитокіном IL-1 β . Для дослідження впливу інгібування HIF-пролілгідроксилази на експресію VCAM-1, індуковану IL-1 β , клітини HUVEC (ендотеліальні клітини пупкової вени людини) протягом 1 дня стимулюють IL-1 β за відсутності або в присутності сполуки В або сполуки С у різних концентраціях. Потім вимірюють експресію VCAM.

IL-1 β (1нг/мл) індукує експресію VCAM-1 у клітинах HUVEC. Однак додавання сполуки В або сполуки С до клітин, стимульованих IL-1 β приводить до залежного від дози інгібування експресії VCAM-1, індукованої IL-1 β . (Дані не показані). Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом ефективні при зниженні експресії VCAM-1, пов'язаної із запальним цитокіном IL-1 β . Далі цей результат означає, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для інгібування експресії VCAM-1, пов'язаної з різними запальними й аутоімунними захворюваннями,

наприклад, такими як анемія, викликана хронічним захворюванням.

Приклад 5: Інгібування експресії VCAM-1 на ендотеліальних клітинах, індукованої TNF- α і IL-1 β .

Клітини HUVEC обробляють контрольним розчином носія або сполукою В, або сполукою С у різних концентраціях (0, 20, 40, 80мкм) протягом 24 годин. Потім клітини промивають і після цього стимулюють або 1нг/мл TNF- α , або 1нг/мл IL-1 β протягом 4 годин. Після цього вимірюють експресію VCAM-1 на поверхні клітин за допомогою способу ELISA на основі клітин.

Як показано на Фіг.25, попередня обробка інгібіторами пролілгідроксилази зменшує стимулювання експресії VCAM-1 на поверхні клітин, пов'язаної із запальними цитокінами TNF- α і IL-1 β . Ці результати показують, що сполуки й способи за даним винаходом інгібують запальну дію TNF- α і IL-1 β , а також інгібують експресію на клітинній поверхні молекул адгезії, які важливі для опосередкування гетероклітинної адгезії лейкоцитів. Інгібування адгезії лейкоцитів обробкою сполуками за даним винаходом, представляє ефективні способи зменшення запальних каскадних реакцій, знижуючи, тим самим, запалення й зменшуючи результат запалення, пов'язаний з обмеженням вироблення ЕРО й інгібуванням еритропоезу.

Приклад 6: Інгібування експресії Е-селектину, індукованої TNF- α .

Ендотеліальний Е-селектин належить до сімейства селектинів, тобто молекул клітинної адгезії, які опосередковують первісне прикріплення лейкоцитів до ендотеліальних клітин судин у випадку запалення. IL-1, TNF- α і ліпополісахариди можуть індукувати експресію Е-селектину. [Див., наприклад, Bevilacqua et al. (1987) Proc Natl Acad Sci USA 84:9238-9242 і Bevilacqua і van Furth (1993) J Leukoc Biol 54:363-378]. Для дослідження впливу інгібування HIF-пролілгідроксилази на індуковану TNF- α експресію Е-селектину, клітини HUVEC протягом 1 дня стимулюють TNF- α у концентрації 1нг/мл за відсутності або в присутності сполуки В або сполуки С у різних концентраціях. Потім вимірюють експресію Е-селектину й VCAM.

Як показано на Фіг.24А і 24В, сполука В або сполука С демонструють залежне від дозування інгібування індукованої TNF- α експресії VCAM і Е-селектину в клітинах HUVEC. На Фіг.24А і 24В дані представлені як відсотки інгібування експресії VCAM і Е-селектину, спостережувані у відповідь на різні концентрації сполуки В (Фіг.24А) або сполуки С (Фіг.24В). Більш ніж 60% інгібування експресії VCAM і Е-селектину спостерігається в клітинах HUVEC, оброблених 50мкм розчином сполуки В або сполуки С. Ці дані показують, що способи й сполуки за даним винаходом ефективні при зниженні експресії VCAM і Е-селектину в ендотеліальних клітинах, пов'язаної із запальним цитокіном TNF- α . Одержані результати далі означають, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для інгібування експресії VCAM і Е-селектину, пов'язаної з різними запальними й аутоімунними розладами, наприклад, такими як анемія, викликана хронічним захворюванням. Крім цього, інгібування експресії ендотеліальними клітинами моле-

кул адгезії, включаючи VCAM і Е-селектин, за допомогою способів і сполук за даним винаходом представляє способи зменшення первинних явищ при запаленні судин.

Приклад 7: Інгібування експресії Е-селектину, індукованої IL-1 β .

Для дослідження впливу інгібування HIF-пролілгідроксилази на індуковану IL-1 β експресію Е-селектину клітини HUVEC протягом 1 дня стимулюють IL-1 β у концентрації 1нг/мл за відсутності або в присутності сполуки В або сполуки С у різних концентраціях. Потім вимірюють експресію Е-селектину.

Сполука В або сполука С демонструє залежне від дозування інгібування індукованої IL-1 β експресії Е-селектину в клітинах HUVEC. (Дані не показані). Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом ефективні при зниженні експресії Е-селектину в ендотеліальних клітинах, пов'язаної із запальним цитокином IL-1 β . Одержані результати далі означають, що сполуки й способи за даним винаходом застосовні для інгібування експресії Е-селектину, пов'язаної з різними запальними й аутоімунними розладами, наприклад, такими як анемія, викликана хронічним захворюванням. Крім цього, інгібування експресії ендотеліальними клітинами молекул адгезії, включаючи VCAM і Е-селектин, за допомогою способів і сполук за даним винаходом представляє способи зменшення первинних явищ при судинному запаленні.

Приклад 8: Інгібування експресії Е-селектину, індукованої TNF- α , IL-1 β і IFN- γ .

Клітини HUVEC обробляють контрольним розчином носія або сполукою В або сполукою С у різних концентраціях протягом 24 годин. Клітини промивають і після цього стимулюють або 1нг/мл TNF- α , або 1нг/мл IL-1 β , або поєднанням TNF- α , IL-1 β і IFN- γ , 1нг/мл кожного, протягом 4 годин. Потім вимірюють експресію Е-селектину на поверхні клітин за допомогою способу ELISA на основі клітин.

Як показано на Фіг.26, попередня обробка клітин HUVEC сполукою В або сполукою С інгібує експресію Е-селектину на поверхні клітин, індуковану запальними цитокинами TNF- α або IL-1 β . Крім цього, попередня обробка кожною із сполук зменшує експресію Е-селектину в присутності трьох запальних цитокінів, які, як відомо, підсилюють експресію Е-селектину (TNF- α , IL-1 β і IFN- γ). Ці результати показують, що представлені сполуки блокують запальну дію TNF- α , IL-1 β і IFN- γ на ендотеліальній клітині, що показано на прикладі інгібування експресії на поверхнях клітин молекул адгезії, які опосередковують згортання лейкоцитів на активованому ендотелії. Оскільки адгезія лейкоцитів до активованого ендотелію за допомогою Е-селектину являє собою первісну стадію збереження каскадного запального процесу, інгібування згортання лейкоцитів шляхом інгібування експресії Е-селектину, представляє спосіб зменшення каскадної запальної реакції, що додатково обмежує вироблення ЕРО й пригнічує еритропоез.

Приклад 9: Синергічне збільшення вироблення ЕРО.

Клітини Нер3В обробляють IL-6 у різних концентраціях (0, 0,1, 1, 10нг/мл) за відсутності або в присутності сполуки А або сполуки В у різних концентраціях (3мкм, 10мкм, 30мкм) протягом 1 або 3 днів. Рівні секретованого ЕРО визначають, застосовуючи комерційний доступний комплект ELISA kit (R&D Systems, catalog no. DEP00). За відсутності сполук за даним винаходом обробка клітин Нер3В IL-6 впливає на вироблення ЕРО. Як показано на Фіг.27А і 27В, клітини Нер3В, оброблені IL-6, демонструють злегка збільшену експресію ЕРО в порівнянні з необробленими клітинами. Конкретно, рівні вмісту ЕРО в контрольних клітинах становлять приблизно 20мМЕ/мл, тоді як у клітинах, оброблених IL-6 з концентрацією 10нг/л, рівні становлять 50мМЕ/мл.

Клітини Нер3В, оброблені сполукою А або сполукою В, за відсутності IL-6, демонстрували збільшення рівнів ЕРО залежно від дозування. Проте, клітини Нер3В, оброблені сполукою А або сполукою В, за присутності IL-6, демонстрували значне збільшення рівнів вмісту ЕРО. (Див. Фіг.27А і 27В). Вплив на вироблення ЕРО обробки сполуками за даним винаходом в присутності IL-6 є синергічним. Наприклад, клітини Нер3В, оброблені IL-6 з концентрацією 10нг/л, показують рівні ЕРО приблизно 50мМЕ/мл. Обробка клітин Нер3В 10мм сполуки А або сполуки В за відсутності IL-6 приводить до рівнів 60мМЕ/мл і 220мМЕ/мл відповідно. За присутності 10нг/моль IL-6 додавання сполуки А і сполуки В збільшує рівні ЕРО до приблизно 270мМЕ/мл і до більш ніж 400мМЕ/мл, відповідно. Отже, сполуки за даним винаходом разом з IL-6 діють синергічно при індукуванні експресії ЕРО в гепатоцитах.

Приклад 10: Подолання індукованого цитокинами інгібування передачі сигналу рецептора ЕРО.

Лінія клітин TF-1 (еритролейкемія людини; ATCC cat #CRL-2003) стимулюється до розмноження у відповідь на додавання ЕРО. У присутності різних прозапальних цитокінів, ЕРО-опосередковане збільшення проліферації клітин TF-1 послаблюється. Для визначення впливу інгібування пролілгідроксилази на проліферацію клітин TF-1, клітини TF-1 обробляють прозапальними цитокинами, IL-1 β , TNF- α і IFN- γ у різних концентраціях за відсутності або в присутності інгібіторів пролілгідроксилази й вимірюють ЕРО-опосередковану проліферацію клітин у такий спосіб. Три ямки, заповнені клітинами, культивованими в 96-ямковому мікротитрувальному планшеті, інкубують у безсироватковому середовищі за відсутності або в присутності ЕРО протягом 24 годин. Протягом останніх 4 годин культивування в кожну ямку додають 1мкКюрі тимідину, міченого тритієм (³H-TdR; Amersham). Реактивність клітин відносно передачі сигналу рецептора ЕРО визначають шляхом вимірювання проліферації клітин. Проліферацію клітин вимірюють, визначаючи кількість ³H-TdR, що увійшов до складу клітин, спочатку руйнуючи клітини водою й потім збираючи ДНК на нейлонові фільтри в колекторі клітин (харвестері).

З іншого боку, як ЕРО-чутливі клітини застосовують суспензію окремих клітин селезінки, одержану із тварин, які були піддані впливу фенілгідразину, що веде до переважання в селезінці ЕРО-

чутливих клітин-попередників. Після цього визначають ЕРО-опосередковану проліферацію *ex vivo*, як описано вище.

Обробка клітин TF-1 ЕРО приводить до зростання клітинної проліферації, що визначено по збільшенню кількості тритійвмісного тимідину у складі клітин. Додавання прозапальних цитокінів IL-1 β , TNF- α або IFN- γ до клітин TF-1, оброблених ЕРО, приводить до зниження реактивності у відношенні ЕРО, що приводить до зменшення проліферації клітин. Визначено вплив додавання сполук за даним винаходом на інгібіторний вплив прозапальних цитокінів на Еро-опосередковану проліферацію клітин TF-1. Виміряний по збільшуваному вмісту тритійвмісного тимідину ріст проліферації клітин TF-1, оброблених ЕРО й прозапальними цитокінами, показує, що сполуки й способи за даним винаходом дозволяють перебороти інгібуючий вплив прозапальних цитокінів на Еро-опосередковане збільшення проліферації клітин.

Приклад 11: Збільшення експресії рецептора трансферину Вплив сполук за даним винаходом на експресію рецептора трансферину досліджують у такий спосіб. Різні клітини (Нер3В, НерG2, НК-2) інкубують із сполукою А або сполукою В протягом 1 дня. Потім клітини досліджують з метою визначення експресії рецептора трансферину за допомогою аналізу FACS (fluorescent-activated cell sorter - клітинний сортер зі збудженням флуоресценції), застосовуючи антитіла CD71-PE (Ancell, catalog no. 223-050). Результати показані нижче в таблиці 1.

Таблиця 1

Тип клітин	Обробка	Середнє FL
Нер3В	DMSO	40,21
	Сполука А	40,89
	Сполука В	42,43
НерG2	DMSO	49,59
	Сполука А	56,52
	Сполука В	53,53
НК-2	DMSO	10,80
	Сполука А	12,20
	Сполука В	18,92

Як показано в таблиці 1, додавання до клітин різних сполук за даним винаходом збільшує експресію рецептора трансферину. Інгібування процесу HIF-пролілгідроксилювання із застосуванням інгібіторів пролілгідроксилази за даним винаходом збільшує експресію рецептора трансферину в клітинах. Збільшення експресії рецептора трансферину при застосуванні інгібіторів пролілгідроксилази за даним винаходом спостерігається в клітинах печінки (наприклад, Нер3В, НерG2), клітинах нирок (наприклад, НК-2) і лімфоцитах (наприклад, ТНР-1). Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення експресії рецептора трансферину в різних типах клітин. Крім цього, збільшена експресія рецептора трансферину могла б привести до збільшення ендцитозу трансферину, зв'язаного із тривалентним залізом, який опосередкований рецептором трансферину, і збільшення, тим самим, транспорту, використання,

накопичення й метаболізму заліза. Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для поліпшення еритропоезу за рахунок збільшення транспорту, використання, накопичення й метаболізму заліза.

