

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391871 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.07

(51) Int. Cl. A61K 31/401 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.02.03

(54) ДАНЕГАПТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИИ
ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК

(31) 21156236.8

(72) Изобретатель:

(32) 2021.02.10

Скваерс Пол, Хиллс Клэр (GB),
Моуритцен Улрик (DK)

(33) EP

(86) PCT/EP2022/052649

(74) Представитель:

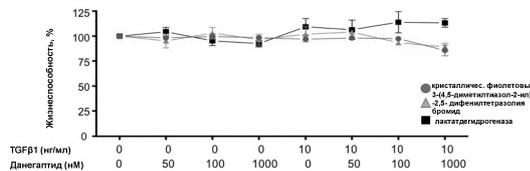
(87) WO 2022/171525 2022.08.18

Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

БРЕЙЕ ТЕРАПЬЮТИКС АПС (DK)

(57) Настоящее изобретение относится к данегаптиду или его фармацевтически приемлемой соли для применения при лечении заболевания почек, такого как хроническое заболевание почек, например диабетическая нефропатия и/или хроническая болезнь почек.



202391871

A1

A1

202391871

ДАНЕГАПТИД ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ИЛИ ПРЕДОТВРАЩЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПОЧЕК

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее изобретение относится к данегаптиду и его применению для лечения или предотвращения заболевания почек, в частности, заболевания почек, проявляющегося в виде воспаления почек и/или почечного фиброза. Настоящее изобретение также относится к лечению или предотвращению хронического заболевания почек, например, 10 диабетической нефропатии и/или хронической болезни почек, или заболевания почек, вызванного другим патологическим состоянием.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

15 Хроническая болезнь почек (ХБП) является наиболее распространенным заболеванием почек, представляющим растущую проблему со здоровьем, связанную с повышенным риском сердечно-сосудистого заболевания, риском развития терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD) и повышенной заболеваемостью и смертностью. Факторы риска, которые, по оценкам, затрагивают 10% населения мира, 20 включают возраст, диабет, артериальную гипертензию, дислипидемию и ожирение. Такое заболевание характеризуется снижением скорости клубочковой фильтрации (СКФ), артериальной гипертензией и протеинурией, а также гломерулосклерозом, тубулярной атрофией и тубулоинтерстициальным фиброзом (ТИФ), наблюдаемыми в качестве общих гистопатологических изменений. Приводя в конечном итоге к потере функции почек, 25 стойкому воспалению и увеличению отложения внеклеточного матрикса, лечение и предотвращение ТИФ и прогрессирующей ХБП представляют собой неудовлетворенные клинические потребности. Следовательно, требуются новые терапевтические подходы.

Изменение экспрессии и функции коннексинов (Cx) связано с патологией различных форм заболеваний почек, в том числе ХБП. Коннексины представляют собой 30 семейство мембраносвязанных белков, которые олигомеризуются с образованием гексамерных сборок, называемых коннексаонами. Коннексаоны либо функционируют в качестве канала для паракриной передачи сигналов и аутокринной передачи сигналов, образуя трансмембранный полуканал, либо, если связываются с коннексаонами на соседних клетках, образуют непрерывную водную пору или щелевой контакт, который 35 обеспечивает прямую передачу метаболических, клеточных сигналов и электрических

- сигналов. Кроме того, коннексины могут играть важную роль в регулировании клеточной адгезии и непосредственно взаимодействовать с комплексами адгезионных и плотных контактов зависимым от фосфорилирования способом. Коннексин 43 (Cx43) является одним из наиболее обильно экспрессируемых коннексинов в почечной сосудистой сети и в почечных канальцах. Перекрестную связь между соседними клетками через щелевые контакты называют «межклеточными взаимодействиями через щелевые контакты» (GJIC). Кроме того, коннексоны могут функционировать как полуканалы, также участвующие во взаимодействии между соседними клетками, например, посредством высвобождения АТФ через сформированные полуканалы.
- 5
- 10 Способность клеток взаимодействовать и синхронизировать свою активность частично связана с поддержанием структуры, целостности и функции ткани. Регуляция синтеза и активности коннексинов имеет решающее значение для клеточной функции, при этом ряд заболеваний почек связывают с изменениями экспрессии и/или функции таких важных белков.
- 15 В почках пациентов с сахарным диабетом гликемическое поражение является основной причиной ESRD и почечной недостаточности, о чем свидетельствуют многочисленные патологические явления, в том числе клубочковая гиперфильтрация, альбуминурия, повышенное отложение внеклеточного матрикса и TIF. Ослабление коннексин-опосредованного межклеточного взаимодействия при диабетической нефропатии может представлять собой ранний признак прогрессирования заболевания, а вызванные глюкозой изменения в коннексин-опосредованном клеточном взаимодействии и сопутствующей пуринергической передаче сигнала, например, P2X7, могут дополнительно способствовать патогенезу заболевания почек при диабете.
- 20
- 25 Данегаптид ((2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензамидопирролидин-2-карбоновая кислота), также известный как ZP1609 или GAP-134, представляет собой небольшой дипептид, полученный из ротигаптида (ZP123), антиаритмического пептида (AAP) и AAP10. Первоначально он был разработан в качестве модификатора щелевых контактов коннексина 43 (Cx43) и антиаритмического агента, при этом он демонстрировал клеткозащитные и антиаритмические свойства (см. WO 2007/078990 и WO 2008/079266).
- 30 Роль межклеточных взаимодействий через щелевые контакты (GJIC) и полуканальной передачи сигналов с участием коннексинов является сложной. Несколько исследовательских групп попытались оценить взаимосвязь между экспрессией белка Cx43, статусом фосфорилирования и функцией белка в различных типах тканей и проявлениями заболеваний, включая почечные ткани, диабетическую ретинопатию, фиброз печени и модели хронических и острых сердечно-сосудистых заболеваний. Важно
- 35

отметить, что экспрессия Сх43 в указанных моделях меняется в зависимости от типа клеток и тканей, и существует значительная неопределенность в отношении роли Сх43, который подвергается повышающей регуляции в некоторых моделях на основе стресса и понижающей регуляции в других. В частности, для моделей ХБП вызванные стрессом изменения экспрессии Сх43 зависят от области почки и модели заболевания. Например, Сх43 проявляет повышенную экспрессию как в клубочках у пациентов с гломерулярными заболеваниями, так и в биопсийном материале, выделенном у субъектов с диабетической нефропатией. Кроме того, исследования *in vivo* с применением моделей ХБП указывают на то, что экспрессия Сх43 увеличивается в модели односторонней обструкции мочеточника (UUO) при прогрессирующем интерстициальном воспалении и фиброзе, в мышинной модели гломерулонефрита (GN) и в модели ренин-зависимой ХБП с применением ренин-трансгенных мышей (RenTG). Последствия такой повышенной экспрессии оценивали с применением мышинной модели на основе гетерогенного Сх43^{+/-}. При индуцировании посредством гломерулонефрита у мышей с Сх43^{+/-} наблюдается протеинурия, при этом уровни азота мочевины крови (BUN) и сывороточного креатинина значительно ниже, чем указанные уровни у животных дикого типа. Кроме того, мыши с гетерогенным (Сх43^{+/-}), индуцированные посредством односторонней обструкции мочеточника (UUO), демонстрируют снижение отложения внеклеточного матрикса и уменьшение воспаления по сравнению с контрольными животными дикого типа. Наконец, фармакологические исследования с применением GAP-26 показали, что адгезия моноцитов и экспрессия коллагена I в модели ренин-зависимой ХБП с применением ренин-трансгенных мышей (RenTG) снижается при блокировании активности Сх43. Перечисленные данные показывают, что реакция почечных клеток изменяется и что изменения экспрессии не являются универсальным ответом на повреждение во всех популяциях почечных клеток.

Вопреки представленным выше доказательствам по некоторым данным экспрессия Сх43 подвергается понижающей регуляции в почках мышей db/db и в проксимальных тубулярных клетках крыс, индуцированных высоким содержанием глюкозы (HG). Кроме того, хотя подоциты демонстрируют повышенную экспрессию Сх43 у животных с гломерулонефритом и диабетической нефропатией, мезангиальные клетки проявляют пониженную экспрессию аналогичной изоформы при культивировании в условиях высокого уровня глюкозы или альдостерона.

На сегодняшний день отсутствует убедительное доказательство того, как измененная экспрессия и функция Сх43 могут оптимально защищать от патологических изменений, наблюдаемых в различных тканях при различных

болезненных состояниях. Важно отметить, что, хотя некоторые исследования показали, что снижение уровней экспрессии Sx43 может обеспечить защиту от изменений ХБП как *in vitro*, так и *in vivo*, ранее не изучалось, может ли данегаптид защищать от воспаления и фиброза в поврежденной почке. Соответственно, отсутствует четкий консенсус в отношении того, как в идеале следует модифицировать Sx43, чтобы в конечном итоге обеспечить терапевтический эффект у пациентов с заболеваниями почек.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 В целом, настоящее изобретение основано на новых и ясных результатах исследований, что данегаптид в качестве модулятора щелевых контактов обладает ранее неизвестным эффектом предотвращения высвобождения АТФ через полуканалы на основе Sx43 в обработанных и стимулированных первичных эпителиальных клетках проксимальных канальцев человека. Блокировка такого высвобождения АТФ была
15 связана со снижением уровня как основных провоспалительных (например, интерлейкина 6, моноцитарного хемоаттрактантного белка, MCP-1, RANTES), так и профиброзных белков (например, PDGF (фактор роста тромбоцитов)). Важно отметить, что данегаптид также предотвращал TGF β -1-индуцированную секрецию основных хемокинов, которые, как известно, рекрутируют и активируют соседние иммунные клетки и клетки, продуцирующие внеклеточный матрикс, в интерстиции. Кроме того, данные, представленные в настоящем документе, показывают, что данегаптид защищает от TGF β 1-индуцированного разделения клеток за счет повышенной адгезии, о чем свидетельствуют повышенные уровни экспрессии адгезионных контактов и плотных контактов. Такое улучшенное связывание между клетками было функционально
25 обусловлено усиленной барьерной функцией, измеренной с помощью трансэпителиального электрического сопротивления, демонстрирующего пониженную трансклеточную проницаемость в условиях обработки данегаптидом. Данные, описанные в настоящем документе, демонстрируют терапевтический потенциал таргетирования коннексинов посредством специфического модулятора щелевых контактов в качестве
30 нового способа лечения заболеваний почек, при котором воспаление и фиброз представляют собой первичную патологию, например, диабетической нефропатии и ХБП. Кроме того, указанные данные подтверждают пункты формулы настоящего изобретения, которые относятся к участию указанных процессов в лечении или предотвращении заболеваний почек, например, тех заболеваний, которые проявляются в виде воспаления

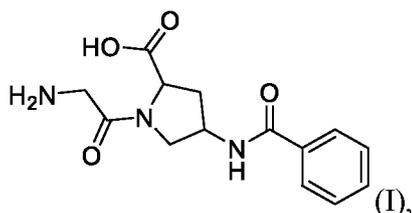
почек и развития почечного фиброза, таких как хроническая болезнь почек, как правило, у пациентов-людей.

Недавно авторы настоящего изобретения опубликовали обзор, посвященный Sx43 в качестве мишени для лечения воспаления при вторичных осложнениях со стороны почки и глаза при диабете (Cliff *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2022, 23, 600).

Основываясь на таких новых данных авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль и/или гидрат особенно подходят для лечения заболевания почек. Заболевания почек, подходящие для лечения с помощью данегаптида, могут иметь несколько степеней тяжести почечной дисфункции в результате различных почечных патологий, включая, но не ограничиваясь ими, воспаление почек и/или почечный фиброз. Полученные данные подтверждают наблюдение, что данегаптин работает как для поддержания межклеточного связывания эпителиальных клеток проксимальных канальцев человека в стрессовых условиях, так и способствует закрытию полуканалов, что, тем самым ограничивает утечку АТФ во внеклеточную среду. Комбинация таких двух эффектов обеспечивает новый и уникальный терапевтический потенциал данегаптида, который считается эффективным по сравнению с другими терапевтическими мероприятиями, нацеленными только на закрытие полуканала.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что данегаптин способен устранять эффекты, связанные с изменением экспрессии и функции Sx, наблюдаемые при некоторых заболеваниях почек, таких как диабетическая нефропатия, гломерулонефрит и ХБП. Это приводит к обращению вспять изменений как экспрессии, так и секреции белков, связанных с воспалением и фиброзом, обычно наблюдаемых при заболеваниях почек, таких как ХБП. В совокупности представленные в настоящем документе результаты показывают, что данегаптин или его фармацевтически приемлемую соль и/или гидрат можно применять для лечения заболеваний почек. В одном из вариантов реализации гидрохлорид данегаптида можно применять для лечения хронической болезни почек (ХБП).

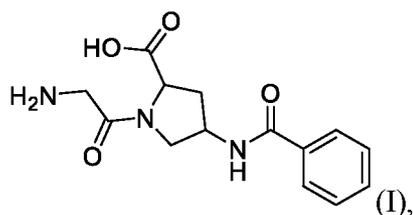
Соответственно, в одном из аспектов настоящего изобретения предложено соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль и/или гидрат; для применения в способе лечения или предотвращения заболевания почек. Заболевание почек предпочтительно представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП).

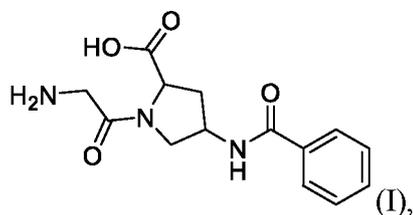
5 Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения, предложенного в настоящем изобретении, включающий анализ образца, полученного от субъекта, на наличие одного или более биомаркеров заболевания почек, и, если указанный биомаркер присутствует, стадию выбора субъекта для лечения. Примеры биомаркеров для этой цели включают, но
10 не ограничиваются ими, протеинурию, оценки СКФ, отношение альбумина к креатинину в моче и/или биомаркеры воспаления или развития фиброза. Предложенный способ предпочтительно дополнительно включает лечение субъекта с применением соединения, описанного в настоящем документе.

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложен способ
15 лечения заболевания почек у субъекта, включающий введение указанному субъекту соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата. Заболевание почек
20 предпочтительно представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП).

Согласно дополнительному аспекту в настоящем изобретении предложено применение соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата для получения
25 лекарственного средства для лечения заболевания почек у субъекта-человека, при этом предложенный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата. Заболевание почек предпочтительно представляет собой хроническую болезнь

почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП).

5 Применяемый в настоящем документе термин «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Например, «А и/или В» следует рассматривать как конкретное описание каждого из (i) А, (ii) В и (iii) А и В, как если бы каждый из них был указан в настоящем документе по отдельности.

10 В настоящем документе диапазоны могут быть выражены в виде диапазона от «примерно» одного конкретного значения и/или до «примерно» другого конкретного значения. При таком обозначении диапазона другой вариант реализации включает диапазон от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Аналогичным образом, если значения выражены в виде приближенных значений путем применения предшествующего термина «примерно», следует понимать, что указанное конкретное значение составляет еще один вариант реализации. Термин «примерно» 15 применительно к числовому значению является необязательным и означает, например, +/- 10%.

Если контекст не указывает на иное, описания и определения признаков, изложенные выше, не ограничиваются каким-либо конкретным аспектом или вариантом реализации изобретения и в равной степени применимы ко всем описанным аспектам и 20 вариантам реализации.

Все документы, упомянутые в настоящем документе, явным образом и в полном объеме включены посредством ссылки.

25 Далее варианты реализации настоящего изобретения описаны в качестве примера, а не ограничения, со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Тем не менее, различные дополнительные аспекты и варианты реализации настоящего изобретения будут очевидны специалистам в данной области техники с учетом настоящего описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

30 **Фиг. 1:** Данегаптид предотвращает вызванное $TGF\beta 1$ увеличение поглощения красителя, опосредованного полуканалами.

На панели А, клетки НК2 культивировали в течение 48 часов в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) с применением/без применения $TGF\beta 1$ (10 нг/мл) ± данегаптид (50, 100 и 1000 нМ) и оценивали жизнеспособность клеток. Результаты 35 представлены в виде среднего значения ± SEM (стандартная ошибка среднего), n=3.

Инкубация с TGFβ1 (10 нг/мл ± данегаптид (от 50 до 1000 нМ) не привела к изменению поглощения МТТ, высвобождению LDH или окрашиванию кристаллическим фиолетовым. На панелях В и С, поглощение карбоксифлуоресцеинового красителя использовали для оценки активности полуканала при степени загрузки красителя, прямо пропорциональной открытию. Клетки культивировали в течение 48 часов в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) с применением/без применения TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптид (50 или 100 нМ). Данегаптид предотвращал вызванное TGFβ1 увеличение поглощения карбоксифлуоресцеинового красителя в клетках НК2 (В) и hPTEC (С). Исследовали диапазон доз данегаптида от 10 до 1000 нМ и обнаружили, что оптимальное ингибирование поглощения карбоксифлуоресцеинового красителя в клетках НК2 происходило при концентрации данегаптида от 50 до 100 нМ (D). Минимальная загрузка красителя происходила в контрольных клетках, при этом загрузка красителя значительно увеличивалась в клетках, обработанных TGFβ1. Добавление данегаптида (50 или 100 нМ) снижало поглощение красителя, возвращая интенсивность флуоресценции к контрольным уровням. Интенсивность выражена в процентах по сравнению с контролем в условиях низкого содержания глюкозы и является репрезентативной для 3 отдельных экспериментов. Данные представлены в виде среднего значения ± SEM, n=3, также указаны основные показатели значимости (**P<0,01, ***P<0,001); однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) и пост-тест Тьюки).

Фиг. 2: Данегаптид предотвращает вызванное TGFβ1 увеличение высвобождения АТФ.

Клетки НК2 культивировали в течение 48 часов в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) с применением/без применения TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптид (50 или 100 нМ). Характерные кривые биосенсоров демонстрируют высвобождение АТФ после удаления внеклеточного кальция. Контрольные клетки (А) проявляют незначительное высвобождение АТФ по сравнению с калибровочной (CALIB) реакцией на 10 мкМ АТФ, при этом заметное увеличение высвобождения наблюдалось в клетках, обработанных TGFβ1 (В). Данегаптид сам по себе (100 нМ) был неспособен изменить базальный АТФ (С), но значительно снижал вызванное TGFβ1 высвобождение АТФ (D). Максимальные реакции количественно определяли путем сравнения с известной концентрацией АТФ (10 мкМ) и отображали средние данные ± SEM на диаграмме (Е). Результаты являются репрезентативными для 3 отдельных экспериментов (n=3; **P<0,01, 777 ***P<0,001; однофакторный ANOVA и пост-тест Тьюки).

Фиг. 3: Данегаптид уменьшает *TGFβ1*-индуцированные изменения мРНК в клеточном цикле и ренопротекторных маркерах.

Первичные hPTECs культивировали в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) ± *TGFβ1* (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 12 часов. В клетках, обработанных *TGFβ1*, анализ с применением кПЦР (количественная полимеразная цепная реакция) продемонстрировал увеличение мРНК p16, мРНК p21 и мРНК циклина D1 и значительное снижение мРНК Клото (Klotho) по сравнению с контролем (** $P < 0,01$ и *** $P < 0,001$; среднее значение ± SEM, $n=3$). Данегаптид (100 нМ) подавлял увеличение p16, p21, циклина D1 (▲▲▲ $P < 0,001$; среднее значение ± SEM, $n=3$) и частично реверсировал вызванное *TGFβ1* изменение Klotho.

Фиг. 4: Данегаптид уменьшает вызванные *TGFβ1* изменения белков адгезионных и плотных контактов и проницаемости эпителия.

Первичные hPTECs культивировали в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) ± *TGFβ1* (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 48 часов. Экспрессию E-кадгерина (ECAD), N-кадгерина (NCAD) и виментина (панель А), а также клаудина-2 и зонула-окклюденнов (ZO-1) и b-катенина (панель В) оценивали с помощью вестерн-блоттинга. *TGFβ1* уменьшал экспрессию E-кадгерина, клаудина-2 и ZO-1 и повышал экспрессию N-кадгерина и виментина (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; среднее значение ± SEM, $n=3$). Эффекты были частично или полностью реверсированы под действием данегаптида (100 нМ; ▲ $P < 0,05$ и ▲▲▲ $P < 0,001$; среднее значение ± SEM, $n=3$). Показаны характерные блоты для каждого белка, экспрессия которых нормализована путем повторного зондирования α-тубулина в качестве контроля загрузки. На панели С, с помощью трансэпителиального электрического сопротивления (TER) оценивали последствие влияния изменения экспрессии белков адгезионных и плотных контактов на целостность эпителия. Клетки НК2 культивировали в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) на трансвелл-вкладышах и измеряли трансэпителиальное сопротивление. *TGFβ1* уменьшал TER, при этом эффект частично обращался вспять при добавлении данегаптида (100 нМ), данные выражены в виде среднего значения ± SEM, $n=3$ (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

Фиг. 5: Данегаптид устраняет вызванные *TGFβ1* изменения экспрессии белков, связанных с внеклеточным матриксом (ECM).

