

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490924** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.10.22

(51) Int. Cl. *A61K 31/401* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61K 38/05 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.12.21

(54) **МОДУЛЯТОРЫ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ
ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ**

(31) 63/292,783

(32) 2021.12.22

(33) US

(86) PCT/EP2022/087342

(87) WO 2023/118366 2023.06.29

(71) Заявитель:

БРЕЙЕ ТЕРАПЬЮТИКС АПС (DK)

(72) Изобретатель:

**Моуритцен Улрик (DK), Янг Бредфорд
(US)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(57) Описано применение клеточных модуляторов, зависимых от щелевых контактов, для лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) и, в частности, их применение для лечения или предотвращения сухой AMD (d-AMD) и для предотвращения прогрессирования во влажную или неоваскулярную или прогрессирующую ангиогенную AMD или географическую атрофию (GA).

A1

202490924

202490924

A1

МОДУЛЯТОРЫ ЩЕЛЕВЫХ КОНТАКТОВ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5

Настоящее изобретение относится к клеточным модуляторам, зависимым от щелевых контактов, и их применению для лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD). Настоящее изобретение также относится к фармацевтическим композициям, приготовленным с возможностью доставки в глаз клеточных модуляторов, 10 зависимых от щелевых контактов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Возрастная макулярная дегенерация (AMD) является одной из наиболее важных 15 причин потери зрения у пожилых людей. AMD представляет собой прогрессирующее и дегенеративное заболевание центральной зоны сетчатки, которое приводит к потере остроты зрения и даже слепоте у пациентов с поврежденными макулами. Учитывая, что возраст является основным фактором риска развития AMD, распространенность и тяжесть данного заболевания, вероятно, увеличиваются по мере увеличения продолжительности жизни 20 человека, например, в развитых странах (Bandello *et al.*, 2017).

AMD представляет собой нарушение центральной зоны сетчатки с многофакторной этиопатологией и может быть классифицирована как сухая AMD (d-AMD; также известная как ненеоваскулярная AMD) или неоваскулярная AMD (n-AMD; также известная как влажная AMD) в зависимости от наличия хориоидальной неоваскуляризации (CNV) - характерного 25 признака n-AMD и отличительной особенности, отличающей ее от ненеоваскулярной сухой AMD. Клинически AMD обычно проявляется в двух формах: неэкссудативная «сухая» форма (т.е. d-AMD) и экссудативная, неоваскулярная «влажная» (т.е. влажная AMD) форма. Более 80% пациентов с AMD имеют d-AMD, которая также называется атрофической AMD и характеризуется истончением макулы, отложениями друз и ранним просачиванием жидкости 30 в сетчатке. Прогрессирующая форма сухой AMD, называемая географической атрофией (GA), характеризуется обширной потерей пигментного эпителия сетчатки (RPE) и фоторецепторов, при этом такая тяжелая стадия заболевания может привести к необратимой слепоте у до 20% пациентов. В настоящее время не существует эффективных способов лечения d-AMD, а также очень сложно восстановить RPE или фоторецепторы после того, как они получили

значительное повреждение или отмерли, особенно на поздних стадиях заболевания (Bandello *et al.*, 2017).

У субпопуляции (10-20%) пациентов с d-AMD развивается влажная AMD, обычно на более поздних стадиях заболевания вследствие аномального роста кровеносных сосудов в сетчатке. Основными способами лечения влажной AMD с помощью глазных инъекций являются те же присутствующие на рынке средства терапии (например, Eylea® и Lucentis®), что и средства, применяемые для лечения диабетической ретинопатии (DR) у пациентов с диабетическим макулярным отеком (DME). Абerrантная неоваскуляризация, которая может характеризовать как пролиферативную DR, так и влажную AMD, связана с резким увеличением просачивания жидкости через сосуды и отеком, которые повреждают сетчатку и макулу, что приводит к изнуряющей потере зрения. Как и в случае пациентов с пролиферативными DR и DME, было показано, что основные способы лечения на основе инъекций препаратов анти-VEGF (ингибитор фактора роста эндотелия сосудов), EYLEA® и Lucentis®, эффективно уменьшают такой патологический ангиогенез и улучшают остроту зрения, при этом оптимальные ответы на лечение наблюдались только примерно у 40% пациентов. Кроме того, указанные способы лечения требуют многолетних затратных инъекций с ограниченной продолжительностью ответа. Таким образом, существует большая неудовлетворенная потребность в более эффективных способах лечения пациентов как с влажной, так и с сухой AMD, которые позволяют эффективно лечить указанные заболевания на более ранних и менее тяжелых стадиях заболевания до того, как произойдет прогрессирование заболевания и необратимая и изнуряющая потеря зрения.

Клинические состояния без явной потери функций или зрения, такие как ранняя и/или промежуточная стадии AMD, характеризуются отложением друз и/или дисфункцией пигментного эпителия сетчатки (RPE) или изменениями в макулярной области. На поздних стадиях заболевание может прогрессировать либо до географической атрофии (GA), либо до неоваскулярной AMD (n-AMD). Географическая атрофия (GA), вторичная по отношению к d-AMD, возникает, когда RPE в области макулы начинает дегенерировать, что приводит к гибели клеток фоторецепторов (PR) в виде палочек и колбочек и возможной потере центрального зрения и слепоте вследствие существенной потери фоторецепторов в глазу (Naylor *et al.*, 2020).

Патогенез

Точные патофизиологические механизмы, лежащие в основе AMD, еще предстоит определить. Однако очевидно, что AMD представляет собой многофакторную патологию, в

которой решающую роль играют генетические факторы риска и факторы риска, связанные с окружающей средой (Bandello *et al.*, 2017).

5 Было выявлено несколько путей, которые, по-видимому, играют важную роль в патогенезе d-AMD, включая окислительный стресс, отложения липофусцина, хроническое воспаление и недостаточность хориоидального кровотока. Такие пути являются возможными мишенями для новых способов лечения (Bandello *et al.*, 2017).

10 Например, гематоретинальные барьеры (BRB) имеют фундаментальное значение для создания и поддержания подходящей среды для оптимальной функции сетчатки (Naylor *et al.*, 2020). BRB состоит из внутреннего гематоретинального барьера (iBRB) и наружного гематоретинального барьера (oBRB). iBRB состоит из эндотелиальных клеток сетчатки и перицитов, которые образуют между эндотелиальными клетками и перицитами жестко регулируемые межклеточные связи посредством специализированных белковых комплексов для поддержания барьерной функции. oBRB состоит из клеток пигментного эпителия сетчатки (RPE), которые образуют между клетками RPE жестко регулируемые межклеточные связи посредством специализированных белковых комплексов для поддержания барьерной функции. Такие специализированные белковые комплексы, локализованные в цитоплазматических мембранах эндотелиальных, перицитарных и эпителиальных клеток сетчатки, включают щелевые контакты, плотные контакты (TJs) и адгезионные контакты.

20 RPE является важнейшим гомеостатическим компонентом oBRB и разделяет мембрану Бруха сосудистой оболочки глаза и слой фоторецепторных клеток нервной части сетчатки. Эпителиальные клетки, образующие монослой RPE, представляют собой пигментированные, высоко поляризованные эпителиальные клетки, апикальная поверхность которых обращена к фоторецепторам, а базальная поверхность прикреплена к мембране Бруха. Такие эпителиальные клетки компактно расположены за счет актин-зависимых межклеточных контактов, в частности TJs. oBRB действует для регулирования и фильтрации молекулярного движения растворенных и питательных веществ из сосудистой оболочки глаза в субретинальное пространство и имеет решающее значение для поддержания гомеостаза сетчатки. Плотный компактный монослой клеток RPE, образующих oBRB, играет важную роль в развитии и поддержании сетчатки, включая секрецию факторов роста, ограничение поступления в сетчатку крупных и токсичных молекул из кровотока, регулирование транспорта питательных веществ и жидкостей в сетчатку и из нее, а также поддержание биогенного здоровья фоторецепторов. Потерю целостности RPE и дисфункцию oBRB связывали с несколькими глазными заболеваниями, в том числе AMD, DR и DME. Нарушение любого из указанных барьеров может привести к накоплению в сетчатке жидкости,

переносимых кровью белков и других потенциально токсичных растворенных веществ (Naylor *et al.*, 2020).

5 RPE можно разделить на апикальную и базолатеральную стороны. Апикальная поверхность находится в непосредственном контакте с наружным сегментом фоторецепторов (POS), а базолатеральная сторона выступает в качестве барьера при ее взаимодействии с
10 высокопроницаемым и высокоперфузируемым хориокапилляром сосудистой оболочки глаза (Naylor *et al.*, 2020). RPE демонстрирует три вида межклеточных контактов: TJs, адгезионные контакты и щелевые контакты. TJs образуют «ворота» или барьер, регулирующий параклеточную диффузию растворенных и питательных веществ в RPE. Адгезионные
15 контакты обеспечивают прочное механическое связывание между смежными клетками RPE. Щелевые контакты обеспечивают коммуникацию между клетками и поддерживают межклеточное связывание между клетками RPE и внутри монослоя RPE путем связывания с TJs (Obert *et al.*, 2017).

15 TJs, соединяющие соседние клетки RPE, блокируют перемещение компонентов плазмы и токсичных молекул в сетчатку, а также обеспечивают контролируемый поток жидкости и растворенных веществ за счет осмотического градиента от хориоидальной сосудистой сети к наружному слою сетчатки. Сетчатка характеризуется самым высоким потреблением кислорода на массу любой ткани в организме, и BRB (как наружный, так и внутренний)
20 необходим для обеспечения отдельного и регулируемого источника питательных веществ, облегчающего такой высокий уровень метаболизма. TJs как в iBRB, так и в oBRB, представляют собой сложные, динамические структуры, и применительно к указанным барьерам целостность таких TJs имеет решающее значение для зрения.

В частности, oBRB обеспечивает выживание фоторецепторов (PRs) путем поддержания основных функций, в том числе фильтрации и транспортировки питательных веществ, а также
25 фагоцитоза наружного сегмента фоторецепторов (POS). Другие важные функции RPE включают поглощение нефокусированного и рассеянного света, адгезию сетчатки и транспортировку и обработку витамина А, а также повторную изомеризацию полностью транс-ретинала до 11-цис-ретинала, что имеет решающее значение для цикла превращений родопсина (Naylor *et al.*, 2020). Таким образом, RPE необходим для зрительной функции -
30 нарушение любой из указанных функций может привести к дегенерации сетчатки, потере зрительной функции и, в конечном итоге, к слепоте.

TJs вместе с щелевыми контактами и адгезионными контактами обеспечивают высокую степень селективности функции параклеточного барьера как в iBRB, так и в oBRB. TJs представляют собой уникальные сборки трансмембранных белков и периферических
35 цитоплазматических белков. Трансмембранные белки включают клаудины, окклюдины,

семейство белков MARVEL (MAL и родственные белки для миграции везикул и мембранной связи) и контактные адгезивные молекулы (JAMs), которые пронизывают цитоплазматическую мембрану. Периферические цитоплазматические белки, такие как zonula occludens-1 (ZO-1), -2 (ZO-2) и -3 (ZO-3), прикрепляют перечисленные трансмембранные белки к цитоскелету наряду с щелевыми контактами и адгезионными контактами, и играют жизненно важную роль в первоначальном формировании и четкой организации TJs (Naylor *et al.*, 2020).

Субъединица коннексина щелевых контактов, имеющих решающее значение для межклеточной коммуникации и способствующих связыванию клеток, представляет собой тетраспановые трансмембранные белки. В геноме человека были идентифицированы двадцать одна изоформа коннексина, каждая из которых имеет различные пространственные и временные профили экспрессии (Obert *et al.*, 2017). Шесть коннексинов собираются в один коннексон (гемиканал), при этом два коннексона из смежных клеток стыкуются с образованием канала щелевого контакта - щелевой контакт сам по себе является агрегатом таких каналов. Различные гетеромерные конфигурации разных коннексиновых белков могут собираться с формированием коннексоновых гемиканалов, что приводит к образованию щелевых контактов с отличительными свойствами коммуникации. Например, TJs содержат по меньшей мере 40 белков, некоторые из которых являются трансмембранными и опосредуют межклеточную адгезию; а другие представляют собой внутриклеточные каркасные белки, которые связывают компоненты контактов с цитоскелетом. Адгезионные контакты содержат адгезивные элементы, представляющие собой кадгериновые рецепторы, которые устраняют разрыв между соседними клеточными мембранами посредством гомофильных взаимодействий, при этом катенины являются основными поддерживающими белками, которые связывают механические контакты с цитоскелетом (Obert *et al.*, 2017).

ZO-1 представляет собой поддерживающий белок, общий для всех трех типов контактов, соединяющий макромолекулярные комплексы контактов с цитоплазматическим актином. ZO-1 принадлежит к семейству мембраноассоциированных гуанилаткиназо-подобных белков (MAGUK) и включает три домена PDZ: домен SH3, домен GUK и богатый пролином домен на С-конце (Obert *et al.*, 2017). Связывание коннексина 43 (Cx43) с доменом PDZ2 белка ZO-1 регулирует размер и стабильность агрегатов каналов щелевых контактов. ZO-1 управляет клеточным распределением Cx43, обеспечивая контрольную точку для динамического переключения между коммуникацией через щелевые контакты и коммуникацией вне контактов (гемиканальным) в перинексусе - специализированном мембранном домене на периферии агрегатов каналов щелевых контактов. Разрушение ZO-1 в

функциональном эпителиальном монослое приводит к потере барьерной функции и реорганизации апикального актина и миозина (Obert *et al.*, 2017).

5 Сх43 является основным коннексином, ответственным за образование щелевых контактов в эндотелиальных, перицитарных и эпителиальных клетках сетчатки, которые опосредуют коммуникацию между клетками путем обеспечения прохождения малых молекул для поддержания гомеостатических процессов, таких как рост, восстановление и выживание. Шесть мономеров коннексина образуют гемиканал (НС), который, будучи отстыкованным при нормальных условиях, является закрытым, при этом стыковка двух НСs из соседних клеток приводит к образованию щелевого контакта, который открывается при определенных физиологических условиях и обеспечивает обмен клеточным содержимым (Coutinho *et al.*, 10 2020). Однако при патологии обычно закрытый, отстыкованный НС подвергается стимуляции и открывается во внеклеточную среду, что в конечном итоге приводит к гибели клеток. Внезапная реперфузия ткани во время состояний открытого НС Сх43 резко увеличивает гибель клеток и повреждение тканей, поскольку клетки не способны справиться с быстрым притоком ионов.

Гипоксия часто связана с продуцированием провоспалительных цитокинов, а также сверхэкспрессией белков, таких как фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), коннексин 43 (Сх43) и синдекан-4 (Coutinho *et al.*, 2020). RPE экспрессирует Сх43 в качестве наиболее активно экспрессируемого коннексина (Obert *et al.*, 2017). Кроме того, известно, что VEGF нарушает организацию ZO-1, что приводит к дезинтеграции плотных контактов и повышенной проницаемости монослоя. Кроме того, исследования *in vitro* с применением эндотелиальных клеток показали, что VEGF-опосредованное нарушение коммуникации через щелевые контакты коррелирует с изменениями фосфорилирования Сх43 (Coutinho *et al.*, 2020).

Например, при неоваскулярной AMD (n-AMD) нерегулируемый рост плохо сформированных кровеносных сосудов, известный как хориоидальная неоваскуляризация (CNV), вызывает кровоизлияние в сетчатку, что приводит к ишемии тканей (Coutinho *et al.*, 2020). Чтобы компенсировать нарушение кровоснабжения/снабжения кислородом, VEGF сверхэкспрессируется пигментным эпителием сетчатки (RPE), что способствует формированию гематоретинального барьера (BRB) между сосудистой оболочкой и нервной частью сетчатки. (Coutinho *et al.*, 2020). Такая сверхэкспрессия VEGF способствует образованию проницаемых кровеносных сосудов, что приводит к попаданию в среду большего количества воспалительных факторов и вызывает дисфункцию барьера RPE и гибель клеток вследствие гипоксии, что в конечном итоге способствует росту кровеносных сосудов в сетчатке и приводит к потере зрения.

В глазу стареющего субъекта внеклеточный материал откладывается в мембране Бруха и в результате толщина мембраны Бруха увеличивается, а проницаемость уменьшается (Naylor *et al.*, 2020). Старение приводит к накоплению окислительных повреждений и сопутствующему снижению защитных механизмов. Было предположено, что в качестве отправной точки служит накопление липофусцина в RPE (Naylor *et al.*, 2020). Считается, что окислительное повреждение является первоначальным триггером для возрастных дегенеративных заболеваний, таких как AMD (Naylor *et al.*, 2020). Адаптивный ответ RPE на стресс у пациентов с AMD становится разрегулированным, а растущий дисбаланс защитных и токсических факторов способствует макулярному повреждению и развитию поражений сетчатки (Naylor *et al.*, 2020). Снижается способность RPE поглощать световую энергию, что считается важным фактором в каскаде событий, приводящих к AMD (Naylor *et al.*, 2020).