Приклад 12: Збільшення експресії рецептора трансферину й поглинання заліза *in vitro*.

Вплив сполук за даним винаходом на поглинання заліза в клітинах визначають у такий спосіб. Первинні моноцити й макрофаги, а також клітинні лінії моноцитів і макрофагів (наприклад, ТНР-1) протягом одного, двох і трьох днів обробляють інгібіторами пролілгідроксилази в різних концентраціях. Потім клітини досліджують на наявність рецептора трансферину на їх поверхні, застосовуючи флуоресцентне імунне фарбування й цитометрію в потоці. Результати, які показують, що додавання інгібіторів пролілгідроксилази збільшує експресію рецепторів трансферину на поверхні клітин, указують на ефективність інгібування пролілгідроксилази з метою збільшення зв'язування трансферину із клітинами й, отже, з метою зв'язування заліза. Зміну поглинання заліза клітинами, які оброблені інгібіторами пролілгідроксилази, визначають у такий спосіб. Клітини обробляють сполукою у присутності ізотопу ^{59}Fe . Збільшення поглинання заліза клітинами, які оброблені інгібіторами пролілгідроксилази, визначають шляхом вимірювання кількості ^{59}Fe , зв'язаного клітинами. Збільшення кількості ^{59}Fe , зв'язаного клітинами, указує на зросле поглинання заліза клітинами.

Приклад 13: Збільшення рівнів вмісту й активності залізорегуляторного білка-2.

Регуляція поглинання, накопичення й використання заліза відбувається, частково, за рахунок експресії й активності ключових білків, залучених у метаболізм заліза, включаючи діючі в транспозиції білки, відомі як залізорегуляторні білки (IRPs). IRP-1 і IRP-2 керують стабільністю й трансляцією мРНК шляхом зв'язування з особливими залізочутливими фрагментами в різних мРНК або білках, залучених у метаболізм заліза, по суті, впливаючи, тим самим, на всі аспекти метаболізму заліза. Дефіцит заліза збільшує активність IRP, приводячи до збільшення експресії рецептора трансферину й зменшення експресії феритину. Подібним чином, у присутності заліза, зменшується активність IRP, що приводить до зменшення експресії рецептора трансферину й збільшення експресії феритину.

Для дослідження впливу сполук за даним винаходом на різні аспекти метаболізму заліза виконується наступний експеримент. Клітини миші Нера-1 обробляють інгібіторами пролілгідроксилази протягом 48 годин. Потім клітини збирають і аналізують клітинні лізати для визначення експресії IRP-2 за допомогою імуноблотинга, застосовуючи специфічні для IRP-2 антитіла (Alpha Diagnostic International Inc., San Antonio TX). Результати, які показують підвищення рівнів IRP-2 у цитоплазмі, яке іде за додаванням сполук за даним винаходом, демонструють, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення рівнів IRP і, отже, метаболізму заліза.

Вплив сполук за даним винаходом на активність IRP-2, виміряну по зміні експресії феритину й трансферину, визначають у такий спосіб. Макрофаги мишей лінії клітин RAW 264.1 обробляють інгібіторами пролілгідроксилази протягом періоду до 48 годин. Потім клітини збирають і аналізують для визначення експресії білків трансферину й феритину за допомогою імуноблотинга (ADI, catalogue #IRP21-S). Зменшення рівнів експресії феритину й збільшення рівнів експресії трансферину, що іде за інгібуванням пролілгідроксилази, показує, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для стабілізації й збільшення активності IRP-2. Збільшена експресія IRP-2 знижує експресію феритину, який відповідає за тривале зберігання заліза, і збільшує експресію трансферину й рецептора трансферину, що сприяє поглинанню, транспорту й використанню заліза й, таким чином, поліпшує еритропоез. За рахунок збільшення експресії й активності IRP-2 способи й сполуки за даним винаходом застосовні для зменшення експресії феритину й пов'язаного з ним довгострокового накопичення заліза, а також для збільшення експресії трансферину й рецептора трансферину. Таким чином, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення поглинання, транспорту й використання заліза, і, отже, застосовні для поліпшення еритропоезу.

Приклад 14: Поліпшення використання заліза.

Перед внутрішньовенною ін'єкцією цитрату заліза, міченого радіоактивним ізотопом ^{59}Fe (Amersham), щурам вводять або наповнювач для контролю, або інгібітори HIF-пролілгідроксилази. Серійні зразки крові відбирають із хвостової вени й у сцинтиляційному лічильнику вимірюють загальну вільну радіоактивність плазми й радіоактивність, пов'язану з еритроцитами, для виявлення транспорту заліза й включення заліза в гем еритроцитів і синтез гемоглобіну. Збільшення зв'язаного еритроцитами ^{59}Fe показує, що сполуки за даним винаходом застосовні для поліпшення використання заліза, необхідного для синтезу гему, вироблення гемоглобіну й еритропоезу.

Приклад 15: Поліпшення експресії еритропоетинових генів *in vivo*.

Клітини Нер3В (ATCC No. HB-8064) вирощують в DMEM, що містить 8% сироватку зародків теляти. Клітини Нер3В висівають в 6-якмовий планшет для культивування в кількості приблизно 500000 клітин на лунку. Через 8 годин середовище заміняють на DMEM, що містить 0,5% сироватки зародків теляти, клітини інкубують протягом ще 16 годин. До клітин додають сполуку В і сполуку D (кінцева концентрація 25мкМ) і клітини інкубують протягом різних періодів часу. Контрольні клітини (не оброблені сполуками, доданий тільки ДМСО) збирають через 0, 6 і 48 годин. У зібраних клітинах оцінюють життєздатність (GUAVA) або додають їх до буфера для екстракції РНК (Rneasy, Qiagen) і зберігають при -20°C для наступного очищення РНК. Генерують репліки мікроматриць, використовуючи РНК, виділену з експериментів по реплікації, які проводять в інші дні. Загальну РНК виділяють із клітин, застосовуючи Rneasy kit (Qiagen).

Осаджують РНК в 0,3М ацетаті натрію (pH 5,2), 50нг/мл глікогені й 2,5 об'ємах етанолу протя-

гом однієї години при -20°C . Зразки центрифугують, осад промивають холодним 80% етанолом, висушують і повторно суспендують у воді. Дволапцюгову кДНК синтезують, використовуючи праймер першого ланцюга T7-(dT)24 (Affymetrix, Inc., Santa Clara CA) і систему SUPERScript CHOICE (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Одержану кДНК екстрагують еквівалентним об'ємом суміші 25:24:1 фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт, застосовуючи вставку PHASE LOCK GEL (Brinkman, Inc., Westbury NY). Водні фази збирають і осаджують кДНК, використовуючи 0,5 об'єму 7,5М ацетату амонію й 2,5 об'єму етанолу. З іншого боку кДНК очищають, застосовуючи модуль очищення зразків GENECHIP (Affymetrix) відповідно до інструкцій виробника.

Мічену біотином кДНК синтезують із кДНК в *in vitro* реакції трансляції (IVT), застосовуючи комплект для внесення міток в транскрипти РНК BIOARRAY High Yield RNA transcript labelling kit (Enzo Diagnostics, Inc., Farmingdale NY) відповідно до інструкцій виробника. Одержаний мічений продукт очищають і фрагментують, застосовуючи модуль очищення зразків GENECHIP (Affymetrix) відповідно до інструкцій виробника.

Суміш для гібридизації одержують внесенням 5мкг проби в суміш 100мкл їх буфера для гібридизації (100мМ MES, 1М $[\text{Na}^+]$, 20мМ EDTA, 0,01% Tween 20), 100мкг/мл ДНК сперми оселедця, 500мкг/мл ацетилованого BSA, 0,03нМ контрольного oligo B2 (Affymetrix) і їх GENECHIP еукаріотичного контролю гібридизації (Affymetrix). Суміш послідовно інкубують при 99°C протягом 5 хвилин і при 45°C протягом 5 хвилин і потім центрифугують протягом 5 хвилин. Матрицю The Human Genome U133 array (Affymetrix) доводять до кімнатної температури й потім попередньо гібридизують з їх буфером для гібридизації при 45°C протягом 10 хвилин при обертанні. Потім буфер заміняють 80мкл суміші для гібридизації й матрицю гібридизують протягом 16 годин при 45°C і 60об/хв. із протигаю. Після гібридизації матриці один раз промивають 6х SSPE, 0,1% Tween 20 і потім промивають і офарблюють, застосовуючи R-флюороеритринспражений стрептавідин (Molecular Probes, Eugene OR), козяче антитіло проти стрептавідину (Vector Laboratories, Burlingame CA) і GENECHIP Fluidics Station 400 instrument (Affymetrix) відповідно до протоколу виробника micro_1v1 (Affymetrix). Матриці аналізують, застосовуючи сканер GENEARRAY (Affymetrix) і програмне забезпечення Microarray Suite (Affymetrix).

Матриця The Human Genome U133 array (Affymetrix) представляє всі послідовності в базі даних Human Unigene database Build 133 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD), що включають приблизно 14500 добре охарактеризованих генів людини.

За якістю РНК стежать за допомогою капілярного електрофорезу (Agilent Bioanalyzer). Суміші для гібридизації одержують, як описано (Affymetrix), і гібридизують на матриці Affymetrix Human U133A array, що містять 22283 набору зондів. Результати обробки матриці аналізують за допомогою програмного забезпечення Affymetrix

MicroArray Suite (MAS), і індивідуальним наборам зондів приписують статуси «є присутнім», «є в невеликій кількості» і «відсутній», відповідно до установок програмного забезпечення за замовчуванням. Статистичний аналіз і відфільтровані списки наборів зондів одержують, застосовуючи програмне забезпечення GeneSpring (Silicon Genetics). Критерій відсічення «експресується» для наборів зондів використовує сполучення статусу "P" і абсолютної величини експресії, одержаної з убудованої моделі помилок даних програми GeneSpring. Дані нормалізують по усереднених контрольних зразках.

Як показано нижче в таблиці 2, у клітинах Нер3В, оброблених сполуками за даним винаходом, зростає експресія генів, що кодують еритропоетичні білки (числа в таблиці показують, у скільки разів виросли рівні мРНК у порівнянні з контролем). (Два значення, відзначених у випадку церулоплазміну для кожних умов, наведені нижче в таблиці 2). Конкретно, експресія генів церулоплазміну й рецептора трансферину 2 зростає в клітинах Нер3В, оброблених різними сполуками за даним винаходом.

Таблиця 2

Сполука	Час	Церулоплазмін (CP)	Рецептор трансферину (TFR2)
D	6год.	2,06/2,387	Не визначений
B	1год.	1,142/0,946	0,575
B	3год.	1,123/0,955	0,558
B	6год.	1,555/1,103	0,822
B	12год.	2,366/2,507	1,253
B	24год.	5,136/4,909	2,522
B	48год.	5,82/4,678	4,169

Приклад 16: Дозування тваринам.

Тварини, використані в наступних прикладах, включають чоловічі особини мишей Swiss Webster (30-32г), чоловічі особини щурів Sprague Dawley (200-350г) і жіночі особини щурів Lewis Simonsen, одержаних в Inc. (Gilroy CA), Charles River (Hollister, CA) або Harlan. Тварин утрмують із застосуванням стандартних методик, причому вода і їжа доступні тваринам вільно. Під час введення препаратів стежать за зміною маси тіла тварин і ознаками явної токсичності й смертності.

Сполуки в основному вводять перорально за допомогою примусового харчування або IV введення. Тварини, яких піддають примусовій годівлі, одержують карбоксиметилцелюлозу (CMC; Sigma-Aldrich, St. Louis MO) в об'ємі 4-10мл/кг або 0,5% з або без 0,1% полісорбату 80 (Об мг/кг/день) або ж дози, що змінюються, сполук за даним винаходом (наприклад, інгібіторів HIF-пролілгидроксилази) в 0,5% CMC з або без 0,1% полісорбату 80, причому застосовуються різні режими дозування. В процесі введення препаратів через відповідні проміжки часу відбирають зразки крові з, наприклад, хвостової вени (щуре) або черевної вени, або за допомогою пункції серця (миші або щуре). В основному тварин піддають анестезії за допомогою ізофлурану, і зразки крові збирають у пробірки сепаратора сироватки MICROTAINER (Becton-Dickinson, Franklin Lakes NJ). Для вимірювання вмісту компонентів сироватки, пробірки інкубують при кімнатній температурі протягом 30 хвилин і потім центрифугують при 8000об/хв. при 4°C протягом 10 хвилин. Потім фракції сироватки піддають обробці й аналізують на наявність певних компонентів, наприклад, заліза (аналіз виконаний Quality Clinical Labs, Mountain View, CA). Для визначення гематокриту зразки крові збирають у пробірки MICROTAINER EDTA-2K (Becton-Dickinson); потім EDTA-кров втягують у капілярні трубки 75мм×1,1-1,2мм I.D. (Chase Scientific Glass, Inc., Rockwood TN) прибли-

зно до 3/4 довжини, один кінець трубки закупорюють ущільнювачем CRITOSEAL (Sherwood Medical Company) і трубки піддають центрифугуванню в центрифугі J-503M MICROHEMATOCRIT (Jorgensen Laboratories, Inc., Loveland CO) при 12000об/хв. протягом 5 хвилин. Величину гематокриту зчитують проти карти зчитування. Після цього, здійснюють повний клінічний аналіз крові, включаючи рівні гемоглобіну в крові, число ретикулоцитів і гематокрит, аналіз виконаний Quality Clinical Labs (Mountain View, CA).