Первичные hPTECs культивировали в условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) ± *TGFβ1* (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 48 часов. На панели А, экспрессию белков ECM коллаген I (Col1), коллаген IV (Col4), фибронектин (Fibro) и ламинин (панель В) оценивали с помощью вестерн-блоттинга. Во всех случаях *TGFβ1*

повышающе регулировал экспрессию белка ($***P<0,001$), эффект уменьшался под действием данегаптида (100 нМ; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0,001$). Данегаптин частично реверсировал вызванное TGF β 1 изменение интегрин-связанной киназы 1 (ILK1; $\blacktriangle\blacktriangle\blacktriangle P<0,001$), но оказывал незначительное влияние на матриксную металлопротеиназу 3 (MMP3). Все столбцы соответствуют среднему значению \pm SEM, (n=3), и показаны репрезентативные блоты с экспрессией, нормализованной путем повторного зондирования α -тубулина в качестве контроля загрузки.

Фиг. 6: Данегаптин предотвращает вызванные TGF β 1 изменения экспрессии адипокинов, хемокинов, факторов роста и интерлейкинов.

10 Микромножества воспалительных антител использовали для оценки регуляции 31 воспалительных белков-кандидатов в клеточных лизатах из клеток hPTEC, обработанных с применением TGF β 1 \pm данегаптин. Результаты являются репрезентативными для 3 отдельных экспериментов и представлены в виде среднего значения \pm SEM, n=3, также указаны основные показатели значимости ($*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$; 15 однофакторный ANOVA и пост-тест Тьюки).

Фиг. 7: Данегаптин предотвращает вызванные TGF β 1 изменения секреции адипокинов, хемокинов, факторов роста и интерлейкинов.

Микромножества воспалительных антител использовали для оценки регуляции 31 воспалительных белков-кандидатов в супернатанте из клеток hPTEC, обработанных с применением TGF β 1 \pm данегаптин. Результаты являются репрезентативными для 3 отдельных экспериментов и представлены в виде среднего значения \pm SEM, n=3, также указаны основные показатели значимости ($*P<0,05$, $**P<0,01$, $***P<0,001$; 20 однофакторный ANOVA и пост-тест Тьюки).

25

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Термины и определения

Для облегчения понимания приведенного ниже описания в следующих параграфах дан ряд определений.

30 В настоящем документе термин «лечение» включает любой тип терапии, направленной на прекращение, предотвращение, смягчение и/или снижение восприимчивости к заболеванию почек, описанному в настоящем документе. Клинические состояния, применяемые в настоящем изобретении, хорошо известны специалисту в данной области техники и определены в Международной классификации болезней (МКБ)

(International Classification of Diseases, ICD-11), подготовленной Всемирной организацией здравоохранения, ВОЗ.

В контексте данного документа «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое способно уменьшить клинические симптомы и признаки заболевания и частично или полностью устранить или разрешить основную патологию и/или нормализовать физиологические реакции у субъекта с указанным состоянием или патологией. Уменьшение симптомов или нормализация физиологических реакций могут быть определены с применением способов, известных в данной области техники, и могут меняться в зависимости от конкретного состояния или патологии.

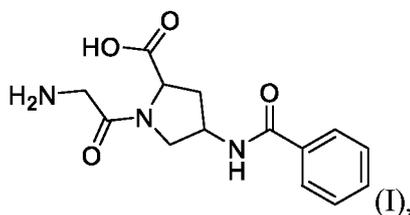
Скорость клубочковой фильтрации (СКФ):

Лучшим показателем функции почек является скорость клубочковой фильтрации (GFR).

СКФ можно оценить по образцу крови с применением уравнений (рСКФ (расчётная скорость клубочковой фильтрации)), основанных на концентрации креатинина или цистатина С в плазме. Указанные способы хорошо известны в данной области техники, при этом общепринятой практикой является определение СКФ у субъекта с точностью, достаточной для определения стадии заболевания у пациента с хроническим заболеванием почек, например, у пациента-человека, страдающего ХБП.

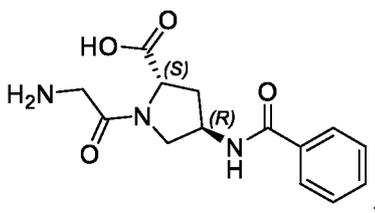
Соединения модуляторы GJIC

При медицинском применении и в способах лечения согласно настоящему изобретению обычно используют 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновую кислоту, соединение формулы (I), также известное как данегаптит:



или его фармацевтически приемлемую соль и/или гидрат.

В частности, при медицинском применении и в способах лечения согласно настоящему изобретению используют (2S,4R) диастереомер указанного соединения, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемую соль и/или гидрат.

Альтернативным названием данного соединения является (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензамидопирролидин-2-карбоновая кислота.

5 Получение 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновой кислоты, такой как ее (2S,4R) диастереомер, подходящие способы ее синтеза и очистки описаны в документе WO 2007/078990, в котором (2S,4R) изомер обозначен как «соединение 2» (WO 2007/078990 в полном объеме включен посредством ссылки).

10 Примером подходящей солевой формы (2S,4R) диастереомера является гидрохлорида моногидрат, получение которого описано в WO 2008/079266 и который также упоминается в настоящем документе как соединение X (WO 2008/079266 в полном объеме включен посредством ссылки).

15 Соединения для применения в настоящем изобретении могут содержать два или более асимметричных атома (также называемых хиральными центрами), что приводит к возможности появления диастереомеров. Медицинское применение и способы согласно настоящему изобретению включают применение указанных диастереомеров.

Фармацевтически приемлемая соль данегаптида включает гидрохлорид данегаптида, в частности, данегаптида гидрохлорида моногидрат.

20 *Фармацевтически приемлемые соли*

Фармацевтически приемлемые соли соединений, подходящих для применения согласно настоящему изобретению, содержащие кислотный фрагмент, можно получить с применением органических или неорганических оснований. Подходящие соли, образованные с основаниями, включают соли металлов, такие как соли щелочных металлов или щелочноземельных металлов, например, соли натрия, калия или магния; соли аммиака и соли органических аминов, такие как, соли, образованные с морфолином, тиоморфолином, пиперидином, пирролидином, низшим моно-, ди- или триалкиламино (например, этил-трет-бутил, диэтил-, диизопропил-, триэтил-, трибутил- или диметилпропиламино) или низшим моно-, ди- или тригидроксиалкиламино (например, моно-, ди- или триэтаноламино). Также можно получать внутренние соли. Если соединение, подходящее для применения согласно настоящему изобретению, содержит основной фрагмент (как, например, в случае 1-(2-аминоацетил)-4-

25

30

бензоиламинопирролидин-2-карбоновой кислоты и ее перечисленных диастереомеров), соли можно получать с применением органических или неорганических кислот. Например, соли можно получать из следующих кислот: уксусной, пропионовой, молочной, лимонной, винной, янтарной, фумаровой, малеиновой, малоновой, миндальной, яблочной, фталевой, соляной, бромистоводородной, фосфорной, азотной, серной, метансульфоной, нафталинсульфоной, бензолсульфоной, толуолсульфоной или камфорсульфоной. Также можно использовать и другие известные фармацевтически приемлемые кислоты. Как уже упоминалось (см. выше), предпочтительная солевая форма (2S,4R) диастереомера 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновой кислоты представляет собой гидрохлорида моногидрат.

Фармацевтически приемлемые соли также можно получать из кислот, которые образуют нетоксичные соли присоединения, содержащие фармацевтически приемлемые анионы, такие как соли гидрохлорид, гидробромид, памоат, гидройодид, сульфат или бисульфат, фосфат или кислый фосфат, ацетат, малеат, фумарат, оксалат, лактат, памоат, тартрат, цитрат, глюконат, сахарат и п-толуолсульфонат. В одном из вариантов реализации фармацевтически приемлемая соль соединения согласно настоящему изобретению представляет собой гидрохлоридную соль.

Настоящее изобретение также может распространяться на применение пролекарств соединений, описанных в настоящем документе, которые подходят для применения согласно настоящему изобретению. В контексте данного документа «пролекарство» относится к фрагменту, который продуцирует, образует или высвобождает соединение одного из описанных типов при введении субъекту-млекопитающему, в частности, субъекту-человеку. Пролекарства можно получать путем модификации функциональных групп, присутствующих в соединениях, таким образом, чтобы указанные модификации отщеплялись от исходных соединений либо путем обычного манипулирования, либо *in vivo*. Примеры пролекарств включают соединения, описанные в настоящем документе, которые содержат один или более молекулярных фрагментов, присоединенных (связанных) к гидрокси-, amino-, сульфгидрильной или карбокси-группе соединения, и которые при введении субъекту, подлежащему лечению, расщепляются *in vivo* с образованием свободной гидрокси-, amino-, сульфгидрильной или карбокси-группы, соответственно. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, ацетатные, формиатные и бензоатные производные функциональных спиртовых и аминогрупп в соединениях, описанных в настоящем документе, для применения согласно настоящему изобретению. Примеры предпочтительных пролекарств включают пролекарства на основе оксазолидинона или имидазолидинона. Сложноэфирные пролекарства можно получить с

применением низших спиртов, таких как спирты C06. Получение и применение пролекарств обсуждается в T. Higuchi and V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 of the A.C.S. Symposium Series, и в Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward V. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

5

Фармацевтические композиции

Соединения или их фармацевтически приемлемые соли или гидраты, применяемые согласно настоящему изобретению, можно вводить в форме соответствующих фармацевтических композиций, которые можно вводить любым приемлемым способом, известным в данной области техники, по отдельности или в комбинации.

10

Фармацевтические композиции, относящиеся к настоящему контексту, могут содержать соединение, описанное в настоящем документе, для применения согласно настоящему изобретению в смеси с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, наполнителями или вспомогательными веществами.

15

Дозы соединений и композиций согласно настоящему изобретению, необходимые для достижения требуемых терапевтических эффектов, будут зависеть от эффективности соединения, конкретной применяемой композиции и выбранного способа введения. Соединения обычно вводят в количестве от примерно 10 мг до примерно 500 мг на пациента в сутки, например, от 10 мг до 100 мг. Например, предложенные соединения можно вводить в количестве от примерно 50 мг до примерно 100 мг на пациента в сутки, например, примерно 50 мг на пациента в сутки. Альтернативно, соединения можно вводить в количестве от примерно 50 мг до примерно 150 мг на пациента в сутки.

20

Введение соединения (или его фармацевтической соли или гидрата) согласно настоящему изобретению можно осуществлять в единичной стандартной лекарственной форме (например, в форме болюса) или в виде непрерывной терапии в форме многократных доз в течение некоторого времени. Альтернативно, можно использовать системы непрерывной инфузии или составы депо с медленным высвобождением. Два или более соединений для применения согласно настоящему изобретению (или их фармацевтические композиции) можно совместно вводить одновременно или последовательно в любом порядке. Кроме того, предложенные соединения и композиции можно вводить аналогичным образом в профилактических целях, например, если считается, что пациент с диабетом подвержен риску развития диабетической нефропатии или диабетической болезни почек. В конечном счете, наилучший режим дозирования будет определяться лечащим врачом индивидуально для каждого пациента.

25

30

35

Согласно настоящему изобретению соединение можно вводить любым

подходящим способом для лечения заболевания почек. В одном из вариантов реализации предложенное соединение вводят субъекту путем перорального введения. В одном из вариантов реализации предложенное соединение вводят путем парентерального введения.

5 Соединение согласно настоящему изобретению можно вводить ежедневно, например, один раз в сутки (QD), два раза в сутки (BID), три раза в сутки (TID) или четыре раза в сутки (QID). Предложенное соединение предпочтительно вводят один раз или два раза в сутки.

Терапевтическое применение

10 Медицинское применение и способы лечения согласно настоящему изобретению используют для лечения или предотвращения заболевания почек. В целом, предложенные соединения особенно полезны в тех случаях, когда заболевание почек проявляется в виде воспаления почек и/или развития почечного фиброза.

15 Альтернативно или дополнительно, настоящее изобретение относится к лечению или предотвращению заболевания почек, которое представляет собой типы хронической болезни почек (ХБП), в частности, у субъектов-людей. В некоторых случаях хроническая болезнь почек может проявляться у пациента в виде развития почечного фиброза и нарушения функции почек. Согласно некоторым аспектам хроническое заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП), в частности, у субъекта-человека.

20 ХБП можно подразделить на различные стадии заболевания в соответствии с МКБ-11.

- Стадия 1: Повреждение почек при нормальной или повышенной СКФ (>90 мл/мин/1,73 м²)

- Стадия 2: Повреждение почек и СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м²

25 • Стадия 3a: СКФ от 45 до 59 мл/мин/1,73 м²

- Стадия 3b: СКФ от 30 до 44 мл/мин/1,73 м²

- Стадия 4: СКФ от 15 до 29 мл/мин/1,73 м²

- Стадия 5: Почечная недостаточность, СКФ <15 мл/мин/1,73 м²

- Стадия не указана

30 В предпочтительном варианте реализации соединение, предложенное в настоящем изобретении, обеспечивает эффективное лечение ХБП на стадиях 1-4. В одном из вариантов реализации соединение согласно настоящему изобретению применяют для лечения ХБП, при этом ХБП находится на стадии 1, определяемой по повреждению почек при нормальной или повышенной скорости клубочковой фильтрации (СКФ), т.е. СКФ >90
35 мл/мин/1,73 м² тела субъекта. В другом варианте реализации ХБП находится на стадии 2,

определяемой по повреждению почек и СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м² тела субъекта. В дополнительном варианте реализации ХБП находится на стадии 3, определяемой по СКФ от 45 до 59 мл/мин/1,73 м² тела субъекта. В еще одном варианте реализации ХБП находится на стадии 4, определяемой по СКФ от 15 до 29 мл/мин/1,73 м² тела субъекта.

5 Предложенное соединение особенно эффективно до появления значительного повреждения ткани, которое видно на стадии 5.

В некоторых случаях указанное соединение можно применять для предотвращения прогрессирования ХБП. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от одной стадии хронической болезни почек (например, на любой из стадий 1, 2, 3а, 3б или 4) к более поздней стадии хронической болезни почек. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 1 к хронической болезни почек на любой из стадий 2, 3а, 3б, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 2 к хронической болезни почек на любой из стадий 3а, 3б, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 3а к хронической болезни почек на стадии 3б, 4 или 5. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 3б к хронической болезни почек на стадии 4 или 5. В некоторых вариантах реализации предложенное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 4 к хронической болезни почек на стадии 5.

В другом варианте реализации соединение для применения согласно настоящему изобретению применяют для лечения диабетического заболевания почек. Такое заболевание также может иметь название диабетической нефропатии и представляет собой повреждение почек, возникающее в результате диабета. У некоторых пациентов диабетическая нефропатия может привести к ХБП и почечной недостаточности.

Соединение согласно настоящему изобретению можно также применять для лечения заболевания почек, при этом указанное заболевание почек вызвано первичным заболеванием, выбранным из группы, состоящей из: иммуноопосредованных заболеваний, заболеваний соединительной ткани, системной красной волчанки (волчаночного нефрита), диабетической нефропатии, саркоидоза, синдрома Шегрена, амилоидоза, множественной миеломы, васкулита, рака и генетических нарушений (таких как врожденный нефротический синдром), атрезии или стеноза мочеточника, конкремента (*почечного камня*) в верхних или нижних мочевых путях или обструктивной нефропатии и рефлюкс-нефропатии.

Другими подходящими показаниями, при которых можно использовать соединение согласно настоящему изобретению, является тубулоинтерстициальное заболевание почек. У некоторых пациентов тубулоинтерстициальное заболевание почек может привести к развитию хронической болезни почек (ХБП). Конкретными примерами таких относящихся к настоящему изобретению диагнозов являются хронический тубулоинтерстициальный нефрит, тубулоинтерстициальные и тубулярные поражения, вызванные лекарствами и тяжелыми металлами, тубулоинтерстициальные нарушения почек при системных заболеваниях соединительной ткани и тубулоинтерстициальные нарушения почек при отторжении трансплантата.

Настоящее изобретение также относится к соединению, определенному в данном документе, для применения при лечении заболевания почек, при этом указанное заболевание почек представляет собой редкое наследственное заболевание почек, которое проявляется в виде воспаления и фиброза. У некоторых пациентов редкое заболевание почек может привести к развитию хронической болезни почек (ХБП). Поликистоз почек (PKD) является подходящим примером редкого заболевания почек, которое проявляется в виде воспаления и развития фиброза. PKD представляет собой генетическое нарушение, характеризующееся образованием в почках многочисленных кист и чаще всего вызываемое мутациями PKD1 или PKD2 при аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек (ADPKD). Интерстициальное воспаление и фиброз являются одним из основных патологических изменений в поликистозных тканях почки с накоплением воспалительных клеток, хемокинов и цитокинов. Иммунный ответ наблюдается на разных стадиях заболевания и возникает до или одновременно с образованием кисты при ADPKD. Доказательство того, что воспаление является важным фактором роста кисты и фиброза, включает увеличение интерстициальных макрофагов, повышенный уровень экспрессии провоспалительных цитокинов, активированную систему комплемента и активированные пути, включая передачу сигналов NF-κB и JAK-STAT в поликистозных тканях почки. Воспалительные клетки участвуют в перепроизводстве нескольких профибротических факторов роста, которые способствуют развитию почечного фиброза при ADPKD. Такие факторы роста запускают эпителиально-мезенхимальный переход и активацию миофибробластов/фиibroцитов, стимулирующих расширение внеклеточного матрикса (ECM), в том числе коллагена I, III, IV, V и фибронектина, что приводит к развитию почечного фиброза и снижению функции почек. Существуют регуляторы несбалансированного метаболизма ECM, которые приводят к увеличению продуцирования ECM и неадекватной деградации в поликистозных тканях почки. Хотя в настоящее время эффективные противofiброзные способы лечения ограничены,

замедление увеличения объема кисты и развития фиброза может быть очень важным фактором с точки зрения продления времени жизни и улучшения ухода за пациентами с ADPKD. Ингибирование профибротических цитокинов, участвующих в фиброзе, может представлять собой новую терапевтическую стратегию для пациентов с ADPKD.

5 Временный или хронический стеноз или обструкция мочеточника является еще одним известным состоянием, которое может привести к развитию ХБП и фиброза. Указанные состояния могут представлять собой такие заболевания, как атрезия или стеноз мочеточника, или конкремент (*почечный камень*) в верхних или нижних мочевых путях, или обструктивная нефропатия и рефлюкс-нефропатия.

10 В целом, известно, что в развитии ХБП участвуют 3 ключевых фактора: повышенное кровяное давление, высокий уровень глюкозы в крови и воспаление. Таким образом, лечение с помощью соединения, описанного в настоящем документе, можно использовать для пациентов, страдающих от повреждения почек из-за высокого кровяного давления, например, вследствие эссенциальной гипертензии или гипертензивной болезни
15 почек, или от повреждения почек вследствие гипергликемии, например, повышенного уровня глюкозы в крови, связанного с диабетом.

Целью лечения пациента с помощью описанного в настоящем документе соединения является предотвращение дальнейшего ухудшения функции почек и развития терминальной стадии почечной недостаточности (ESRD) и почечной недостаточности.

20 После развития у пациента почечной недостаточности варианты лечения ограничены и включают инвазивные процедуры, такие как гемодиализ, перитонеальный диализ и трансплантация почки.

Пациент с недавно диагностированным сахарным диабетом может быть хорошим кандидатом для лечения с помощью описанного в настоящем документе соединения по
25 нескольким причинам. Некоторые из клинических проявлений, часто наблюдаемых во время первоначального диагноза диабета, представляют собой протеинурию и повышенный уровень глюкозы в моче, что свидетельствует о продолжающемся клеточном стрессе в тканях почки. Пациенты с диабетом 1 типа обычно характеризуются периодом, называемым «фазой медового месяца», когда лечение с применением экзогенного
30 инсулина является на какое-то время достаточным для компенсации потери секреторной способности и потенциального уменьшения продолжающейся потери массы бета-клеток. Это, по-видимому, уменьшает нагрузку на бета-клетки, что позволяет им оправиться от продолжающейся иммунной атаки. Введение пациенту описанного в настоящем документе соединения в этот период времени может дополнительно помочь защитить
35 оставшуюся массу бета-клеток в дополнение к защите почек от продолжающегося

клеточного стресса, воспаления и развития фиброза. Данные, представленные в настоящем документе, подтверждают, что пациент с недавно диагностированным сахарным диабетом и продолжающимся стрессом в тканях почек может извлечь пользу от периода лечения с помощью описанного в настоящем документе соединения которое
5 уменьшает воспалительные и профибротические состояния в почках.