Целостность наружного гематоретинального барьера (oBRB) удерживает сосуды сосудистой оболочки от проникновения в сетчатку и превращения d-AMD во влажную AMD. Потеря такого связывания RPE–RPE может вызвать сверхэкспрессию VEGF (Naylor *et al.*, 2020). Возрастная дегенерация RPE, разрывы, образование друз или апоптоз также могут привести к потере связывания RPE- RPE.

Диагностика и способы лечения

В качестве диагностических инструментов в клиниках существует множество доступных обследований с целью мониторинга морфологических изменений сетчатки, RPE и сосудистой оболочки глаза у пациентов с d-AMD. Например, аутофлуоресценция глазного дна и оптическая когерентная томография (ОСТ) считаются наиболее полезными инструментами при диагностике и наблюдении за изменениями, вызванными d-AMD, включая мониторинг прогрессирования области атрофии. Другим примером является ОСТ-ангиография, новое средство визуализации, которое может дать дополнительную информацию о пациентах, страдающих d-AMD. ОСТ также можно использовать для диагностики и мониторинга макулярного отека, наблюдаемого при влажной AMD (Bandello *u др.*, 2017).

Недавно были открыты клиники для интравитреальных инъекций препаратов на основе ингибитора фактора роста эндотелия сосудов (анти-VEGF препараты) и были разработаны новые способы лечения, направленные на созревание и ремоделирование сосудов, которые позволили кардинальным образом изменить естественное течение заболевания. Такие интравитреальные агенты, блокирующие VEGF, произвели революцию в лечении пациентов с влажной AMD благодаря уменьшению роста поражений, вызванных CNV, и снижению просачивания из них жидкости и предотвращению умеренной и тяжелой потери зрения (Naylor *et al.*, 2020).

Однако в настоящее время отсутствует одобренное средство терапии для географической атрофии (GA), поздней формы d-AMD, поскольку не существует лечения, которое позволяет восстановить повреждение пигментного эпителия сетчатки (RPE) или фоторецепторов. По этой причине современные подходы к лечению d-AMD вероятно способны только предотвращать и/или замедлять прогрессирование существующей атрофии (Bandello *et al.*, 2017).

На многочисленных животных моделях было показано, что блокаторы гемиканалов (HC) Cx43 предотвращают просачивание из сосудов, поддерживают восстановление проницаемых кровеносных сосудов и способствуют восстановлению тканей (Coutinho *et al.*, 2020). При хронических гипоксических или воспалительных состояниях гемиканалы Cx43 называли «патологическими порами», поскольку они отвечают за активацию воспалительного каскада через пириновый домен семейства NOD-подобных рецепторов, содержащий комплекс 3 (NLRP3) инфламасома, что приводит к продуцированию воспалительных цитокинов и, таким образом, поддерживает воспалительную среду (Coutinho *et al.*, 2020). Было показано, что блокирование открытого гемиканала Cx43 во время травмы с помощью пептидомиметиков Cx43, таких как Gap27 и пептид5, способствует выживанию клеток и восстановлению тканей при повреждении сердца, спинного мозга и в глазных моделях. Однако одной из проблем, связанной с указанными пептидами при применении в высоких концентрациях и/или при длительных периодах воздействия, является их действие на внеклеточные мотивы Cx43, потенциально влияющее на функцию щелевых контактов, необходимую для выживания клеток. (Coutinho *et al.*, 2020).

Gap19 представляет собой блокатор HC, полученный из второй цитоплазматической петли Cx43, который не нарушает функцию щелевых контактов. Однако для связывания с соответствующей последовательностью цитоплазматического хвоста Cx43 ему необходимо проникнуть в клетку (Coutinho *et al.*, 2020). Из-за его плохого проникновения в клетки ранее использовались высокие концентрации, но с ограниченной эффективностью. Соответственно, для улучшения транспортировки карго-молекул через клеточную мембрану были исследованы проникающие в клетки пептиды (CPP). Например, было показано, что Xentry, CPP, полученный из X-белка вируса гепатита В, улучшает транспортировку ряда молекул в клетки посредством эндоцитарных механизмов путем связывания с экспрессируемым на поверхности клеток синдеканом-4 (Coutinho *et al.*, 2020). Поскольку синдекан-4 не экспрессируется на циркулирующих моноцитах и эритроцитах, можно предотвратить секвестрацию путем циркуляции при системной доставке, при этом поглощение клетками, экспрессирующими синдекан-4, увеличивается. Coutinho *et al.* обнаружили, что конъюгация Xentry с Gap19 (XG19) может увеличить клеточное поглощение Gap19 и заблокировать опосредованное гемиканалом

Cx43 повреждение гипоксических клеток при низких концентрациях пептидов (Coutinho *et al.*, 2020).

Obert *et al.* (2017) выдвинули гипотезу, что целенаправленная передача сигналов ZO-1 будет поддерживать целостность BRB и уменьшать патофизиологию RPE за счет стабилизации щелевых контактов и/или TJs. Они разработали пептидомиметик на основе коннексина 43, карбоксильного концевой участка 1 альфа-коннексина (α CT1), чтобы конкурентно блокировать взаимодействия в домене PDZ2 белка ZO-1, ингибируя, тем самым, лиганды, которые селективно связываются с таким доменом. α CT1 имитирует COOH-концевой PDZ-связывающий домен Cx43, отличающийся от некоторых других миметиков Cx43, которые, как полагают, вызывают снижение активности канала Cx43 или которые нацелены на домен Cx43, связанный с микротрубочками, что уменьшает активность гемиканала. Считалось, что α CT1 поддерживает целостность BRB и снижает патофизиологию RPE путем стабилизации щелевых контактов и/или TJs. В экспериментах у мышей вызывали дисфункцию барьера клеток RPE с помощью лазерной фотокоагуляции, вызывающей хориоидальную неоваскуляризацию (CNV), или путем воздействия яркого света, приводящего к морфологическому повреждению. Лечение с применением α CT1 уменьшало развитие CNV и просачивание жидкости, как было определено с помощью оптической когерентной томографии, при этом повреждение коррелировало с нарушением клеточной целостности окружающих клеток RPE. Предварительное лечение посредством α CT1 с применением глазных капель позволяло предотвратить повреждение светом, которое обычно значительно нарушает морфологию клеток RPE. Эксперименты *in vitro* с применением монослоев RPE и клеток Мадин-Дарби почек собак (MDCK) показали, что α CT1 стабилизирует плотные контакты независимо от его влияния на Cx43. В целом, стабилизация межклеточных контактов с помощью α CT1 была эффективной в отношении ослабления дисфункции RPE в моделях патологии, подобной AMD. Obert *et al.* пришли к выводу, что α CT1-опосредованная стабилизация плотных контактов может служить в качестве нового способа лечения как влажной AMD, так и d-AMD.

King *et al.* (2021) также предоставил обзор различных молекул, нацеленных на Cx43, и упоминает данегапид. Однако другие пептиды, описанные в данном документе, одновременно эффективно не блокируют гемиканалы и не стабилизируют межклеточное связывание посредством щелевых контактов в стрессовых условиях при AMD.

Соответственно, в данной области техники существует потребность в дополнительных способах лечения возрастной макулярной дегенерации (AMD) и особенно сухой AMD (d-AMD), в частности, до того, как она разовьется в прогрессирующую географическую атрофию (GA), или влажную AMD, или неоваскулярную AMD (n-AMD).

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В широком смысле настоящее изобретение относится к соединениям, которые представляют собой клеточные модуляторы, зависимые от щелевых контактов, такие как модуляторы межклеточной коммуникации через щелевые контакты (GJIC) и модуляторы межклеточного связывания, для применения в способах лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD), обычно у пациентов-людей. AMD может представлять собой сухую AMD (d-AMD), прогрессирующую GA, влажную AMD или неоваскулярную AMD (n-AMD). В некоторых предпочтительных аспектах настоящее изобретение, в частности, относится к лечению или предотвращению сухой AMD (d-AMD), в частности, непосредственно перед ухудшением состояния до момента, когда у пациента развивается влажная AMD или прогрессирующая GA.

Хотя роль межклеточной коммуникации через щелевые контакты (GJIC) была широко изучена в различных тканях, настоящее изобретение касается ее участия в структурной целостности межклеточной связи и дисфункции наружного BRB, включая барьерную целостность RPE у пациентов с AMD. Каналы щелевых контактов обеспечивают прохождение ионов, питательных веществ и других сигнальных молекул (до 1 кДа) между соседними клетками. Важно отметить, что опосредованная коннексином 43 (Cx43) GJIC играет критическую роль в регуляции роста клеток, герметичности сосудов, целостности барьеров и гибели клеток в сетчатке и, таким образом, является неотъемлемым фактором для поддержания метаболического и сосудистого гомеостаза сетчатки. Cx43 активно экспрессируется в сетчатке, что предполагает значительную степень зависимость от щелевых контактов связывания, особенно в структурах iBRB и oBRB. Однако в условиях окислительного стресса, ишемического стресса, гипоксии, высокого уровня глюкозы и диабетических состояний Cx43-зависимое межклеточное связывание подвергается понижающей регуляции и функциональность нарушается, что, тем самым, приводит к снижению активности щелевых контактов в RPEs и васкулярных клетках сетчатки. Кроме того, понижающая регуляция Cx43, вызванная окислительным стрессом, ишемическим стрессом, гипоксией, высоким уровнем глюкозы и диабетом, а также пониженная активность GJIC, играют решающую роль в разрастании RPE и гибели васкулярных клеток в сетчатке мышей, крыс и людей с диабетом, демонстрируя значительное увеличение количества ацеллюлярных капилляров и потерю перипитов.

Кроме того, известно, что кровеносные сосуды, в том числе сосуды, присутствующие в глазу, состоят из двух взаимодействующих типов клеток (Song *et al.*, 2005). Таким образом,

эндотелиальные клетки образуют внутреннюю выстилку стенки сосуда, тогда как перициты окружают поверхность васкулярной трубки, поддерживая и сохраняя структуру сосуда и целостность барьера, и способствуют подавлению просачивания жидкости из сосуда. Таким образом, перициты имеют функциональное значение, поскольку, когда сосуды теряют
5 перициты, они становятся геморрагическими и гипердилатированными, что приводит к таким состояниям, как просачивание из сосудов и отек, когда просачивание жидкости превышает резорбтивную способность RPE, что приводит к потере зрения и, в конечном итоге, к слепоте. Наряду с воздействием модуляторов щелевых контактов на эндотелиальные клетки сетчатки и RPEs в настоящей заявке показано, что барьерная целостность RPE может быть защищена
10 от окислительного стресса и стресса, вызванного высоким уровнем глюкозы, а также от набухания наружного слоя сетчатки у крысы, при этом модель диабетической ретинопатии можно значительно улучшить путем введения модулятора щелевых контактов.

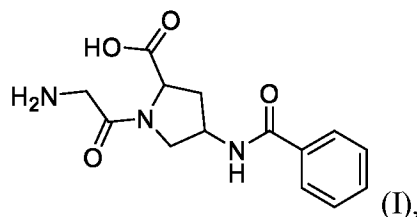
Кроме того, комбинация в виде поддержания структурного межклеточного связывания и закрытия гемиканалов обеспечивает уникальное и улучшенное преимущество соединений, описанных в настоящем документе, таких как данегаптин, по сравнению с ранее описанным
15 терапевтическим действием молекул, в основном нацеленных на закрытие гемиканалов (таких как пептид5 и тонаберсат).

Не желая быть связанными теорией, авторы настоящего изобретения при исследовании BRB-моделей AMD и DME предположили, что МоА (механизм действия) эффектов соединений, описанных в настоящем документе, таких как данегаптин, в первую очередь обусловлен лечебным/защитным воздействием соединения на межклеточное связывание, зависимое от щелевых контактов (в сочетании с TJs), в присутствии высоких концентраций
20 глюкозы, активных форм кислорода (RoS) и метаболических/биоэнергетических (т.е. при окислительном фосфорилировании (OxPos), цикле трикарбоновых кислот (TCA) и гликолизе) и других клеточных стрессоров. Соединения, описанные в настоящем изобретении, могут также предотвращать патологическое открытие гемиканалов щелевых контактов при AMD, которое может вызывать потерю клеток и разъединение клеток. Считается, что указанный механизм действия играет дополнительную и важную структурную роль для поддержания целостности BRB помимо классической сигнальной роли межклеточной коммуникации через
25 щелевые контакты (GJIC) с небольшими ионами (например, Ca^{2+}) и другими малыми молекулами, когда межклеточная координация в определенных тканях является критически важной (например, в кардиомиоцитах сердца). Такой механизм действия предшествует основным способам лечения на основе анти-VEGF препаратов и воздействует на ключевую патологию при DR, DME и AMD. Следовательно, соединения, описанные в настоящем
30

документе, такие как данегаптин, могут быть полезны для предотвращения развития указанных заболеваний, а также для лечения таких заболеваний после их развития.

Описанные в настоящем документе соединения представляют собой модуляторы щелевых контактов. Данегаптин, описанный в настоящем документе, представляет собой соединение в виде (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновой кислоты (Butera *et al.*, 2009).

Соответственно, в первом аспекте настоящего изобретения предложено соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат, для применения в способе лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, при этом предложенный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения; или его фармацевтически приемлемой соли.

Указанное соединение предпочтительно представляет собой (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновую кислоту; или ее фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят местно в глаз. В некоторых вариантах реализации указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят местно посредством интравитреальной инъекции в глаз.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят системно. В некоторых вариантах реализации указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят системно путем перорального, подкожного, трансдермального или внутривенного введения. Указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат предпочтительно вводят системно посредством перорального введения.

В некоторых вариантах реализации предложенный способ предназначен для предотвращения AMD у субъекта-человека. В некоторых вариантах реализации предложенный способ предназначен для предотвращения прогрессирования AMD у субъекта-человека.

Предложенные соединения предпочтительно предназначены для применения в способе предотвращения прогрессирования сухой AMD во влажную AMD у субъекта-человека. Предложенный способ предпочтительно предназначен для предотвращения прогрессирования промежуточной сухой AMD в прогрессирующие формы сухой AMD у субъекта-человека.

5 AMD предпочтительно характеризуют как сухую AMD на ранней стадии. AMD предпочтительно характеризуют как сухую AMD на промежуточной стадии. AMD предпочтительно характеризуют как сухую AMD на поздней стадии. Поздняя стадия сухой AMD предпочтительно представляет собой географическую атрофию (GA). Указанные варианты реализации являются предпочтительными, поскольку не существует известных

10 способов лечения сухой AMD.

В некоторых вариантах реализации AMD характеризуют как влажную, неоваскулярную или прогрессирующую ангиогенную AMD. В некоторых вариантах реализации предложенный способ предназначен для предотвращения развития хориоидальной неоваскуляризации у субъекта-человека.

15 В некоторых вариантах реализации у пациента имеется сопутствующая патология. Например, в некоторых вариантах реализации пациент имеет хронически высокие уровни глюкозы в крови, в том числе пациент, который осуществляет гликемический контроль. В некоторых вариантах реализации у пациента также имеется диабет 1 типа или диабет 2 типа.

В некоторых вариантах реализации у пациента также имеется гипертензия или

20 хронически высокое кровяное давление, включая пациента, имеющего согласно контролю нормальное кровяное давление. В некоторых вариантах реализации пациент согласно контролю имеет нормальное кровяное давление благодаря лечению гипертензии, гликемическому контролю или снижению уровня холестерина. В некоторых вариантах реализации пациент имеет высокий уровень холестерина.

25 В некоторых вариантах реализации у пациента также имеется диабетическая ретинопатия или диабетический макулярный отек. В некоторых вариантах реализации у пациента имеется заболевание глаз, связанное с окклюзией вены сетчатки (RVO). В некоторых вариантах реализации у пациента имеется заболевание глаукома с патологическим внутриглазным давлением или без него. В некоторых вариантах реализации у пациента

30 имеется увеит или другие формы воспалительного заболевания глаз.

В некоторых вариантах реализации у пациента в глазу наблюдаются или наблюдались отложения друз или белковые экссудаты.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует дисфункцию RPE (пигментированного эпителия сетчатки) или наружного гематоретинального барьера

35 (oBRB), включая потерю целостности барьера между клетками RPE и потерю клеток RPE. В

некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует вызванную стрессом дисфункцию слоев сетчатки или слоев сосудистой оболочки в глазу. В некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует потерю фоторецепторов в глазу, например, в сетчатке. В некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует просачивание жидкости через сосуды в сетчатке, включая просачивание жидкости через сосуды, приводящее к макулярному отеку. В некоторых вариантах реализации указанное соединение улучшает отвод жидкости из тканей сетчатки через пигментированный эпителий сетчатки. В некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует гибель или потерю эндотелиальных клеток сетчатки, эндотелиальных клеток сосудистой оболочки, перицитов или эпителиальных клеток сетчатки.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение ингибирует патологическое открытие гемиканала и/или высвобождение АТФ через гемиканал, например, опосредованное коннексином 43 открытие и/или высвобождение АТФ. Патологические эффекты открытия гемиканала и высвобождения АТФ через гемиканал (или других таких небольших сигнальных молекул размером <1 кДа) могут быть как аутокринными, так и паракринными.