Наприкінці кожного дослідження тварин безболісно умертвляють, наприклад, знекровлюють під загальною анестезією, або тварини вмирають від ядухи в атмосфері CO₂, і відбирають зразки органів і тканин. Тканини або фіксують у формаліні з нейтральним буфером, або зберігають замороженими при -70°C. Тканини для геномного аналізу поміщають в RNeasy (спеціальний реагент).

Приклад 17: Збільшення експресії генів, що кодують білки, які належать до процесингу заліза in vivo.

Чоловічих особин миші Swiss Webster піддають, як описано вище, впливу однієї дози 0,5% CMC (Sigma-Aldrich) (0мг/кг) або 100мг/кг сполуки А. Через 4, 8, 16, 24, 48 або 72 години після введення тварин піддають анестезії, умертвляють, відокремлюють зразки тканин нирок, печінки, мозку, легенів і серця й зберігають у розчині RNALATER (Ambion) при -80°C. В іншому експерименті протягом 4 послідовних днів тварин піддають впливу доз 0,5% CMC (0мг/кг/день), 7мг/мл сполуки А в 0,5% CMC (30мг/кг/день) або 25мг/мл сполуки А в 0,5% CMC (100мг/кг/день). Через чотири години після введення останньої дози тварин піддають анестезії, умертвляють, відбирають приблизно по 150мг тканин печінки й кожної із нирок і зберігають у розчині RNALATER (Ambion) при -20°C.

Виділення РНК виконують, здійснюючи наступну методику. Частину кожного органа розрізають на шматочки, додають 875мкл буфера RLT (комплект RNEASY kit; Qiagen Inc., Valencia CA), і одержані шматочки гомогенізують протягом приблизно 20 секунд, застосовуючи роторно-статорний гомогенізатор POLYTRON (Kinematica, Inc., Cincinnati OH). Гомогенат піддають мікроцентрифугуванню протягом 3 хвилин для осадження нерозчинних речовин, надосадову рідину переносять у нову пробірку й виділяють РНК, застосовуючи комплект RNEASY kit (Qiagen) відповідно до інструкцій виробника. РНК елюють 80мкл води й визначають кількість за допомогою реагенту RIBOGREEN (Molecular Probes, Eugene OR). Вимірюють поглинання на довжинах хвиль 260 і 280нм для визначення чистоти й концентрації РНК.

З іншого боку, зразки тканин ріжуть на шматочки й гомогенізують у реагенті TRIzol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad CA), застосовуючи роторно-статорний гомогенізатор POLYTRON (Kinematica). Гомогенати доводять до кімнатної температури, додають 0,2 об'єми хлороформу, і зразки енергійно перемішують. Суміші інкубують при кімнатній температурі протягом декількох хвилин і потім центрифугують при 12000g протягом 15хв. при 4°C. Водні фази збирають і додають 0,5 об'єми ізопропанолу. Зразки перемішують, інкубують при кімнатній температурі протягом 10хв. і центрифугують протягом 10 хвилин при 12000g при 4°C. Рідину над осадом видаляють, осад промивають 75% EtOH і центрифугують при 7500g протягом 5 хвилин при 4°C. Вимірюють поглинання на довжинах хвиль 260 і 280нм для визначення чистоти й концентрації РНК.

РНК осаджують в 0,3М ацетаті натрію (рН 5,2), 50нг/мл глікогену й 2,5 об'ємах етанолу протягом 1 години при -20°C. Зразки центрифугують і осад промивають холодним 80% етанолом, потім висушують і повторно суспендують у воді. Дволанцюгову кДНК синтезують, застосовуючи праймер першого ланцюга T7-(dT)24 (Affymetrix, Inc., Santa Clara CA) і систему SUPERScript CHOICE (Invitrogen) відповідно до інструкцій виробника. Одержану кДНК екстрагують еквівалентним об'ємом суміші 25:24:1 фенол:хлороформ:ізоаміловий спирт, застосовуючи вставку PHASE LOCK GEL (Brinkman, Inc., Westbury NY). Водні фази збирають і осаджують кДНК, використовуючи 0,5 об'єми 7,5М ацетату амонію й 2,5 об'єми етанолу. З іншого боку кДНК очищають, застосовуючи модуль очищення зразків GENECHIP (Affymetrix) відповідно до інструкцій виробника.

Мічену біотином кДНК синтезують із кДНК in vitro реакції трансляції (IVT), застосовуючи комплект для внесення міток у транскрипти РНК BIOARRAY High Yield RNA transcript labelling kit (Enzo Diagnostics, Inc., Farmingdale NY) відповідно до інструкцій виробника. Одержаний мічений продукт очищають і фрагментують, застосовуючи модуль очищення зразків GENECHIP (Affymetrix) відповідно до інструкцій виробника.

Суміш для гібридизації одержують внесенням 5мкг проби в суміш 100мкл їх буфера для гібридизації (100мМ MES, 1М [Na⁺], 20мМ EDTA, 0,01%

Tween 20), 100мкг/мл ДНК сперми оселедця, 500мкг/мл ацетилованого BSA, 0,03нМ контрольного oligo B2 (Affymetrix) і їх GENECHIP еукаріотичного контролю гібридизації (Affymetrix). Суміш послідовно інкубують при 99°C протягом 5 хвилин і при 45°C протягом 5 хвилин, і потім центрифугують протягом 5 хвилин. Матрицю мишачого геному Murine genome MOE430Aplus2 array (Affymetrix) доводять до кімнатної температури й потім попередньо гібридизують з їх буфером для гібридизації при 45°C протягом 10 хвилин при обертанні. Потім буфер заміняють 80мкл суміші для гібридизації й матрицю гібридизують протягом 16 годин при 45°C і 60об/хв. із противагою. Після гібридизації матриці один раз промивають 6х SSPE, 0,1% Tween 20 і потім промивають і офарблюють, застосовуючи R-флюоресцентноспряжений стрептавідин (Molecular Probes, Eugene OR), козяче антитіло проти стрептавідину (Vector Laboratories, Burlingame CA) і GENECHIP Fluidics Station 400 instrument (Affymetrix) відповідно до протоколу виробника EukGE-WS2v4 (Affymetrix). Матриці аналізують, застосовуючи сканер GENEARRAY (Affymetrix) і програмне забезпечення Microarray Suite (Affymetrix).

Матриця мишачого геному Murine genome MOE430Aplus2 array (Affymetrix) представляє всі послідовності в базі даних Murine UniGene database Build 107 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD), що включають приблизно 14000 добре охарактеризованих мишачих генів.

Наведена нижче таблиця 3 показує експресію мРНК церулоплазміну в нирках миші після введення сполуки А. Дані нормовані за середнім значенням, що спостерігалось у контрольних тварин, які не одержували зазначеної сполуки.

Таблиця 3

Умови експерименту	Церулоплазмін (Відносні рівні мРНК)
Сполуки не вводилися	0,81
СМС контроль	1,26
Сполука А - 4 години	1,16
Сполука А - 8 годин	1,39
Сполука А - 16 годин	1,22
Сполука А - 24 години	2,45
Сполука А - 48 годин	1,44
Сполука А - 72 години	2,10

Наведені вище в таблиці 3 дані демонструють, що способи и сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення експресії гена церулоплазміну. Церулоплазмін, відомий також як фероксидоза-1, перетворює відновлену форму заліза, що виділяється з місць його накопичення (таких як феритин) в окиснену форму. Окиснена форма заліза здатна зв'язуватися з білком плазми, що здійснює транспорт заліза, тобто із трансферіном. Дефіцит церулоплазміну пов'язаний з накопиченням заліза в печінці й інших тканинах. Існують докази того, що церулоплазмін сприяє відтоку заліза з печінки й припливу заліза в залізодефіцитні клітини. [Див., наприклад, Tran et al. (2002) J Nutr 132:351-356].

Наведена нижче таблиця 4 показує експресію мРНК гепсидину в печінці мишей після введення сполуки А. Дані нормовані по величинах, які спо-

стерігалися у контрольних тварин, які не одержували зазначеної сполуки.

Таблиця 4

Умови /Дослідження тварини	Час	Гепсидин (відносні рівні мРНК)
Контрольне	-	1,0
I-мультивисока доза	-	0,275
II-мультивисока доза	-	0,703
II-мультинизька доза	-	0,129
III	4 години	0,672
III	8 годин	0,305
III	16 годин	0,119

Як показано вище в таблиці 4, введення сполуки А приводить до зменшення експресії мРНК гепсидину в печінці миші. Зменшення експресії гепсидину пов'язане зі збільшенням виділення заліза з ретикулоендотеліальних клітин і збільшенням поглинання заліза в кишечнику.

Фіг.6А показує відносні рівні експресії рецептора трансферину (сірі стовпчики) у нирках, а також транспортера заліза дванадцятипалої кишки NRAMP2 (природний резистентнозв'язаний білок макрофагів 2) (відомий також як S1c11a2 (сімейство переносників розчинних речовин 11, пов'язаний із протоном транспортер іонів двовалентних металів член 2) по-іншому іменований DCT1 (транспортер двовалентних катіонів 1), DMT1 (транспортер двовалентних металів 1)) (чорні стовпчики).

В іншому експерименті мРНК виділяють із малої кишки, відбираючи зразок через 4 години після IV введення миші 60мг/кг сполуки А, сполуки В і сполуки С. Одержують проби від кожної із двох тварин з 5 груп, яких піддали обробці, і гібридизують з мишачими мікроматрицями Affymetrix MOE430Aplus2 (одна тварина на матрицю). Проводять статистичне порівняння даних, одержаних з матриць оброблених і необроблених тварин. Фіг.6В показує відносні рівні експресії мРНК NRAMP2 у тонкому кишечнику у тварин, яких піддали впливу сполуки А, сполуки В і сполуки С. Рівні експресії для кожного експресуючого гена показані у вигляді кратності по відношенню до контролю, тобто необробленим тваринам. Результати цих експериментів показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення експресії NRAMP2 у кишечнику. Крім того, ці результати означають, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення абсорбції заліза й, за рахунок цього, для збільшення доступності заліза, для синтезу гемму, синтезу гемоглобіну, вироблення червоних кров'яних тілець і еритропоезу.

Фіг.6С показує кратності перевищення експресії 5-амінолевулінатсинтази (ALAS-2) в тваринах, яких піддали дії сполук, у порівнянні з контрольними тваринами, яким вводять носій. Дані показують, що введення інгібіторів пролілгідроксилази нормальним тваринам приводить до збільшення експресії генів, що приймають участь у метаболізмі заліза, включаючи гени, залучені в абсорбцію заліза з кишечника й транспорт заліза на периферії через рецептори трансферину. Експресія цих генів наведе-

дена щодо вихідних рівнів (контролю) через 16 годин після введення дози. Дані також демонструють узгоджену експресію ALAS-2, тобто першого ферменту на шляху синтезу гемму, а також швидкість визначального ферменту в цьому синтезі, у характерних тканинах, після впливу інгібітору пролілгідроксилази. Сукупність цих результатів показує, що сполуки за даним винаходом узгоджено збільшують експресію генів, що кодують білки, які залучені в активацію еритропоезу, включаючи абсорбцію заліза, транспорт заліза й синтез гемму.

З іншого боку застосовують цитометричний аналіз у потоці для вимірювання поверхневих маркерів клітин макрофагів CD11c і рівнів рецептора трансферну в подвійних периферичних моноядерних клітинах крові, пофарбованих з використанням імунної мітки. Активність застосованих для обробки сполук показана завдяки тому, що виявлено збільшення експресії рецептора трансферину макрофагами. Крім цього плазма може бути зібрана й досліджена відносно рівнів трансферину із застосуванням комерційно доступного набору для ELISA, [Див., наприклад, KomaBiotech, Korea].

Приклад 18: Посилення еритропоезу in vivo

Вплив введення сполук за даним винаходом на еритропоез визначають у такий спосіб. Нормальних мишей перетворюють на анемічних й підтримують їх в анемічному стані шляхом постійного введення TNF- α , причому подібний режим, як відомо, інгібує еритропоез через недостатнє вироблення й передачу сигналів EPO, у відповідь на присутність TNF- α . Після того, як у мишей викликана анемія протягом періоду від однієї до чотирьох тижнів тваринам вводять інгібітори пролілгідроксилази. Тканини досліджують на вироблення BFU-E і CFU-E, і аналізують зразки крові, визначаючи її склад. Результати, що показують збільшення числа BFU-E і CFU-E у кістковому мозку, селезінці й на периферії й/або збільшення вмісту в сироватці гемоглобіну, ретикулоцитів, а також збільшення гематокриту у тварин, яких піддали впливу PHIs (інгібіторів пролілгідроксилази), демонструють ефективність даного способу.