В почке снижение E-кадгерин-опосредованной клеточной адгезии инициирует серию событий, результатом которых в конечном итоге является прерывистый фенотип, связанный с частичной эпителиально-мезенхимальной трансформацией. Инициация облегчает дезинтеграцию комплексов как адгезионных, так и плотных контактов, что
10 приводит к потере адгезии, уменьшению межклеточного взаимодействия через щелевые контакты и пропускающему тубулярному эпителию. Применение описанного в настоящем документе соединения позволяет обратить вспять изменения белков адгезионных и плотных контактов и трансклеточной проницаемости. Кроме того, применение соединения согласно настоящему изобретению позволяет ингибировать высвобождение
15 полуканального АТФ, например, Sx43-опосредованное высвобождение АТФ.

Накопление внеклеточного матрикса (ECM), вызванное дисбалансом между образованием и деградацией, является основным отличительным признаком ХБП. Роль TGF β 1 в данном процессе хорошо известна (например, см. Meng *et al.*, *Nat Rev Nephrol*, 2016, 12, 325-338; и Akagi, Y *et al.*, *Kidney International*, 1996, Vol. 50: 148-55), и
20 понимание того, как устранить указанные изменения, имеет четкие последствия для того, как избежать или уменьшить прогрессирование заболевания.

Воспалительная реакция в проксимальных канальцах и вокруг них включает активацию нескольких типов клеток в сочетании с секрецией многочисленных маркеров воспаления. В частности, растворимые хемокины, цитокины и факторы роста
25 рекрутируют и активируют инфильтрирующие иммунные клетки и резидентные фибробласты. Устойчивая активация таких клеток опосредует тубулоинтерстициальный фиброз.

Соответственно, в одном из аспектов соединение согласно настоящему изобретению обращает вспять изменения экспрессии и секреции белков внеклеточного
30 матрикса, адипокинов, хемокинов и факторов роста, индуцированные TGF β 1. Согласно другому аспекту соединение согласно настоящему изобретению уменьшает воспаление в проксимальном канальце или тубулоинтестинальных тканях. Согласно дополнительному аспекту соединение согласно настоящему изобретению защищает от изменений функции почек, связанных с воспалением и фиброзом.

35 Клеточное старение может играть ключевую роль в прогрессировании хронической

болезни почек, при этом указанное старение связано с ЕМТ (эпителиально-мезенхимальный переход), провоспалительным секретомом и отложением внеклеточного матрикса. Старение означает необратимую остановку пролиферативного роста с соответствующими изменениями организации хроматина, транскрипции генов и секреции белка. В этом контексте известно, что стареющие клетки демонстрируют повышенную экспрессию ингибиторов циклин-зависимой киназы (CDK) (CKI), в том числе p21Cip1 (p21) и p16Ink4a (p16), и измененную экспрессию ренопротекторного Клото. Таким образом, при переходе к стареющему фенотипу, предшествующему развитию функциональных изменений, связанных с повреждением почки, клиренс стареющих клеток при заболевании почек может улучшить функцию почек. Данные, представленные в настоящем документе, например, в примере 4, показывают, что TGFβ1 индуцирует повышенную экспрессию p16, p21 и циклина D1 и что такие изменения экспрессии обращались вспять при совместной инкубации клеток с данегаптидом. Указанные наблюдения подтверждают, что данегаптид или его фармацевтически приемлемую соль можно использовать для лечения заболевания почек, такого как хроническая болезнь почек (ХБП).

Согласно настоящему изобретению данегаптид или его фармацевтически приемлемую соль (например, в форме подходящей фармацевтической композиции) можно вводить нуждающемуся в этом субъекту в терапевтически эффективном количестве.

Эффективное количество соединения может составлять по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг массы тела/сутки, например, по меньшей мере примерно 0,3 мг/кг массы тела/сутки, по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг массы тела/сутки, например, по меньшей мере примерно 1 мг/кг массы тела/сутки, например, по меньшей мере примерно 2 мг/кг массы тела/сутки. С другой стороны, эффективное количество соединения или димера может составлять не более примерно 10 мг/кг массы тела/сутки, например, не более примерно 5 мг/кг массы тела/сутки и не более примерно 3 мг/кг массы тела/сутки. Ожидается, что эффективное количество соединения будет составлять примерно 0,5 мг/кг массы тела/сутки, примерно 1 мг/кг массы тела/сутки, примерно 2 мг/кг массы тела/сутки или примерно 5 мг/кг массы тела.

Эксперименты, проведенные в системах *in vitro*, описанных в настоящем документе, с подбором дозы, выполненным в системах *in vitro* (поглощение карбоксифлуоресцеинового красителя в клетках НК2 и биосенсорное определение АТФ в клетках НК2), показывают, что концентрация от 50 до 100 нМ является оптимальной в микроокружении, при этом было подтверждено, что данегаптид не оказывает негативного влияния на жизнеспособность клеток в указанных анализах. Таким образом, согласно

одному из вариантов реализации применение соединения согласно настоящему изобретению обеспечивает концентрацию вводимого соединения от примерно 50 нМ до примерно 100 нМ в микроокружении почечных тканей.

5 Субъект(ы)/пациент(ы), получающий лечение согласно настоящему изобретению, предпочтительно является человеком и может иметь любой возраст, т.е. быть младенцем, ребенком, подростком, взрослым или пожилым человеком.

Способ выбора субъекта для лечения

10 В одном из вариантов реализации предложен способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем документе, включающий получение образца, содержащего биомаркер заболевания почек. В некоторых вариантах реализации указанный способ дополнительно включает лечение субъекта с применением указанного соединения. Любые средства, известные в данной области техники, которые позволяют диагностировать клинические заболевания, описанные в настоящем документе, такие как
15 хроническая болезнь почек, подходят для выбора субъекта для лечения с помощью соединения согласно настоящему изобретению.

В одном из вариантов реализации предложен способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем документе, включающий:

- a. обеспечение образца или биопсии, взятых у субъекта,
- 20 b. определение утолщения базальной мембраны (ВМ) и/или
- c. расширения мезангиального матрикса относительно исходного уровня у контрольного образца,

при этом утолщенная базальная мембрана и/или расширенный мезангиальный матрикс указывают на то, что субъект реагирует на лечение посредством указанного
25 соединения.

В одном из вариантов реализации образец, взятый у субъекта, выбран из группы, состоящей из: образца, содержащего пораженную ткань или пораженные клетки почки, образца крови, образца мочи, биопсийного образца и резекции ткани. В конкретном варианте реализации образец, взятый у субъекта, представляет собой образец,
30 содержащий пораженную ткань или пораженные клетки почки. В другом варианте реализации образец представляет собой образец крови. В дополнительном варианте реализации образец представляет собой образец мочи. В одном из вариантов реализации контрольный образец получен от одного или более здоровых субъектов и содержит здоровую ткань или здоровые клетки того же происхождения, что и пораженная ткань или
35 пораженные клетки.

Другим простым и подходящим диагностическим маркером для выбора пациента для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем документе, является измерение уровня белка или альбумина в образце мочи пациента. Стойкая протеинурия или альбуминурия могут являться клиническим показанием, при котором данегаптид будет обладать терапевтическим потенциалом. Иногда ранние проявления описывают как пациента с микроальбуминурией. Измерение альбуминурии, отношения альбумина к креатинину в моче или микроальбуминурии представляют собой конкретные полезные диагностические маркеры, подтверждающие выбор пациента для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем документе. Измерения альбуминурии и микроальбуминурии могут быть надлежащим образом дополнены другими диагностическими маркерами, такими как наличие артериальной гипертензии, дислипидемии и уровней гемоглобина A1c, для дальнейшей оптимизации выбора пациента для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем документе. Измерение или обнаружение воспалительных клеток или эритроцитов в моче являются известными маркерами нефрита и могут использоваться в качестве подходящих подтверждающих маркеров для выбора пациента для лечения. Наличие других биомаркеров воспалительного заболевания почек, таких как моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), липокалин, ассоциированный с желатиназой нейтрофилов (NGAL), молекула повреждения почек-1 (KIM-1), хемокины, экспрессируемые и секретируемые Т-клетками при активации (RANTES), фактор некроза опухоли-альфа (TNF- α), матриксная металлопептидаза 9 (MMP9), фактор межклеточной адгезии 1 (ICAM 1), Клото, асимметричный диметиларгинин (ADMA) и некоторые цитокины, такие как интерлейкин-18 (IL-18), трансформирующий фактор роста бета 1 (TGF β 1), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), белок 2, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP2), белок 3, связывающий инсулиноподобный фактор роста (IGFBP3) и фактор ингибирования лейкемии (LIF), также могут быть полезны для прогнозирования, реагирует ли субъект на лечение посредством соединений, описанных в настоящем документе. Дополнительные примеры биомаркеров при хронической болезни почек (ХБП) см. в Fassett *et al.*, *Kidney International*, 2011, 80, 806-821; Lopez-Giacoman *et al.*, *World J Nephrol*, 2015, 4(1), 57-73; Lousa *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 43. В примере 7, описанном в настоящем документе, показано, что соединение согласно настоящему изобретению модулирует перечисленные биомаркеры заболевания почек и другие маркеры воспаления в первичных эпителиальных клетках проксимальных канальцев человека (первичных hPTECs), подвергаемых TGF β 1-индуцированному

стрессу, демонстрируя защитный эффект против заболевания почек, такого как хроническая болезнь почек (ХБП).

В одном из вариантов реализации соединение согласно настоящему изобретению применяют при лечении заболевания почек, при этом указанное заболевание почек
5 проявляется в виде протеинурии, альбуминурии или микроальбуминурии.

При биопсии ткани почки, взятой у пациента с заболеванием почек, можно наблюдать повреждение почек вследствие гломерулонефрита, интерстициального нефрита или поликистоза почек, при этом такие наблюдения также могут служить руководством при выборе пациента для лечения с помощью соединения, описанного в настоящем
10 документе. Согласно одному из вариантов реализации соединение, предложенное в настоящем изобретении, применяют при лечении заболевания почек, при этом указанное заболевание почек представляет собой гломерулярное заболевание. В дополнительном варианте реализации гломерулярное заболевание представляет собой гломерулосклероз или диабетический гломерулосклероз.

15 Комбинации перечисленных диагностических маркеров и включение маркеров воспаления могут дополнительно помочь идентифицировать подходящих субъектов для лечения.

Пациента, подходящего для лечения, у которого заболевание почек проявляется в виде почечного воспаления и/или развития почечного фиброза, можно идентифицировать
20 с помощью различных диагностических маркеров и/или по наличию определенных симптомов. У пациентов могут наблюдаться такие симптомы, как лихорадка, озноб, боль в боку, животе и/или паху. Частое мочеиспускание или ощущение жжения или боль при мочеиспускании также могут быть симптомами, свидетельствующими о том, что у пациента может быть воспаление почек. Диагностические маркеры, такие как
25 обнаружение эритроцитов или воспалительных клеток в образце мочи, могут подтвердить наличие воспаления почек. Применение микроскопа, анализ мочи с помощью тест-полоски или специальные диагностические тесты, в том числе биомаркеры, измеренные в моче или крови, позволяют выявить признаки воспаления и/или развития фиброза.

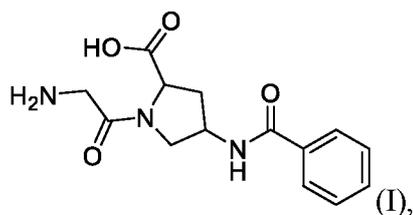
30 Способы лучевой диагностики, включающие ультразвунографию и компьютерную томографию (КТ), могут дополнительно подтверждать наличие воспаления. Признаки почечного фиброза можно диагностировать на основе биопсии почек, при этом подходящие способы лучевой диагностики включают ультразвунографию и магнитно-резонансную томографию (МРТ).

В клинической практике идентификация пациента с заболеванием почек, проявляющемся в виде воспаления почек и/или почечного фиброза, часто будет основана на комбинации имеющихся у пациента соответствующих симптомов и подтверждена с помощью нескольких из таких диагностических маркеров.

5

ПУНКТЫ:

1. Соединение формулы I:



10 или его фармацевтически приемлемая соль и/или гидрат; для применения при лечении или предотвращении заболевания почек.

2. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 1, отличающееся тем, что заболевание почек проявляется у субъекта в виде воспаления почек и/или развития почечного фиброза.

15 3. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или диабетическую нефропатию.

4. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 3, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой диабетическую нефропатию, которая привела к хронической болезни почек (ХБП).

20 5. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 3 или п. 4, отличающееся тем, что:

(a) хроническая болезнь почек находится на стадии 1, определяемой по повреждению почек и СКФ > 90 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

25 (b) хроническая болезнь почек находится на стадии 2, определяемой по повреждению почек и СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

(c) хроническая болезнь почек находится на стадии 3a, определяемой по СКФ от 45 до 59 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

(d) хроническая болезнь почек находится на стадии 3b, определяемой по СКФ от 30 до 44 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

30 (e) хроническая болезнь почек находится на стадии 4, определяемой по СКФ от 15 до 29 мл/мин/1,73 м² тела субъекта.

6. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из

предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек проявляется в виде протеинурии, альбуминурии или микроальбуминурии.

7. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой гломерулярное заболевание, такое как гломерулосклероз или диабетический гломерулосклероз.

8. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек вызвано первичным заболеванием, выбранным из группы, состоящей из: системной красной волчанки (волчаночного нефрита), диабетической нефропатии, саркоидоза, синдрома Шегрена, амилоидоза, множественной миеломы, васкулита, атрезии или стеноза мочеточника, конкремента (*почечного камня*) в верхних или нижних мочевых путях или обструктивной нефропатии и рефлюкс-нефропатии.

9. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой тубулоинтерстициальное заболевание почек, такое как хронический тубулоинтерстициальный нефрит, тубулоинтерстициальные и тубулярные поражения, вызванные лекарствами и тяжелыми металлами, и тубулоинтерстициальные нарушения почек при системных заболеваниях соединительной ткани.

10. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой редкое наследственное заболевание почек, такое как поликистоз почек (PKD).

11. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует высвобождение полуканального АТФ, например, Сх43-опосредованное высвобождение АТФ.

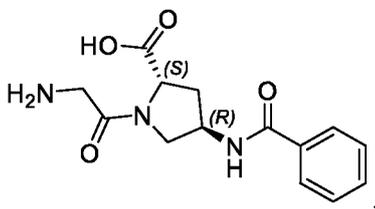
12. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что:

(a) указанное соединение обращает вспять изменения экспрессии и секреции белков внеклеточного матрикса, адипокинов, хемокинов и факторов роста, индуцированные TGF β 1; и/или

(b) указанное соединение защищает от изменений функции почек, связанных с воспалением и фиброзом; и/или

(с) указанное соединение уменьшает воспаление в проксимальном канальце или тубулоинтестинальных тканях.

13. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение представлено формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

14. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное применение обеспечивает целевую концентрацию введенного соединения, составляющую от 50 до 100 нМ, в микроокружении почечных тканей.

15. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемая соль представляет собой гидрохлоридную соль.

16. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят перорально или парентерально, при этом указанное соединение предпочтительно вводят перорально.

ПРИМЕРЫ

Материалы

Клональные эпителиальные клетки почки человека (HK2) и первичные эпителиальные клетки проксимальных канальцев человека (hPTECs) приобретали в ATCC (Американская коллекция типовых культур) (LGC Standards). Материалы для культивирования тканей приобретали в Invitrogen (Пейсли, Великобритания). Поливинилиденфторидную (ПВДФ) мембрану Immobilon-F1 получали в компании Millipore (Уотфорд, Великобритания), а блокирующий буфер Odyssey и вторичные флуоресцентные антитела приобретали в компании LI-COR (Кембридж, Великобритания). Антитела к E-кадгерину, N-кадгерину и ZO-1 получали в компании Cell Signalling Technologies (Хартфордшир, Великобритания), тогда как антитела к клаудину-2, Col I и Col IV получали в компании ABCAM (Кембридж, Великобритания). Антитело к

фибронектину приобретали в компании Santa Cruz (Санта-Крус, штат Калифорния, США). Рекомбинантный hTGF β 1 получали в компании Sigma (Poole, Великобритания), как и все другие химические продукты общего назначения. Данегаптид был предоставлен компанией Zealand Pharmaceuticals. Биосенсоры АТФ получали в компании Sarissa Biomedical Ltd (Ковентри, Великобритания), и чашки для флуоресцентной микроскопии получали в компании WPI (Хартфордшир, Великобритания). Фильтры Transwell приобретали в компании Corning (Ноттингемшир, Великобритания). Набор Proteome Profiler Human Cytokine Array Kit (набор для скрининга протеома для определения цитокинов у человека) получали в компании R&D Systems (Оксфордшир, Великобритания).

Первичные эпителиальные клетки проксимальных канальцев человека (hPTECs) держали в базальной среде для эпителиальных клеток почки от компании ATCC, в которую добавляли 0,5% FCS (фетальная телячья сыворотка) масс./об., трийодтиронин (10 нМ), rhEGF (рекомбинантный человеческий эпидермальный фактор роста) (10 нг/мл), гемисукцинат гидрокортизона (100 нг/мл), rhInsulin (рекомбинантный человеческий инсулин) (5 мкг/мл), эпинефрин (1 мкМ), трансферрин (5 мкг/мл) и L-аланил-L-глутамин (2,4 мМ), в увлажненной атмосфере при 37 °C при 5% содержании CO₂. Перед обработкой клетки подвергали ночному сывороточному голоданию. Клетки почки человека (HK2) (пассаж 18-30) выращивали в среде DMEM/Hams F12 (смесь модифицированной по способу Дульбекко среды Игла и субстрата Хэма F-12) с добавлением 10% FCS масс./об., глутамин (2 ммоль/л) и EGF (эпидермальный фактор роста) (5 нг/мл) в увлажненной атмосфере при 37 °C при 5% содержании CO₂. Клетки HK2 иммортализовывали путем трансдукции генов Е6/Е7 вируса папилломы человека 16 (HPV-16) и не содержали микоплазм. Во всех экспериментах клетки высевали в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 ммоль/л) в течение 48 часов, а затем подвергали ночному сывороточному голоданию перед обработкой.

Пример 1 - Данегаптид не влияет на жизнеспособность тубулярных эпителиальных клеток.

Материалы и способы

Клетки HK2 культивировали в среде условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) в течение 48 часов перед ночным сывороточным голоданием, а затем обрабатывали с применением TGF β 1 (10 нг/мл) \pm данегаптид (от 50 нМ до 1 мкМ) в течение 48 часов (фиг. 1А, n=3).

Анализ на основе MTT

Для оценки цитотоксического действия данегаптида на пролиферацию клеток проводили анализ на основе 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ), как известно в данной области техники. Клетки НК2 высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 мМ) в течение 48 часов перед ночным сывороточным голоданием, а затем стимулировали в течение 48 часов с помощью TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптин (от 50 до 1000 нМ). Колориметрическое измерение продуцирования формазана соответствовало количеству жизнеспособных клеток.

Анализ на лактатдегидрогеназу

10 Высвобождение лактатдегидрогеназы (LDH) в среду в результате повреждения цитоплазматической мембраны обычно используют для оценки гибели клеток или цитотоксичности. Клетки НК2 высевали в 96-луночные планшеты и культивировали в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 мМ) в течение 48 часов перед ночным сывороточным голоданием. Затем клетки стимулировали в течение 48 часов с помощью TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптин (от 50 до 1000 нМ). Набор II для анализа LDH-цитотоксичности (Abscam) использовали для количественного определения LDH в соответствии с инструкциями производителя.

Анализ с применением кристаллического фиолетового

20 Такой простой анализ применяли для измерения относительной плотности клеток, прилипших к многолуночным чашкам. Кристаллический фиолетовый окрашивает ДНК и может быть количественно определен колориметрическим способом после солиubilизации. Клетки НК2 высевали в 12-луночные планшеты и культивировали в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 мМ) в течение 48 часов перед ночным сывороточным голоданием, а затем стимулировали в течение 48 часов с помощью TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптин (от 50 до 1000 нМ). Данный анализ был описан ранее (Hills, С.Е.; Jin, Т.; Siamantouras, Е.; LiuIssac, I.K.K.; Jefferson, K.P.; Squires, P.E. "Special K" and a Loss of Cell-To-Cell Adhesion in Proximal Tubule-Derived Epithelial Cells: Modulation of the Adherens Junction Complex by Ketamine. *PLoS One* **2013**, *8*, e71819). Кратко, клетки фиксировали с применением параформальдегида в течение 10 минут, промывали с помощью PBS и инкубировали в течение 10 минут при комнатной температуре в 1% растворе кристаллического фиолетового. После еще нескольких промывок окрашенное вещество солиubilизировали с применением 1% додецилсульфата натрия и измеряли оптическую плотность с помощью устройства для считывания планшетов.