В некоторых вариантах реализации концентрация введенного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или состава, например, содержащего соединение состава для перорального применения, системного применения и с замедленным высвобождением, составляет в микроокружении глаза от примерно 50 нМ до примерно 150 нМ, например, примерно 100 нМ.

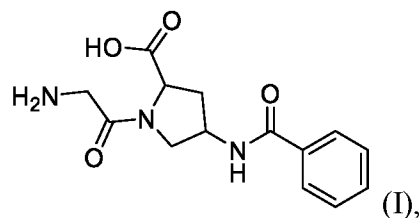
В некоторых вариантах реализации указанное соединение вводят пациенту один раз или два раза в сутки. В некоторых вариантах реализации указанное соединение вводят пациенту до четырех раз в сутки.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложены фармацевтические композиции, приготовленные с возможностью доставки указанных соединений в глаз.

Соединения, описанные в настоящем изобретении, позволяют клеткам защищать себя при возрастной макулярной дегенерации (AMD). Не желая быть связанными с какой-либо конкретной теорией, авторы настоящего изобретения предполагают, что предложенные соединения могут оказывать стабилизирующее действие на клетки путем уменьшения склонности митохондрий к просачиванию и/или путем уменьшения склонности клеток к развитию проницаемой наружной клеточной мембраны и/или путем улучшения межклеточного и/или структурного связывания клеток. Предложенные соединения могут приводить к лучшему связыванию между клетками, позволяя клеткам обмениваться доступной энергией (АТФ) и обеспечивать межклеточную передачу сигналов, в том числе передачу сигналов по кальциевым каналам. Предложенные соединения также могут

приводить к уменьшению вызванного патологическим стрессом просачиванию АТФ во внеклеточный компартмент, что приводит к воспалению. Указанные соединения также могут функционально улучшать целостность барьера iBRB и oBRB и/или улучшать способность RPE впитывать жидкость.

5 В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложено применение соединения формулы (I):

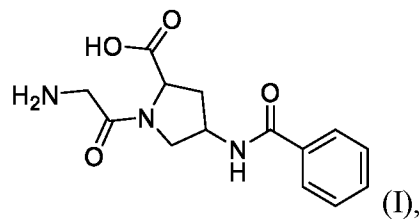


или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата,

10 для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, при этом предложенный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложен способ лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, при этом 15 указанный способ включает введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата,

при этом указанное соединение представляет собой соединение формулы (I):



20 или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

В дополнительном аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая соединение, описанное в данном документе, для применения в способе, описанном в данном документе, при этом указанная фармацевтическая композиция содержит указанное соединение и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. 25 Предложенное соединение предпочтительно предназначено для введения путем системного введения, перорального введения, подкожного введения, трансдермального введения, введения с помощью назального спрея, глазных капель или контактных линз в составе глазных

капель, посредством контактных линз, посредством назального спрея или посредством инъекции, например, интравитреальной инъекции.

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

В настоящей заявке «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим признаком или компонентом 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.

Если контекст не требует иного, описания и определения признаков, приведенные выше, не ограничиваются каким-либо конкретным аспектом или вариантом реализации настоящего изобретения и в равной степени применимы ко всем описанным аспектам и вариантам реализации.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Данегаптид защищает от DR и AMD-имитирующего опосредованного повреждения путем снижения проницаемости монослоев пигментных эпителиальных клеток сетчатки человека, подвергаемых стрессу. Линия клеток RPE (пигментированный эпителий сетчатки) человека, ARPE-19, выращенная в виде монослоев сливающихся клеток, показала увеличение проницаемости после 48 часов окислительного повреждения под действием сублетального *t*BHP (*трет*-бутилгидропероксида) в условиях высокого содержания глюкозы, которое было предотвращено путем обработки данегаптидом с применением двух различных маркеров проницаемости (6-CF и RhoB). Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. (стандартная ошибка среднего), при этом каждая точка данных представляла собой отдельное экспериментальное состояние и анализировалась с применением однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с критерием множественных сравнений Хольма-Шидака; P_{app} (коэффициент кажущейся проницаемости), 6-CF (6-карбоксифлуоресцеин; верхний график **A**), RhoB (родамин-В; нижний график **B**), * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, $n = 6-8$.

Фигура 2. Данегаптид защищает от DR и AMD-имитирующего опосредованного повреждения путем улучшения уровня организации плотных контактов (TiJOR) и улучшения межклеточного связывания между пигментными эпителиальными

клетками сетчатки человека в монослоях, подвергаемых стрессу. Линия клеток RPE (пигментированный эпителий сетчатки) человека, ARPE-19, выращенная в виде монослоев сливающихся клеток, показала увеличение разъединения клеток и дезорганизации плотных контактов (TJ), измеренное посредством иммуноцитохимического анализа путем иммуноокрашивания антитела к zonula occludens-1 (ZO-1) (нижние изображения **В**; слева = контроль; в середине = высокое содержание глюкозы и 200 мкМ *t*BHP; справа = высокое содержание глюкозы, 200 мкМ *t*BHP и 100 нМ данегаптида), при этом коэффициент организации плотных контактов (TiJOR; верхняя гистограмма **А**) после 48 часов окислительного повреждения сублетальным *t*BHP (*трет*-бутилгидропероксид) при высоком содержании глюкозы снижался в результате клеточного стресса, что можно было предотвратить путем обработки данегаптимом. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M., при этом каждая точка данных представляла собой результат отдельного анализа TiJOR и анализировалась с применением однофакторного ANOVA с критерием множественных сравнений Хольма-Шидака; TiJOR (коэффициент организации плотных контактов); HG (гипергликемия); *t*BHP (*трет*-бутилгидропероксид); DGP (данегаптим), *** $p < 0,001$, $n = 13-16$.

Фигура 3. А. Уровни глюкозы в крови (ммоль/л) и В. уровни гликированного гемоглобина (HbA1c) в крови (ммоль/моль) во время исследований *in vivo*. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD (стандартное отклонение) для от 15 до 18 крыс на группу. Данные анализировали с помощью двухфакторного ANOVA (уровень глюкозы в крови, $p < 0,001$; и уровень HbA1c в крови, $p < 0,001$) с последующим ретроспективным анализом Тьюки по сравнению с группой, не подвергавшейся воздействию. *** $p < 0,001$.

Фигура 4. Показатели катаракты во время исследований *in vivo*. Катаракты оценивали по шкале от 0 (нормальный хрусталик) до 3 (тяжелые помутнения, охватывающие более 75% хрусталика). Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. для от 15 до 18 крыс на группу. Данные анализировали с помощью двухфакторного ANOVA ($p < 0,001$) с последующим ретроспективным анализом Тьюки по сравнению с группой, не подвергавшейся воздействию. *** $p < 0,001$.

Фигура 5. Данегаптим защищает от утолщения наружного слоя сетчатки у крыс с DR после индукции посредством стрептозотоцина (STZ). Согласно спектральной оптической когерентной томографии (SD-OCT) данегаптим предотвращал утолщение наружного гематоретинального барьера сетчатки, измерения которого включали наружный сетчатый и ядерный слои, внутренний и наружный сегменты и слои RPE/сосудистой оболочки глаза. SD-OCT-сканы сетчатки сегментировали и анализировали толщину наружного слоя сетчатки с помощью алгоритма сверточной нейронной сети. **А. STZ-индукция серых крыс**

приводила к статистически значимому увеличению толщины наружного слоя сетчатки в группах, получавших STZ + наполнитель ($n = 21$), после 9 недель индукции по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию ($n = 16$; t -критерий $p < 0,01$). **В.** Лечение данегаптидом путем локализованных глазных инъекций с целью введения 100 нМ каждую неделю в течение трех недель позволило предотвратить указанное увеличение толщины наружного слоя сетчатки ($p < 0,05$), тогда как интравитреальная инъекция анти-VEGF и анти-VEGF + данегаптид не оказывали никакого эффекта. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$. **С.** Типичные SD-OCT-сканы толщины наружного слоя сетчатки левого и правого глаза через девять недель после STZ-индукции.

10 **Фигура 6. Схематический чертеж с указанием областей, используемых для регионального анализа толщины сетчатки.** ST: верхняя височная; SN, верхняя носовая; IT, нижняя височная; IN, нижняя носовая.

Фигура 7. Данегаптид защищает от утолщения наружного слоя сетчатки по всей сетчатке. А-Д. Толщина наружного слоя сетчатки статистически значимо увеличивалась у крыс, получавших STZ + наполнитель, по сравнению с крысами, не подвергавшимися воздействию, во всех областях, верхней височной (**А**), верхней носовой (**В**), нижней височной (**С**) и нижней носовой (**Д**). Данные анализировали с помощью непарного t -критерия. **Е-Н.** Данегаптид предотвращал утолщение наружного слоя сетчатки во всех областях: верхней височной (**Е**), верхней носовой (**Ф**), нижней височной (**Г**) и нижней носовой (**Н**), как определено посредством однофакторного ANOVA или критерия Краскела-Уоллиса ($p < 0,01$) с последующим применением критерия множественных сравнений Тьюки или Дьюнна. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. для $n = 12-18$ крыс на группу. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$.

25 **Фигура 8. Региональный анализ толщины внутреннего слоя сетчатки.** Хотя у STZ-индуцированных животных сетчатка была тоньше по сравнению с животными (**А-Д**), не подвергавшимися воздействию, статистически значимые различия между лечебными группами (**Е-Н**) выявлены не были. Верхняя височная (**А** и **Е**), верхняя носовая (**В** и **Ф**), нижняя височная (**С** и **Г**) и нижняя носовая (**Д** и **Н**) области. Данные представлены в виде среднего значения \pm SD для от 12 до 18 крыс на группу. Данные для группы, не подвергавшейся воздействию, и группы, получавшей STZ + наполнитель, анализировали с помощью непарного t -критерия. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. Данные по лечебным группам, получавшим STZ, анализировали с применением однофакторного ANOVA или критерия Краскела-Уоллиса, при этом значения p составляли $> 0,05$ для всех областей.

35 **Фигура 9. Лечение с применением данегаптида и анти-VEGF уменьшает экстравазацию голубого Эванса (ЕВ) в диабетической сетчатке. А.** Индукция

гипергликемии посредством STZ привела к значительному 6,28-кратному увеличению экстравазации EB через 9 недель после индукции (на $100 \pm 13,5\%$ в группе, не подвергавшейся воздействию, по сравнению с $628 \pm 212,5\%$ в группе, получавшей STZ + наполнитель, $n = 10-11$, t-критерий $p < 0,01$). В. Анти-VEGF ($p < 0,01$), данегаптин ($p < 0,05$) и комбинированное лечение ($p < 0,05$) приводили к статистически значимому снижению экстравазации EB на 82,3%, 68,9% и 65,6%, соответственно. Данные STZ-индуцированных групп соответствовали нормальности при применении критерия Д'Агостино и Пирсона и были проанализированы посредством однофакторного ANOVA ($p < 0,01$) с последующим применением критерия множественных сравнений Хольма-Шидака. Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фигура 10. Данегаптин предотвращает потерю перицитов через 9 недель после индукции посредством STZ. А. Индукция DR посредством STZ приводила через 9 недель к статистически значимому увеличению количества призраков перицитов (t-критерий, $p < 0,05$, $n = 45-67$). В. Количество призраков перицитов в группах, получавших STZ, сравнивали путем применения однофакторного ANOVA ($p < 0,001$) с последующим применением критерия множественных сравнений Даннетта. Как AF564 ($p < 0,01$, $n = 45$), так и данегаптин ($p < 0,001$, $n = 58$) приводили к статистически значимому снижению количества призраков перицитов. Комбинированное лечение с применением AF564 и данегаптида не оказывало влияния на наличие призраков перицитов ($p = 0,11$; $n = 61$). Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Фигура 11. Типичные изображения трипсиновых гидролизатов, демонстрирующие защиту от потери перицитов при применении данегаптида. Окрашивание с помощью PAS использовали для оценки сосудистых нарушений, включая ацеллюлярные капилляры (стрелки) и призраки перицитов (наконечники стрелок). Перициты не указаны. Масштабная линейка = 100 мкм.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Определения

Если не указано иное, для конкретных терминов приведены следующие определения.

В настоящем описании и формуле изобретения для природных аминокислот используют стандартные трехбуквенные и однобуквенные коды. В настоящем документе термин «пептид» обозначает цепь из двух или более аминокислотных фрагментов (аминокислотных остатков), которые связаны посредством пептидной связи. В общем случае

пептиды могут содержать одну или более природных аминокислот и/или одну или более неприродных аминокислот.

В настоящем документе термин «природная аминокислота» относится к одной из следующих 20 аминокислот: Ala (A), Cys (C), Ser (S), Thr (T), Asp (D), Glu (E), Asn (N), Gln (Q), His (H), Arg (R), Lys (K), Ile (I), Leu (L), Met (M), Val (V), Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), Gly (G) и Pro (P). В молекулах природных пептидов такие аминокислоты (за исключением Gly, в котором отсутствует хиральный центр) обычно встречаются в форме остатков L-аминокислот, но соединения, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают и пептиды, содержащие остатки D-аминокислот.

В данной области техники используют трехбуквенные коды аминокислот. Нур относится к 4-гидроксипролину.

Соединения для применения в настоящем изобретении могут содержать два или более асимметричных атома (также называемых хиральными центрами), что обеспечивает возможность образования диастереомеров. Соединения, подходящие для применения в настоящем изобретении, включают такие диастереомеры.

В контексте данного документа термин «васкулярные клетки» включает эндотелиальные клетки и перициты, в том числе эндотелиальные клетки сетчатки и эндотелиальные клетки сосудистой оболочки сетчатки.

20 Возрастная макулярная дегенерация (AMD)

AMD представляет собой дегенеративное заболевание центральной зоны сетчатки (в которой центральное зрение формируется в области, известной как макула). Макула имеет важное значение для обеспечения четкого, прямолинейного зрения, которое используют для чтения, распознавания лиц и вождения. AMD можно классифицировать как сухую AMD (d-AMD; также известную как неоваскулярная AMD или неэкссудативная AMD) или неоваскулярную AMD (n-AMD; также известную как влажная AMD или экссудативная AMD).

Как правило, влажная AMD обычно начинается как сухой тип AMD. Типичными стадиями AMD являются:

1. Сухая AMD на ранней стадии. Характеризуется друзами средних размеров (от 63 до 125 микрон или мкм), но без пигментных изменений или нарушений (Ferris *et al.*, 2013). Указанная стадия также называется ранней формой AMD.

2. Сухая AMD на промежуточной стадии. Характеризуется либо крупными друзами (более 125 микрон или мкм), либо пигментными изменениями/нарушениями с друзами по меньшей мере средних размеров. Такая стадия также называется промежуточной формой AMD.

3. Сухая AMD на поздней стадии. Характеризуется поражениями, связанными с атрофией тканей и/или прогрессирующим развитием атрофических областей внутри или вблизи макулы. Указанная стадия d-AMD включает географическую атрофию (GA), характеризующуюся атрофией наружной ткани сетчатки, пигментного эпителия сетчатки, фоторецепторов и/или хориокапилляриса. Такая стадия также называется поздней формой AMD. Географическая атрофия (GA) представляет собой хроническую прогрессирующую дегенерацию макулы как часть возрастной макулярной дегенерации (AMD) на поздней стадии. Данное заболевание характеризуется локализованной резко очерченной атрофией наружной ткани сетчатки, пигментного эпителия сетчатки и хориокапилляриса.

4. Влажная или неоваскулярная или прогрессирующая ангиогенная AMD. Характеризуется хориоидальной неоваскуляризацией (CNV). Неоваскуляризация представляет собой рост новых кровеносных сосудов или ангиогенез. Такие новые сосуды являются незрелыми, хрупкими и легко пропускают жидкость и кровь. Они также могут создавать рубцовую ткань и в результате ухудшать зрение или вызывать отслоение сетчатки. Влажная AMD относится к компоненту проницаемых сосудов, когда чрезмерное просачивание жидкости через сосуды может привести к образованию отека сетчатки. Образование новых сосудов может происходить с существенным отеком или без него, при этом отек может происходить без существенной неоваскуляризации или ангиогенеза. Такие стадии заболевания также называют экссудативной AMD и поздней формой AMD.

Поскольку настоящее изобретение направлено на изучение роли щелевых контактов, в предпочтительных аспектах настоящее изобретение относится к лечению пациентов с AMD, то есть к описанным выше стадиям с 1 по 4, более предпочтительно к описанным выше стадиям с 1 по 3 (то есть к сухой AMD), или к терапии, которая может предотвращать дальнейшее ухудшение AMD в направлении к более запущенным или поздним стадиям заболевания. Настоящее изобретение также относится к другим факторам сосудистого стресса, таким как профилактическая терапия для пациентов, страдающих диабетом, которые подвержены риску развития AMD.