Інша експериментальна тваринна модель застосовна для вивчення впливу введення інгібіторів пролілгідроксилази на еритропоез. У цій моделі у трансгенних мишей у результаті конститутивно надлишкової експресії TNF- α розвивається анемія, викликана хронічним захворюванням. Після початку анемії у даних мишей їм вводять інгібітори про-

лілігдроксилази протягом різних періодів часу й використовуючи різні стратегії дозування. Потім відбирають і аналізують зразки тканин і крові. Як зазначено вище, результати, що показують збільшення числа BFU-E і CFU-E у кістковому мозку, селезінці й на периферії й/або збільшення вмісту в сироватці гемоглобіну, ретикулоцитів, а також збільшення гематокриту, ефективно доводять, що анемія, пов'язана з надлишковим виробленням TNF- α у трансгенних тварин, лікується введенням

інгібіторів пролілігдроксилази, із застосуванням способів і сполук за даним винаходом.

Приклад 19: Збільшення рівнів заліза в сироватці.

Чоловічих і жіночих особин щурів двічі на тиждень (понеділок і четвер) піддають впливу сполуки А в різних концентраціях (0, 20, 60 або 150мг/кг) протягом 93 днів. Визначають загальні рівні заліза в сироватці.

Таблиця 5

Доза	Залізо в сироватці (мкг/дл) Самці щурів (середнє \pm ст.відх.)	Залізо в сироватці (мкг/дл) Самки щурів (середнє \pm ст.відх.)
0мг/кг	158 \pm 37	342 \pm 91
20мг/кг	198 \pm 64	505 \pm 41*
60мг/кг	357 \pm 111*	445 \pm 46*
150мг/кг	307 \pm 142*	399 \pm 117

Як показано в таблиці 5, введення сполуки А збільшує рівні заліза в сироватці як у чоловічих, так і в жіночих особин. (Дані в таблиці 5 представлені у вигляді рівнів заліза в сироватці+стандартне відхилення, * означає значну різницю рівнів заліза в сироватці в порівнянні із тваринами, які не піддавалися дії сполуки А). Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення рівнів заліза в сироватці й, тим самим, застосовні для лікування розладів, пов'язаних з дефіцитом заліза.

Приклад 20: Ефективність у тваринних моделях з анемією, викликаною хронічним захворюванням/ослабленим еритропоезом/ослабленим метаболізмом заліза.

Анемія, викликана хронічним захворюванням (ACD), пов'язана з різними запальними станами, включаючи артрит, неопластичне захворювання й інші розлади, пов'язані із хронічним запаленням. Для дослідження результатів стабілізації HIF як модель ACD використовують захворювання у щурів, застосовуючи способи й сполуки за даним винаходом при лікуванні анемії, пов'язаної із хронічним захворюванням. У цій моделі у щурів провокують виникнення ACD за допомогою пептидогліканполісахаридних полімерів. [Див., наприклад, Sartor et al. (1989) Infection and Immunity 57:1177-1185]. При цьому у тварин на початкових стадіях розвивається сильна гостра анемія, за якою на більш пізніх стадіях іде помірно сильна хронічна мікроцитарна анемія.

Тваринна модель ACD - серія експериментів 1:

Жіночим особинам щурів Lewis масою близько 160г уводять PG-PS IDS (Lee Laboratories, 15мкг/г ваги тіла, інтраперитонеально).

PG-PS 10S містить очищені пептидогліканполісахаридні полімери, виділені із клітинної стінки *Streptococcus pyogenes*, Group A, штам D58. Артрити й анемії дозволяють розвиватися протягом 35 днів. На 35-й день із хвостової вени під загальною анестезією (ізофлуран) відбирають зразки крові (приблизно 400мкл) для проведення CBC і визначення кількості ретикулоцитів (виконано Quality Clinical Labs). Тварин, у яких сформувався рівень гематокриту 45% або вище, вважають не анемічними й знімають із дослідження.

На 35 день після введення PG-PS анемічні тварини одержують тільки носій або їм уводять сполуку А (60мг/кг, PO) протягом двох послідовних днів на тиждень протягом двох тижнів. Автоматизований повний аналіз крові (CBC) виконують на 35 день (див. вище), 39, 42 і 49 дні, рівні заліза в сироватці вимірюють на 49 день.

Кількість ретикулоцитів

Як показано на Фіг.7, введення сполуки А анемічним тваринам збільшує кількість ретикулоцитів на 39 день (тобто через 5 днів після початку введення сполуки А). Рівні ретикулоцитів становлять приблизно 2% і 4% від червоних кров'яних тілець у контрольних тварин (не анемічних) і анемічних (оброблених PG-PS) тварин, відповідно. Однак, рівень ретикулоцитів у тварин, яких піддали впливу сполуки А, становить приблизно 10% від кількості червоних кров'яних тілець. Вплив сполуки А збільшує кількість ретикулоцитів у тварин з анемією. Отже, сполука А стимулює еритропоез у тваринній моделі ACD.

Гематокрит

У анемічних тварин, яких піддали впливу сполуки А, зростають значення гематокриту. Рівні гематокриту (вимірні за допомогою Baker 9000 в Quality Clinical Labs) у анемічних тварин (оброблених PG-PS) становлять менше 35%, у порівнянні з 41% у контрольних не анемічних тварин. (Див. Фіг.8). Введення анемічним тваринам сполуки А збільшує значення гематокриту до 37% тільки за перші 5 днів після початку впливу сполуки. Після введення другої дози сполуки А рівні гематокриту зростають до приблизно 40%, тобто стають порівнянними з рівнями гематокриту, які спостерігаються у контрольних не анемічних тварин. При використанні щурів як моделі ACD сполука А збільшує гематокрит у модельних тварин. Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення гематокриту й лікування анемії, викликаної хронічним захворюванням.

Гемоглобін

Крім цього, введення сполуки А збільшувало рівні гемоглобіну у анемічних тварин. Як показано на Фіг.9, на 35 день контрольні не анемічні тварини мають рівень гемоглобіну приблизно 15г/дл, у той час як рівні гемоглобіну у тварин, яких піддали

впливу PG-PS (тобто анемічних тварин) становлять приблизно 13г/дл. Як показано на Фіг.9, сполука А збільшує рівні гемоглобіну у анемічних тварин уже в перші 5 днів (39 день) після введення сполуки. Рівні гемоглобіну залишаються підвищеними на 49 день, досягаючи рівнів, порівнянних з контрольними не анемічними тваринами, і показуючи, що сполука за даним винаходом відновлюють нормальні рівні гемоглобіну у анемічних тварин. Ці результати показують, що сполука А підвищує гемоглобін у анемічних тварин, при використанні щурів як моделі ACD. Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення гемоглобіну й лікування анемії, викликані хронічним захворюванням.

Кількість червоних кров'яних тілець

Крім цього, введення сполуки А збільшує кількість червоних кров'яних тілець у анемічних тварин. Як показано на Фіг.10, кількість червоних кров'яних тілець зростає у анемічних тварин, яких піддали впливу сполуки А, у порівнянні із тваринами, яких не піддали такому впливу, уже в перші 5 днів після початку введення сполуки (тобто 39 день на Фіг.10). Сполука А збільшує кількість червоних кров'яних тілець у анемічних тварин, при використанні щура як моделі ACD. Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення кількості червоних кров'яних тілець і лікування анемії, викликані хронічним захворюванням.

Середній корпускулярний об'єм

У порівнянні з не анемічними тваринами анемічні тварини показують зменшення середнього корпускулярного об'єму. (Див. Фіг.11). Анемічні тварини, яких піддали впливу сполуки А, показують збільшення середнього корпускулярного об'єму в порівнянні із тваринами, яким сполука не вводилася, уже в перші 5 днів після введення сполуки (день 39 на Фіг.11).

Середній корпускулярний об'єм у оброблених тварин залишався підвищеним у порівнянні з неопрацьованими анемічними тваринами протягом усього експерименту. Ці результати показують, що сполука А поліпшує (тобто зменшує) рівень мікроцитозу (мікроцитемію, тобто наявність великого числа мікроцитів - аномально малих червоних кров'яних тілець, пов'язаних з різними формами анемії). Отже, способи й сполуки за даним винаходом поліпшують/знижують мікроцитоз при анемії, викликані хронічним захворюванням.

Середній корпускулярний гемоглобін

У анемічних тварин також спостерігаються знижені рівні середнього корпускулярного гемоглобіну. Як показано на Фіг.12, вплив на анемічних тварин сполуки А збільшує рівні середнього корпускулярного гемоглобіну, вище рівнів, що спостерігаються у анемічних тварин, яким сполуку не вводять. Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення рівнів середнього корпускулярного гемоглобіну.

Тваринна модель ACD - серія експериментів 2:

Жіночим особинам щурів Lewis за допомогою ін'єкції вводять PG-PS (інтраперитонеально). Дають розвиватися артрити й анемії протягом 28 днів. Тваринам вводять сполуку А шляхом приму-

сового харчування через рот двічі на тиждень (понеділок і четвер) протягом шести тижнів, відповідно на 28, 31, 35, 38, 42, 45, 49, 52, 56, 59, 63, 66 і 70 дні після ін'єкції PG-PS.

Цільну кров відбирають через хвостову вену для CBC аналізу на 28, 42, 56 і 70 дні. Крім цього відбирають сироватку на 70 день для аналізу зв'язування заліза. CBC і аналіз зв'язування заліза здійснений Quality Clinical Labs (Mountain View, CA).

Гематокрит

Через 28 днів після введення PG-PS рівні гематокриту у тварин знижені. Фіг.13 показує, що тварини, яким ін'єктовано PG-PS, є анемічними, рівень гематокриту становить 85% від рівня гематокриту у тварин, яким PG-PS не вводили (тобто не анемічних тварин). (Тиждень 0 на Фіг.13 відповідає 28 дню в даній методиці експерименту). При впливі сполуки А (40мг/кг) тварини, яким не вводили PG-PS (тобто не анемічні тварини), згодом демонструють збільшення рівнів гематокриту, до значень більше 110%, відносно тварин, яким не вводили ні PG-PS, ні сполуку А. Як показано на Фіг.13, введення сполуки А анемічним тваринам приводить до збільшення рівнів гематокриту.

Гемоглобін

Введення сполуки А підвищує рівні гемоглобіну, як у анемічних, так і у не анемічних тварин. Як показано на Фіг.14, рівні гемоглобіну у не анемічних тварин, яких піддали впливу сполуки А (40мг/кг), збільшуються приблизно до 110% від рівнів у контрольних тварин, яких не піддавали впливу. (Тиждень 0 на Фіг.14 відповідає 28 дню в даній методиці експерименту). У анемічних тваринні рівні гемоглобіну зростають при введенні сполуки А двічі на тиждень у кількості 10мг/кг, 20мг/кг або 40мг/кг. Рівні гемоглобіну продовжують зростати протягом, як мінімум, 4 тижнів.

Кількість червоних кров'яних тілець

Кількість червоних кров'яних тілець у анемічних тварин менше, ніж у не анемічних тварин. Конкретно, кількість червоних кров'яних тілець у анемічних тварин становить менше 90% відносно аналогічного показника, спостережуваного у не анемічних тварин на 28 день після ін'єкції PG-PS. Як показано на Фіг.15, кількість червоних кров'яних тілець збільшується у анемічних тварин, яких піддали впливу сполуки А, у порівнянні із тваринами, які не піддавалися дії цієї сполуки. (Тиждень 0 на Фіг.15 відповідає 28 дню в даній методиці експерименту). Збільшення кількості красних кров'яних тілець спостерігається протягом 2 тижнів після введення сполуки, і ця кількість продовжує зростати протягом 6-ти тижневого періоду експерименту.

Середній корпускулярний об'єм

Анемічні тварини демонструють зниження середнього корпускулярного об'єму в порівнянні з не анемічними (яким не вводили PG-PS) тваринами. Як показано на Фіг.16, середній корпускулярний об'єм у тварин, яким вводили PG-PS, продовжує зменшуватися із часом, демонструючи, що наслідки анемії, викликані хронічним захворюванням, призводять до мікроцитарної анемії (яка відрізняється, зокрема, більш низькою кількістю червоних кров'яних тілець і їх меншим розміром) і до нездатності виробляти гемоглобін через те, що запаси

заліза недоступні для використання. (Тиждень 0 на Фіг.16 відповідає 28 дню в даній методиці експерименту). Введення сполуки А тваринам з анемією приводить до уповільнення зменшення середнього корпускулярного об'єму. Отже, інгібування пролілгидроксилази із застосуванням сполук і способів за даним винаходом є ефективним при ослабленні зменшення середнього корпускулярного об'єму, пов'язаного з анемією, викликану хронічним захворюванням, а також з анемією, викликану дефіцитом заліза, відновленні середнього корпускулярного об'єму, збереженні середнього корпускулярного об'єму й т.д. Крім цього, дані показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні з метою збільшення доступності накопиченого заліза для його використання при виробленні гемоглобіну.

Середній корпускулярний гемоглобін

Тварини з анемією мають знижені рівні середнього корпускулярного гемоглобіну в порівнянні з контрольними тваринами, показуючи, що анемія, викликана хронічним захворюванням, впливає на вироблення гемоглобіну. Як показано на Фіг.17, анемічні тварини, яким уведена сполука А, із часом демонструють уповільнення зменшення рівнів середнього корпускулярного гемоглобіну. (Тиждень 0 на Фіг.17 відповідає 28 дню в даній методиці експерименту).