Результаты

Анализ на основе МТТ подтвердил, что ни TGF β 1 (101,9 \pm 11,7%), ни данегаптин сам по себе не изменяли жизнеспособность клеток (95,2 \pm 7% (50 нМ), 103 \pm 5,7% (100 нМ) и 96,6 \pm 5,3% (1 мкМ)) по сравнению с контролем. Также не наблюдалось влияния на жизнеспособность клеток при совместной инкубации обработанных TGF β 1 клеток с данегаптидом (104,1 \pm 2,2% (50 нМ), 93,4 \pm 1,6% (100 нМ) и 89,3 \pm 3,7% (1 мкМ)). Для подтверждения указанных данных проводили анализ с применением кристаллического фиолетового и LDH. Высвобождение LDH в клетках, обработанных TGF β 1, было сопоставимо с контролем (109,3 \pm 11,3%), и совместная инкубация с данегаптидом не оказывала дополнительного эффекта (106,4 \pm 11,6% (50 нМ), 113,9 \pm 15,6% (100 нМ) и 113,2 \pm 4,3% (1 мкМ)). Как и ожидалось, данегаптин сам по себе существенно не изменял высвобождение LDH по сравнению с контролем (104,4 \pm 4,3% (50 нМ), 95,3 \pm 4,7% (100 нМ) и 92,6 \pm 3,3% (1 мкМ)). Окрашивание клеток с помощью кристаллического фиолетового позволило воспроизвести указанные результаты, при этом данные для TGF β 1 (10 нг/мл, 96,9 \pm 0,7,3%) и TGF β 1 плюс данегаптин (от 50 нМ до 1 мкМ) были сопоставимы с контролем (98,2 \pm 1,9% (50 нМ), 97,5 \pm 1,8% (100 нМ) и 85,8 \pm 5,3% (1 мкМ)). В заключении, данегаптин сам по себе не влиял на окрашивание кристаллическим фиолетовым (98,3 \pm 2,5% (50 нМ), 99,6 \pm 2,7% (100 нМ) и 98,5 \pm 2,2% (1 мкМ) контроля). С учетом полученных данных для последующих исследований была выбрана концентрация от 50 до 100 нМ.

Вывод:

Данный пример продемонстрировал, что на жизнеспособность клеток не оказывали неблагоприятного влияния профибротический цитокин TGF β 1, применяемый для стимуляции клеток, или данегаптин, введенный в качестве модификатора щелевых контактов и блокатора полуканалов для модификации TGF β 1-индуцированных клеточных реакций.

Пример 2 - Данегаптин блокирует вызванные TGF β 1 изменения поглощения красителя, опосредованного полуканалами, в тубулярных эпителиальных клетках.

Материалы и способы

Анализ поглощения карбоксифлуоресцеинового красителя

Клетки НК2 и hPTEC высевали в чашках для флуоресцентной микроскопии (диаметр 22 мм) и культивировали в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 ммоль/л) в течение 48 часов. После ночного сывороточного голодания клетки инкубировали с применением TGF β 1 (10 нг/мл) \pm данегаптин (100 нМ) в течение 48 часов.

Для последующих стадий использовали сбалансированный солевой раствор (BSS, pH 7,0), содержащий NaCl (137 мМ), KCl (5,4 мМ), MgSO₄ (0,8 мМ), Na₂HPO₄ (0,3 мМ), KH₂PO₄ (0,4 мМ), NaHCO₃ (4,2 мМ), HEPES (10 мМ) и глюкозу (5 мМ). Для индуцирования поглощения красителя клетки подвергали воздействию BSS, не содержащего Ca²⁺ (5 CaCl₂ + EGTA (этиленгликоль тетрауксусная кислота) (1 мМ)), плюс карбоксифлуоресцеин (200 мкМ) в течение 10 минут с последующим 10-минутным периодом в Ca²⁺-содержащем BSS (1,3 мМ) плюс карбоксифлуоресцеин (200 мкМ). Затем чашки промывали посредством Ca²⁺-содержащего BSS (12 мл). Изображения получали с помощью камеры с зарядовой связью Cool Snap HQ (Roper Scientific) и программного обеспечения Metamorph (Universal Imaging Corp., Марлоу, Бакс, Великобритания). Для количественной оценки поглощения красителя использовали ImageJ, при этом вокруг каждой клетки (приблизительно 10-15 клеток/чашка) очерчивали исследуемую область (ROI) и измеряли среднюю интенсивность пикселя. Значение фоновой флуоресценции вычитали из каждой ROI.

15 Результаты

Анализ поглощения карбоксифлуоресцеинового красителя использовали для определения, может ли данегаптин устранять индуцированное TGFβ1 поглощение красителя через полуканалы в клетках НК2 и первичных hPTECs. Как и ожидалось, TGFβ1 (10 нг/мл) увеличивал поглощение красителя до 354,9±32,6% относительно контроля в клетках НК2, тогда как совместная инкубация с данегаптидом (50 нМ и 100 нМ) значительно притупляла реакцию 165,5±17,9% и 147,6±18,1%, соответственно (фиг. 1B; P≤0,001, n=4). Данегаптин сам по себе не изменял поглощение красителя. Поглощение карбоксифлуоресцеина увеличивалось при применении TGFβ1 (10 нг/мл) в первичных hPTECs (310,8±38,6% относительно контроля), реакция частично нивелировалась по сравнению с контролем при совместной инкубации с данегаптидом (100 нМ; 145±19,7%) (фиг. 1C; P≤0,01, n=4). В заключении, исследовали диапазон доз данегаптида от 10 до 1000 нМ и обнаружили, что оптимальное ингибирование поглощения карбоксифлуоресцеинового красителя в клетках НК2 происходило при концентрации данегаптида от 50 до 100 нМ (фиг. 1D).

30

Вывод:

Данный пример продемонстрировал, что TGFβ1 (10 нг/мл) стимулирует и подвергает стрессу эпителиальные клетки почки, что приводит к открытию их полуканалов на основе Sx43, обеспечивая приток карбоксифлуоресцеинового красителя в 35 клетки. Совместное введение данегаптида (100 нМ) модифицировало полуканалы Sx43

таким образом, что они оставались в закрытом состоянии, и тем самым ограничивало поглощение красителя в качестве маркера клеточного стресса. Следовательно, данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для защиты эпителиальных клеток почек от TGFβ1-индуцированного стресса и патологического открытия полуканалов.

Пример 3 - Данегаптин устраняет вызванное TGFβ1 опосредованное полуканалами высвобождение АТФ в hPTECs.

Материалы и способы

10 *Биосенсорное определение АТФ*

Биосенсоры АТФ (Sarissa Biomedical, Ковентри, Великобритания) применяли в амперометрической установке с одновременной двойной записью, как описано ранее (Price, G.W.; Chadjichristos, C.E.; Kavvadas, P.; Tang, S.C.W.; Yiu, W.H.; Green, C.R.; Potter, J.A.; Siamantouras, E.; Squires, P.E.; Hills, C.E. Blocking Connexin-43 mediated hemichannel activity protects against early tubular injury in experimental chronic kidney disease. *Cell Commun. Signal.* **2020**, *18*). Нулевой биосенсор использовали для учета неспецифических электроактивных артефактов и вычитали из кривой АТФ. Для обеспечения обнаружения АТФ во все регистрирующие растворы включали глицерин (2 мМ). Клетки НК2 высевали на стеклянные покровные стекла (диаметр 10 мм) в DMEM/F12 с низким содержанием глюкозы (5 ммоль/л) в течение 48 часов перед ночным сывороточным голоданием. Затем клетки инкубировали с применением TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптин (100 нМ) в течение 48 часов. Покровные стекла переносили в камеру, содержащую Ca²⁺-содержащий BSS, перфузировали со скоростью 6 мл/мин (37 °С) и оставляли на 10 минут для акклиматизации. АТФ и нулевые биосенсоры сгибали и опускали таким образом, чтобы электрод лежал параллельно клеточному монослою. После достижения стабильного исходного уровня перфузия BSS, не содержащего Ca²⁺, стимулировала открытие полуканалов. После высвобождения АТФ Ca²⁺-содержащий BSS использовали для закрытия полуканалов с последующим применением калибровочного раствора АТФ (10 мМ). Регистрируемые данные получали при 4 Гц с применением интерфейса Micro CED (Mark2) с помощью программного обеспечения Spike (v8.03).

Результаты

Для определения, может ли данегаптин (50-100 нМ) предотвратить вызванное TGFβ1 (10 нг/мл) высвобождение АТФ из полуканалов в hPTECs, авторы изобретения применяли биосенсорное определение АТФ. TGFβ1 (10 нг/мл) увеличивал высвобождение АТФ с 0,33±0,11мкМ до 3,60±0,29мкМ в hPTECs (фиг. 2В и Е; P≤0,001), эффект частично

нивелировался под действием данегаптида как при дозе 50 нМ ($1,90 \pm 0,26 \text{ мкМ}$; $P \leq 0,01$), так и при дозе 100 нМ ($0,79 \pm 0,19 \text{ мкМ}$; $P \leq 0,001$) (фиг. 2Е, $n=3$, 6 повторных анализов/номер образца). Данегаптин сам по себе не влиял на высвобождение АТФ (фиг. 2С и Е), при этом регистрировали уровни АТФ $0,35 \pm 0,10 \text{ мкМ}$ (50 нМ) и $0,31 \pm 0,09 \text{ мкМ}$ (100 нМ) по сравнению с контролем (фиг. 2Е).

Вывод:

Данный пример продемонстрировал, что TGF β 1 (10 нг/мл) стимулирует и подвергает стрессу эпителиальные клетки почки, что приводит к открытию их полуканалов на основе Сх43, обеспечивая отток АТФ во внеклеточный матрикс. Совместное введение данегаптида (как 50 нМ, так и 100 нМ) модифицировало полуканалы Сх43 таким образом, что они оставались в закрытом состоянии несмотря на TGF β 1-индуцированный стресс, и, тем самым, ограничивало утечку АТФ из цитозоля во внеклеточную среду. Следовательно, данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для защиты почечных эпителиальных клеток от TGF β 1-индуцированного стресса и патологического открытия полуканалов с последующей утечкой АТФ во внеклеточную среду. Хорошо известно, что высокий уровень АТФ во внеклеточном компартменте является мощным стимулом воспаления. Таким образом, данегаптин обеспечивает подходящий способ лечения заболевания почек, которое проявляется в виде воспаления и развития фиброза, и, в частности, хронической болезни почек.

Пример 4 - Данегаптин реверсирует TGF β 1-индуцированные изменения белков во время клеточного цикла и маркера ренопротекции в hPTECs.

Материалы и способы

Для определения, может ли данегаптин подавлять опосредованную полуканалами регуляцию общего клеточного цикла и ренопротекторных маркеров, hPTECs инкубировали с применением TGF β 1 (10 нг/мл) \pm данегаптин (100 нМ) в течение 12 часов и оценивали экспрессию мРНК гена-кандидата с помощью анализа с применением кПЦР.

РНК экстрагировали с применением мини-набора RNeasy (QIAGEN) и обратно транскрибировали (Invitrogen). Проводили ПЦР в реальном времени (SYBR GreenER, Invitrogen), используя прибор StepOne Plus (Applied Biosystems Inc, Фостер-Сити, Калифорния). Экспрессию кДНК получали путем сравнения со стандартной кривой последовательно разбавленной кДНК. Использовали следующие праймеры: р16 (прямой праймер: CTCGTGCTGATGCTACTGAGGA, обратный праймер: GGTCGGCGCAGTTGGGCTCC), р21 (прямой праймер:

AGGTGGACCTGGAGACTCTCAG, обратный праймер:
 TCCTCTTGGAGAAGATCAGCCG), циклин D1 (прямой праймер:
 TCTACACCGACAACCTCCATCCG, обратный праймер:
 TCTGGCATTGTTGGAGAGGAAGTG), Клото (прямой праймер:
 5 CCTCCTTTACCTGAAAATCAGCC, обратный праймер:
 CAGGTTCGGTAAACTGAGACAGAG). Анализ кривой плавления подтвердил
 специфичность праймера и проверил на возможное загрязнение.

Результаты

10 Добавление данегаптида к hPTECs, обработанным с помощью TGFβ1, возвращало
 экспрессию p16 от 358,8±21,1% до 193±18,5% относительно контроля, p21 от 221,8±12,9%
 до 142,2±6,2% и циклина D1 от 253,2±7,7% до 132,9±15,0% (фиг. 3; 150 P≤0,001, n=3,
 соответственно). Кроме того, данегаптин частично реверсировал снижение Клото от
 43,3±3,8% до 59,9±11,7% относительно контроля, фиг. 3, n=3).

Вывод:

15 Данный пример продемонстрировал, что TGFβ1-обработанные hPTECs
 реагировали повышенной экспрессией мРНК, кодирующей белки во время клеточного
 цикла, такие как p16, p21 и циклин D1, и что данегаптин был способен частично
 уменьшать TGFβ1-индуцированные изменения указанных уровней мРНК. Кроме того,
 данный пример продемонстрировал, что TGFβ1 индуцировал повышение экспрессии p16,
 20 p21 и циклина D1 и что такие изменения обращались вспять при совместной инкубации
 клеток с данегаптидом. Кроме того, полученные данные показали, что TGFβ1 снижал
 уровень мРНК важного ренопротекторного фактора, называемого Клото, и что данегаптин
 был частично способен защитить от такого TGFβ1-индуцированного снижения Клото.
 Пониженное продуцирование белка Клото наблюдалось у пациентов с хронической
 25 почечной недостаточностью, и это может быть одним из факторов, лежащих в основе
 дегенеративных процессов, наблюдаемых при ХБП. Опять же, указанные данные
 дополнительно подтверждают, что данегаптин может оказывать защитное действие на
 эпителиальные ткани почки, подверженные воздействию профибротического цитокина
 TGFβ1 и, следовательно, данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль является
 30 перспективным кандидатом для лечения заболевания почек, и, в частности, хронической
 болезни почек.

Пример 5 - Данегаптид обращает вспять TGFβ1-опосредованные изменения белков адгезионных и плотных контактов и трансклеточной проницаемости в hPTECs.

Материалы и способы

Для определения, может ли данегаптид устранять TGFβ1-опосредованные изменения белков адгезионных и плотных контактов, hPTECs инкубировали с TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 48 часов и оценивали экспрессию белков-кандидатов с помощью вестерн-блоттинга.

Получение цитозольного белка из клеток НК2 и HPTEC, их разделение посредством электрофореза в полиакриламидом геле в присутствии додецилсульфата натрия и перенос на ПВДФ мембраны Immobilon-Fl было описаны ранее (Price, G.W.; Chadjichristos, C.E.; Kavvadas, P.; Tang, S.C.W.; Yiu, W.H.; Green, C.R.; Potter, J.A.; Siamantouras, E.; Squires, P.E.; Hills, C.E. Blocking Connexin-43 mediated hemichannel activity protects against early tubular injury in experimental chronic kidney disease. *Cell Commun. Signal.* 2020, 18). Мембраны блокировали посредством блокирующего буфера Odyssey (LI-COR), затем зондировали в течение ночи с применением антител против E-кадгерина (1:1000), N-кадгерина (1:1000), клаудина-2 (1:500) и ZO-1 (1:1000), Col I (1:1000), Col IV (1:2000), фибронектина (1:4000), ламинина (1:500), ILK1 (1:500), бета-катенина (1:2000), виментина (1:500), MMP3 (1:500). Полосы визуализировали с помощью OdysseyFC и определяли полуколичественно с применением ImageStudio (v5.2, LI-COR). Кроме того, измеряли трансэпителиальное электрическое сопротивление (TER) в качестве функциональной меры связывания эпителиальных клеток и трансклеточной проницаемости.

Результаты

Данегаптид частично восстанавливал экспрессию E-кадгерина (ECAD) от 33,3±3,3% до 89±7,6% относительно контроля, N-кадгерина (NCAD) от 224,4±29,6 до 161,9±27,4% и виментина от 212,9±13% до 147,3±8,8% (фиг. 4A; $P \leq 0,001$, $P \leq 0,01$ и $P \leq 0,001$ соответственно, $n=3$). Экспрессия бета-катенина под действием данегаптида оставалась неизменной и составляла от 149,2±11,2% (один TGFβ1) до 151,6±16,8% (TGFβ1 + данегаптид, фиг. 4B; $P=NS$, $n=3$). Оценка влияния данегаптида на белки плотных контактов подтвердила, что модификатор щелевых контактов частично восстанавливал экспрессию клаудина-2 от 44,5±5% до 74,6±5% относительно контроля и ZO-1 от 27,8±11,3% до 52,8±5,4% по сравнению с контролем (фиг. 4B; $P \leq 0,05$, $n=3$). Исследования, в которых изучали трансэпителиальное электрическое сопротивление, подтвердили, что снижение экспрессии белков плотных контактов, наблюдаемое под действием TGFβ1 (10 нг/мл), сопровождалось потерей трансэпителиального сопротивления от 57,33±1,86

Ом·см² до 10±1,53 Ом·см² ($P \leq 0,001$, n=3) Такая повышенная проницаемость была частично скорректирована путем совместной инкубации с данегаптидом (36±2,08 Ом·см²) (фиг. 4С; $P \leq 0,001$, n=3).

Вывод:

5 Данный пример продемонстрировал, что данегаптид был способен поддерживать связывание эпителиальных клеток, несмотря на стресс, вызванный TGFβ1. О таком защитном эффекте данегаптида свидетельствовали как экспрессия белков адгезионных и плотных контактов, так и функциональные показатели трансклеточной проницаемости. Считается, что потеря E-кадгерин-опосредованной клеточной адгезии и дезинтеграция
10 плотных контактов является иницирующим триггером частичного эпителиально-мезенхимального перехода, при этом все такие факторы, как дезинтеграция соединительных белков, пропускающий эпителий и приобретение мезенхимальных белков, таких как специфические белки виментин и фибробласт, связаны с основной патологией тубулоинтерстициального фиброза, тяжесть которой обуславливает
15 прогрессирование заболевания. Известно, что поддержание межклеточного связывания и способность клеток взаимодействовать и синхронизировать свою активность имеет важное значение для поддержания структуры, целостности и функции ткани. Следовательно, данегаптид или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для лечения заболевания почек, в частности, хронической
20 болезни почек.

Пример 6 - Данегаптид предотвращает вызванную TGFβ1 повышающую регуляцию белков внеклеточного матрикса в hPTECs.

Материалы и способы

25 Для исследования влияния данегаптида на вызванные TGFβ1 изменения экспрессии белков ЕСМ, клетки hPTEC культивировали условиях низкого содержания глюкозы (5 мМ) в течение 48 часов, подвергали ночному сывороточному голоданию и обрабатывали с применением TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 48 часов. Экспрессию белков ЕСМ коллаген I, коллаген IV, фибронектин, ламинин, интегрин-
30 связанная киназа 1 и матриксная металлопротеиназа 3 оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

Результаты

По сравнению с контролем TGFβ1 увеличивал экспрессию белков ЕСМ коллаген I (334,6± 30,14%), коллаген IV (354,5±16,9%), фибронектин (301,7±50,4%) и ламинин
35 (324,8±36,4%) (фиг. 5А и В; $P \leq 0,001$, n=3). Совместная инкубация с данегаптидом

значительно уменьшала указанные изменения, восстанавливая экспрессию до 180,7±27,3% (коллаген I), 164,2±6,9% (коллаген IV), 161,3±4% (фибронектин), 149±20,4% (ламелин) ($P \leq 0,001$; $n=3$ в каждом случае). Данегаптин (100 нМ) также снижал вызванные TGFβ1 (10 нг/мл) изменения интегрин-связанной киназы 1 (ILK1) от 378,9±16,8% до 251,8±33% ($P \leq 0,001$), но оказывал минимальное влияние на матричную металлопротеиназу 3 (ММР3), снижая экспрессию от 185,3±19,6% при применении одного цитокина до 147,1±12,2% при совместной инкубации с данегаптидом.