Пациенты с диабетом, которые подвержены риску развития AMD, включают пациентов со всеми типами диабета (тип 1, тип 2 и гестационный диабет). Риск развития AMD увеличивается, чем дольше человек страдает диабетом. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать для лечения всех таких типов пациентов. Хотя патофизиологическая связь между диабетом и AMD до конца не изучена, высокий стрессовый уровень глюкозы и повышенная проницаемость кровеносных сосудов, наблюдаемая при диабете, могут привести к повышенному отложению друз, увеличению содержания ROS и

гипоксическим состояниям, при этом VEGF является распространенным и важным патологическим фактором роста при обоих заболеваниях.

Кроме того, медицинское применение и способы согласно настоящему изобретению можно использовать для профилактического применения у пациентов, осуществляющих гликемический контроль. При таком лечении, когда пациент с хронически высокими уровнями глюкозы в крови осуществляет гликемический контроль, ткани глаза могут привыкнуть к высокой доступности глюкозы и испытывать стресс при достижении нормальных уровней глюкозы. Такие пациенты подвержены риску ухудшения течения AMD и могут быть защищены, когда уровень глюкозы в крови находится под контролем. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве профилактического способа лечения при осуществлении пациентами гликемического контроля.

Диабетическая ретинопатия (ДР) включает изменения в кровеносных сосудах сетчатки, которые могут вызвать кровотечение или просачивание жидкости, ухудшающие зрение. Диабетическая ретинопатия является наиболее распространенной причиной потери зрения среди людей с диабетом и основной причиной слепоты среди взрослых трудоспособного возраста. Диабетический макулярный отек является следствием диабетической ретинопатии, вызывающей набухание в области макулы сетчатки.

Диабетический макулярный отек (DME) представляет собой накопление жидкости (отек) в макуле. DME является наиболее распространенной причиной потери зрения среди людей с диабетической ретинопатией. У примерно половины из всех людей с диабетической ретинопатией в определенный момент жизни развивается DME. Хотя это чаще происходит по мере ухудшения диабетической ретинопатии, DME может возникнуть на любой стадии заболевания.

Пациенты с диабетической ретинопатией и/или диабетическим макулярным отеком также подвержены риску развития AMD. Как описано выше, пациенты с диабетом имеют повышенный риск развития AMD, при этом такой риск дополнительно увеличивается, если у пациента также развивается диабетическая ретинопатия или диабетический макулярный отек. В обоих случаях внутренние и наружные гематоретинальные барьеры подвергаются воздействию из-за патологических стрессовых состояний и становятся проницаемыми. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве способа лечения или предотвращения у пациентов, у которых также имеется диабетическая ретинопатия или диабетический макулярный отек.

Окклюзия вен сетчатки (RVO) наблюдается, когда закупорка артерии или вены (называемая окклюзией или инсультом) происходит в артерии или вене, контролирующей приток крови к сетчатке и из нее. Обычно это происходит, когда сгусток крови блокирует вену

сетчатки. Пациенты с окклюзией вен сетчатки (RVO) также подвержены риску развития AMD. Известно, что ишемические состояния, возникающие в результате RVO, приводят к патологически высоким уровням VEGF, а повышенные уровни VEGF в глазу могут стимулировать или ухудшать развитие AMD, в том числе развитие неоваскулярной AMD или влажной AMD. Известно, что высокие уровни VEGF, наблюдаемые в глазу пациента с RVO, вызывают значительное просачивание жидкости через сосуды и образование отека, и в данном случае было бы полезно ослабить просачивание жидкости через сосуды и усилить как iBRB, так и oBRB, описанных в настоящем документе, с помощью агента, модулирующего щелевые контакты. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве способа лечения или предотвращения у пациентов, у которых также имеется заболевание глаз, связанное с окклюзией вен сетчатки (RVO).

Глаукома является распространенным состоянием глаз, при котором повреждается зрительный нерв, соединяющий глаз с головным мозгом. Обычно такое состояние вызвано накоплением жидкости в передней части глаза, что увеличивает давление внутри глаза. Однако глаукома может возникать без повышения внутриглазного давления. Глаукома может привести к потере зрения, если ее не диагностировать и не лечить на ранней стадии. Пациенты с заболеванием глаукома, как с патологическим внутриглазным давлением, так и без него, подвержены риску развития AMD. Пигментированный эпителий сетчатки (RPE) играет важную роль в удалении жидкости из сетчатки и из глаза в целом. При уменьшении оттока жидкости из передней части глаза, как это часто наблюдается при глаукоме, удаление жидкости из заднего сегмента глаза через RPE становится все более важным для избежания повышения глазного давления. Следовательно, терапевтическое вмешательство, такое как применение соединений, описанных в настоящем документе, в том числе данегаптида, которое может стабилизировать связывание клеток RPE и улучшать их функцию, включая удаление жидкости из глаза, является полезными для пациентов с глаукомой и пациентов с глаукомой с риском развития AMD. Кроме того, согласно наблюдениям у пациентов с глаукомой и с риском развития атрофии нервной ткани нервная ткань и зрительный нерв с течением времени подвергаются стрессу. Опять же, в данном случае терапевтическое вмешательство, такое как применение соединений, описанных в настоящем документе, в том числе данегаптида, которое может защитить RPE и наружный гематоретинальный барьер (oBRB), будет способствовать функциональной и метаболической поддержке, которую RPEs оказывают нервной ткани, включая фоторецепторы, палочки и колбочки. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве способа лечения или предотвращения у пациентов, у которых также имеется заболевание глаукома с патологическим внутриглазным давлением или без него.

Воспалительные заболевания глаз, такие как увеит, возникают в ответ на инфекцию, аллергию, аутоиммунные расстройства, раздражение, повреждение или травму глаз, век или окружающих тканей. Увеит локализуется в месте, где возникает воспаление, в среднем слое ткани в стенке глаза (увеа). Пациенты с увеитом или другими формами воспалительного заболевания глаз подвержены риску развития AMD. Известно, что воспалительные состояния, наблюдаемые при увеите, стимулируют патологически повышенные уровни некоторых цитокинов и факторов роста, включая VEGF. Такие сигнальные молекулы могут дополнительно подвергать стрессу RPE и ухудшать целостность и функцию барьера RPE и, таким образом, наружного слоя сетчатки. Кроме того, известно, что патологический стресс RPE может привести к открытию гемиканала Cx43 и чрезмерному просачиванию АТФ во внеклеточный матрикс, где АТФ отвечает за стимуляцию пуриnergического рецептора, которая опять же играет главную роль при воспалении и ангиогенезе (Clapp *et al.*, 2019). Следовательно, терапевтическое вмешательство, такое как применение соединений, описанных в настоящем документе, в том числе данегаптида, которое может стабилизировать межклеточное связывание клеток RPE и предотвратить патологическое открытие гемиканалов Cx43, является полезными для пациентов с увеитом и пациентов с увеитом с риском развития AMD. Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве способа лечения или предотвращения у пациентов, у которых также имеется увеит или другие формы воспалительного заболевания глаз.

Характерной особенностью макулярной дегенерации являются друзы. Друзы представляют собой крошечные желтые или белые скопления внеклеточного материала, которые накапливаются между мембраной Бруха и пигментным эпителием сетчатки (RPE) глаза. Друзы содержат белки и липиды (природные молекулы, содержащие жиры). Пациенты с отложениями друз или другими белковыми экссудатами в глазу подвержены риску развития AMD. Отложение друз снижает эффективность обмена кислорода, питательных веществ и продуктов жизнедеятельности между RPE и сосудистым сплетением сетчатки. Учитывая, что сетчатка и фоторецепторы характеризуются очень высоким потреблением энергии и высокой потребностью в эффективной оксигенации, любое снижение способности RPE поддерживать фоторецепторы и нервную ткань может привести к стрессу тканей сетчатки и повышенному риску развития AMD. Следовательно, терапевтическое вмешательство, такое как применение соединений, описанных в настоящем документе, в том числе данегаптида, которое может стабилизировать RPE и улучшать метаболическую функцию и обмен кислородом, питательными веществами и продуктами жизнедеятельности между RPE и сосудистым сплетением сетчатки, было бы полезным для пациентов с друзами или подверженных риску повышенного отложения друз, например, отложения друз, наблюдаемого при AMD.

Соответственно, настоящее изобретение можно использовать в качестве способа лечения или предотвращения у пациентов, у которых также наблюдаются отложения друз или белковые экссудаты в глазу или которые подвержены риску повышенного отложения друз.

5 В связи с методологией настоящего изобретения можно использовать различные пути введения, в том числе, но не ограничиваясь ими, внутриглазную инъекцию, системное введение, пероральное введение, подкожное введение, трансдермальное введение, назальный спрей, глазные капли или контактные линзы. В некоторых вариантах реализации указанное соединение или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат находятся в лекарственной форме, вводимой с целью его терапевтического применения местно (например, путем
10 интравитреальной инъекции) в глаз или системно (например, путем перорального, подкожного, трансдермального или внутривенного введения). Указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат предпочтительно применяют системно посредством перорального введения.

В этой связи может быть желательным обеспечение в плазме крови субъекта
15 концентрации вводимого соединения (или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата) в диапазоне от 50 нМ до 5 мкМ. Исследования *in vitro*, описанные в настоящем документе, показали, что для клеток RPE оптимальный эффект наблюдался при достижении в микроокружении культур клеток RPE целевых концентраций соединений-модуляторов щелевых контактов на уровне 100 нМ. Кроме того, исследования *in vivo*, проведенные на
20 крысах с диабетом, подтвердили, что интравитреальные инъекции данегаптида в дозах, выбранных для достижения 100 нМ в тканях сетчатки, также обеспечивали защитные эффекты наружным слоям сетчатки, включая RPE. В качестве примера, такие терапевтические и защитные эффекты можно обеспечить, когда концентрация в плазме на уровне от 50 до 150 нМ регулируется посредством осмотического насоса, или путем местной инъекции в глаз,
25 направленной на достижение более высокой концентрации в стекловидном теле (*corpus vitreum*), что обеспечивает градиент концентрации по отношению к сосудам сетчатки. Указанные данные свидетельствуют, что эффективные дозы, подлежащие введению, достигают от 50 до 150 нМ в микроокружении тканей сетчатки, включая RPE.

30 Соединения, подходящие для применения в соответствии с настоящим изобретением

Примером соединения, хорошо подходящего для применения в соответствии с настоящим изобретением, является 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновая кислота, такая как ее (2S,4R) диастереомер [т.е. (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновая кислота], или ее фармацевтически приемлемая соль

или гидрат. Примером альтернативного названия данного соединения является (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензамидопирролидин-2-карбоновая кислота.

5 Другие диастереомеры последнего соединения (т.е. диастереомеры 2S4S, 2R4R, 2S4R или 2R4S) также могут представлять ценность для применения в контексте настоящего изобретения.

Конкретные формы указанного соединения также можно называть данегаптидом.

Фармацевтически приемлемая соль данегаптида включает гидрохлорид данегаптида.

10 Описанные в настоящем документе соединения представляют собой клеточные модуляторы, зависимые от щелевых контактов. В некоторых вариантах реализации указанные соединения могут ингибировать дисфункцию барьера RPE (пигментного эпителия сетчатки), в том числе потерю целостности барьера между клетками RPE и потерю клеток RPE. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может ингибировать дисфункцию слоев сетчатки или слоев сосудистой оболочки в глазу. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может ингибировать потерю фоторецепторов в сетчатке. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может ингибировать просачивание жидкости
15 через сосуды в сетчатке, в том числе просачивание жидкости через сосуды, приводящее к макулярному отеку. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может улучшать резорбцию жидкости из тканей сетчатки за счет улучшения целостности барьера и функции RPE, способствуя, тем самым, лечению и уменьшению макулярного отека. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может ингибировать гибель или потерю эндотелиальных клеток сетчатки, эндотелиальных клеток сосудистой оболочки, перицитов или эпителиальных клеток сетчатки, в том числе клеток RPE. В некоторых вариантах реализации указанное соединение может ингибировать патологическое открытие гемиканала и/или высвобождение АТФ через гемиканал, например, открытие
20 опосредованного коннексином 43 гемиканала и/или высвобождение АТФ через гемиканал. Патологические эффекты открытия гемиканала и/или высвобождения АТФ через гемиканал (или других таких малых сигнальных молекул) могут быть как аутокринными, так и паракринными.

Например, Squires *et al.*, 2021 показали, что данегаптид может уменьшить просачивание
30 АТФ из эпителиальных клеток почек. Mugisho *et al.*, 2019 показали, что пептид5, блокатор гемиканала коннексина 43, уменьшает высвобождение воспалительных цитокинов и АТФ, что может быть полезно при лечении воспалительных заболеваний, таких как AMD и DR. González-Casanova *et al.*, 2021 предположили, что блокаторы коннексиновых гемиканалов или лекарственные средства для усиления межклеточной коммуникации через щелевые контакты
35 (GJIC) могут быть полезны при лечении DR. Subauste, 2019 исследовал путь рецептора CD40-

АТР-P2₇ и связал его с индуцированием воспалительных реакций и гибелью эндотелиальных клеток. Clarr *et al.*, 2019 предположил, что защитная роль блокировки рецептора P2₇ при DR и/или AMD может быть обусловлена ингибированием высвобождения воспалительных цитокинов и ингибированием высвобождения VEGF.

5 В обзоре King *et al.* (2021) описаны различные молекулы, нацеленные на Cx43, однако такие молекулы одновременно не блокировали гемиканалы и не стабилизировали щелевые контакты в стрессовых условиях при AMD. Напротив, соединения, описанные в настоящем документе, в том числе данегаптид, имеют конкурентное преимущество, состоящее не только в блокировке гемиканалов, но и в эффективной стабилизации межклеточного связывания, 10 зависимо от щелевых контактов, в стрессовых условиях при AMD.

В дополнение к соединениям, описанным выше, дополнительные соединения, которые могут подходить для применения в контексте настоящего изобретения, включают некоторые другие соединения, модулирующие щелевые контакты, такие как антиаритмические пептиды AAR (Aonuma *et al.*, 1980), AAR10 (Dhein *et al.*, 1994; Muller *et al.*, 1997), HP5 (описанные в патенте США № 4775743) и другие антиаритмические пептиды, описанные в WO 02/077017, 15 WO 2007/078990 или WO 2018/202865.

Следует понимать, что описанные в настоящем документе соединения можно применять в комбинации. Например, в способах, описанных в настоящем документе, можно одновременно или последовательно вводить более одного соединения-модулятора щелевых 20 контактов.

Фармацевтически приемлемые соли

Фармацевтически приемлемые соли соединений, подходящих для применения в соответствии с настоящим изобретением, содержащие кислотный фрагмент, можно получить 25 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- 30 бутил-, диэтил-, диизопропил-, триэтил-, трибутил- или диметилпропиламино) или низшим моно-, ди- или тригидроксиалкиламино (например, моно-, ди- или триэтаноламино). Также можно получить внутренние соли. Если соединение, подходящее для применения в соответствии с настоящим изобретением, содержит основной фрагмент (как, например, в случае 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновой кислоты и ее 35 перечисленных диастереомеров), соли можно получить с применением органических или

неорганических кислот. Например, соли можно получить из следующих кислот: уксусной, пропионовой, молочной, лимонной, винной, янтарной, фумаровой, малеиновой, малоновой, миндальной, яблочной, фталевой, соляной, бромистоводородной, фосфорной, азотной, серной, метансульфоновой, нафталинсульфоновой, бензолсульфоновой, толуолсульфоновой или камфорсульфоновой. 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 моногидрат гидрохлорида.

Идеи настоящего изобретения также могут распространяться на применение пролекарств описанных в настоящем документе соединений, подходящих 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-, амино-, сульфгидрильной или карбокси-группе соединения, и которые при введении субъекту, подлежащему лечению, расщепляются *in vivo* с образованием свободной гидрокси-, амино-, сульфгидрильной или карбокси-группы, соответственно. Примеры пролекарств включают, но не ограничиваются ими, ацетатные, формиатные и бензоатные производные функциональных спиртовых и аминогрупп в описанных в настоящем документе соединениях для применения в соответствии с настоящим изобретением. Примеры предпочтительных пролекарств включают пролекарства на основе оксазолидинона или имидазолидинона. Сложноэфирные пролекарства можно получить путем применения низших спиртов, таких как C₁₋₆ спирты. Получение и применение пролекарств обсуждается в T. Higuchi и 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 B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Фармацевтические композиции

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

композиции, относящиеся к настоящему контексту, могут содержать описанное в настоящем документе соединение для применения в соответствии с настоящим изобретением в смеси с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, разбавителями, наполнителями или вспомогательными веществами. Как правило, фармацевтические композиции, применяемые в соответствии с настоящим изобретением, могут быть приготовлены с возможностью введения указанного соединения в глазных каплях, контактных линзах, назальном спрее, интравитреально или системно.