Стан заліза - залізо в сироватці й насичення трансферину

Пацієнти з анемією, викликану хронічним захворюванням, із клінічної точки зору відрізняються зниженою концентрацією заліза в плазмі й зниженим насиченням трансферину. Визначають вплив сполук за даним винаходом на рівні заліза в сироватці й насичення трансферину у нормальних і анемічних тварин. При використанні тваринної моделі анемії, викликану хронічним захворюванням, провокують розвиток анемії у щурів за допомогою ІР ін'єкції пептидогліканполісахаридних полімерів, як описано вище. Артриту й анемії дають розвинути протягом 28 днів. Потім тварин піддають впливу сполуки А в різних концентраціях двічі на тиждень протягом 6 тижнів. Визначення рівнів заліза в сироватці й насичення трансферину здійснене Quality Clinical Labs.

Як показано на Фіг.18А, тварини з анемією (PG-PS) мають більш низькі рівні вмісту заліза в сироватці в порівнянні з не анемічними тваринами (імітація). Введення сполуки А приводить до збільшення рівнів заліза в сироватці як у анемічних (PG-PS), так і у не анемічних контрольних (імітація) тварин. Тварини, яких піддали впливу сполуки А, мають збільшене насичення трансферину, у порівнянні з не анемічними тваринами, що не одержували сполуку А, і в порівнянні з анемічними тваринами, що не одержували сполуку А. (Див. Фіг.18В). Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення рівнів заліза в сироватці й процентного насичення трансферину.

Абсорбція заліза

На 6 тижні введення сполуки А тваринам з анемією (40мг/кг, двічі на тиждень) виконують мікроматричний аналіз для визначення експресії генів, які кодують білки, включені в транспорт і абсо-

рбцію заліза в кишечнику. Мікроматричний аналіз виконують із застосуванням описаних вище методик, використовуючи матрицю The Rat Genome 230A array (Affymetrix), яка представляє всі послідовності в базі даних Rat Unigene database build 99 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD), що включають приблизно 4699 добре охарактеризованих генів щура, а також приблизно 10467 EST (Expression sequence tag) послідовностей і приблизно 700 не-EST послідовностей.

Як показано на Фіг.19, введення сполуки А контрольним тваринам збільшує експресію мРНК для NRAMP2 (незабарвлені стовпчики) і спрутину (чорні стовпчики). Анемічні тварини (PG-PS), яких не піддавали впливу сполуки А, мають знижені рівні експресії мРНК, як для NRAMP2, так і для спрутину. Ці результати показують, що анемія, викликана хронічним захворюванням, пов'язана зі зниженою експресією білків, включених у процес абсорбції заліза. Проте, анемічні тварини, яких піддали впливу сполуки А, демонструють збільшену експресію NRAMP2 і спрутину в кишечнику (Фіг.19). Ці результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для збільшення експресії генів, пов'язаних із транспортом і абсорбцією заліза. Крім цього, одержані результати означають, що сполуки за даним винаходом збільшують абсорбцію й транспорт заліза у здорових суб'єктів, а також у суб'єктів з анемією, викликану хронічним захворюванням.

Приклад 21: Поліпшення еритропоезу у людей.

Вплив інгібування пролілгидроксилази на еритропоез у людей вивчають у такий спосіб. Здійснюють пероральне введення сполуки А в кількості 20мг/кг два або три рази на тиждень здоровим добровольцям. У різний час після введення сполуки, у добровольців відбирають кров для визначення ЕРО, гемоглобіну, гематокриту, кількості червоних кров'яних тілець, розчинного рецептора трансферину й рівнів феритину в сироватці.

Кількість ретикулоцитів

Як показано на Фіг.20, введення людям сполуки А збільшує кількість ретикулоцитів вище контрольного рівня плацебо. Збільшення числа ретикулоцитів спостерігається у пацієнтів, яким вводять сполуку два або три рази на тиждень. У людей, яких піддали впливу сполуки А, рівні ретикулоцитів збільшуються більш ніж до 1,7% від кількості червоних кров'яних тілець, у порівнянні з рівнями, приблизно 1,4% у людей, яким не вводять сполуку А. Введення сполуки А збільшує кількість ретикулоцитів у людей. Отже, способи й сполуки за даним винаходом застосовні для поліпшення еритропоезу й, тим самим, для збільшення рівнів ретикулоцитів.

Гематокрит

У людей, яких піддали впливу сполуки А, зростають рівні гематокриту. У людей, яким сполуку А вводять двічі на тиждень протягом 3 тижнів, рівні гематокриту перевищують 46% у порівнянні з приблизно 44% у контрольних плацебо пацієнтів. Сполука А збільшує гематокрит у людей. Отже, сполуки й способи за даним винаходом застосовні

для поліпшення еритропоезу й, тим самим, для збільшення гематокриту.

Кількість червоних кров'яних тілець

Введення сполуки А збільшує кількість червоних кров'яних тілець у людей. Як показано на Фіг.21, у людей, яких піддавали впливу 20мг/кг сполуки А двічі або тричі на тиждень, кількість червоних кров'яних тілець збільшується в порівнянні із плацебо контрольними пацієнтами. Ці дані показують, що способи й сполуки за даним винаходом застосовні для поліпшення еритропоезу й, тим самим, для збільшення кількості червоних кров'яних тілець.

Стан заліза - розчинний рецептор трансферину й феритин у сироватці.

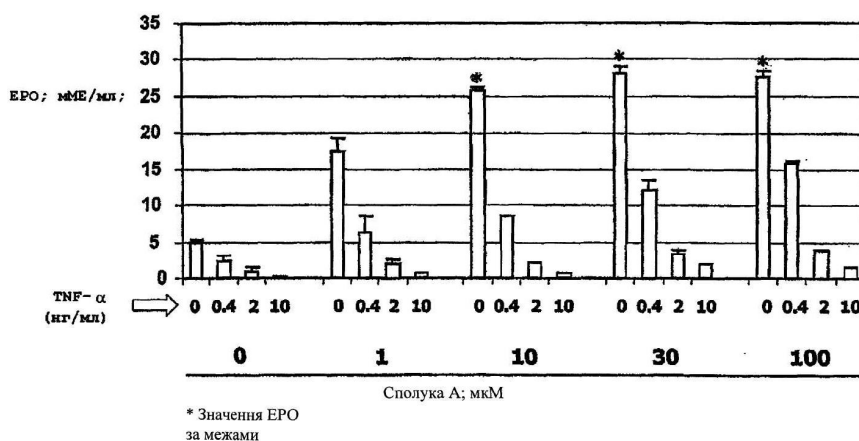
Представлені вище результати показують, що способи й сполуки за даним винаходом ефективні при збільшенні кількості ретикулоцитів, червоних кров'яних тілець, підвищенні гемоглобіну й гематокриту у людей. Як показано на Фіг.22, введення сполуки А людям збільшує рівні розчинного рецептора трансферину в порівнянні з рівнями, які спостерігаються у контрольних пацієнтів, яких не піддавали дії сполук. Збільшення рівнів розчинного рецептора трансферину спостерігається у людей, що одержували сполуки два або три рази на тиж-

день. Максимальна реакція 35% і 31% спостерігається на 21 день у пацієнтів, що одержували ліки двічі й тричі на тиждень, відповідно. Середні концентрації sTfR у плазмі у плацебо пацієнтів залишаються незмінними. Крім цього, у людей, яких піддали впливу сполуки А, рівні феритину в сироватці знижуються приблизно на 46%, що служить ознакою зростаючого споживання заліза у цих пацієнтів (Див. Фіг.23).

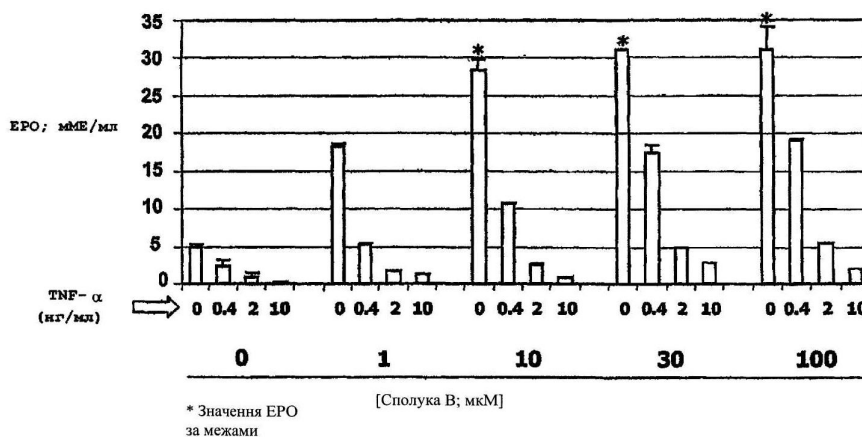
Сукупність наведених даних показує, що стабілізація HIF із застосуванням сполук і способів за даним винаходом приводить до збільшення мобілізації запасів заліза, збільшення транспорту заліза в кістковий мозок і збільшення споживання заліза для синтезу гемоглобіну, еритропоезу й вироблення червоних кров'яних тілець.

Різні модифікації даного винаходу, додатково до тих, які представлені й описані в даній заявці, будуть очевидні фахівцям в даній галузі техніки з попереднього опису. Мається на увазі, що такі модифікації попадають у межі доданої формули винаходу.

Всі джерела, цитовані в даній заявці, цим включені в заявку у всій повноті за допомогою посилаючого.