Вывод:

Данный пример продемонстрировал, что TGFβ1 повышал экспрессию белков ЕСМ, которые, как известно, связаны с развитием фиброза, таких как коллаген I, коллаген IV, фибронектин и ламелин. Кроме того, интегрин-связанная киназа представляет собой внутриклеточную серин/треониновую протеинкиназу, которая играет фундаментальную роль в регуляции адгезии, выживания, пролиферации клеток и отложения внеклеточного матрикса (ЕСМ). Важно отметить, что согласно исследованиям ингибирование ILK уменьшало почечный фиброз в нескольких моделях ХБП. В настоящем исследовании вызванное TGFβ1 увеличение экспрессии ILK1 обращалось вспять при совместной инкубации клеток с данегаптидом. Данегаптин был способен частично защищать от TGFβ1-индуцированного продуцирования таких белков ЕСМ. Следовательно, данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для лечения заболевания почек, которое проявляется в виде развития фиброза, и, в частности, хронической болезни почек.

Пример 7 - Данегаптид уменьшает вызванные TGFβ1 изменения экспрессии адипокинов, хемокинов, факторов роста и интерлейкинов из hPTECs.
Материалы и способы

5 Для определения, устраняет ли данегаптид TGFβ1-индуцированные изменения экспрессии и секреции основных провоспалительных медиаторов, использовали набор для скрининга протеома (Human Cytokine Array Kit от компании R&D Systems, Оксфордшир, Великобритания). Первичные hPTECs культивировали, как описано выше, и обрабатывали с применением TGFβ1 (10 нг/мл) ± данегаптид (100 нМ) в течение 48 часов.

Результаты

10 Для 31 белков-кандидатов, сгруппированных в зависимости от первичной функции, приведен перечень изменений лизата (фиг. 6, таблица 1) и супернатанта (фиг. 7, таблица 2).

По сравнению с контролем TGFβ1 повышал экспрессию основных цитокинов и сигнальных молекул, имеющих отношение к ХБП и диабетической нефропатии, включая 15 TNF-α, IFN-γ, IL-8, IGFBP-2, IGFBP-3 и ICAM-1. Совместная инкубация с данегаптидом уменьшала указанные изменения согласно наблюдаемой общей картине. Согласно исследованиям уровни хорошо известных и эффективных хемоаттрактантов, продуцируемых активированными тубулярными клетками, такие как MCP-1 (моноцитарный хемоаттрактантный белок 1) и RANTES (хемокины, экспрессируемые и 20 секретируемые Т-клетками при активации), также увеличивались после стимуляции с помощью TGFβ1, при этом согласно наблюдениям такое увеличение ослаблялось при совместном введении данегаптида.

Таблица 1:

Группа	Белок	TGFB-1 (% по сравнению с контролем)	TGFB-1 + DG (% по сравнению с контролем)
Адипокины	IFN γ	206±15,4	112±12,7
	TNF-a	192±14,7	144±18,5
Функция клеток	Ангиогенин	237±36	100±20,3
	Цистатин С	182±17,5	123±14,3
	Эндоглин	145±24,9	72,3±8,9
	Калликреин 3	76±12,0	67±14,3

	MMP9	24±3,1	95±10,6
	Серпин E1	186±40,2	148±28,5
	Тромбоспондин-1	128±37,5	100±19,8
	TFF3	204±25,8	132±3,9
Хемокины	ENA 78	207±21,6	97±18,2
	ICAM 1	190±13,6	80±28,7
	MCP-1	134±30,2	97,6±13,9
	RANTES	235±13,5	104±15,2
Цитокины	G-CSF	201±24,6	126±4,7
	GM-CSF	221±11,1	136±11,6
	IGFBP2	519±99,4	334±66, 1
	IGFBP3	394±94 5	97±28,5
	LIF	328±70,4	225±82
Интерлейкины	IL1A	127426,4	80±18,8
	IL3	176±3,4	129±15,7
	IL8	236±9,4	122±5,2
	IL12 p70	177±31,0	97±4,6
	IL13	269±3,9	150±46,0
Факторы роста	FGF7	139±5,6	106±15,2
	Fit 3 лиганд	212±13,3	208±31,4
	HGF	153±17,0	104,0±9,0
	PDGF-AA/BB	247±53,4	95,2±14,6
	VEGF	203±25,9	101±16,4
Рецепторы	DPPIV	315±6,8	187±25,2
	RAGE	109±423,8	105±9,2

Таблица 2:

Группа	Белок	TGFB-1 (% по сравнению с контролем)	TGFB-1 + DG (%по сравнению с контролем)
Адипокины	IFNg	123±11,0	90±12,7
	TNF-a	176±5,5	139±6,1
Функция клеток	Ангиогенин	184±13,2	129±14,7
	Цистатин С	169±19,7	88±6,8
	Эндоглин	101±10,6	94±5,8
	Калликреин 3	75±5,61	74±20,6
	ММР9	41±8,8	80±8,9
	Серпин Е1	91±4,7	81±42,8
	Тромбоспондин-1	120±24,8	115±11,9
	TFF3	114±22,2	98±17,5
Хемокины	ENA 78	193±17,7	119±3,9
	ICAM 1	191±±13,0	124±16,6
	MCP-1	171±14,3	101±6,2
	RANTES	140±8,6	101±12,1
Цитокины	G-CSF	171±7,3	117±12,0
	GM-CSF	213±33,3	114±3,8
	IGFBP2	259±49,6	90±6,4
	IGFBP3	147±7,0	84,7±14,3
	LIF	249±32,1	134±5,4
Интерлейкины	IL1A	109±14,8	89±21,5
	IL3	127±30,6	107±38,0
	IL8	138±48,4	99±26,4
	IL12 p70	74±11,5	63±15,9
	IL13	95±16,4	62±27,2
Факторы роста	FGF7	125±11,3	102±16,5

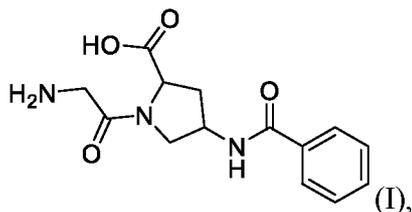
	Fit 3 лиганд	179±6,5	103±12,8
	HGF	85±15,8	88±13,7
	PDGF-AA/BB	137±9,7	99±6,3
	VEGF	209±43,3	217±49,3
Рецепторы	DPPIV	222±24,3	179±37,8
	RAGE	170±16,3	99±12,5

Вывод:

Данный пример продемонстрировал, что основные цитокины, хемокины и другие сигнальные молекулы, которые, как известно, связаны с воспалительными процессами при нескольких заболеваниях почек, включая ХБП и диабетическую нефропатию, проявляли повышающую регуляцию в ответ на стимуляцию посредством TGFβ1, и что данегаптин продемонстрировал защитные эффекты от таких TGFβ1-индуцированных изменений в первичных hPTECs. Известно, что воспалительная реакция в проксимальных канальцах и вокруг них включает как активацию нескольких типов клеток, так и секрецию многочисленных маркеров воспаления. В частности, известно, что растворимые хемокины, цитокины и факторы роста рекрутируют и активируют инфильтрирующие иммунные клетки и стимулируют резидентные фибробласты. Устойчивая активация таких клеток связана с патологическим воспалением и развитием тубулоинтерстициального фиброза. Следовательно, данегаптин или его фармацевтически приемлемая соль является перспективным кандидатом для лечения заболевания почек, которое проявляется в виде воспаления, и, в частности, хронической болезни почек.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы I:



5 или его фармацевтически приемлемая соль и/или гидрат; для применения при лечении или предотвращении заболевания почек, при этом заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП).

10 2. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 1, отличающееся тем, что указанное соединение вводят субъекту-человеку.

15 3. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 2, отличающееся тем, что указанный субъект представляет собой младенца, ребенка, подростка, взрослого или пожилого человека.

20 4. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что заболевание почек проявляется у субъекта в виде воспаления почек и/или развития почечного фиброза.

25 5. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП).

30 6. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), представляет собой диабетическую нефропатию, которая привела или может привести к хронической болезни почек (ХБП).

35 7. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что:

(а) хроническая болезнь почек находится на стадии 1, определяемой по

повреждению почек и СКФ > 90 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

(b) хроническая болезнь почек находится на стадии 2, определяемой по повреждению почек и СКФ от 60 до 89 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

5 (c) хроническая болезнь почек находится на стадии 3a, определяемой по СКФ от 45 до 59 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

(d) хроническая болезнь почек находится на стадии 3b, определяемой по СКФ от 30 до 44 мл/мин/1,73 м² тела субъекта; или

(e) хроническая болезнь почек находится на стадии 4, определяемой по СКФ от 15 до 29 мл/мин/1,73 м² тела субъекта.

10

8. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на любой из стадий 1, 2, 3a, 3b или 4 к более поздней стадии хронической болезни почек.

15

9. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 1 к хронической болезни почек на любой из стадий 2, 3a, 3b, 4 или 5.

20

10. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 2 к хронической болезни почек на любой из стадий 3a, 3b, 4 или 5.

25

11. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 3a к хронической болезни почек на стадии 3b, 4 или 5.

30

12. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической болезни почек на стадии 3b к хронической болезни почек на стадии 4 или 5.

35

13. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 7, отличающееся тем, что указанное соединение предотвращает переход от хронической

болезни почек на стадии 4 к хронической болезни почек на стадии 5.

14. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное заболевание почек
5 проявляется в виде протеинурии, альбуминурии или микроальбуминурии.

15. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), представляет собой гломерулярное заболевание, такое
10 как гломерулосклероз или диабетический гломерулосклероз.

16. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), выбрано из группы, состоящей из: системной красной
15 волчанки (волчаночного нефрита), диабетической нефропатии, саркоидоза, синдрома Шегрена, амилоидоза, множественной миеломы, васкулита, атрезии или стеноза мочеточника, конкремента (*почечного камня*) в верхних или нижних мочевых путях или обструктивной нефропатии и рефлюкс-нефропатии.

17. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), представляет собой тубулоинтерстициальное
20 заболевание почек.

18. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 17, отличающееся тем, что указанное тубулоинтерстициальное заболевание почек выбрано из хронического тубулоинтерстициального нефрита, тубулоинтерстициальных и тубулярных поражений, вызванных лекарствами и тяжелыми металлами, и тубулоинтерстициальных
25 нарушений почек при системных заболеваниях соединительной ткани.

19. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), представляет собой редкое наследственное
30 заболевание почек.

35

20. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 19, отличающееся тем, что редкое наследственное заболевание почек представляет собой поликистоз почек (PKD).

5 21. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует высвобождение полуканального АТФ.

10 22. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 21, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует Сх43-опосредованное высвобождение АТФ.

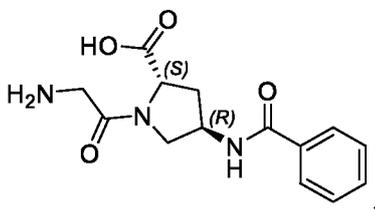
23. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что:

15 (a) указанное соединение обращает вспять изменения экспрессии и секреции белков внеклеточного матрикса, адипокинов, хемокинов и факторов роста, индуцированные TGF β 1; и/или

(b) указанное соединение защищает от изменений функции почек, связанных с воспалением и фиброзом; и/или

20 (c) указанное соединение уменьшает воспаление в проксимальном канальце или тубулоинтестинальных тканях.

24. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение представлено
25 формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

25. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из
30 предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное применение обеспечивает целевую концентрацию введенного соединения от примерно 50 нМ до примерно 100 нМ в микроокружении почечных тканей.

26. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве от примерно 10 мг до примерно 500 мг на субъекта в сутки.

5

27. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 26, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве от примерно 10 мг до примерно 100 мг на субъекта в сутки.

10 28. Соединение для применения при лечении или предотвращении по п. 26, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве от примерно 50 мг до примерно 150 мг на субъекта в сутки.

15 29. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве по меньшей мере примерно 0,1 мг/кг массы тела субъекта в сутки.

20 30. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве по меньшей мере примерно 0,3 мг/кг массы тела субъекта в сутки.

25 31. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве по меньшей мере примерно 0,5 мг/кг массы тела субъекта в сутки.

32. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве по меньшей мере примерно 1 мг/кг массы тела субъекта в сутки.

30 33. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят в количестве по меньшей мере примерно 2 мг/кг массы тела субъекта в сутки.

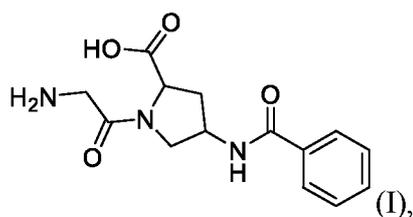
34. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что фармацевтически приемлемая соль представляет собой гидрохлоридную соль.

5 35. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят перорально или парентерально.

10 36. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят перорально.

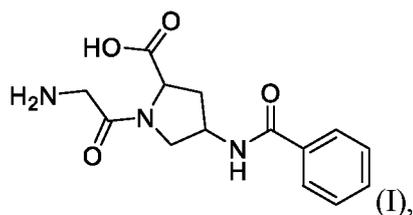
15 37. Соединение для применения при лечении или предотвращении по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят один раз или два раза в сутки.

38. Способ лечения или предотвращения заболевания почек у субъекта, отличающийся тем, что указанное заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни
20 почек (ХБП), при этом указанный способ включает введение субъекту соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата.

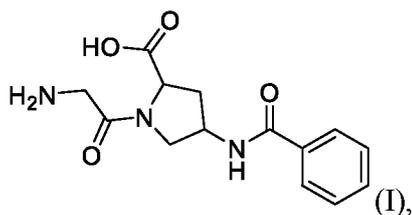
25 39. Применение соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения заболевания почек, при этом

указанное заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП).

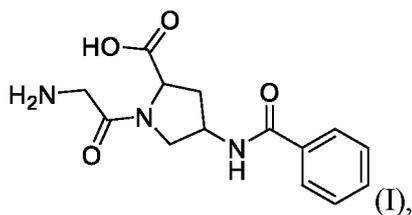
40. Способ (a) обращения вспять изменений экспрессии и секреции белков внеклеточного матрикса, адипокинов, хемокинов и факторов роста, индуцированных TGF β 1; и/или (b) защиты от изменений функции почек, связанных с воспалением и фиброзом; и/или (c) уменьшения воспаления в проксимальном канальце или тубулоинтестинальных тканях у субъекта, при этом указанный способ включает введение субъекту соединения формулы (I):



10

или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата.

41. Способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения формулы (I):



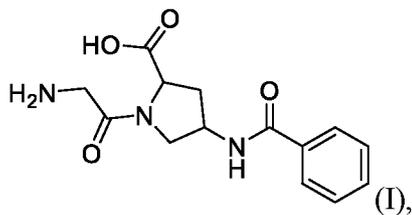
15

или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата, при этом указанный способ включает:

- (a) обеспечение образца или биопсии, взятых у субъекта;
- (b) определение наличия одного или более биомаркеров заболевания почек в образце или биопсии;
- (c) выбор субъекта для лечения, если в образце или биопсии присутствует один или более биомаркеров заболевания почек.

20

42. Способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения формулы (I):



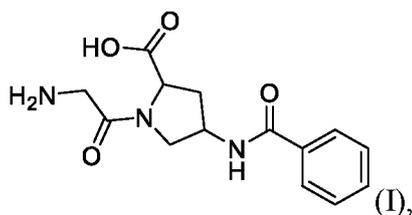
или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата, при этом указанный способ включает:

(a) определение наличия одного или более биомаркеров заболевания почек в образце или биопсии, полученной от пациента;

5 (b) выбор субъекта для лечения, если в образце или биопсии присутствует один или более биомаркеров заболевания почек.

43. Способ выбора субъекта для лечения по п. 41 или 42, отличающийся тем, что указанные один или более биомаркеров заболевания почек выбраны из протеинурии, 10 оценок СКФ, отношения альбумина к креатинину в моче и/или биомаркеров воспаления или развития фиброза.

44. Способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения формулы (I):



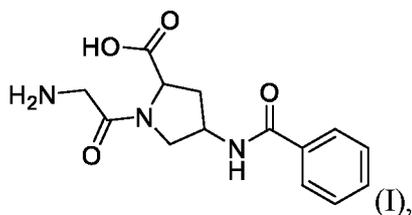
15 или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата, при этом указанный способ включает:

(a) обеспечение образца или биопсии, взятых у субъекта;

(b) определение утолщения базальной мембраны (ВМ) и/или расширения мезангиального матрикса относительно исходного уровня у контрольного образца;

20 при этом утолщенная базальная мембрана и/или расширенный мезангиальный матрикс указывает на то, что субъект реагирует на лечение посредством указанного соединения.

45. Способ выбора субъекта для лечения с помощью соединения формулы (I):



25 или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата, при этом указанный способ включает:

(а) определение утолщения базальной мембраны (ВМ) и/или расширения мезангиального матрикса в образце или биопсии, полученной от пациента, относительно исходного уровня у контрольного образца;

5 при этом утолщенная базальная мембрана и/или расширенный мезангиальный матрикс указывает на то, что субъект реагирует на лечение посредством указанного соединения.

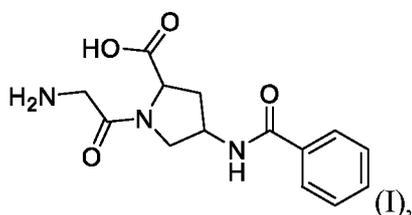
46. Способ выбора субъекта для лечения по любому из п.п. 41-45, отличающийся тем, что указанный способ представляет собой способ *ex vivo*.

10

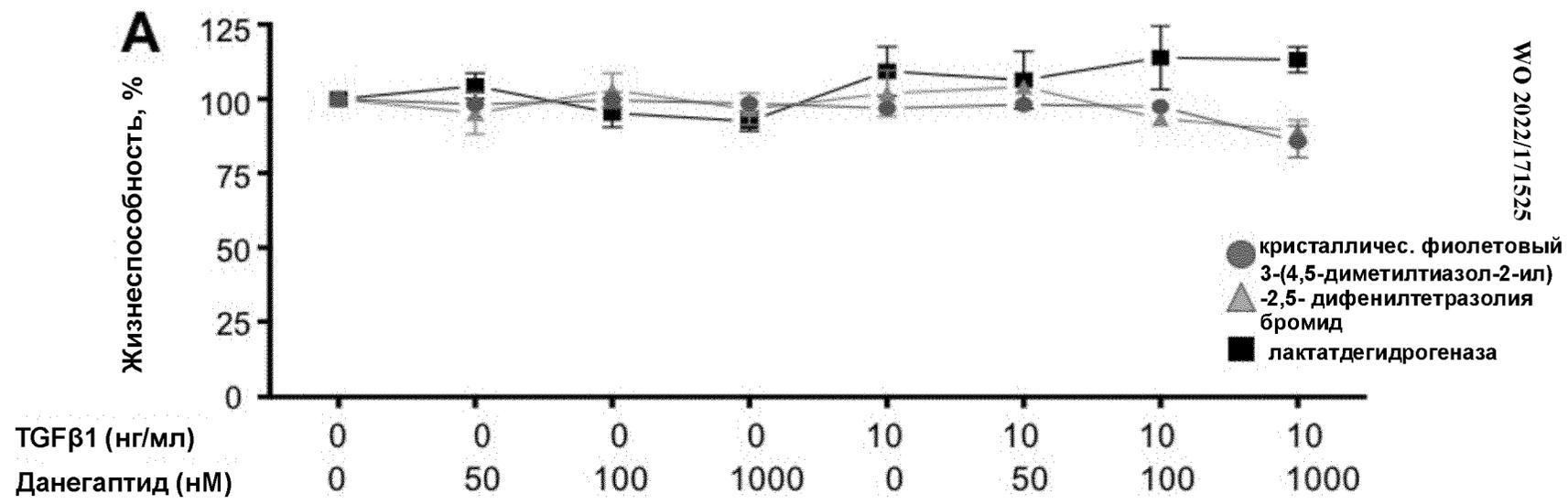
47. Способ выбора субъекта для лечения по любому из п.п. 41-45, отличающийся тем, что указанный способ представляет собой способ *in vitro*.