Подходящие составы могут включать составы, обеспечивающие замедленное высвобождение соединений согласно настоящему изобретению. Они могут быть особенно полезны для последующего введения (после первого введения). Указанные композиции предпочтительно находятся в форме жидких составов, при этом способы их получения описаны в целом в «Remington 's Pharmaceutical Sciences», 17th Ed., Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, U.S.A., 1985. Такие композиции обычно содержат эффективное количество одного или более активных соединений согласно настоящему изобретению вместе с подходящим носителем для обеспечения дозировки в форме, совместимой с выбранным способом введения. Указанный носитель предпочтительно находится в форме наполнителя, разбавителя, буферного агента, агента, регулирующего тоничность, консерванта, ингибитора и/или стабилизатора. Вспомогательные вещества, составляющие носитель, должны быть совместимы с активным фармацевтическим ингредиентом(ами) и предпочтительно способны стабилизировать соединения, не оказывая вредного воздействия на субъект, подлежащий лечению.

Можно использовать форму депо или состава с замедленным высвобождением с тем, чтобы терапевтически эффективные количества препарата поступали в кровоток в течение многих часов или дней после введения соединения или композиции, например, путем трансдермальной инъекции или депонирования. Составы, подходящие для замедленного высвобождения, могут содержать биоразлагаемые полимеры, такие как L-молочная кислота, D-молочная кислота, DL-молочная кислота, гликолид, гликолевая кислота и их изомеры. Аналогичным образом, носитель или разбавитель может включать любой материал с замедленным высвобождением, известный в данной области техники, такой как глицерилмоностеарат или глицерилдистеарат, сам по себе или в смеси с воском.

Другие составы с замедленным высвобождением могут включать, но не ограничиваются ими, составы, содержащие по меньшей мере одно из описанных в настоящем документе соединений в комбинации с липосомами, микросферами, эмульсиями или мицеллами и жидкими стабилизаторами.

Введение соединения (или его фармацевтической соли или гидрата) в соответствии с настоящим изобретением можно осуществлять в единичной дозированной 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 в соответствии с настоящим изобретением (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 или пациенты с отложениями друз подвержены риску развития AMD или ухудшения AMD или макулярного отека, связанного с AMD. В конечном счете, наилучший режим дозирования будет определяться лечащим врачом индивидуально для каждого пациента.

Терапевтическое применение

Состояния, которые можно лечить или предотвратить в соответствии с настоящим изобретением путем применения соединений, описанных в данном документе, включают возрастную макулярную дегенерацию (AMD), в частности у субъекта-человека.

Согласно настоящему изобретению одно или более соединений или их фармацевтически приемлемых солей или гидратов (например, в форме подходящей фармацевтической композиции) можно вводить субъекту, нуждающемуся в этом, в терапевтически эффективном количестве.

В контексте данного документа термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству, которое способно уменьшить симптомы конкретного нейроваскулярного состояния или патологии в глазу и которое предпочтительно способно частично или полностью 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. Эффективное количество будет определено специалистом с учетом таких факторов, как эффективность лекарственного средства, возраст и конституция пациента, масса тела, фармакокинетический профиль лекарственного средства, и в общем случае лекарственное средство будет назначено каждому пациенту или группе пациентов.

Эффективное количество соединения может составлять по меньшей мере примерно 10 мкг/кг массы тела/сутки, например, по меньшей мере примерно 100 мкг/кг массы тела/сутки, по меньшей мере примерно 300 мкг/кг массы тела/сутки и по меньшей мере примерно 1000

мкг/кг массы тела/сутки. С другой стороны, эффективное количество соединения или димера может составлять не более примерно 100 мг/кг массы тела/сутки, например, не более примерно 50 мг/кг массы тела/сутки и не более примерно 10 мг/кг массы тела/сутки. Ожидается, что эффективное количество соединения будет составлять примерно 100 мкг/кг массы тела/сутки, примерно 300 мкг/кг массы тела/сутки или примерно 1000 мкг/кг массы тела.

Эксперименты, проведенные в описанной в настоящем документе системе *in vitro*, результаты определения дозы, выполненные в системе *in vitro* (анализ связывания клеток/SLDT (анализ соскабливания и переноса красителя)), показывают, что концентрация от 50 до 150 нМ в микроокружении является оптимальной, при этом пилотное исследование *in vivo* показало, что 1000 нМ инъекции были лучше, чем 200 нМ инъекции, когда целью являлась концентрация 100 нМ в микроокружении глаза.

В некоторых вариантах реализации указанное соединение вводят пациенту один или два раза в сутки, что иногда обозначают как QD (*quaque die*) или BID (*bis in die*), соответственно. В некоторых вариантах реализации, в которых указанное соединение вводят пациенту два раза в сутки (BID), доза составляет примерно 75 мг/кг на введение. В некоторых вариантах реализации указанное соединение вводят пациенту четыре раза в сутки, что иногда обозначают как QID (*quater in die*). В некоторых вариантах реализации, в которых указанное соединение вводят пациенту четыре раза в сутки (QID), доза составляет от примерно 75 мг/кг до примерно 125 мг/кг на введение.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПРИМЕРЫ

Соединения-модуляторы щелевых контактов и гемиканалов

Соединения (пептиды) для применения в соответствии с настоящим изобретением можно синтезировать соответствующим образом с помощью твердофазного или жидкофазного синтеза. В этом контексте можно сослаться, например, на Fields *et al.*, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis", Synthetic Peptides (2002, 2nd Edition).

Что касается получения 1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновой кислоты, например, ее (2S,4R) диастереомера, подходящие способы ее синтеза и очистки описаны в WO 2007/078990, в котором (2S,4R) изомер обозначен как «соединение 2» (WO 2007/078990 в полном объеме включен посредством ссылки).

Примером подходящей солевой формы (2S,4R) диастереомера является моногидрат гидрохлорид, 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).

Исследования *in vitro* – фигуры 1 и 2

Линия клеток и культура клеток

Использовали пигментные эпителиальные клетки сетчатки человека (ARPE-19, CRL-2302™, American Tissue Type Collection, АТТС, Манассас, Вирджиния). Клетки пересеивали и хранили в соответствии с инструкциями поставщика. Вкратце, клетки культивировали в смеси 1:1 модифицированной по способу Дульбекко среды Игла и среды Хэма F12, содержащей 1,2 г/л бикарбоната натрия, 2,5 мМ L-глутамина, 15 мМ HEPES (N-2-гидрокси-этилпиперазин-1'-2-этансульфоновая кислота) и 0,5 мМ пирувата натрия, с добавлением фетальной бычьей сыворотки до конечной концентрации 10% и культивировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂/95% влажности. В клеточные культуры добавляли пенициллин/стрептомицин до конечной концентрации 100 Ед/мл.

Клетки хранили в колбах T25 и T75 для культивирования клеток тканей (TPP Techno Plastic Products AG, Трасадинген, Швейцария). Для проведения экспериментов клетки высевали во вкладышах Трансвелл (150000-260000 клеток/лунку; 12 мм Transwell® с полиэфирным мембранным вкладышем с размером пор 0,4 мкм, Corning, Корнинг, Нью-Йорк) или на многокамерных предметных стеклах (100000 клеток на лунку; предметные стекла с 8 лунками Nunc® Lab-Tek IT, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс).

Исследования проницаемости

Для проведения экспериментов на проницаемость клетки ARPE-19 выращивали до состояния конfluence в вкладышах Трансвелл в течение от 48 до 72 часов. Затем клетки в течение 24 часов предварительно обрабатывали данегаптидом (DGP; 100 нМ; растворен в физиологическом растворе) или контрольным наполнителем. Далее, клетки в течение 48 часов подвергали воздействию комбинации сублетального окислительного стресса (250 мкМ *трет*-бутилгидропероксида; Millipore Sigma, Сент-Луис, Миссури) и гипергликемии (30 мМ глюкозы; Millipore Sigma, Сент-Луис, Миссури) при постоянном присутствии 100 нМ DGP или наполнителя.

Для оценки проницаемости количественно оценивали перемещение из апикального участка в базолатеральный участок красителей с низкой и высокой проницаемостью, 6-карбоксифлуоресцеина (6-CF; Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) и родамина В (RhoB; Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс), соответственно. С этой целью красители, разведенные в сбалансированном солевом растворе Хэнка (HBSS, Corning, Корнинг, Нью-Йорк), добавляли в апикальный компартмент (верхняя часть - вкладыш, камера для образца; 6-CF: 100 мкМ, RhoB: 50 мкМ) клеток. Через равные промежутки времени (10,

20, 30, 45, 60, 90 и 120 мин) отбирали образцы (100 мкл) из базолатерального компартмента (нижняя часть - лунка, приемная камера). Отбираемый объем образца заменяли свежим буфером.

Суммарную концентрацию 6-CF и RhoV рассчитывали с помощью стандартной кривой (0-10 мкМ), построенной с применением считывающего устройства для микропланшетов (Cytation5, Agilent, Санта-Клара, Калифорния), при этом в окончательных расчетах учитывался объем, удаленный и замененный средой. 6-CF количественно определяли, используя возбуждение при длине волны 490 нм/излучение при длине волны 520 нм, тогда как RhoV количественно определяли, используя возбуждение при длине волны 533 нм/излучение при длине волны 627 нм. См. **фигуру 1**.

Количественная оценка организации плотных контактов

Для иммуноцитохимического анализа клетки ARPE-19 выращивали до состояния конfluence на предметных стеклах с лунками в течение 72 часов. Затем клетки в течение 24 часов предварительно обрабатывали данегаптидом (DGP; 100 нМ) или контрольным наполнителем. Далее, клетки в течение 48 часов подвергали воздействию комбинации сублетального окислительного стресса (250 мкМ *трет*-бутилгидропероксида; Millipore Sigma, Сент-Луис, Миссури) и гипергликемии (30 мМ глюкозы; Millipore Sigma, Сент-Луис, Миссури) при постоянном присутствии 100 нМ DGP или наполнителя.

Клетки фиксировали с помощью 4% параформальдегида в течение 15 минут, а затем блокировали и пермеабелизировали в блокирующем растворе (10% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина, 0,5% Тритон X-100 в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4). В течение 2 часов при комнатной температуре клетки метили антителом против ZO-1 (мышинное античеловеческое антитело 70-1, 1 пг/мл, кат. № 339100, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Карлсбад, штат Калифорния) в растворе антитела (3% нормальной козьей сыворотки, 1% бычьего сывороточного альбумина, 0,5% Тритон X-100, 0,05% азида натрия в 0,1 М фосфатном буфере pH 7,4). После промывания 3× в фосфатно-солевом буфере клетки метили флуоресцентно конъюгированным вторичным антителом, перекрестно адсорбированным антителом козы к IgG мыши (H+L), (AlexaFluor® 488, разведение 1:2000) в течение 1 часа при комнатной температуре. Ядра совместно метили и окрашивали с применением 0,1 пг/мл дигидрохлорида 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI, Sigma-Aldrich) и промывали фосфатно-солевым буферным раствором. Предметные стекла с лунками заключали под покровную пленку, используя Aqua/Poly-Mount (Polysciences, Inc., Уоррингтон, Пенсильвания). Изображения получали с применением конфокального микроскопа Leica SPE (Leica Microsystems, Баффало Гроув, Иллинойс). См. **фигуру 2**.

Анализ данных

Коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app} , см/с) рассчитывали согласно уравнению (Ziniauskaitė *et al.*, 2019):

$$P_{app} = \frac{\Delta Qr/\Delta t}{A \times C_d}$$

где:

$\Delta Qr/\Delta t$ = наклон линейной области суммарного количества исследуемого соединения в приемной камере относительно графика зависимости от времени

C_d = исходная концентрация исследуемого соединения в камере для образца

A = площадь поверхности

См. **фигуру 1**.

Уровень организации плотных контактов (TiJOR) рассчитывали на основе конфокальных изображений, как описано ранее (Тегун *et al.*, 2013). См. **фигуру 2**.

Данные наносили на график и анализировали в Prism 9 (GraphPad, Inc., Ла-Хойя, Калифорния, Калифорния, США). Данные представлены в виде среднего значения \pm S.E.M., при этом каждая точка данных представляла собой отдельное экспериментальное условие. Данные анализировали с применением однофакторного анализа ANOVA, группового анализа, а также критерия множественных сравнений Хольма-Шидака.

Исследования *in vivo* – фигуры 3-11

Животные

Все животные получали лечение в соответствии с Заявлением ARVO (Ассоциация по исследованиям зрения и офтальмологии) об использовании животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения, Директива ЕС 2010/63/EU Европейского парламента и Совета по защите животных, используемых в научных целях, и с применением протоколов, утвержденных и контролируемых Советом по экспериментам на животных Финляндии (номер лицензии на животных ESAVI-9520-2020).

Для таких исследований на животных серых крыс (штамм: крысы BN/Crl; Charles River Laboratories, Германия) в возрасте от 9 до 10 недель на момент индукции помещали в клетки с индивидуальной вентиляцией с подстилкой из осины, подстилочным материалом для гнезда (*Populus tremula*, Tapvei®, Estonia OÜ) и поликарбонатными красными трубками (Datesand group) в качестве интерьера, при постоянной температуре ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), относительной влажности ($50 \pm 10\%$) и в условиях тусклого регулируемого освещения (свет включали с 7:00 до 19:00) со свободным доступом к пище (условия содержания крыс/мышей V1534-000, ssniff

Spezialdiäten GmbH) и водопроводной воде. Эксперименты начались после недельного карантина и акклиматизации в виварии.

Массу тела всех животных контролировали на исходном уровне и два раза в неделю в течение всего периода исследования.

5 Ежедневно проводились проверки благополучия животных. При выявлении у животного проблем с благополучием оказывалась медицинская помощь под руководством наблюдающего ветеринара в сотрудничестве с руководителем исследования.

10 Для предотвращения чрезмерной потери массы после индукции, крысам ежедневно давали влажный корм (обычный корм, гидратированный водопроводной водой) и поддерживающий корм ((Solid Drink - Diet Bio Cup, Triple A Trading). Животные с потерей массы более 15 процентов получали дополнительную гидратацию с ежедневными подкожными (п/к) инъекциями (Ringer-Lactat Animalcare, Eucuphar NV). Парафимоз и задержку мочи лечили с помощью моногидрата гидрохлорида лидокаина (2%, ксилокаин, AstraZeneca). Возникали небольшие кожные инфекции, которые лечили с помощью фузидовой кислоты

15 (1%, Isathal®, Dechra).

Во время исследования животные не подвергались никаким другим терапевтическим способам лечения.

В настоящем исследовании использовали в общей сложности 111 крыс. Из них 28 крыс были умерщвлены до конечной точки из-за различных проблем с благополучием, главным образом из-за тяжелой потери массы (>25% от исходного уровня), которая обычно

20 наблюдалась у серых крыс с диабетом, получавших STZ. Животных случайным образом распределяли на лечебные группы на основе уровней глюкозы и здоровья глаз. В конце исследования (неделя 9) в исследовании участвовало в общей сложности 83 крысы, распределенные по пяти лечебным группам:

25 **Группа 1:** Не подвергавшаяся воздействию для забора образцов ткани (n = 18);

Группа 2: STZ + наполнитель (n = 15);

Группа 3: STZ + AF564 (или анти-VEGF) (n = 17);

Группа 4: STZ + данегаптин (n = 17);

Группа 5 STZ + AF564 (или анти-VEGF) + данегаптин (n = 16).

30

Анестезия и купирование

Для всех процедур крыс подвергали анестезии путем подкожной инъекции смеси, содержащей кетамин (30 мг/кг; кетамитол вет. 50 мг/мл, Intervet) и гидрохлорид медетомидина (0,2 мг/кг; целетор (Cepetor) вет. 1 мг/мл; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH). Анестезию

35 купировали с помощью α_2 -антагониста для медетомидина, атипамезола (1,0 мг/кг; ревертор

(RevertorTM), 5 мг/мл; CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH). Для проведения дозирования все анестезирующие реагенты разводили в физиологическом солевом растворе для получения рабочих растворов. Для предотвращения обезвоживания во время восстановления после анестезии вводили раствор лактата Рингера.

5

Индукция диабетической ретинопатии и измерения уровней глюкозы в крови

Перед индукцией животных взвешивали и измеряли уровень глюкозы в крови с помощью измерительного устройства для экспресс-анализа (AlphaTRAK 2; Zoetis). Крысы голодали в течение четырех часов перед индукцией.

10 Диабет индуцировали у серых крыс (в возрасте от 9 до 10 недель) с применением однократной дозы стрептозотоцина (STZ; 65 мг/кг). Sigma) в 10 мМ буферном растворе цитрата натрия, рН 4,5. После инъекции STZ крыс помещали в их клетки со свободным доступом к пище и 10% (масс./об.) раствору сахарозы в водопроводной воде в течение 48 часов. На следующее утро всем индуцированным крысам внутрибрюшинно или подкожно
15 вводили 5% глюкозы (1 мл). Через четыре дня после первой инъекции STZ успешное проведение индукции отслеживали путем измерения уровней глюкозы в крови из подкожной вены. Индукция диабета считалась успешной, когда значения содержания глюкозы в крови, измеренные с помощью измерительного устройства для экспресс-анализа, были равны или превышали 16 ммоль/л (288 мг/дл). Животные, которые на основании такого критерия не были
20 диабетиками, через 96 часов после первой инъекции STZ получали вторую инъекцию STZ.