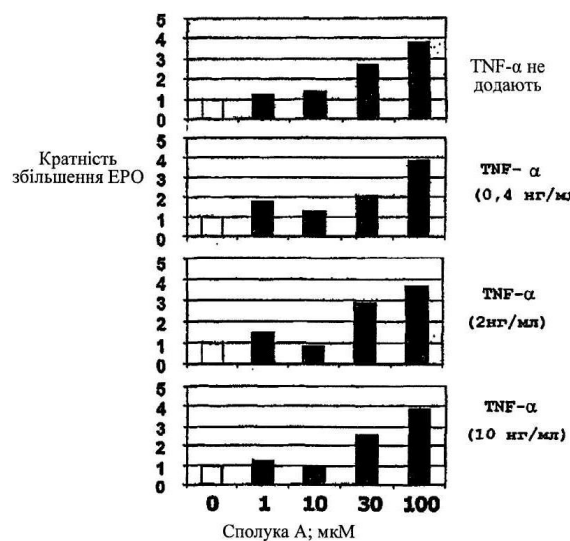


Фіг. 1А

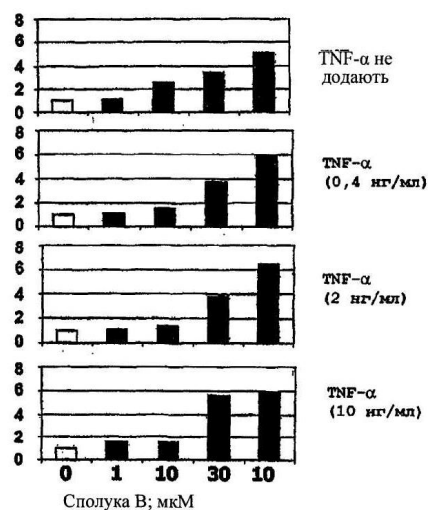


Фіг. 1В

Сполуку А додають через
2 години після TNF- α

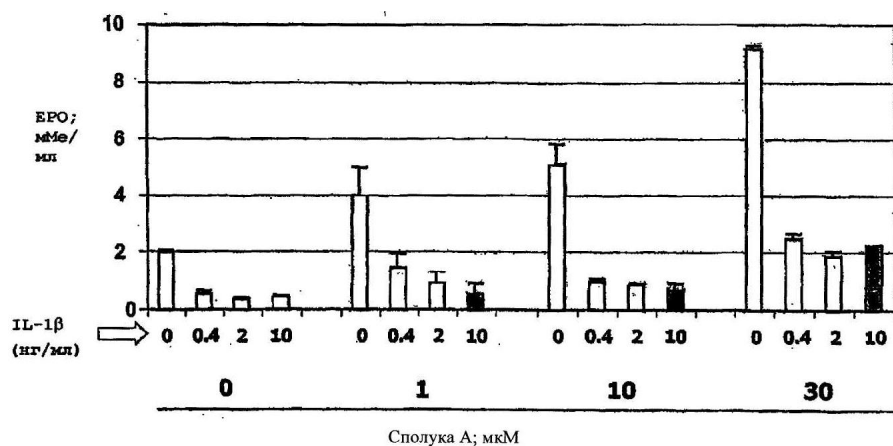


Сполуку А додають через
2 години після TNF- α

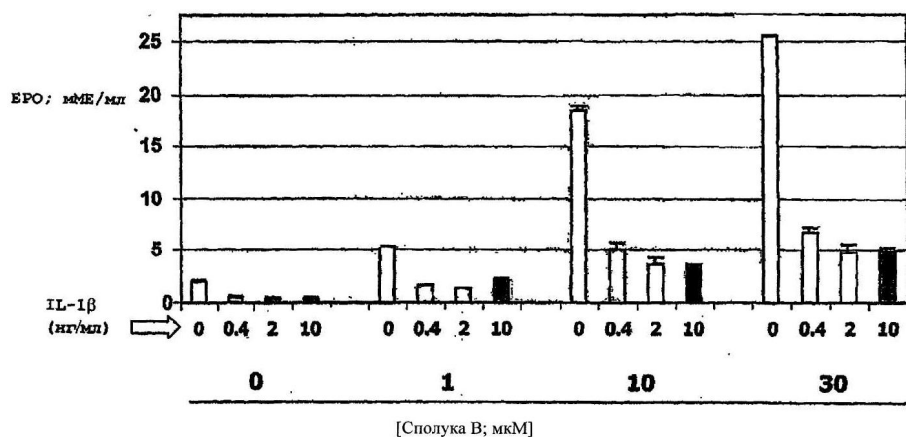


Фіг. 2А

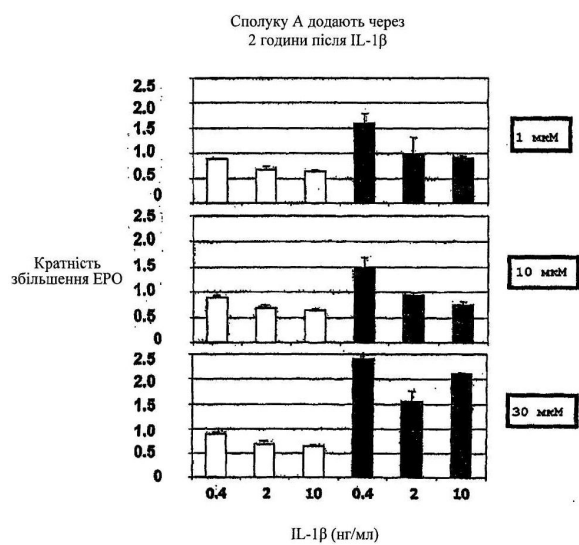
Фіг. 2В



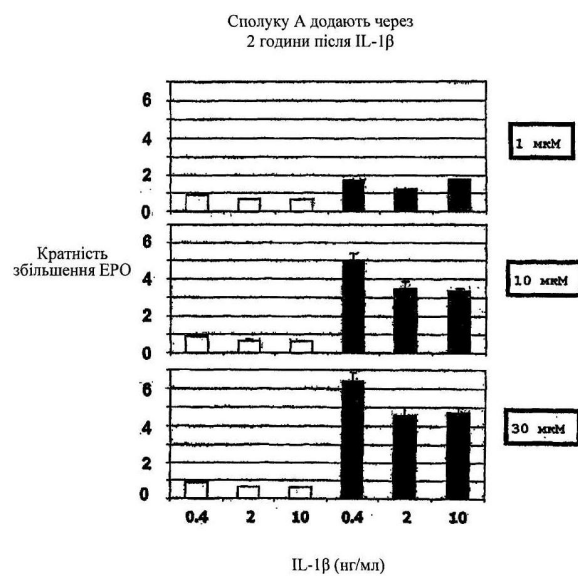
Фіг. 3А



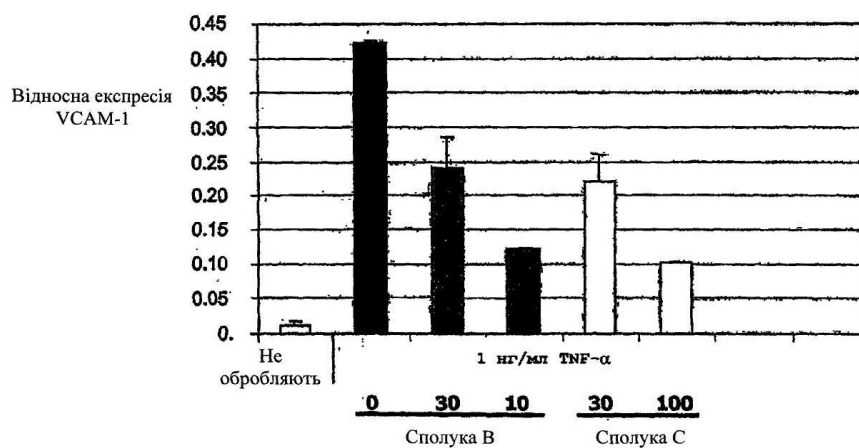
Фіг. 3В



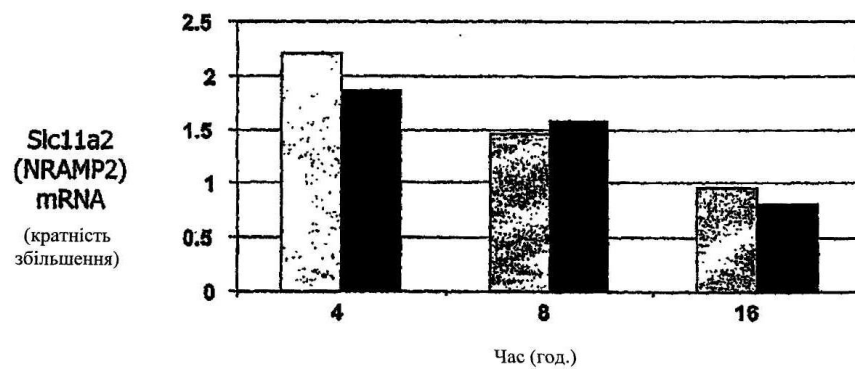
Фіг. 4А



Фіг. 4В

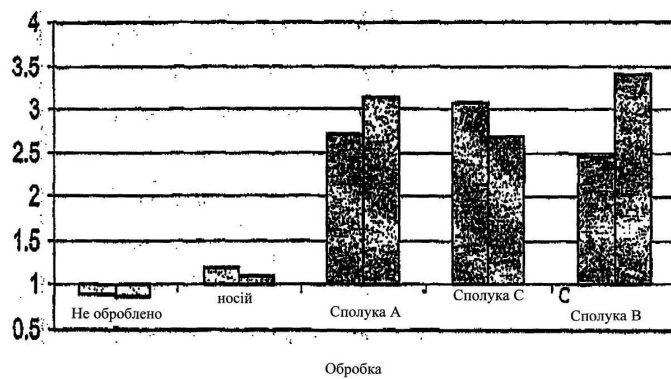


Фіг. 5



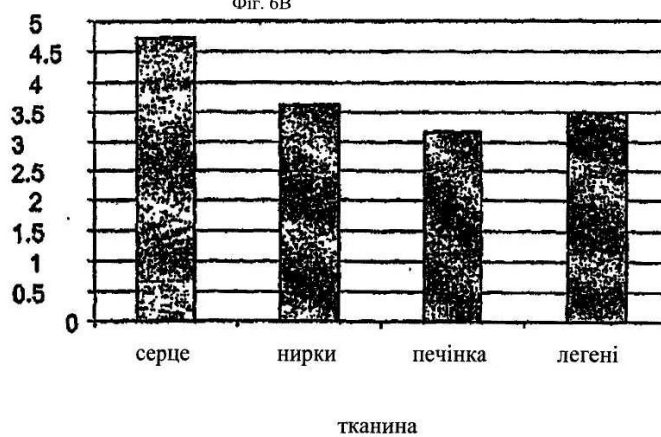
Фіг. 6А

мРНК Slc11a2 (NRAMP2)
(кратність змінення)



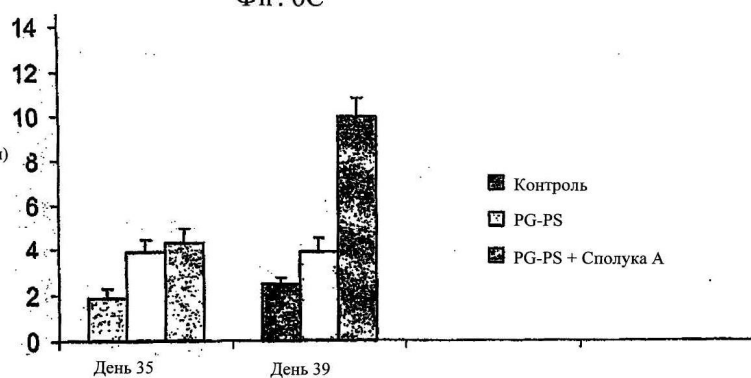
Фіг. 6В

мРНК ALAS-2
(кратність збільшення)



Фіг. 6С

Ретикулоцити
(% від червоних кров'яних клітин)