48. Способ лечения или предотвращения заболевания почек у субъекта, отличающийся тем, что указанное заболевание почек представляет собой хроническую болезнь почек (ХБП) или первичное заболевание, приводящее к хронической болезни почек (ХБП), при этом указанный способ включает введение субъекту соединения формулы (I):

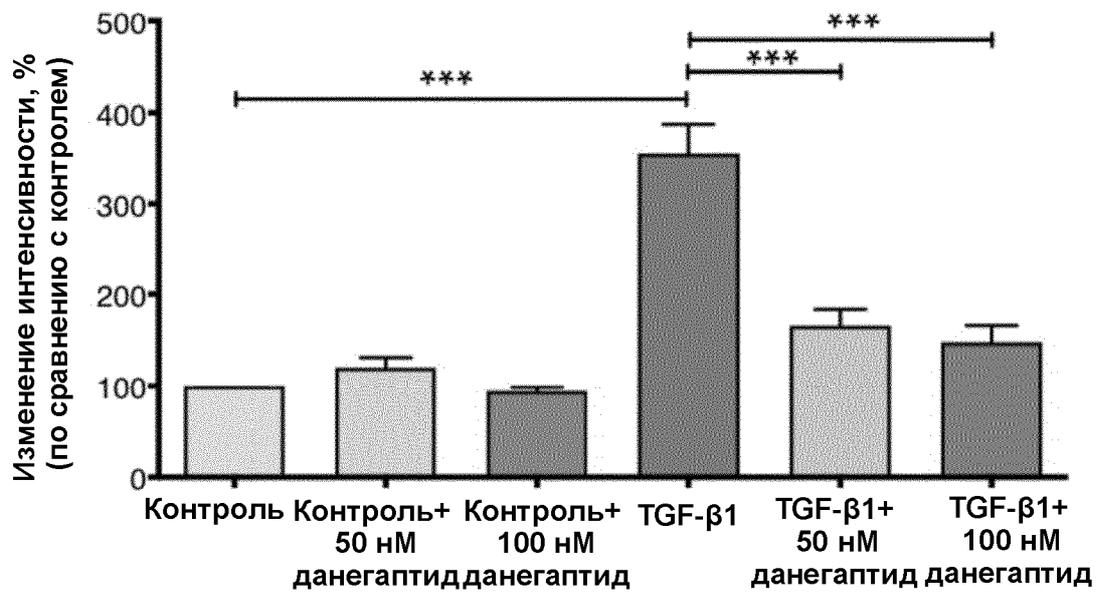
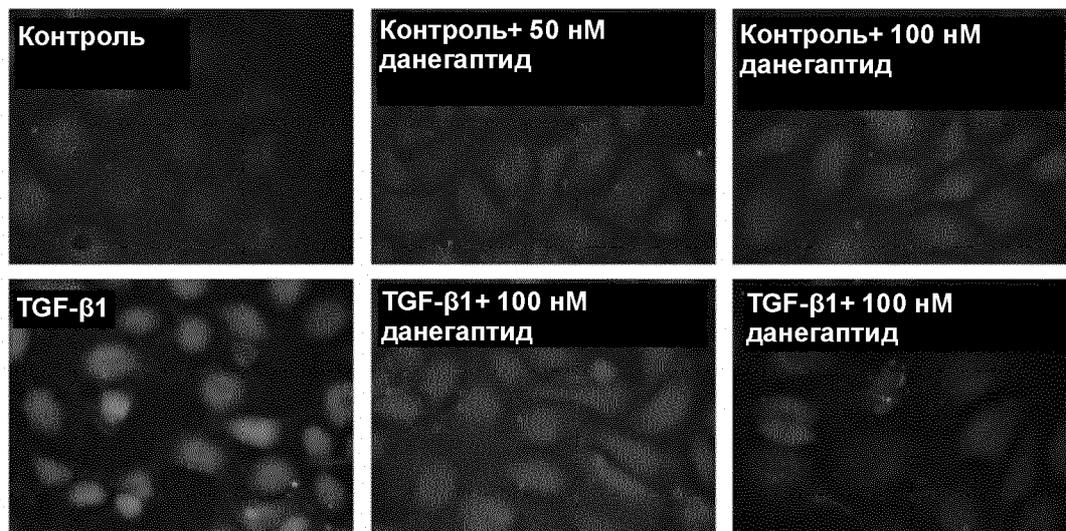
15



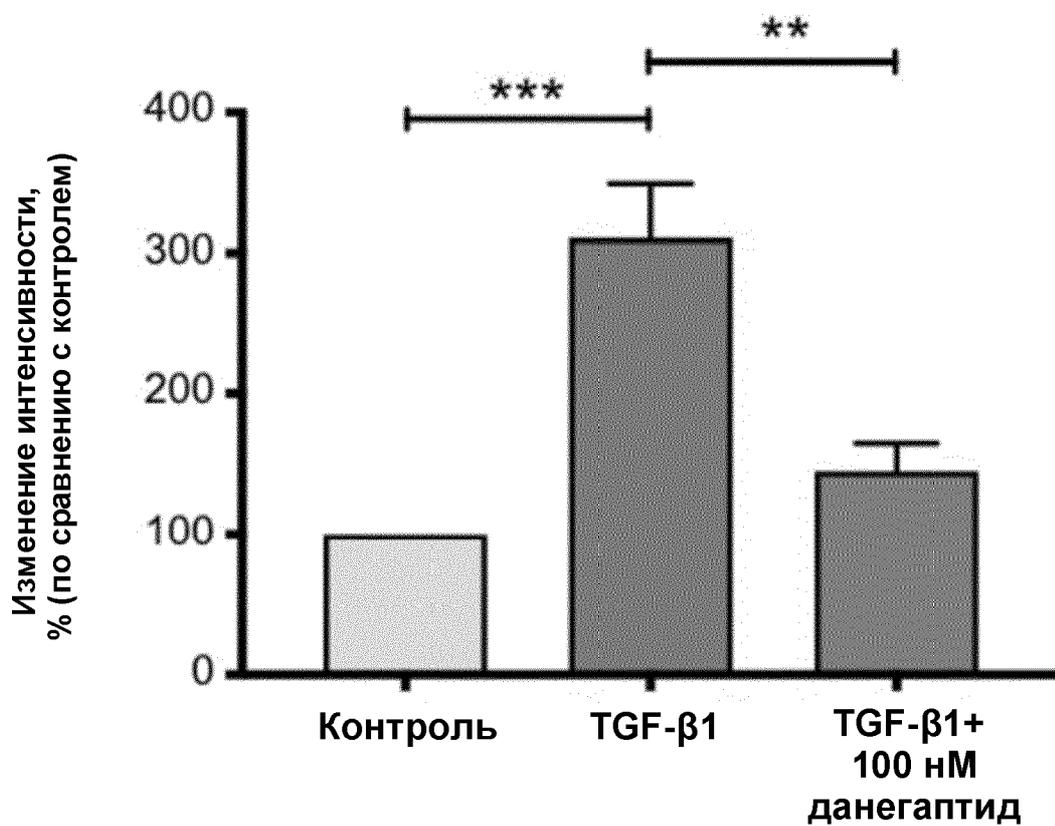
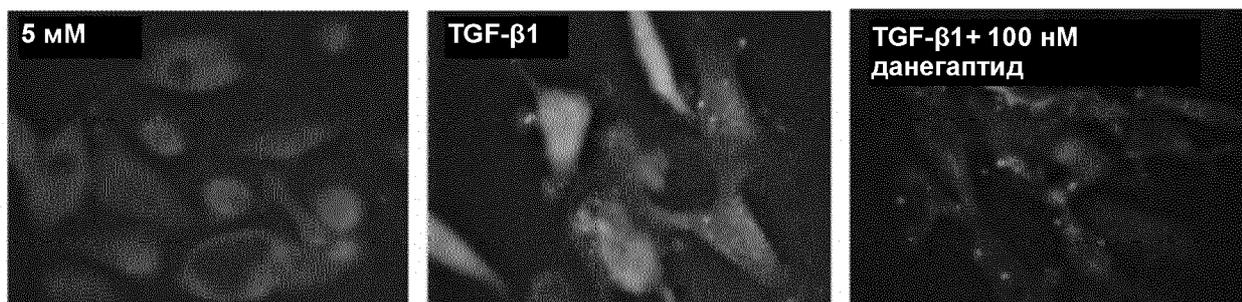
20 или его фармацевтически приемлемой соли и/или гидрата, при этом указанный субъект выбран согласно способу выбора субъекта для лечения по любому из п.п. 41-47.