У выбранных крыс в течение 6 недель контролировали уровни глюкозы в крови и состояние здоровья животных, а затем подвергали лечению с применением еженедельных интравитреальных (IVT) инъекций наполнителя или исследуемых соединений в течение трех недель, в общей сложности 3× интравитреальные инъекции в глаз на глаз на животное.

25 Уровни глюкозы в крови контролировали еженедельно в течение всего периода наблюдения. В тех случаях, когда измерение уровня глюкозы в крови выпадало из диапазона измерительного устройства для экспресс-анализа (>41,7 ммоль/л), отбирали образцы плазмы и анализировали с помощью колориметрического анализа (набор для анализа глюкозы у крыс, Crystal Chem). См. **фигуру 3А**.

30 Образцы плазмы для измерения гликированного гемоглобина (HbA1c) отбирали через пять и девять недель после индукции DR. HbA1c измеряли посредством промышленного турбидиметрического иммунологического анализа (Konelab Prime 60i; Thermo Scientific). См. **фигуру 3В**.

35 **Приготовление исследуемых растворов**

Раствор наполнителя

Раствор наполнителя, содержащий D-маннит и дигидрат тринатрий цитрата, приготавливали следующим образом:

№	Концентрация	Единица измерения	Название	Количество
1	50	мг/мл	D-маннит	50,00 г
2	0,71	мг/мл	Тринатрий цитрат, дигидрат	710 мг
3	в достаточном количестве	-	Гидроксид натрия	в достаточном количестве
4	в достаточном количестве	-	Соляная кислота	в достаточном количестве
5	-	-	Вода для инъекции	Доведение до 1000 мл*

(*) Плотность: 1,079 г/мл, если относится к процедуре приготовления.

5

Стерильный раствор расфасовывали в виде аликвот в пробирки фирмы Falcon объемом 15 мл, два дополнительных образца по 0,5 мл хранили в стандартных пробирках из темного стекла в качестве арбитражных образцов. Все аликвоты хранили в защищенном от света месте при +4 ° С.

10

Растворы данегаптида

Исходный раствор, содержащий 0,3 мг/мл данегаптида, приготавливали еженедельно, начиная с первого дня введения дозы, следующим образом.

№	Концентрация	Единица измерения	Название	Количество
1	0,3	мг/мл	Данегапид [#]	
2	-	-	Тринатрий цитрат, дигидрат	
3	в достаточном количестве	-	Гидроксид натрия	в достаточном количестве
4	в достаточном количестве	-	Соляная кислота	в достаточном количестве
5	-	-	Вода для инъекции	Доведение до 20,0 мл

([#]) получен в виде HCl-соли/моногидрата, приемлемый диапазон массы [6,94-7,34] мг ~

15 ±3% (2,8) % от целевого значения

Две аликвоты по 0,5 мл хранили в стандартных пробирках из темного стекла в качестве арбитражных образцов. Остальную часть раствора использовали для приготовления дозировочных растворов на данную неделю (для введения в течение двух дней). Исходный раствор и аликвоты хранили в защищенном от света месте при +4 ° С.

20

Исходный раствор, содержащий 0,3 мг/мл данегаптида, разводили до 9 мкг/мл следующим образом.

Приготовление	
1,00	мл исходного раствора данегаптида (0,3 мг/мл)
32,3	мл состава на основе наполнителя
33,3	мл

5 Две аликвоты по 0,5 мл хранили в стандартных пробирках из темного стекла в качестве арбитражных образцов. Аликвоты хранили в защищенном от света месте при +4 ° С. Раствор, содержащий 9 мкг/мл данегаптида, дополнительно использовали для приготовления рабочего раствора, содержащего 0,3 мкг/мл данегаптида, следующим образом, и отбрасывали остатки.

Приготовление	
0,700	мл исходного раствора данегаптида (9,0 мкг/мл)
20,3	мл состава на основе наполнителя
21,0	мл состава для дозирования, содержащего 0,3 мкг/мл данегаптида

10 Две аликвоты по 0,5 мл хранили в стандартных пробирках из темного стекла в качестве арбитражных образцов. Аликвоты хранили в защищенном от света месте при +4 ° С. Остатки рабочего раствора ежедневно отбрасывали.

15 Раствор, содержащий 9 мкг/мл данегаптида, дополнительно использовали для приготовления раствора, содержащего 0,6 мкг/мл данегаптида, который использовали для получения лечебного средства для группы «STZ + AF564 + данегапид» (см., например, **фигуры 3В, 4, 5С, 9В и 10В**), «STZ + анти-VEGF + данегапид» (см., например, **фигуру 5В**) или «STZ + AF564 + DGP» (см., например, **фигуры 7Е-Н и 8Е-Н**).

Приготовление	
0,670	мл исходного раствора данегаптида (9,0 мкг/мл)
9,330	мл состава на основе наполнителя
10,0	мл состава для дозирования, содержащего 0,6 мкг/мл данегаптида

20 Две аликвоты по 0,5 мл хранили в стандартных пробирках из темного стекла в качестве арбитражных образцов. Аликвоты хранили в защищенном от света месте при +4 ° С. Остатки рабочего раствора отбрасывали ежедневно.

Растворы крысиных антител к VEGF (AF564)

Для введения лечебного средства на основе анти-VEGF («STZ + AF564» на **фигурах 3В, 4, 5С, 7Е-Н, 8Е-Н, 9В и 10В** или «STZ + анти-VEGF» на **фигуре 5В**) крысиное антитело к VEGF (AF564; R&D Systems) растворяли в концентрации 0,675 мг/мл в растворе наполнителя.

5 Для приготовления дозировочного раствора один флакон, содержащий 100 мкг антитела, растворяли в 150 мкл раствора наполнителя.

Для совместного введения данегаптида и антитела к VEGF («STZ + AF564 + данегаптин» на **фигурах 3В, 4, 5С, 9В и 10В**; «STZ + анти-VEGF + данегаптин» на **фигуре 5В**; или «STZ + AF564 + DGP» на **фигурах 7Е-Н и 8Е-Н**) один флакон антитела (100 мкг)
10 растворяли в 75 мкл наполнителя с получением 2× исходного раствора AF564 и затем объединяли с равным объемом 2× рабочего раствора данегаптида (0,6 мкг/мл) с получением в дозировочном растворе конечной концентрации антитела AF564 на уровне 0,675 мг/мл и данегаптида на уровне 0,3 мкг/мл.

Пять микролитров дозировочного раствора вводили в глаз крысы путем
15 интравитреальной инъекции. Глаз крысы содержит примерно от 20 до 25 мкл стекловидной влаги. Таким образом, доставка 5 мкл исследуемого препарата приводила к разбавлению до конечной концентрации антитела к VEGF в глазу на уровне от 0,135 до 0,1125 мг/мл, что аналогично клинической дозе для человека 0,125 мг/мл, согласно Filek *et al.* 2019.

20 Лечение путем интравитреального (IVT) введения

Для интравитреального введения лечебного средства животных подвергали анестезии, помещали под стереоскоп (Leica Microsystems) и наносили на роговицу каплю йода, которой давали равномерно распределиться (Minims Povidone Iodine 5%, Bausch & Lomb). С помощью иглы калибра 30G делали вблизи лимба небольшой разрез в сосудистой оболочке,
25 открывающий стекловидную камеру. Для введения соединений в интравитреальное пространство использовали микрошприц с прикрепленной иглой калибра 33G (Hamilton Bonaduz AG, Бонадуц). Исследуемый раствор вводили в интравитреальное пространство в течение 10 секунд, для избежания обратного оттока соединения иглу перед удалением выдерживали в данном месте в течение дополнительных 30 секунд. После инъекции наносили
30 мазь с хлорамфениколом (Офтан Хлора, Santen Oy). Различные лечебные средства вводили три раза путем двустороннего интравитреального введения объема 5 мкл на шестой, седьмой и восьмой неделях после STZ-индукции.

Визуализация *in vivo*

На девятой неделе после индукции DR развитие диабетической ретинопатии и связанного с ней просачивания жидкости через сосуды отслеживали с помощью спектральной оптической когерентной томографии (SD-OCT). Для подгруппы исследуемых животных (от 9 до 14 на лечебную группу) проводили анализ изображений *in vivo*. Наряду с визуализацией *in vivo* у всех животных оценивали развитие диабетической катаракты на шестой, седьмой, восьмой и девятой неделях после индукции.

Спектральная оптическая когерентная томография (SD-OCT)

На девятой неделе путем сканирования методом SD-OCT (Envisu R2200, Bioptigen Inc./Leica Microsystems) делали снимки сетчатки анестезированных крыс, показанные на **фигуре 5С**. Сканируемая область охватывала участок сетчатки площадью $2,4 \times 2,4$ мм², расположенный в центре вокруг зрительного нерва. Каждый скан состоял из 100 В-сканов, каждый из которых состоял из 1000 А-сканов. SD-OCT выполняли на обоих глазах на девятой неделе после индукции DR перед умерщвлением и отбором образцов.

Толщину сетчатки на девятой неделе анализировали с помощью сверточной нейронной сети на основе архитектуры U-net с применением метода трансферного обучения. Полученные маски сегментации использовали для измерения толщины слоя в каждом столбце шириной в пиксель, т. е. а-скане, в результате чего на один b-скан приходилось 1000 точек измерения для каждого слоя. В расчетах использовали только точки измерения, которые соответствовали установленным критериям автоматического контроля качества. Результаты измерения толщины были представлены в виде полученных методом SD-OCT измерений внутреннего слоя сетчатки, в том числе слоя нервных клеток ганглия, внутреннего сетчатого и внутреннего ядерного слоев; и наружного слоя сетчатки, в том числе наружного сетчатого слоя, наружного ядерного слоя, внутреннего и наружного сегмента и RPE/сосудистой оболочки глаза. Измерения толщины сетчатки, такие как изменения результатов измерения толщины сетчатки, получали путем вычисления среднего значения всех измерений на один скан или путем субанализа верхней височной, верхней носовой, нижней височной и нижней носовой области (см. **фигуру 6** со схематическим чертежом, на котором показаны указанные области глаза). См. **фигуры 5, 7 и 8**, на которых показаны результаты SD-OCT.

Умерщвление животных и сбор тканей

У животных, найденных мертвыми или умерщвленными до конечной точки исследования, образцы не отбирали.

Образцы для анализа сосудистой сети сетчатки

В конечной точке шесть крыс на лечебную группу умерщвляли путем передозировки анестезией и подвергали транскардиальной перфузии с применением 0,9% раствора NaCl (10

мл/мин в течение 3 мин, насос 120 S/DV с ручным управлением и регулируемой скоростью, насосы Уотсона-Марлоу). Глаза (n = 12) энуклеировали и фиксировали ориентацию и помещали в 4% PFS до приготовления плоских препаратов сетчатки.

Измерение просачивания жидкости из сетчатки с применением голубого Эванса

5 Перед умерщвлением пяти крысам на лечебную группу вводили внутривенно в хвостовую вену 4% раствор голубого Эванса (100 мкл/100 г). Через 2 часа отбирали образцы плазмы и подвергали животных транскардиальной перфузии с применением физиологического раствора в течение 30 минут при скорости потока 10 мл/мин (насос 120S/DV с ручным управлением и регулируемой скоростью). Глаза (n = 10) энуклеировали, 10 сетчатку вырезали, мгновенно замораживали и хранили при температуре -80 °С до анализа экстравазации с применением голубого Эванса. Результаты показаны на **фигуре 9**.

Обработка ткани

15 *Гистологическое окрашивание с применением PAS (реактив Шиффа, Шифф-йодная кислота) и анализ ацеллюлярных капилляров и перицитов*

Плоские препараты сетчатки расщепляли с помощью трипсина для выделения сосудистой сети сетчатки и окрашивали с применением реактива Шиффа (PAS). Вкратце, плоские препараты сетчатки помещали в дистиллированную воду на ночь и инкубировали с применением 4% трипсина в 0,1 М буфере Трис-НСl (рН 7,8) в течение 1,5 часов при + 37 °С. 20 Образцы тщательно промывали дистиллированной водой для отделения слоев клеток сетчатки от сосудистой сети. Плоский препарат сосудистой сети высушивали на предметном стекле микроскопа и обрабатывали для окрашивания PAS. Образцы окисляли, промывали dH₂O, помещали в реагент Шиффа, промывали, контрокрашивали гематоксилином, дифференцировали кислым спиртом, обезвоживали и заделывали с применением Дерех.

25 С помощью устройства Leica Thunder 3D Tissue Imager (Leica Microsystems) получали от четырех до шести отдельных изображений, полученных из центральной области и из периферической области сосудистой сети сетчатки. Количество ацеллюлярных капилляров, количество перицитов и количество призраков перицитов вручную подсчитывались исследователем, не обладающем информации о распределении по экспериментальным 30 группам.

Количество точек данных на группу было следующим: животные, не подвергавшиеся воздействию (n = 67), STZ + наполнитель (n = 59), STZ+ AF564 (n = 45), STZ + данегапид (n = 58), STZ + AF564 + данегапид (n = 61).

35 См. **фигуру 11**, на которой показаны типичные изображения, полученные с применением PAS, и **фигуру 10**, на которой показаны полученные результаты.

Измерение экстравазации сетчатки с помощью голубого Эванса

Сетчатки гомогенизировали в формамиде в соотношении 1:10 (масс./об.) и инкубировали в течение ночи при + 70°. Гомогенаты центрифугировали при 20800 × g в течение 45 минут, после чего переносили супернатант в чистую пробирку. 30 мкл супернатанта переносили пипеткой в трех повторах в 384-луночный планшет. Поглощение ($\lambda = 620$ нм) образцов измеряли с применением считывающего устройства для планшетов (Cytation 3, BioTek Instruments Inc., Винуски, Вермонт), и рассчитывали концентрацию голубого Эванса в каждом образце с применением стандартной кривой голубого Эванса и нормировали к массе ткани. Результаты показаны на **фигуре 9**.

Анализ данных

Количественные данные отображали на графике, анализировали и представляли в виде среднего значения \pm стандартное отклонение (SD) или стандартная ошибка (SEM), как указано. Оценивали нормальность и, при необходимости, логарифмически преобразовывали данные для достижения гауссова распределения. Выбросы выявляли способом GROUT с коэффициентом Q, составляющим 1%. Различия считали статистически значимыми при уровне $p < 0,05$. Данные анализировали с применением программного обеспечения GraphPad Prism (v9.1.2. GraphPad Inc., Ла-Хойя, штат Калифорния), используя соответствующие статистические критерии, как указано.

Результаты

Результаты экспериментальных исследований показаны на **фигурах 1-11**.

Фигура 1: Данегаптин защищает от DR и AMD-имитирующего опосредованного повреждения путем снижения проницаемости монослоев пигментных эпителиальных клеток сетчатки человека, подвергаемых стрессу.

Слившийся монослой эпителиальных клеток сетчатки человека (ARPE-19) в планшетах Трансвелл обрабатывали с помощью либо наполнителя (полная среда), либо данегаптида (DGP, 100 нМ) в течение 24 часов. Далее, среду заменяли на: (i) наполнитель (полная среда; **фигуры 1A и 1B**, левая колонка «-, -»); (ii) среду с добавлением большого количества 30 мМ глюкозы (гипергликемический стресс) и сублетальной концентрацией 200 мкМ *трет*-бутилгидропероксида (*t*BHP) (окислительный стресс) (**фигуры 1A и 1B**, средняя колонка, «+, -»); или (iii) среду с добавлением 30 мМ глюкозы, сублетальной концентрацией *трет*-бутилгидропероксида (*t*BHP, 200 мкМ) плюс 100 нМ данегаптида (**фигуры 1A и 1B**, правая колонка, «+, +»), и инкубировали в течение 48 часов.

Комбинация высокого содержания 30 мМ глюкозы (гипергликемический стресс) и окислительного стресса вызывала дисфункцию барьера RPE и увеличение проницаемости через монослой RPE, как показано с помощью двух флуоресцентных маркеров проницаемости, 6-карбоксифлуоресцеина (6-CF; **фигура 1А**) или родамина-В (RhoB; **фигура 1В**). Увеличение проницаемости монослоя RPE вследствие гипергликемических и окислительных стрессовых условий и защиту посредством данегаптида измеряли путем отбора образцов через 10, 20, 30, 45, 60, 90 и 120 минут после введения маркеров проницаемости во вкладыш Трансвелл камеры и апикальную сторону монослоя RPE и измерения оттока или количества маркера проницаемости, присутствующего в нижней камере планшетов Трансвелл и базолатеральной стороне монослоя RPE.