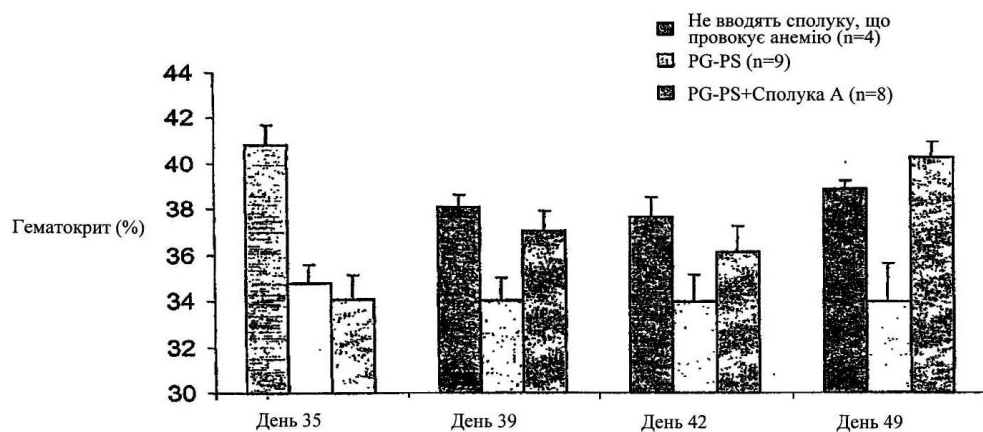


Фіг. 7

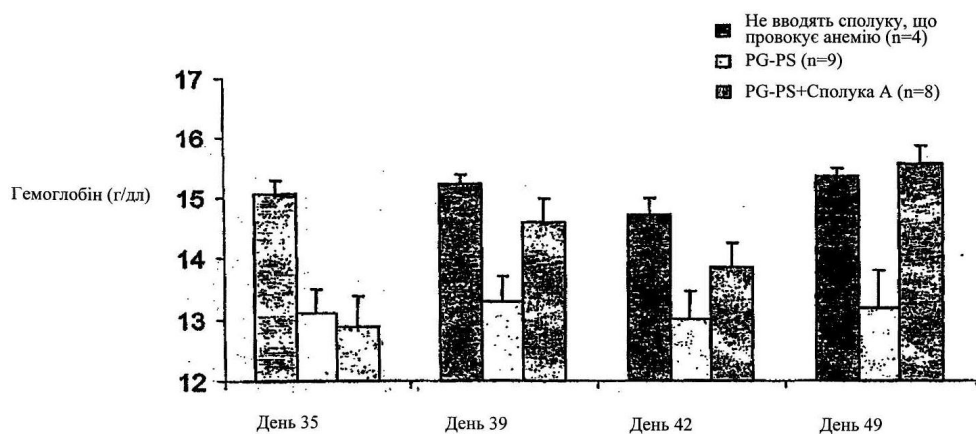
95

87109

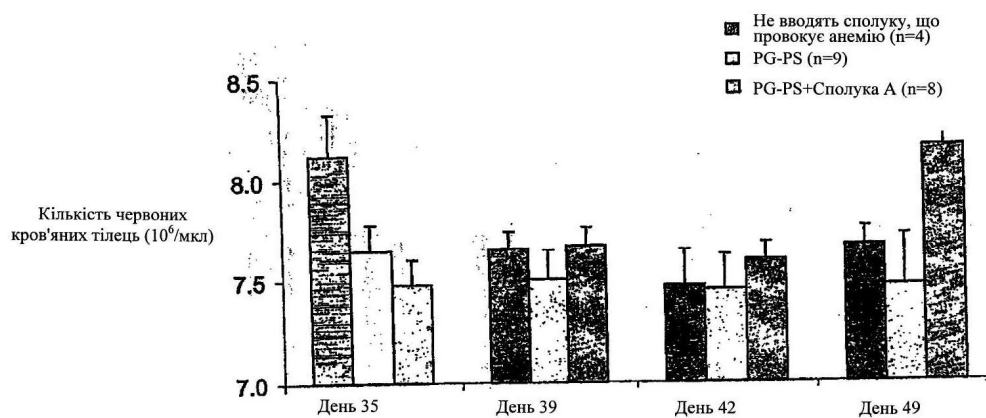
96



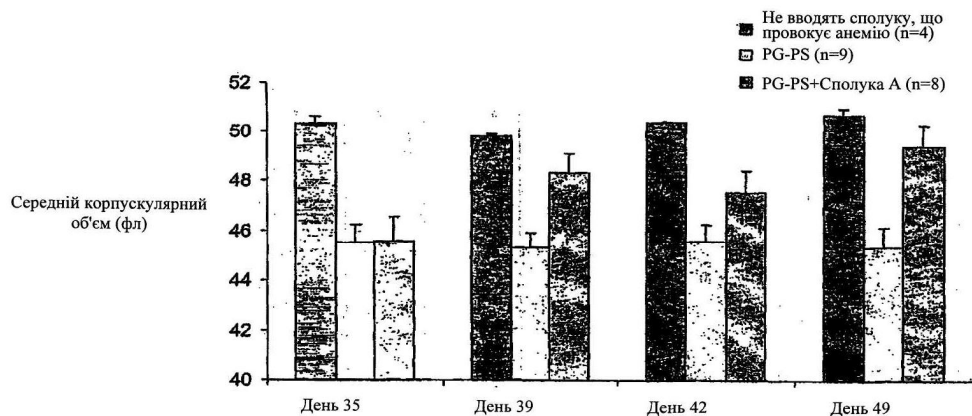
Фіг. 8



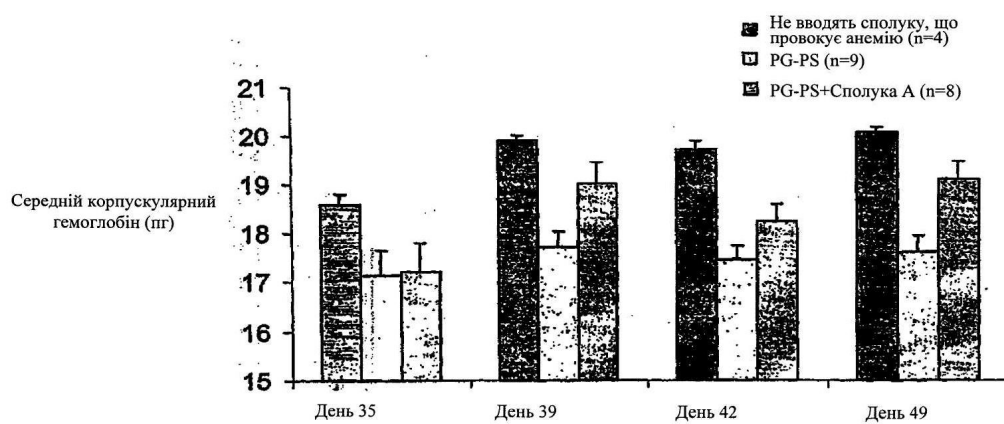
Фіг. 9



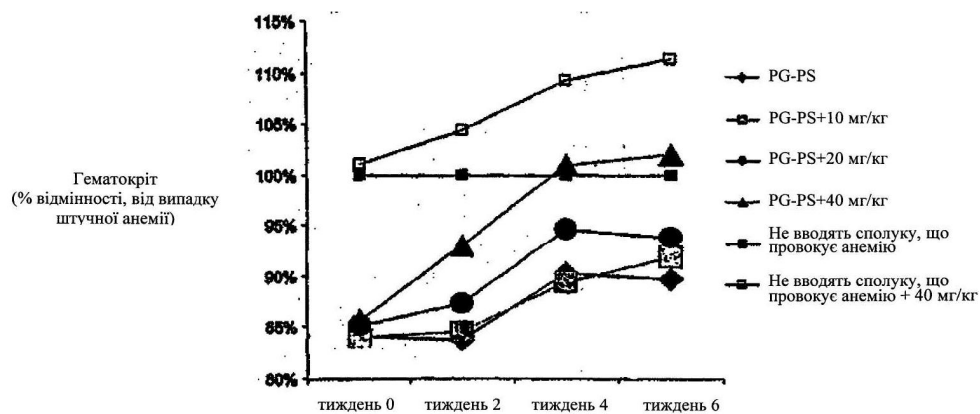
Фіг. 10



Фіг. 11

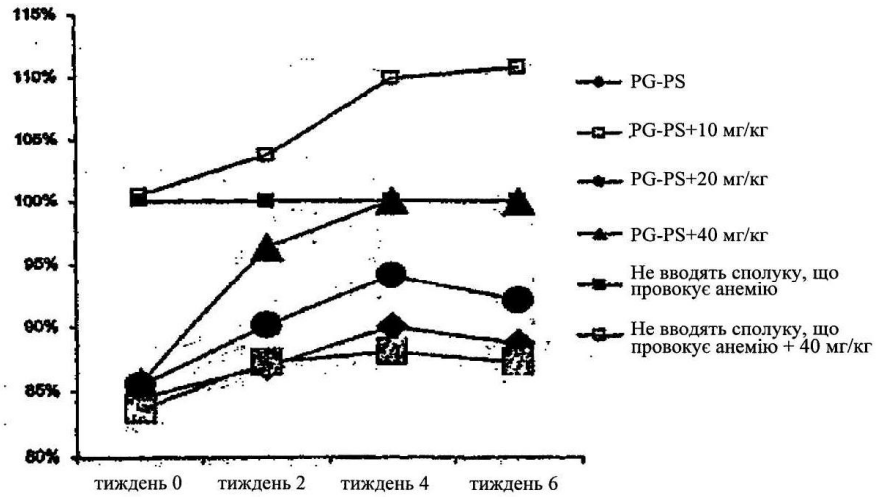


Фіг. 12



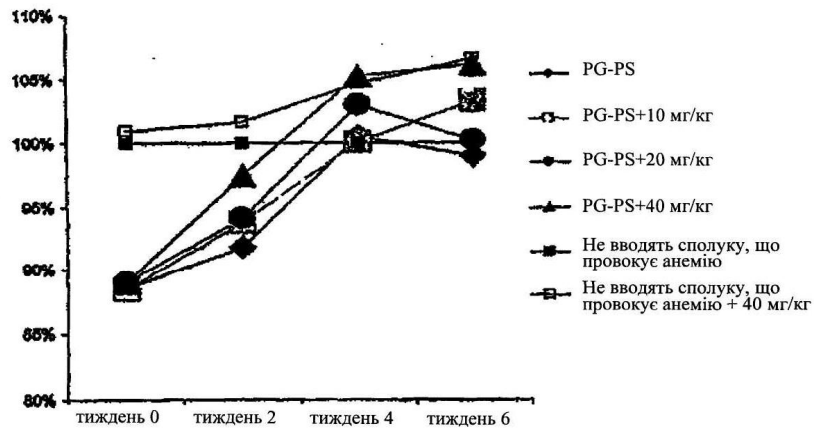
Фіг. 13

Гемоглобін
(% відмінності, від випадку
штучної анемії)



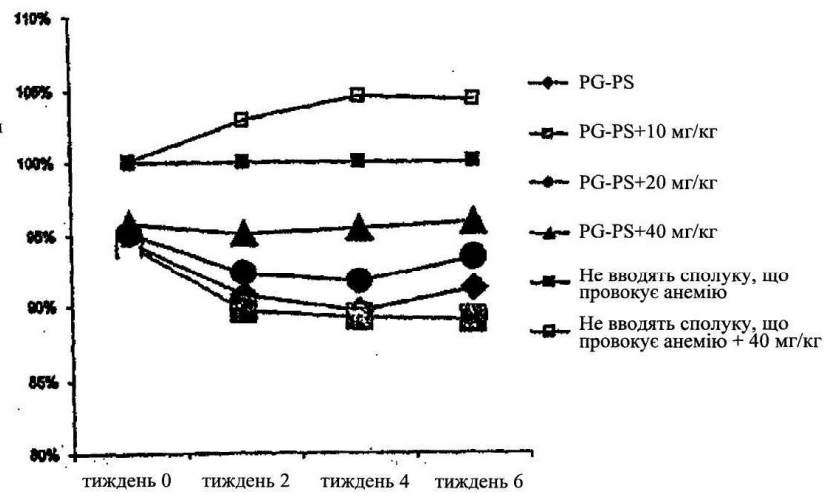
Фіг. 14

Червоні кров'яні тіลця
(% відмінності, від випадку
штучної анемії)

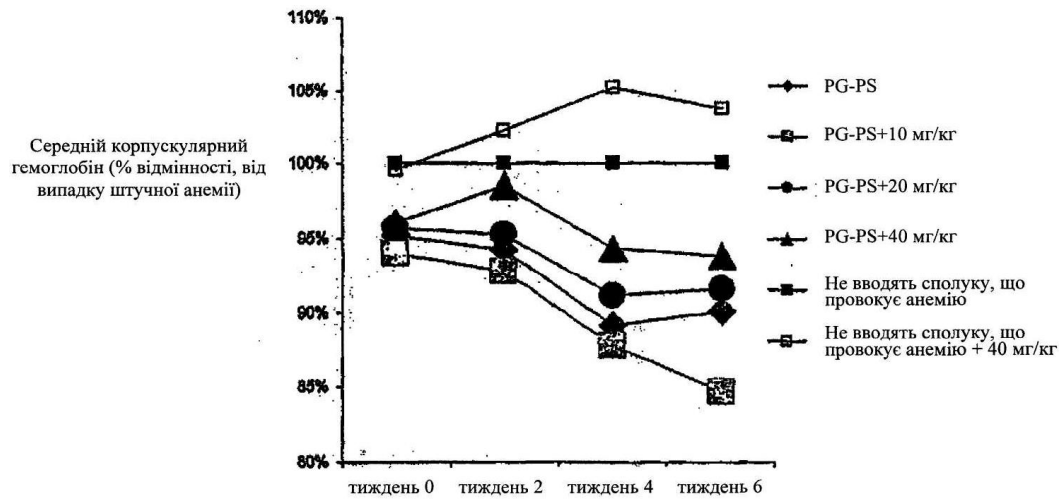


Фіг. 15

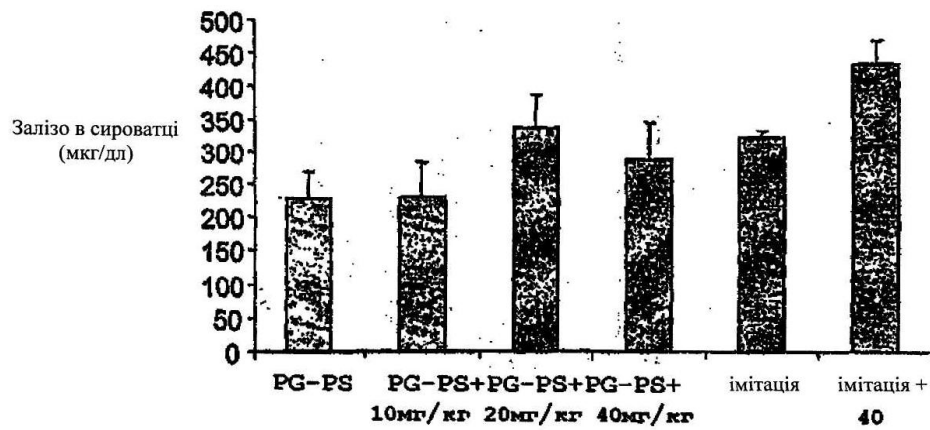
Середній корпускулярний об'єм
(% відмінності, від випадку
штучної анемії)