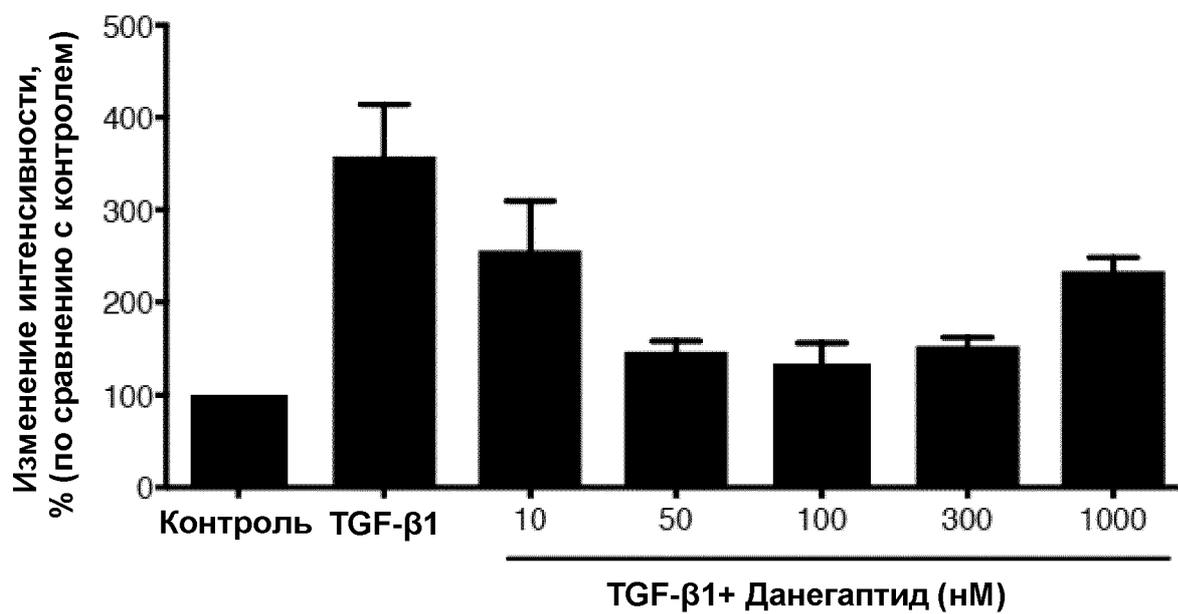
Фиг. 1А



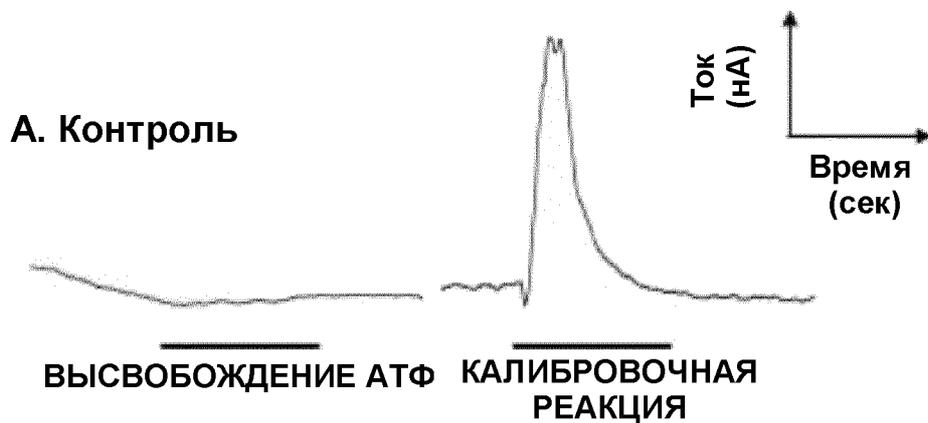
Фиг. 1В



Фиг. 1С



Фиг. 1D



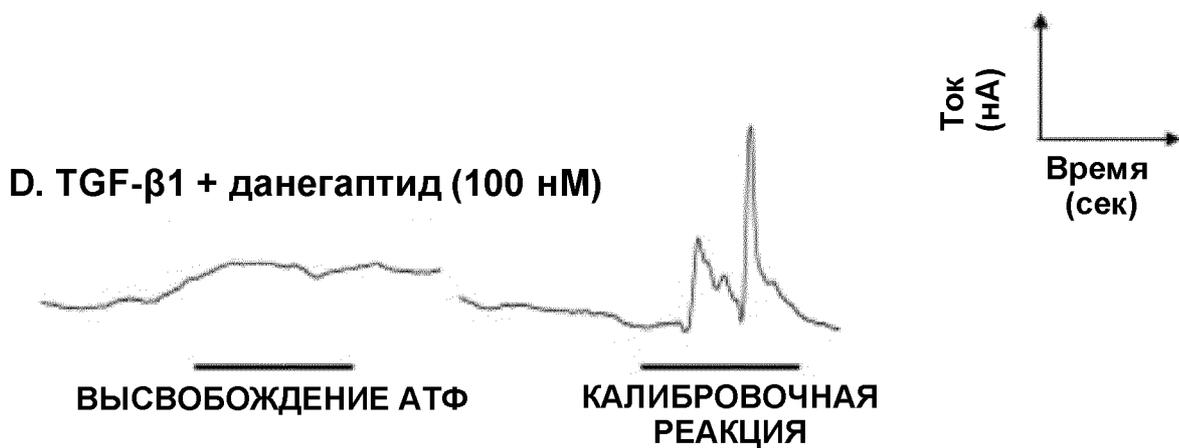
Фиг. 2А



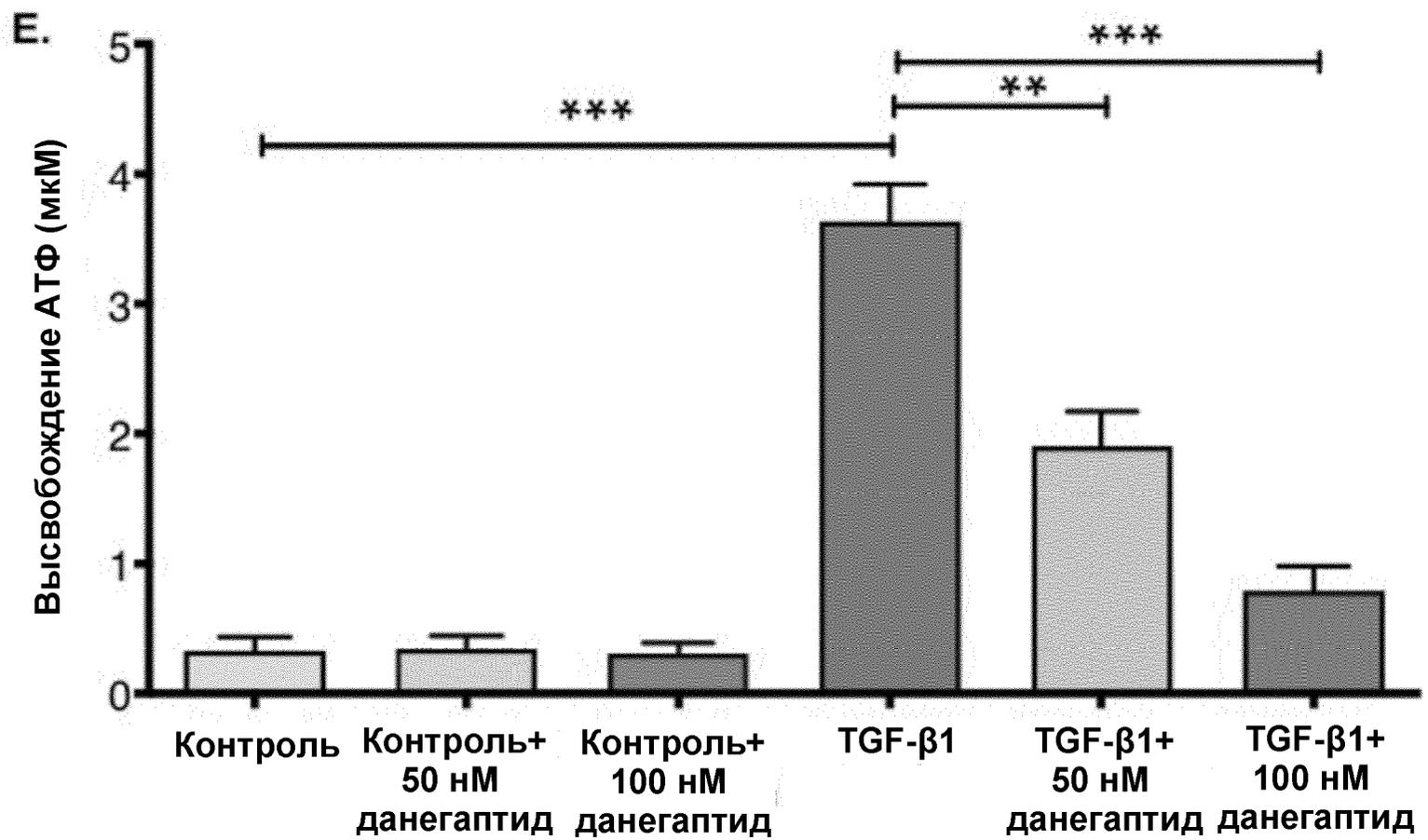
Фиг. 2В



Фиг. 2C

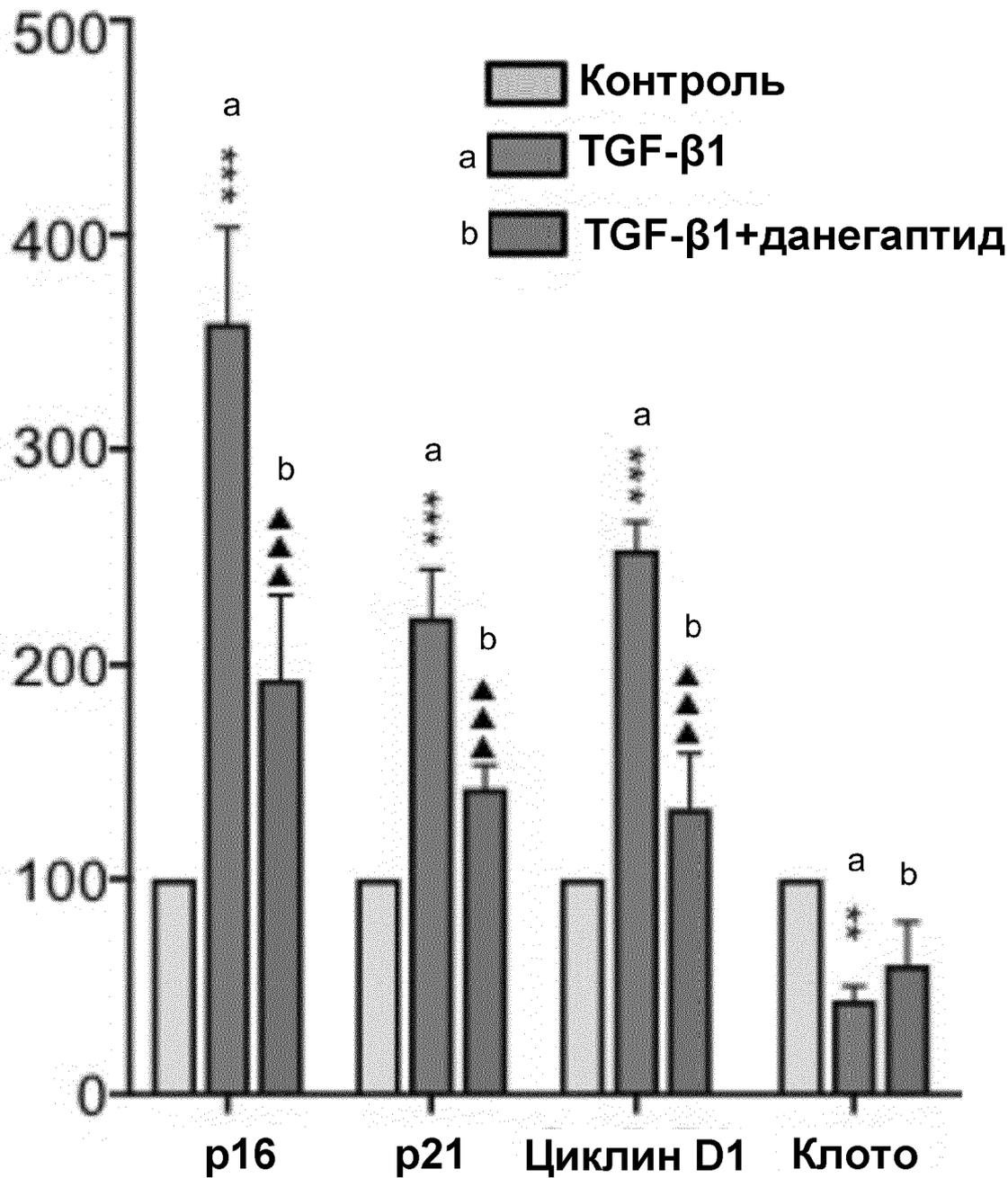


Фиг. 2D

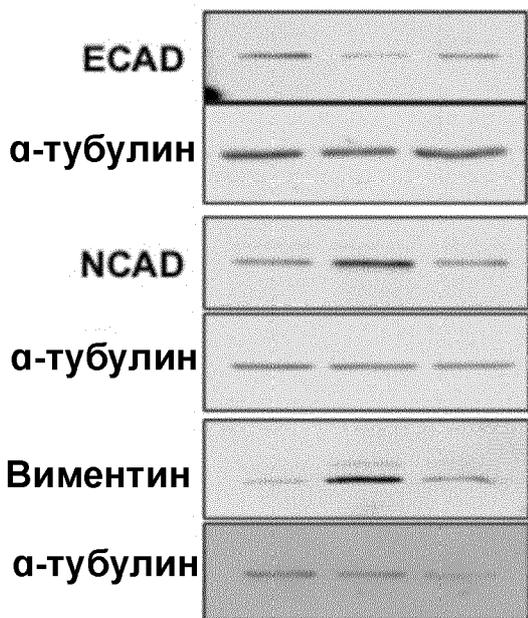
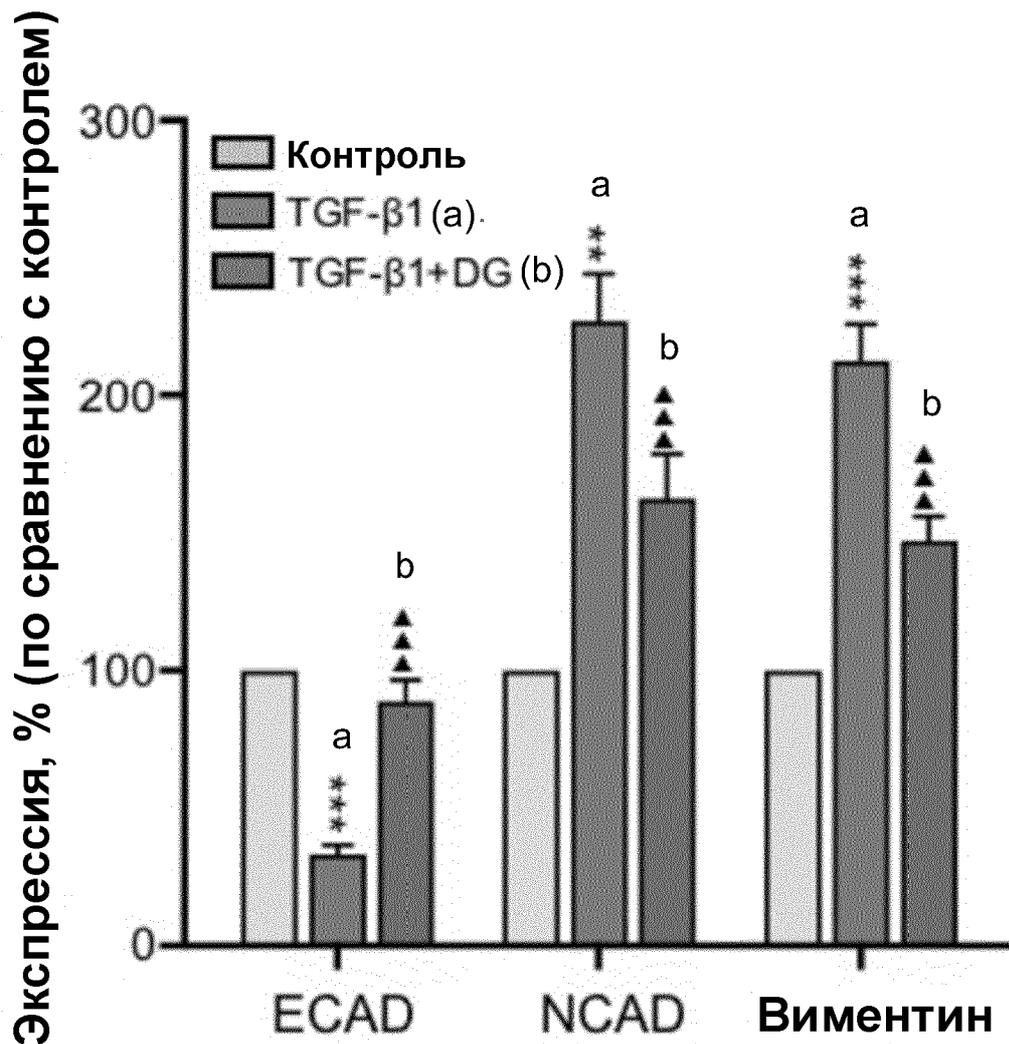


ФИГ. 2Е

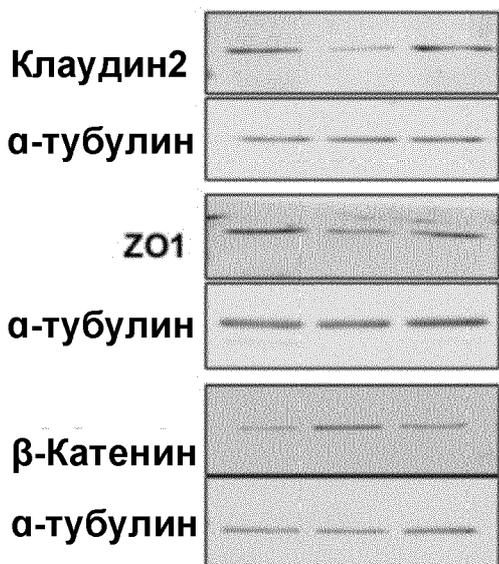
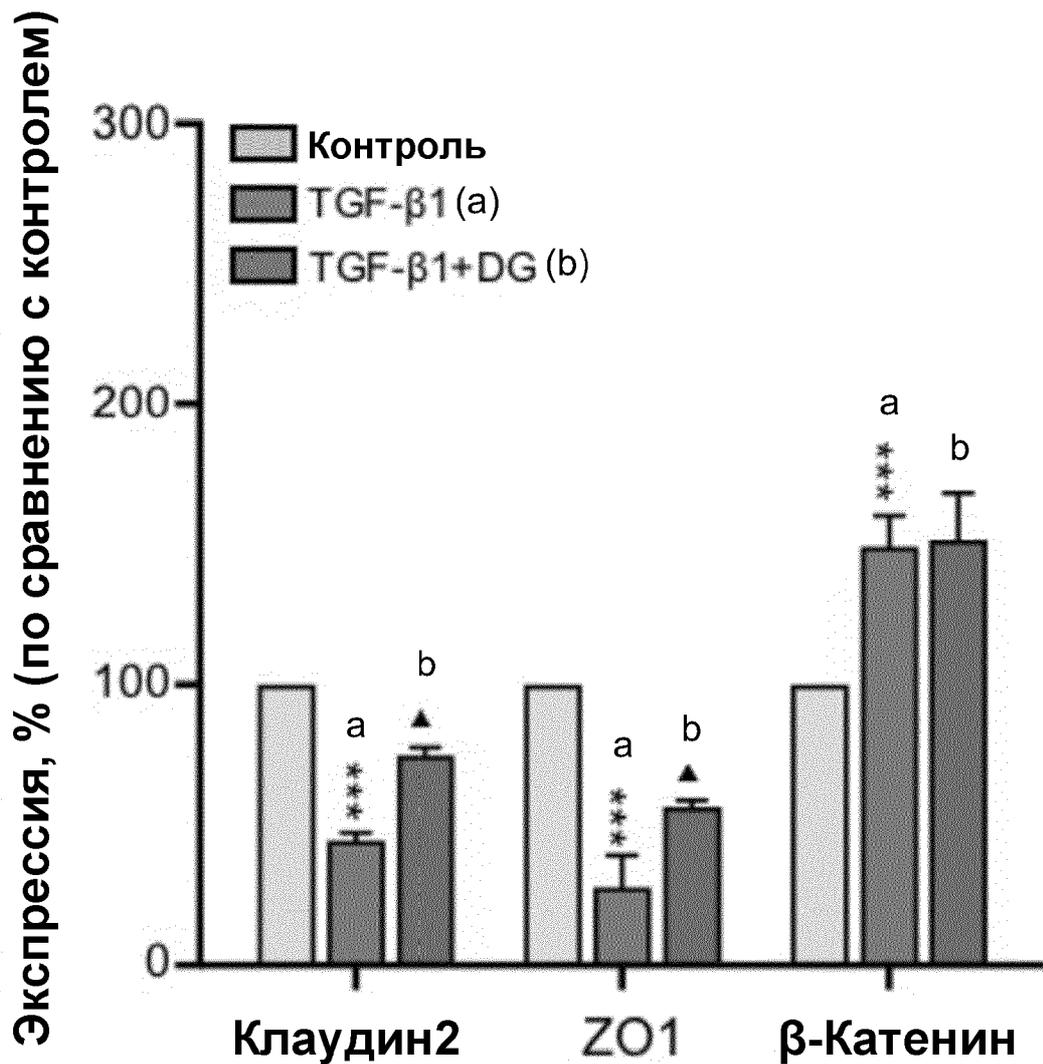
Экспрессия мРНК, % (по сравнению с контролем)



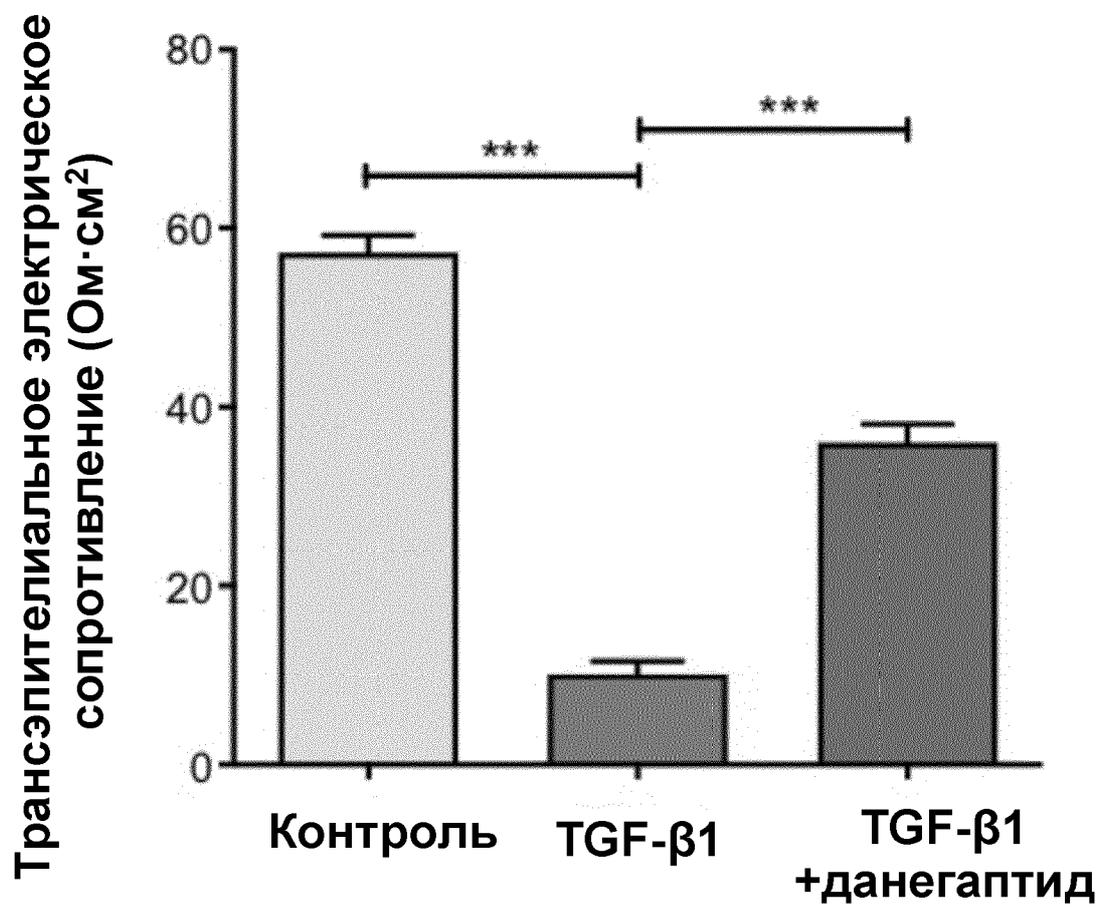
Фиг. 3



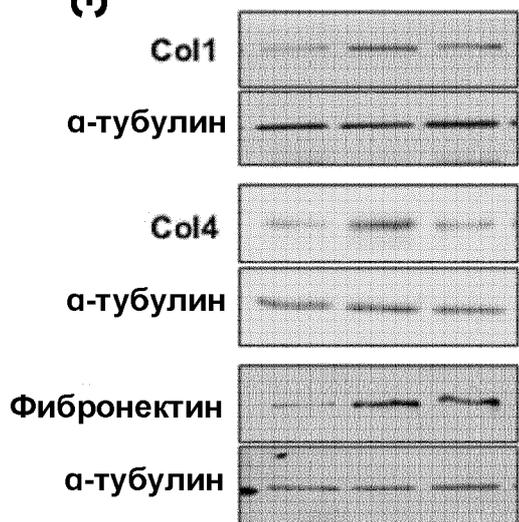
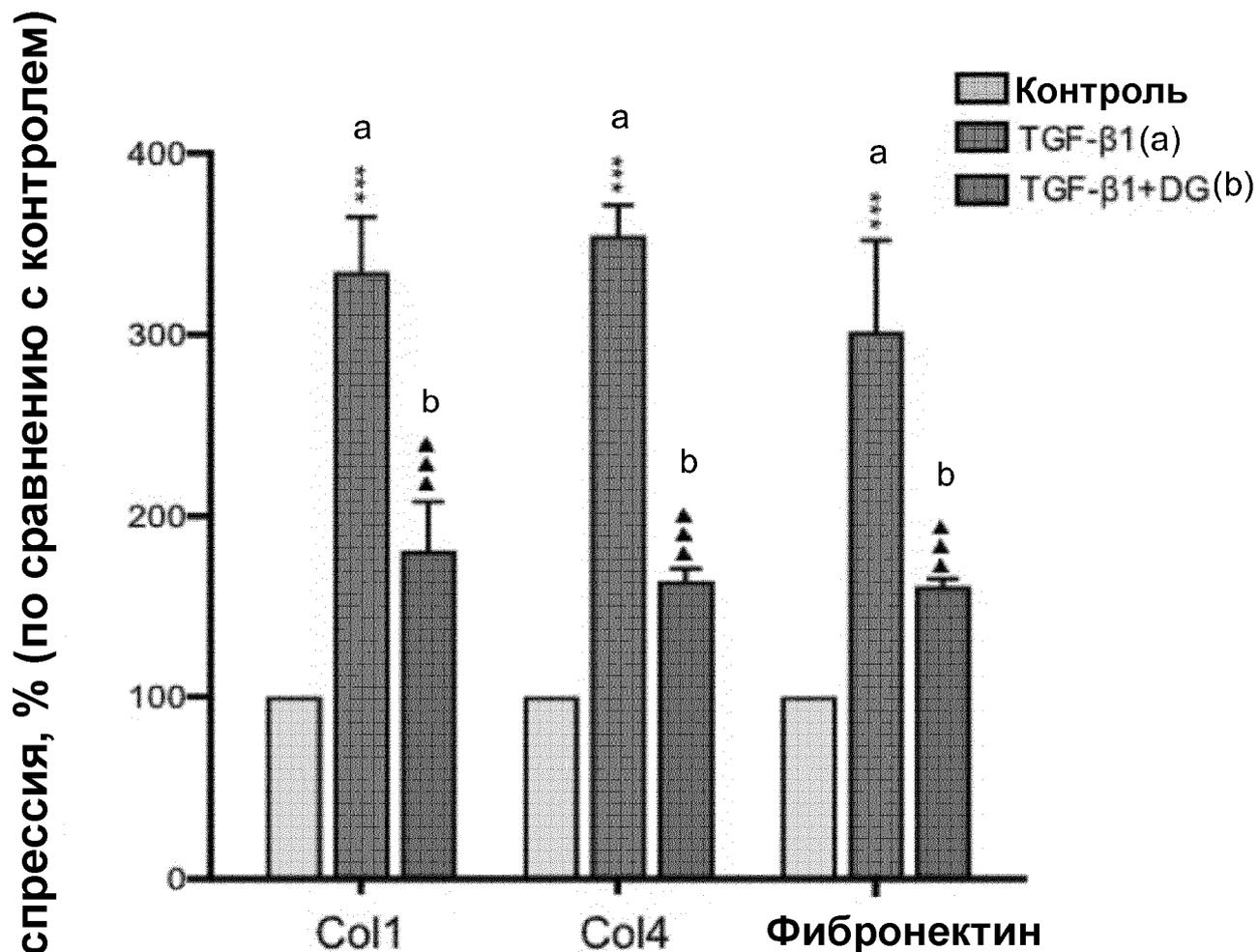
Фиг. 4А



Фиг. 4В

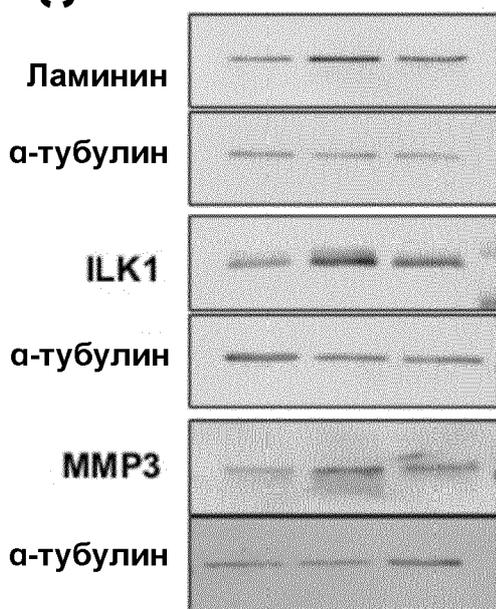
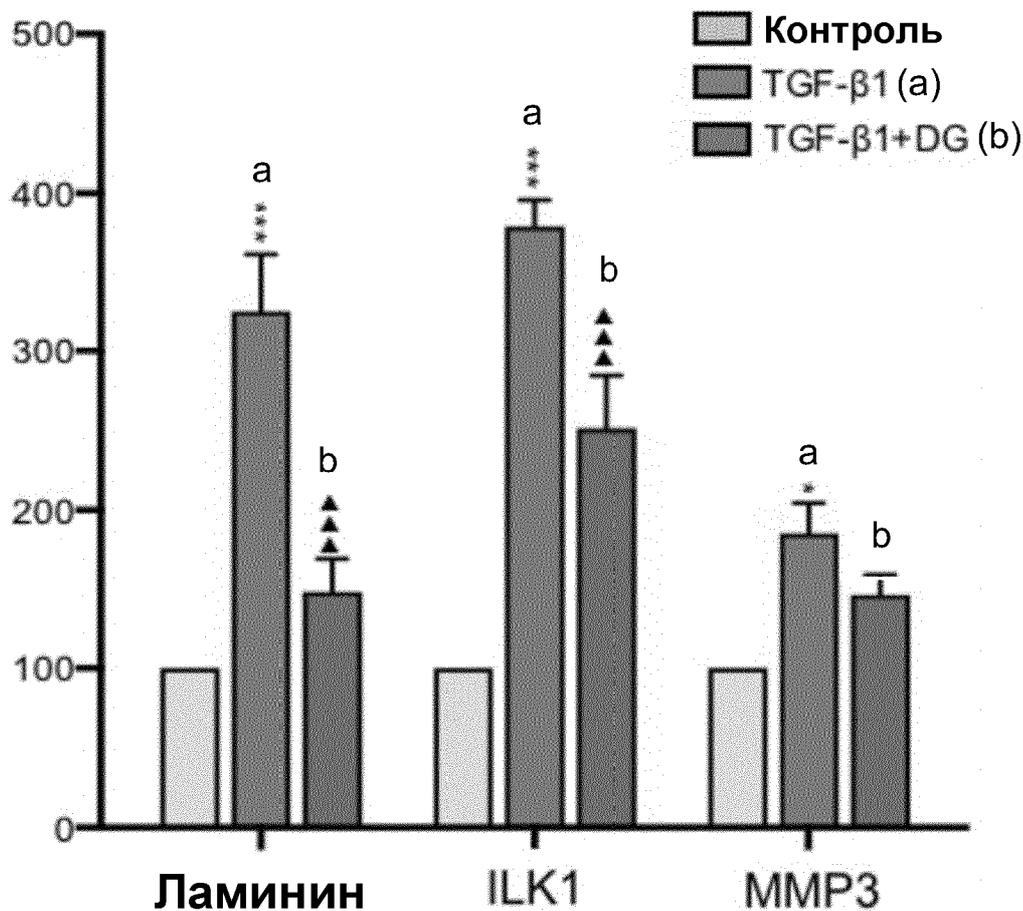