Суммарную концентрацию 6-CF и RhoB, присутствующих в нижней камере, рассчитывали путем измерения величины флуоресцентного сигнала на основе стандартной кривой, построенной с применением считывающего устройства для микропланшетов (Cytation5, Agilent, Санта-Клара, Калифорния, США). Величину параклеточной проницаемости количественно оценивали как коэффициент кажущейся проницаемости (P_{app}) и рассчитывали путем определения потока в равновесном состоянии. DR и AMD-имитирующее повреждение при гипергликемии и окислительном стрессе значительно увеличивало проницаемость как 6-CF, так и RhoB ($n = 6-8$) в монослоях RPE (**фигуры 1А и 1В**, средняя колонка, «+,-»); по сравнению с контрольной левой колонкой, «-,-»), при этом обработка посредством 100 мМ данегаптида полностью защищала от такого увеличения проницаемости ($n = 6-8$), вызванного указанными стрессорами барьера RPE (**фигуры 1А и 1В**, правая колонка, «+,+»).

Фигура 2: Данегаптин защищает от DR и AMD-имитирующего опосредованного повреждения путем улучшения уровня организации плотных контактов (TijOR) и улучшения межклеточного связывания между пигментными эпителиальными клетками сетчатки человека в монослоях, подвергаемых стрессу.

Эпителиальные клетки сетчатки человека (ARPE-19) высевали и культивировали на предметных стеклах с лунками микроскопа и выращивали до состояния конfluence с получением плотных монослоев, визуализированных посредством межклеточных связей RPE в условиях обработки либо наполнителем (полная среда), либо данегаптидом (DGP, 100 нМ) в течение 24 часов. Далее, среду заменяли на: (i) наполнитель (полная среда; **фигура 2А**, левая колонка «-,-»; **фигура 2В**, левое изображение); (ii) среду с добавлением 30 мМ глюкозы (гипергликемический стресс) и сублетальной концентрацией *трет*-бутилгидропероксида (tBHP, 200 мкМ) (окислительный стресс) (**фигура 2А**, средняя колонка «+,-»; **фигура 2В**, среднее изображение); или (iii) среду с добавлением 30 мМ глюкозы, сублетальной

концентрацией *трет*-бутилгидропероксида (tBHP, 200 мкМ) плюс 100 нМ данегаптида (**фигура 2А**, правая колонка «+,+»; **фигура 2В**, правое изображение), и инкубировали в течение 48 часов. Результаты показаны на верхнем графике на **фигуре 2 (фигура 2А)**.

5 Организацию плотного контакта оценивали с помощью иммуоцитохимического анализа путем иммуноокрашивания антитела к zonula occludens-1 (ZO-1) (нижние изображения на **фигуре 2**; то есть **фигура 2В**), основного компонента плотных контактов, который связывает цитоплазматический домен как трансмембранного белка Сх43 щелевых контактов, так и трансмембранных белков TJ, окклюдина(ов) и клаудина(ов). Коэффициент организации плотных контактов (TiJOR) рассчитывали согласно Terryн *et al.*, 2013, при этом
10 указанный коэффициент позволял измерить степень TJ-зависимого межклеточного связывания. DR и AMD-имитирующее повреждение при гипергликемии и окислительном стрессе значительно снижало TiJOR (n = 13-16). Обработка с помощью 100 нМ данегаптида полностью защищала от такой потери организации плотных контактов (n = 13-16) и
15 разъединения клеток RPE, что коррелировало со способностью данегаптида защищать от дисфункции барьера RPE и патологической параклеточной проницаемости RPE, вызванной комбинацией указанных гипергликемических и окислительных клеточных стрессоров.

Высокий уровень глюкозы и окислительный стресс (т. е. клеточный стресс) приводят к дезорганизации плотных контактов (т. е. снижению TiJOR) и разрушению межклеточного связывания. Полученные результаты показали, что данегаптин может защищать от такого
20 разъединения клеток в стрессовых условиях. То есть, данегаптин может улучшать TiJOR и поддерживать межклеточное связывание между клетками RPE, подвергаемыми стрессу.

Фигура 3: Уровни глюкозы в крови (ммоль/л) и уровни гликированного гемоглобина в крови (HbA1C) (ммоль/моль) во время исследований *in vivo*.

У всех животных уровни глюкозы в крови измеряли с помощью измерительного
25 устройства для экспресс-анализа один раз в две недели после индукции DR посредством STZ. В тех случаях, когда показания измерительного устройства для экспресс-анализа находились вне диапазона, отбирали дополнительные образцы плазмы, которые измеряли с применением флюорофотометрического способа. Уровни глюкозы в крови значительно повышались на четвертый день после индукции по сравнению с группой, не подвергавшейся воздействию
30 (двухфакторный ANOVA, $p < 0,001$) (**фигура 3А**).

Уровни гликированного гемоглобина (HbA1c) значительно повышались на день 35 исследования и оставались на аналогичных уровнях в конце исследования (день 60) (двухфакторный ANOVA, $p < 0,001$) (**фигура 3В**).

Фигура 4: Показатели катаракты во время исследований *in vivo*.

Внешний вид катаракты, вызванной гипергликемией, представляет собой распространенный фенотип модели STZ и оценивался в дни введения исследуемого препарата и в конце периода исследования. Внешний вид катаракты оценивали по шкале от 0, нормальный хрусталик, до 3, когда помутнения покрывало более 75% хрусталика. У животных, не подвергавшихся воздействию, не наблюдалось катаракт или помутнений ни на одном этапе исследования. Различные STZ-индуцированные группы показали схожую степень катаракт на протяжении всего исследования после интравитреального введения, при этом легкая катаракта появлялась на день 42 и становилась более тяжелой, достигая средней степени тяжести ко дню 60 (рис. 4). Тем не менее, не наблюдалось значимого различия в катарактах между лечебными группами, получавшими STZ.

Фигура 5: Данегапид защищает от утолщения наружного слоя сетчатки у крыс с DR после STZ-индукции.

Увеличение толщины наружного слоя сетчатки у серой крысы обычно наблюдается во время ранней фазы STZ-индуцированной DR. Несмотря на небольшое абсолютное увеличение, которое обычно составляет от 3 до 5%, современная визуализация *in vivo* с применением SD-OCT позволяет выявить такие биологически значимые различия, которые указывают на отек или набухание клеток, свидетельствующие о нарушении наружного гематоретинального барьера.

SD-OCT-сканы получали на девятой неделе перед отбором образцов. Сканы сетчатки сегментировали и анализировали толщину с помощью алгоритма сверточной нейронной сети.

Толщину наружного слоя сетчатки количественно определяли на основе полученных методом SD-OCT изображений 24 мест для генерирования средней толщины наружного слоя сетчатки. Выбросы удаляли, используя способ GROUT ($Q = 1\%$), что приводило к удалению в общей сложности 5 выбросов (группа, не подвергавшаяся воздействию: 0, STZ + наполнитель: 1; STZ + AF564: 1; STZ + данегапид: 1; STZ + AF564 + данегапид: 2). При проверке на нормальность данные SD-OCT показали нормальное распределение.

Индукция посредством стрептозотоцина (STZ) приводила у серых крыс к гипергликемии, DR и статистически значимому увеличению толщины наружного слоя сетчатки в группе, получавшей STZ + наполнитель ($123,8 \pm 0,9$ мкм; $n = 21$; t-критерий $p < 0,01$) после 9 недель индукции по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию, которых не подвергали STZ-индукции и которые имели DR ($119,8 \pm 0,5$ мкм; $n = 16$; t-критерий $p < 0,01$), согласно измерениям посредством визуализации методом SD-OCT и количественного определения изменений в наружном сетчатом, наружном ядерном слоях, внутреннем и наружном сегментах и слоях RPE/сосудистой оболочки глаза с применением алгоритма нейронной сети (фигура 5А).

Лечение данегаптидом путем локализованных интравитреальных (IVT) глазных инъекций с целью введения 100 нМ данегаптида в глаз каждую неделю в течение трех недель лечения позволило предотвратить такое увеличение толщины наружного слоя сетчатки ($119,7 \pm 0,8$ мкм; $n = 27$; $p < 0,05$) согласно измерениям посредством визуализации методом SD-OCT, тогда как лечение с помощью соединения анти-VEGF (AF564; $122,7 \pm 1,2$ мкм; $n = 25$; $p = 0,60$) и лечение посредством инъекций анти-VEGF + данегаптид ($122,3 \pm 1,1$ мкм; $n = 17$; $p = 0,60$) не оказывало никакого защитного эффекта (**фигура 5B**). Патологическое утолщение oBRB вызвано дисфункцией барьера RPE, и это является отличительной особенностью DME и AMD. Способность одного данегаптида предотвратить такое утолщение наружного слоя сетчатки у указанных крыс с диабетом и DR показало, что данегаптид может представлять собой эффективную терапию для AMD, а также DR и DME (как показано ранее).

Типичные SD-OCT-сканы толщины наружного слоя сетчатки левого и правого глаза через девять недель после STZ-индукции показаны на **фигуре 5C**.

Не желая быть связанными какой-либо теорией, авторы настоящего изобретения полагают, что увеличение толщины наружного слоя сетчатки, вызванное STZ-индукцией, демонстрирует набухание клеток в результате клеточного стресса. Считается, что это связано с открытием гемиканала Sx43, что позволяет воде проникать в клетки. Данегаптид, вероятно, закрывает гемиканалы Sx43, защищая таким образом субъекта от набухания клеток и, соответственно, утолщения наружного слоя сетчатки.

Фигура 7: Данегаптид защищает от утолщения наружного слоя сетчатки по всей сетчатке.

Анализировали толщину наружного слоя сетчатки в различных областях сетчатки, в частности, верхней носовой (SN), верхней височной (ST), нижней носовой (IN) и нижней височной (IT) областях (места расположения показаны на **фигуре 6**), при этом для каждого измерения использовали 8 мест (**фигура 7** и **таблица 1**).

Таблица 1. Среднее значение (в мкм) толщины наружного слоя сетчатки на каждую лечебную группу и квадрант

	ST	SN	IT	IN
Группа, не подвергавшаяся воздействию	123,99	120,83	121,62	118,56
STZ + наполнитель	126,95	125,40	127,44	126,09
STZ + AF564	123,85	123,49	126,55	123,62
STZ + данегаптид	118,14	117,36	123,61	121,17

STZ + AF564 + данегапид	124,33	123,45	126,39	123,25
--------------------------------	--------	--------	--------	--------

Толщина наружного слоя сетчатки статистически значимо увеличивалась у крыс, получавших STZ + наполнитель, по сравнению с крысами, не подвергавшимися воздействию, во всех областях (**фигуры 7А-Д**; см. также **таблицу 1** «STZ + наполнитель» по сравнению с группой, «не подвергавшейся воздействию»). Данегапид предотвращал утолщение наружного слоя сетчатки во всех областях (**фигуры 7Е-Н**; см. также **таблицу 1** «STZ + данегапид» по сравнению с «STZ + наполнитель»).

Фигура 8. Региональный анализ внутренней (и общей) толщины сетчатки.

SD-OCT-сканы получали на девятой неделе перед отбором образцов. Сканы сетчатки сегментировали и анализировали толщину с помощью алгоритма сверточной нейронной сети. Толщину внутреннего слоя сетчатки анализировали по областям (**фигура 8**). Анализируемыми областями были верхняя носовая (SN), верхняя височная (ST), нижняя носовая (IN) и нижняя височная (IT) области (места расположения показаны на **фигуре 6**).

Сетчатка была значительно тоньше в глазах STZ-индуцированных животных по сравнению с животными, не подвергавшимися воздействию (**фигуры 8А-Д**). Однако статистически значимые различия между лечебными группами не были выявлены (**фигуры 8Е-Н**).

Анализ общей толщины сетчатки у STZ-индуцированных животных был затруднен вследствие уменьшения толщины внутреннего слоя сетчатки и сопутствующего увеличения толщины наружного слоя сетчатки, и поэтому, как правило, не обеспечивал достаточной степени детализации для исследования фармакологических эффектов лечения. Измерения общей толщины сетчатки приведены в **таблице 2**.

Таблица 2. Общая толщина сетчатки (в мкм) по областям, количественно определенная на основе изображений, полученных методом SD-OCT

	Вся сетчатка	ST	SN	IT	IN
Группа, не подвергавшаяся воздействию	215 ± 0,6	220 ± 0,7	214 ± 0,7	217 ± 0,7	209 ± 0,8
STZ + наполнитель	215 ± 1,8	218 ± 3,6	211 ± 3,5	221 ± 1,8	210 ± 2,3
STZ + AF564	213 ± 2,0	218 ± 2,6	211 ± 2,6	219 ± 2,0	210 ± 2,6
STZ + данегапид	212 ± 2,2	210 ± 2,6	205 ± 1,9	217 ± 1,6	206 ± 1,8
STZ + AF564 + данегапид	207 ± 2,3	218 ± 1,9	210 ± 2,0	220 ± 1,4	208 ± 2,3

Фигура 9: Лечение с применением данегаптида и анти-VEGF уменьшает экстравазацию голубого Эванса (ЕВ) в диабетической сетчатке.

Экстравазация голубого Эванса представляет собой общепризнанную меру количественной оценки просачивания жидкости через сосуды во многих системах органов. В случае сетчатки экстравазацию голубого Эванса можно обнаружить в лизатах тканей при нарушении внутреннего или наружного (или обоих) гематоретинального барьера.

Для определения эффекта данегаптида самого по себе или в комбинации с антителом к VEGF голубой Эванса вводили путем внутривенной инъекции и оставляли для протекания перфузии в течение 2 часов. По истечении указанного периода собирали образцы крови для определения количества голубого Эванса в плазме, которое служило в качестве фактора нормирования для количественной оценки экстравазации голубого Эванса в сетчатке. Приведенные значения представляют собой нормированное количество голубого Эванса, полученное как концентрация голубого Эванса (нг/мл) на миллиграмм массы ткани, деленная на концентрацию голубого Эванса в плазме.

Одна из точек данных (в группе, получавшей «STZ + данегаптин») из всего набора данных была исключена на основе анализа выбросов с применением способа GROUT со значением Q, составляющим 1%. Такой один выброс считался техническим артефактом, поскольку указанное единичное значение отклонялось более чем в 30 раз от измерений двух дополнительных технических параллельных анализов одного и того же образца. Затем полученные данные анализировали на нормальность с применением критерия Колмогорова-Смирнова. Большинство экспериментальных групп не соответствовали нормальному распределению (таблица 3), и поэтому указанные данные были логарифмически преобразованы.

Таблица 3. P-значения для критерия Колмогорова-Смирнова для нормального и логарифмически нормального распределений

	Группа, не подвергавшаяся воздействию	STZ + наполнитель	STZ + AF564	STZ + данегаптин	STZ + AF564 + данегаптин
P-значения при нормальном распределении	>0,10	0,02	0,05	>0,10	0,02
P-значение при логарифмически нормальном распределении	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10	>0,10

Учитывая изменчивость экстравазации EB, которая типична для модели STZ у серых крыс, анализировали размер эффекта у различных лечебных групп. Во-первых, для определения кратного увеличения экстравазации EB после введения STZ данные нормировали к группе, не подвергавшейся воздействию (**фигура 9А**). Индукция посредством STZ приводила к более чем пятикратному увеличению экстравазации EB через 9 недель после индукции ($100 \pm 13,5\%$ в группе, не подвергавшейся воздействию, по сравнению с $628 \pm 212,5\%$ в группе, получавшей STZ + наполнитель, $n = 10-11$, t -критерий $p < 0,01$).

Далее, полученные данные нормировали к группе, получавшей STZ + наполнитель, для определения относительного размера эффекта при вмешательстве путем интравитреальных инъекций. Для получения наборов относительных данных полученные данные оценивали на нормальность с применением критерия Д'Агостино и Пирсона, при этом все группы, получавшие STZ, соответствовали нормальности.

Лечение на основе анти-VEGF с применением AF564 приводило к статистически значимому снижению экстравазации EB ($17,8 \pm 4,3\%$ для группы, получавшей STZ + наполнитель, $n = 10$, однофакторный ANOVA $p < 0,01$, тест множественных сравнений Хольм-Шидака $p < 0,01$), соответствующему снижению на 82,3% (**фигура 9В**, «STZ + AF564» по сравнению с «STZ + наполнитель»).

Аналогичным образом, данегапид продемонстрировал статистически значимое снижение экстравазации EB ($31,1 \pm 5,3\%$ для «STZ + наполнитель», $n = 9$, однофакторный ANOVA $p < 0,01$, критерий множественных сравнений Holm-Šidák $p < 0,05$), соответствующее снижению на 68,9% (**фигура 9В**, «STZ + данегапид» по сравнению с «STZ + наполнитель»).

Эффект комбинированного лечения с помощью анти-VEGF и данегаптида показал эффект, аналогичный применению одного данегаптида ($34,4 \pm 10,3\%$, $n = 10$, $p < 0,05$), что эквивалентно снижению на 65,6% (**фигура 9В**, «STZ + AF564 + данегапид» по сравнению с «STZ + наполнитель»).