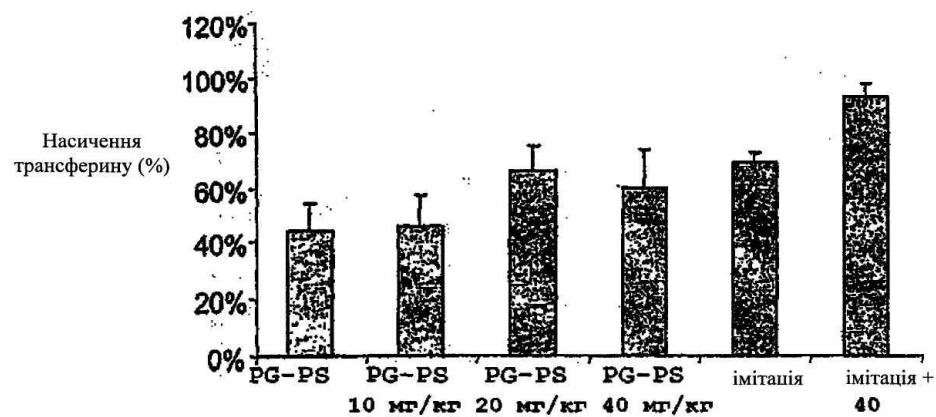
Фіг. 16



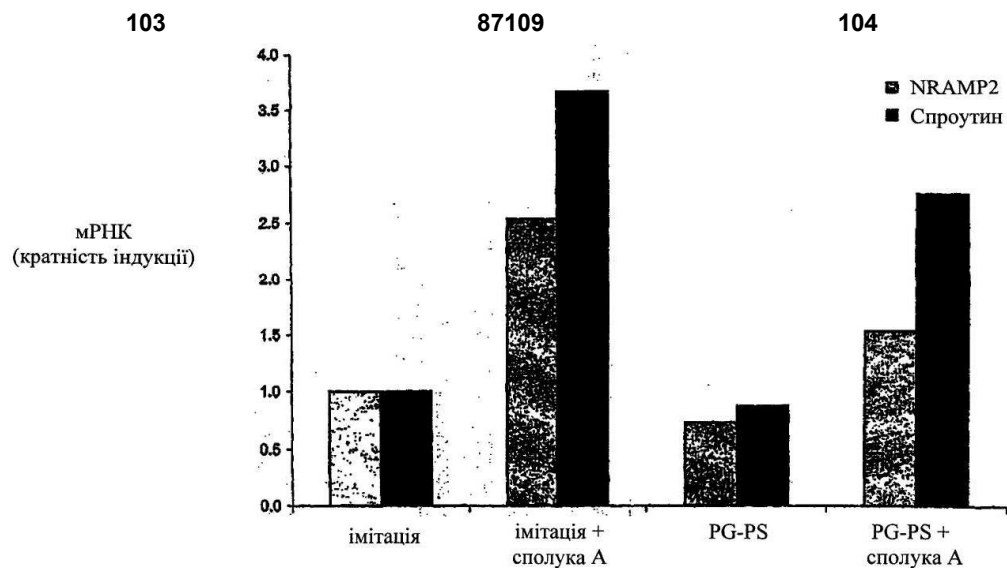
Фіг. 17



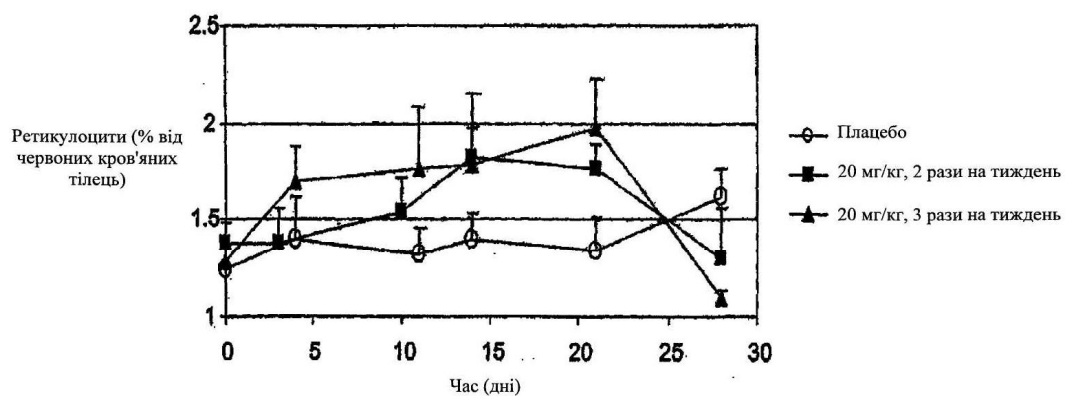
Фіг. 18A



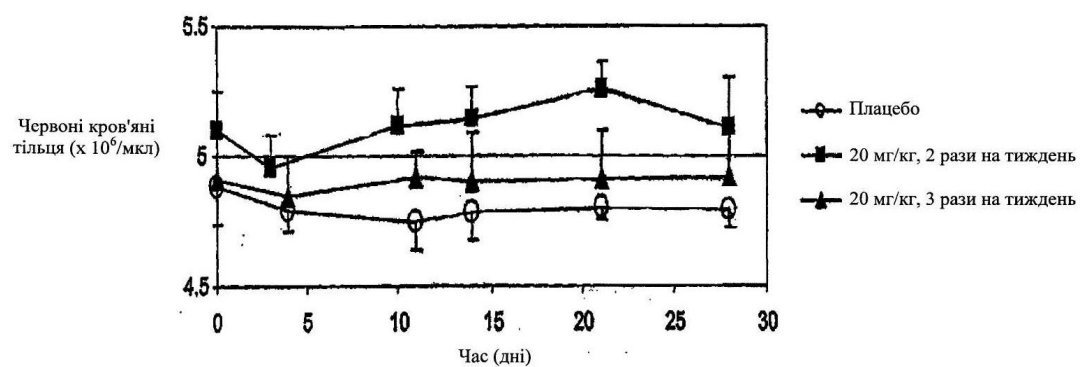
Фіг. 18B



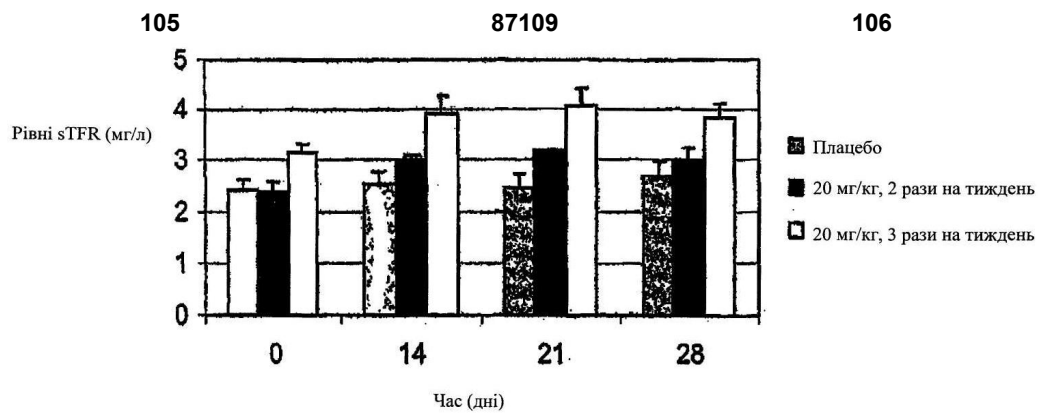
Фіг. 19



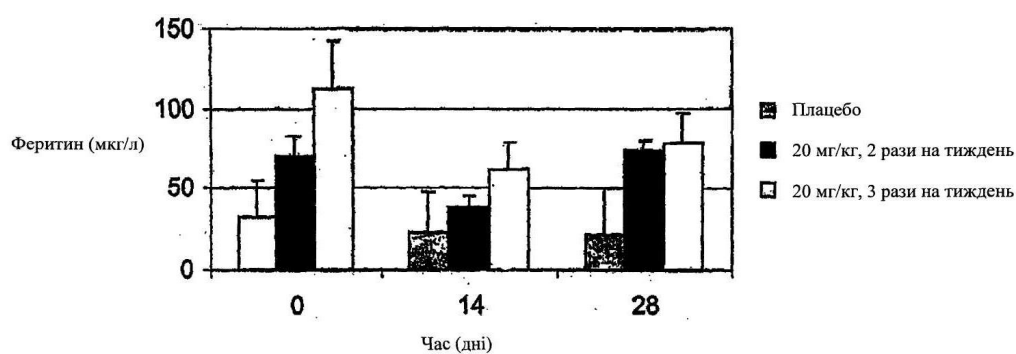
Фіг. 20



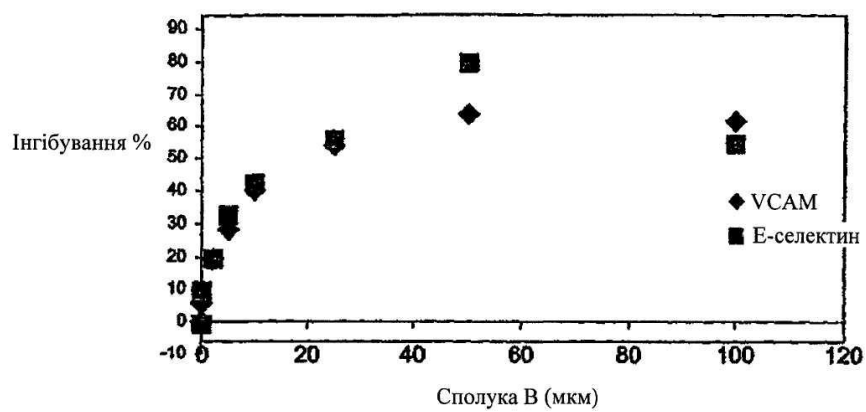
Фіг. 21



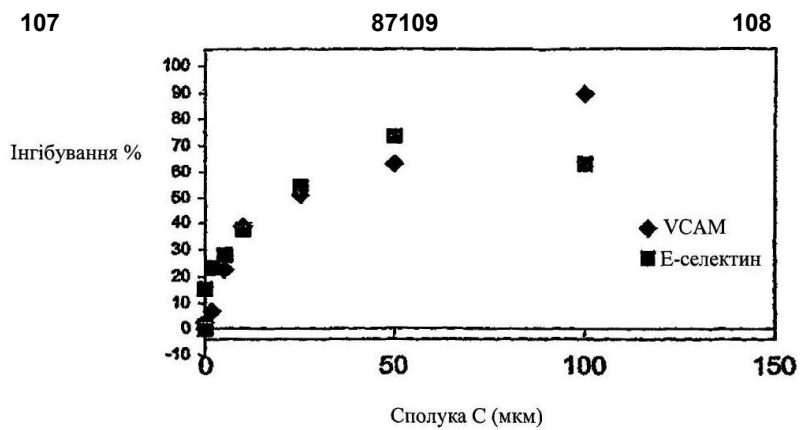
Фіг. 22



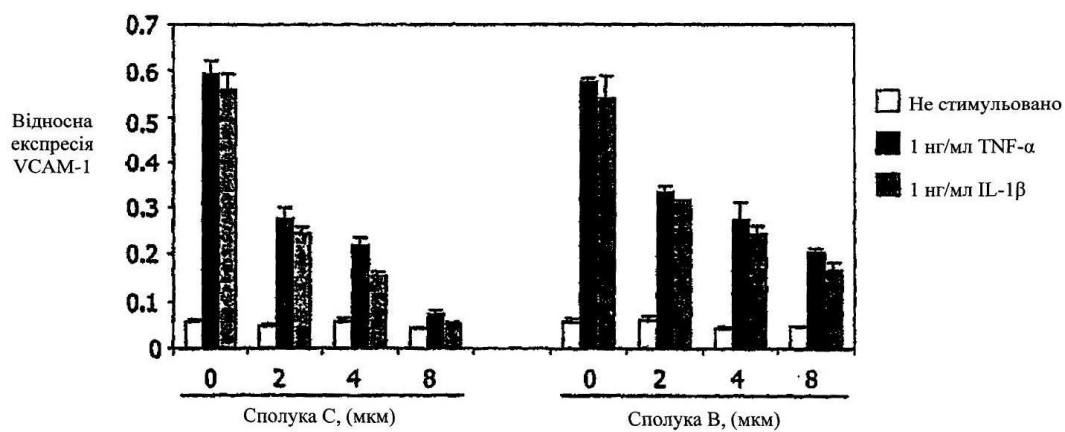
Фіг. 23



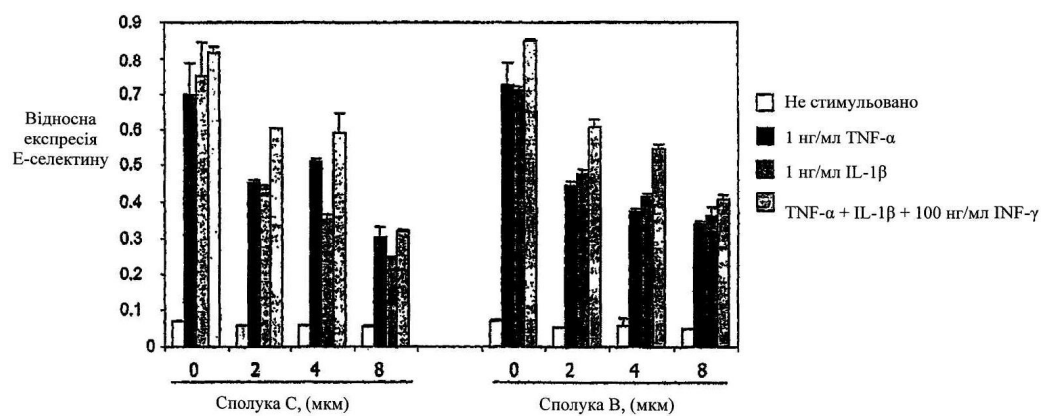
Фіг. 24А



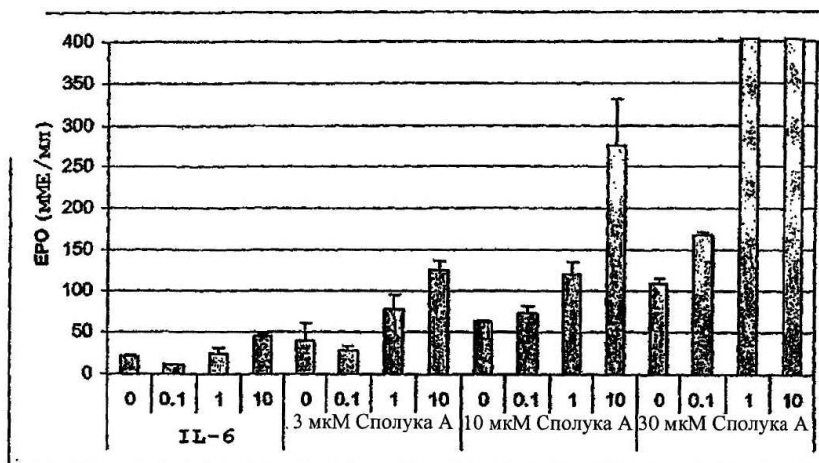
Фіг. 24В



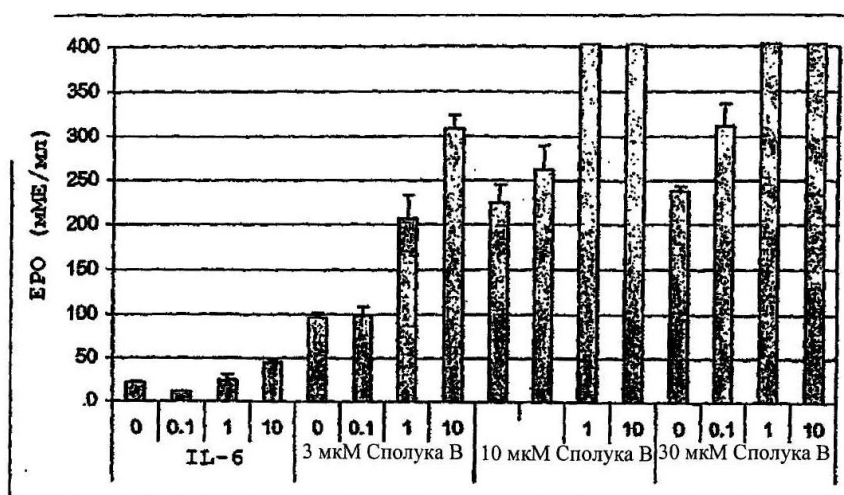
Фіг. 25



Фіг. 26



Фіг. 27А



Фіг. 27В