Фиг. 4С



Фиг. 5А

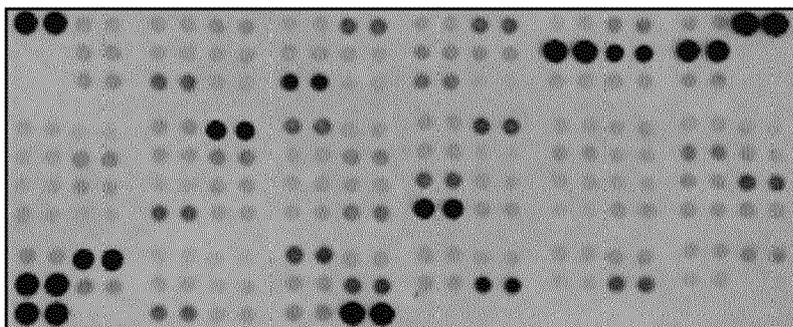
Экспрессия, % (по сравнению с контролем)



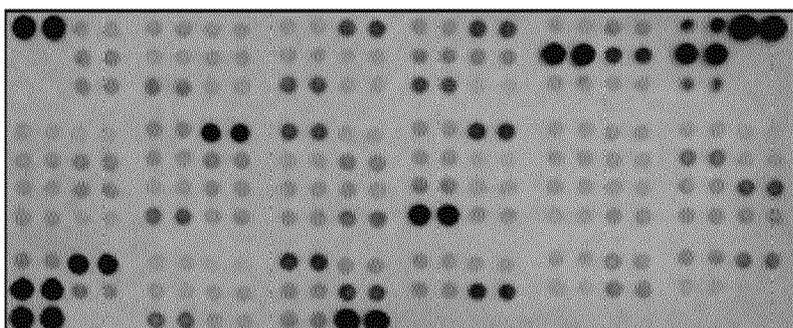
Фиг. 5В

Лизат

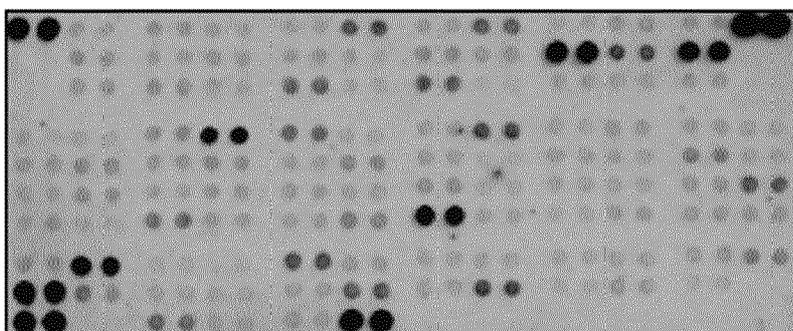
контроль



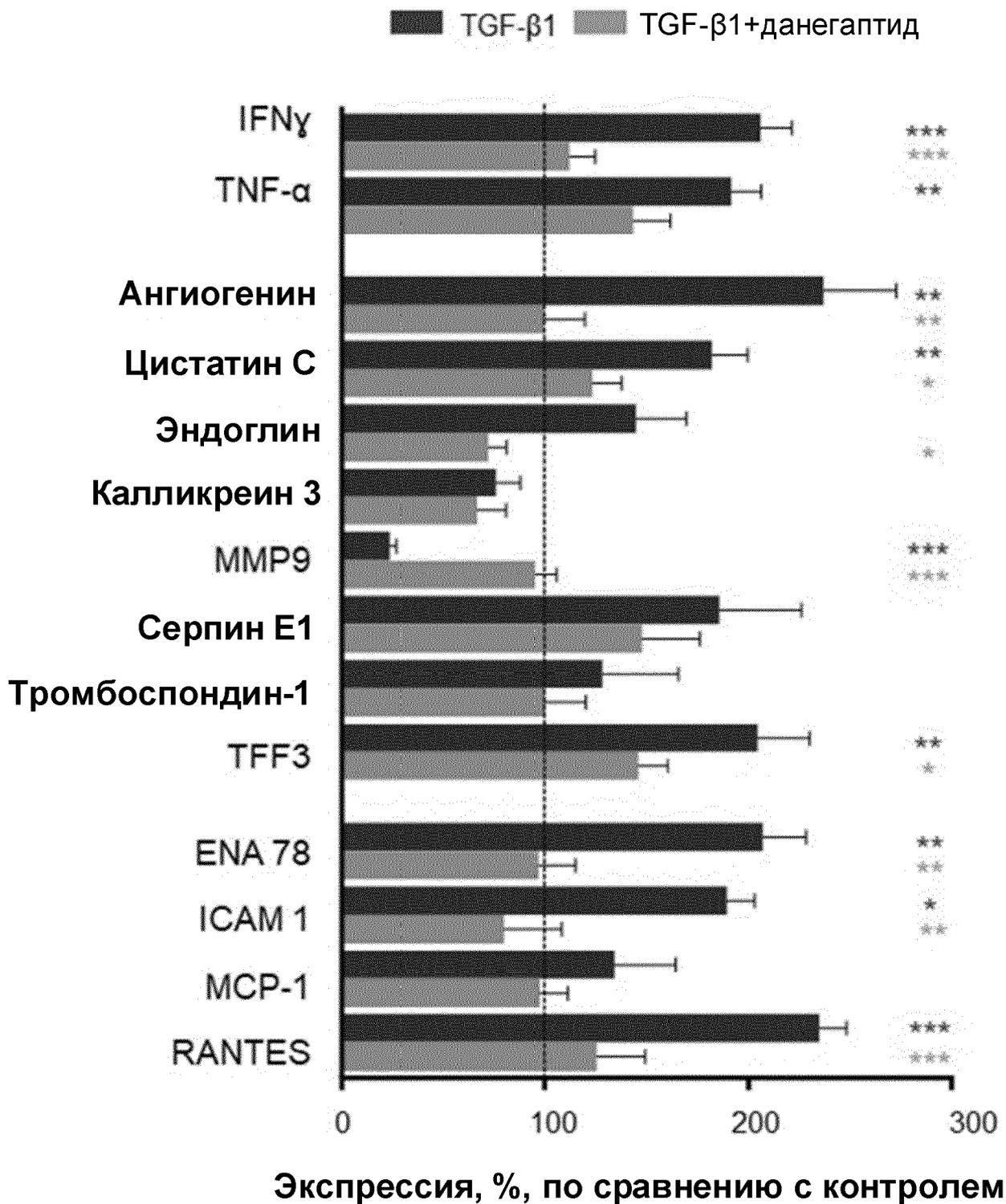
TGF- β 1



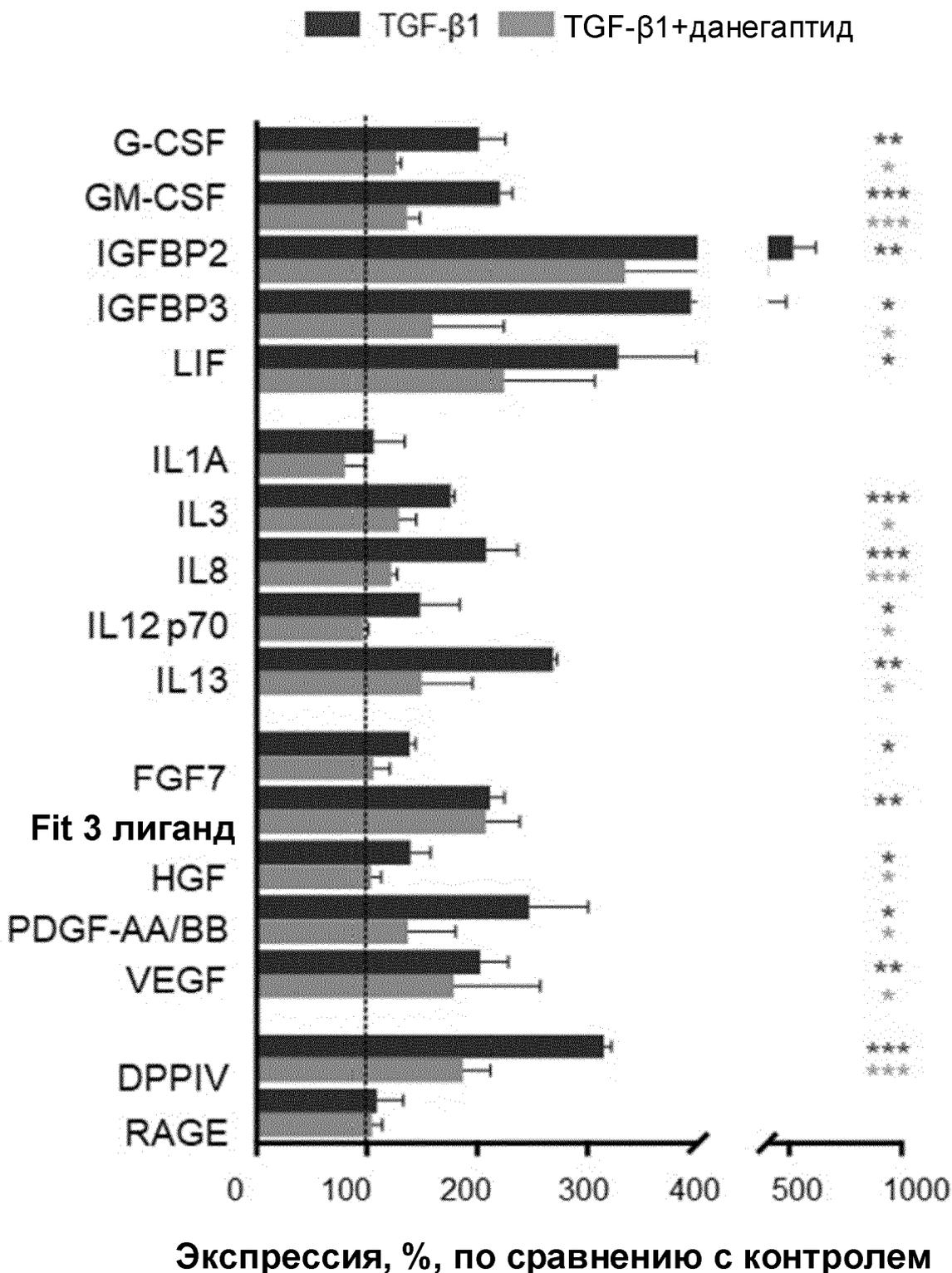
TGF- β 1+данегапид



Фиг. 6



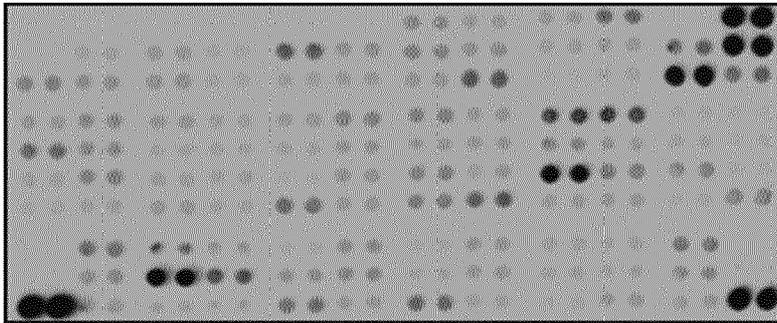
Фиг. 6 продолж.



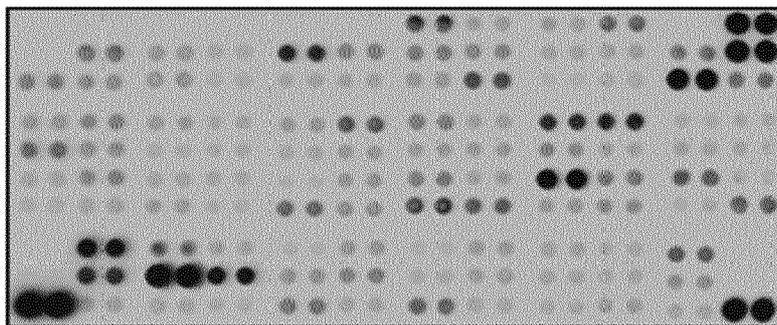
Фиг. 6 продолж.

Супернатант

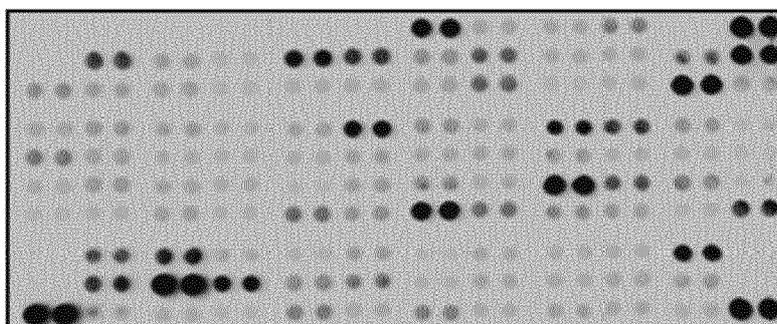
контроль



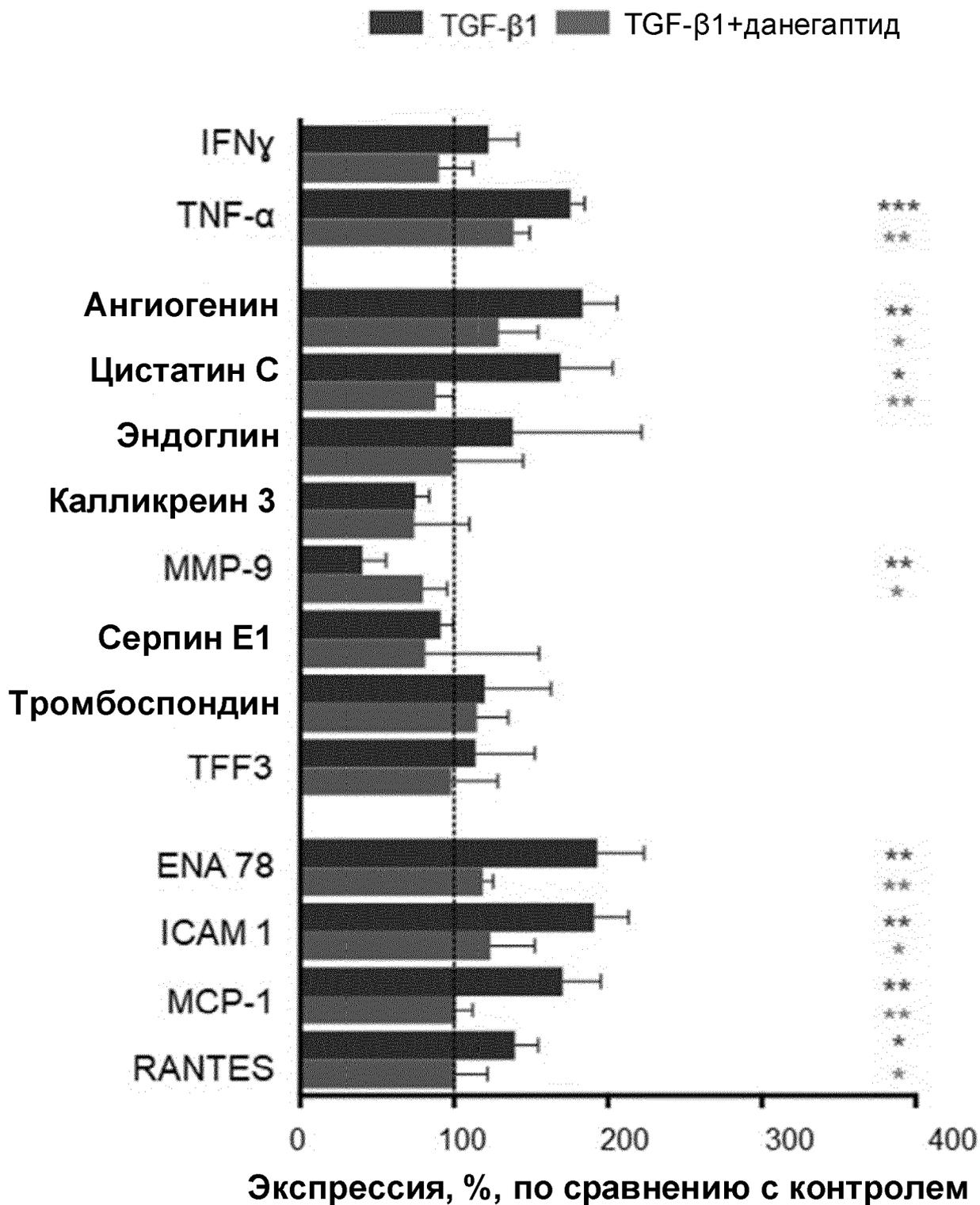
TGF- β 1



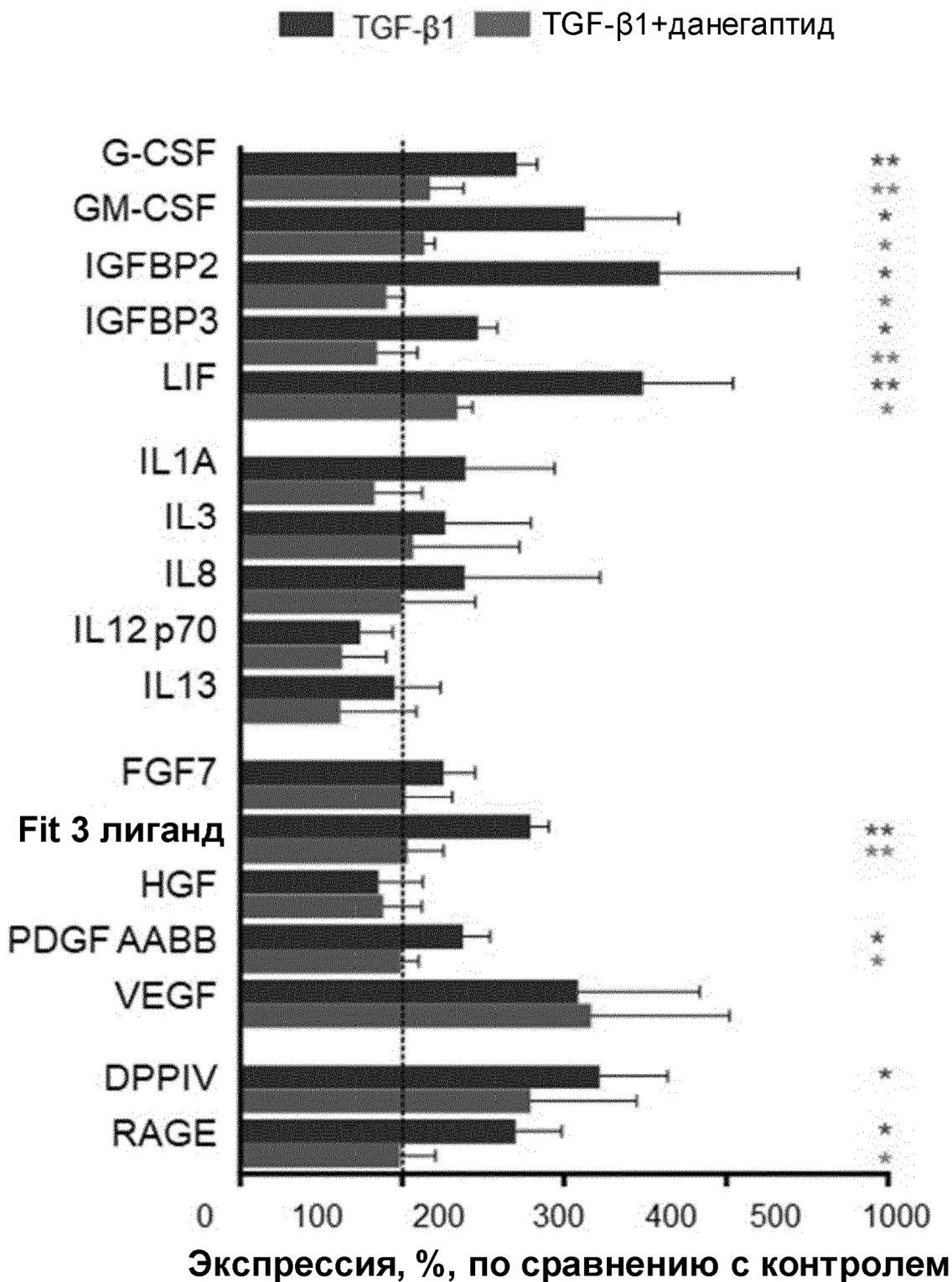
TGF- β 1+данегапид



Фиг. 7



Фиг. 7 продолж.



Фиг. 7 продолж.