Фигуры 10 и 11: Данегапид предотвращает потерю перицитов через 9 недель после индукции посредством STZ.

Сосудистые нарушения и воздействие индукции DR посредством STZ-индукции также оценивали путем количественного определения ацеллюлярных капилляров, перицитов и призраков перицитов на расщепленных трипсином тотальных препаратах сетчатки. Для количественного определения для каждого животного количественно оценивали от 4 до 15 отдельных изображений, и данные, полученные от каждого изображения, включали в анализ.

На основе предыдущих исследований авторов изобретения, проведенных на STZ-индуцированной модели DR у серых крыс, наиболее надежным показанием для определения сосудистых нарушений является количественная оценка призраков перицитов, которые

появляются на ранней стадии заболевания и соотносятся с потерей перicyтов сетчатки, тогда как ацеллюлярные капилляры обычно наблюдаются на более поздних стадиях. В частности, в пилотном исследовании было установлено, что индукция DR посредством STZ приводит к статистически значимому увеличению количества призраков перicyтов через 12 недель.

5 Таким образом, авторы изобретения ожидали обнаружить присутствие призраков перicyтов при нормальном количестве перicyтов на неделе 9.

Такие наблюдения были подтверждены в данном исследовании, поскольку у STZ-индуцированных животных не наблюдалось различий в общем количестве перicyтов (сумма жизнеспособных перicyтов и призраков перicyтов) или ацеллюлярных капилляров (таблица 4; «STZ + наполнитель» по сравнению с группой, «не подвергавшейся воздействию»). Кроме того, не было выявлено значимых различий между разными лечебными группами (таблица 4).

Таблица 4. Количественное определение перicyтов и клеточных капилляров

15 (*) суммарное количество перicyтов и призраков перicyтов

	Группа, не подвергавшаяся воздействию	STZ + наполнитель	STZ + AF564	STZ + данегапид	STZ + AF564 + данегапид
Перicyты*	52 ± 2	52 ± 2	47 ± 3	49 ± 2	51 ± 2
Ацеллюлярные капилляры	22 ± 1	22 ± 1	18 ± 2	20 ± 1	25 ± 1

Не наблюдалось статистически значимой разницы в общем количестве перicyтов, количественно определенном как суммарное количество перicyтов и призраков перicyтов (однофакторный ANOVA, $p = 0,51$). Аналогичным образом, отсутствовали значимые различия в количестве ацеллюлярных капилляров, за исключением статистической тенденции к уменьшению количества ацеллюлярных капилляров в группе, получавшей анти-VEGF (STZ + AF564; $p = 0,06$), по сравнению с глазами в группе, получавшей наполнитель (STZ + наполнитель) (однофакторный ANOVA, $p < 0,001$, с последующим применением критерия множественных сравнений Хольма-Шидака).

25 Далее, количественно определяли количество призраков перicyтов. С применением способа GROUT ($Q = 1\%$) из набора данных удаляли выбросы, что привело к удалению 19 из общего количества собранных 324 точек данных.

Для проверки модели, основанной на наличии призраков перicyтов, количество призраков перicyтов в сетчатке группы, не подвергавшейся воздействию, сначала сравнивали с количеством в сетчатке STZ-индуцированных животных, получавших наполнитель. STZ-

индукция приводила к статистически значимому увеличению количества призраков перицитов в сетчатке по сравнению с крысами, не подвергавшимися воздействию (**фигура 10А**).

5 Далее, посредством однофакторного ANOVA ($p < 0,05$) с последующим применением критерия множественных сравнений по Даннетту сравнивали группы, получавшие STZ (**фигура 10В**). Лечение с помощью как антитела к VEGF (AF564; $p < 0,01$), так и данегаптида ($p < 0,001$), приводило к статистически значимому снижению количества призраков перицитов, тогда как комбинированное лечение не демонстрировало статистического эффекта ($p = 0,11$).

10 Типичные примеры расщепленных трипсином, окрашенных посредством PAS тотальных препаратов сетчатки приведены на **фигуре 11**, на которой показаны ацеллюлярные капилляры (стрелки), перициты (не указаны) и призраки перицитов (наконечники стрелок).

Выводы

15 Воздействие сублетального окислительного стресса и гипергликемии на клетки ARPE-19 (48 час) приводило к статистически значимому увеличению P_{app} (**фигуры 1А и 1В**, средняя колонка, «+,-» по сравнению с контрольной левой колонкой, «-,-») и сопутствующему снижению TiJOR (**фигура 2А**, средняя колонка, «+,-» по сравнению с контрольной левой колонкой, «-,-»). Предварительная обработка данегаптимом (100 нМ) полностью защищала от
20 такого увеличения проницаемости (**фигура 1А и 1В**, правая колонка, «+,+»; по сравнению с контрольной левой колонкой, «-,-» и средней колонкой, «+,-»). Аналогичным образом, данегаптим продемонстрировал частичную защиту от дезорганизации плотных контактов и разрушения межклеточного связывания, которое оценивали путем количественного определения TiJOR (**фигура 2А**, правая колонка, «+,+»; по сравнению с контрольной левой
25 колонкой, «-,-» и средней колонкой, «+,-»).

STZ приводил к надежной индукции гипергликемии, которую количественно определяли по устойчивым повышенным уровням глюкозы (**фигура 3А**) и гемоглобина А1с (**фигура 3В**) на протяжении всего исследования. STZ-индуцированная катаракта, которая часто наблюдается в данной модели, к концу исследования развивалась до состояния средней
30 степени тяжести (**рис. 4**). Все исследуемые препараты хорошо переносились, и макроскопические офтальмологические исследования не выявили признаков офтальмологической токсичности. Исследуемые препараты не оказывали дифференциальных эффектов на развитие катаракты (**фигура 4**).

Индукция DR посредством STZ приводила к статистически значимому увеличению
35 толщины наружного слоя сетчатки (**фигура 5В**; «STZ + наполнитель» по сравнению с группой

«не подвергавшейся воздействию»), которое было полностью обращено вспять при применении данегаптида ($p < 0,05$) (**фигура 5B**; «STZ + данегаптин»). Напротив, AF564 ($p = 0,60$) (**фигура 5B**; «STZ + AF564») и комбинированное лечение ($p = 0,60$) (**фигура 5B**; «STZ + AF564 + данегаптин») не имели эффекта. Такое уменьшение толщины наружного слоя сетчатки при применении данегаптида было показано по всей сетчатке (**фигура 7**).

Положительный контроль, антитело AF564 к VEGF, приводил к статистически значимому снижению экстравазации EB на 82,3% ($p < 0,01$) (**фигура 9B**; «STZ + AF564» по сравнению с «STZ + наполнитель»). Аналогичным образом, данегаптин приводил к снижению экстравазации EB на 68,9% ($p < 0,05$) (**фигура 9B**; «STZ + данегаптин» по сравнению с «STZ + наполнитель»). Комбинированное лечение с применением AF564 и данегаптида показало аналогичный эффект при экстравазации EB, как и данегаптин сам по себе (снижение на 65,6%, $p < 0,05$) (**фигура 9B**; «STZ + AF564 + данегаптин» по сравнению с «STZ + наполнитель» и «STZ + данегаптин»).

Количество призраков перицитов значительно увеличивалось у крыс, получавших STZ ($p < 0,05$) (**фигура 10A**; «STZ + наполнитель» по сравнению с крысами, «не подвергавшимися воздействию»). Как AF564 ($p < 0,01$) (**фигура 10B**; «STZ + AF564»), так и данегаптин ($p < 0,001$) (**фигура 10B**; «STZ + данегаптин») вызывали статистически значимое снижение количества призраков перицитов, тогда как комбинированное лечение не имело эффекта ($p = 0,11$) (**фигура 10B**; «STZ + AF564 + данегаптин»).

Биологически значимых эффектов данегаптида на толщину внутреннего слоя сетчатки выявлено не было.

Такие объединенные результаты (**фигуры 1-11**) показывают, что данегаптин может защищать от дисфункции барьера RPE, о чем свидетельствует способность данегаптида предотвращать увеличение проницаемости монослоя RPE вследствие гипергликемического и окислительного стресса, связанного с T1, при этом его способность предотвращать утолщение наружного слоя сетчатки у крыс с DR, указывают на то, что данегаптин может представлять собой эффективный способ лечения пациентов с d-AMD, влажной AMD или неоваскулярной AMD.

Данегаптин защищает от потери целостности гематоретинального барьера (BRB) частично посредством коннексина 43 (Cx43) в щелевых контактах за счет:

- Внутреннего BRB: Защищает от потери перицитов и эндотелиальных клеток и просачивания жидкости через сосуды, что наблюдается не только при DR, но также недавно выявлено и у пациентов с AMD (см., например, Hudson *et al.*, 2020 и Hadziahmetovic *et al.*, 2021); и
- Наружного BRB: Защищает от потери целостности барьера, связывающего

пигментированные эпителиальные клетки сетчатки, что приводит к снижению целостности барьера и связанных с ним функций слоя клеток RPE, включая активный транспорт воды из субретиального пространства и просачивание жидкости через сосуды, вызывающее влажную AMD.

5 Соответственно, данегаптин предоставляет мощную защиту от экспериментальных условий, имитирующих известные патологии диабетической ретинопатии (ДР) и возрастной макулярной дегенерации (AMD), связанные с разрушением плотных контактов и межклеточного связывания. Кроме того, данегаптин путем защиты от патологического открытия гемиканала Cx43 может защищать от набухания клеток, утолщения наружного слоя
10 клеток сетчатки и патологического просачивания АТФ во внеклеточный компартмент, где АТФ, как известно, вызывает воспаление. Данегаптин также хорошо переносился крысами и приводил к значительной защите от стресса и связанной с DR потери перицитов, просачивания жидкости через сосуды сетчатки и разрушения гематоретинальных барьеров (как внутреннего, так и наружного BRBs). Уровень защиты, обеспечиваемый данегаптидом, от просачивания
15 жидкости через сосуды и потери перицитов, был аналогичен уровню защиты, наблюдаемому при лечении с применением анти-VEGF. Кроме того, данегаптин защищал от стресса и DR-индуцированного увеличения толщины наружного слоя сетчатки, что не было показано при лечении с применением анти-VEGF.

20 Цитируемые источники

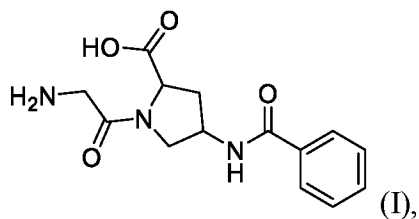
Все публикации, патенты и заявки на патент, цитируемые в настоящем документе или поданные вместе с настоящей заявкой, включая ссылки, поданные как часть Заявления о раскрытии информации, в полном объеме включены в настоящую заявку посредством ссылки.

- Aonuma *et al.*, Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), **1980**, 28, 3332-3339.
- 25 Bandello *et al.*, F1000 Research, **2017**, 6, 245.
- Butera *et al.*, J. Med. Chem., **2009**, 52(4), 908-911.
- Clapp *et al.*, Acta Diabetologica, **2019**, 56, 1031-1036.
- Coutinho *et al.*, Drug Deliv. Transl. Res., **2020**, 10(3), 751-765.
- Dhein *et al.*, Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol., **1994**, 350, 174-184.
- 30 Ferris *et al.*, Ophthalmology, **2013**, 120(4), 844-851.
- Fields *et al.*, "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis", Synthetic Peptides (2002, 2nd Edition)
- Filek *et al.*, Clin. Ophthalmol., **2019**, 13, 1087-96.
- González-Casanova *et al.*, Int. J. Mol. Sci., **2021**, 22(6), 3194.
- 35 Hadziahmetovic *et al.*, Front. Cell Dev. Biol., **2021**, 8, 612812.

- Hudson *et al.*, *Neural Regen. Res.*, **2020**, 15(9), 1656-1657.
- King *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 10186.
- Mugisho *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, **2019**, 1862, 3, 385-393.
- 5 Muller *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.*, **1997**, 327, 65-72.
- Naylor *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(1), 211.
- Obert *et al.*, *J. Mol. Med. (Berl)*, **2017**, 95(5), 535-552.
- Song *et al.*, *Neuro-Oncology*, **2005**, 7(4), 453-464.
- Squires *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(6), 2809.
- 10 Terryn *et al.*, *Cytometry A*, **2013**; 83, 235-241.
- Патент США № 4775743
- WO 02/077017
- WO 2007/078990
- WO 2008/079266
- 15 Ziniauskaitė *et al.*, *Ocul Surf.*, 2019, 17, 257-264.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



5 или его фармацевтически приемлемая соль или гидрат,
для применения в способе лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, при этом указанный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

10

2. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 1, отличающееся тем, что указанное соединение представляет собой (2S,4R)-1-(2-аминоацетил)-4-бензоиламино-пирролидин-2-карбоновую кислоту или ее фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

15

3. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят местно в глаз.

20

4. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 3, отличающееся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят местно путем интравитреальной инъекции в глаз.

25

5. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 1 или 2, отличающееся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят системно.

30

6. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 5, отличающееся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят системно путем перорального, подкожного, трансдермального или внутривенного введения.

7. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 6, отличающееся тем, что указанное соединение или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат вводят системно путем перорального введения.
- 5 8. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный способ предназначен для предотвращения AMD у субъекта-человека.
- 10 9. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный способ предназначен для предотвращения прогрессирования AMD у субъекта-человека.
- 15 10. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный способ предназначен для предотвращения прогрессирования сухой AMD во влажную AMD у субъекта-человека.
- 20 11. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный способ предназначен для предотвращения прогрессирования промежуточной сухой AMD в прогрессирующие формы сухой AMD у субъекта-человека.
- 25 12. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что AMD характеризуют как сухую AMD на ранней стадии.
- 30 13. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из п.п. 1-11, отличающееся тем, что AMD характеризуют как сухую AMD на промежуточной стадии.
- 35 14. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из п.п. 1-11, отличающееся тем, что AMD характеризуют как сухую AMD на поздней стадии.
15. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из п.п. 14, отличающееся тем, что сухая AMD на поздней стадии представляет собой географическую атрофию.

16. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из п.п. 1-11, отличающееся тем, что AMD характеризуют как влажную, неоваскулярную или прогрессирующую ангиогенную AMD.

5

17. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанный способ предназначен для предотвращения развития хориоидальной неоваскуляризации у субъекта-человека.

10

18. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что пациент имеет хронически высокие уровни глюкозы в крови, в том числе пациент, который осуществляет гликемический контроль.

15

19. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента также имеется диабет 1 типа или диабет 2 типа.

20

20. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента также имеется гипертензия или хронически высокое кровяное давление, включая пациента, имеющего согласно контролю нормальное кровяное давление.

25

21. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 20, отличающееся тем, что пациент согласно контролю имеет нормальное кровяное давление благодаря применению антигипертензивного лечения, гликемического контроля или снижения уровня холестерина.

30

22. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что пациент имеет высокий уровень холестерина.

35

23. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента также имеется диабетическая ретинопатия или диабетический макулярный отек.

24. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента имеется заболевание глаз, связанное с окклюзией вен сетчатки (RVO).
- 5
25. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента имеется заболевание глаукома с патологическим внутриглазным давлением или без него.
- 10
26. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента имеется увеит или другие формы воспалительного заболевания глаз.
- 15
27. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что у пациента в глазу наблюдаются или наблюдались отложения друз или белковые экссудаты.
- 20
28. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует дисфункцию RPE (пигментированного эпителия сетчатки) или наружного гематоретинального барьера (oBRB).
- 25
29. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 28, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует потерю целостности барьера между клетками RPE и потерю клеток RPE.
- 30
30. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует вызванную стрессом дисфункцию слоев сетчатки или слоев сосудистой оболочки в глазу.
- 30
31. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует потерю фоторецепторов в глазу.

32. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 31, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует потерю фоторецепторов в сетчатке.
33. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует просачивание жидкости через сосуды в сетчатке.
34. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 33, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует просачивание жидкости через сосуды, что приводит к макулярному отеку.
35. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение улучшает отвод жидкости из тканей сетчатки через пигментированный эпителий сетчатки.
36. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует гибель или потерю эндотелиальных клеток сетчатки, эндотелиальных клеток сосудистой оболочки, перицитов или эпителиальных клеток сетчатки.
37. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует патологическое открытие гемиканала.
38. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение ингибирует патологическое высвобождение АТФ через гемиканал.
39. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 38, отличающееся тем, что патологическое открытие гемиканала и/или высвобождение АТФ через гемиканал представляет собой опосредованное коннексином 43 открытие и/или высвобождение АТФ.
40. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что концентрация введенного соединения

или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или состава, такого как содержащий соединение состав для перорального применения, системного применения и с замедленным высвобождением, составляет в микроокружении глаза от примерно 50 нМ до примерно 150 нМ.

5

41. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по п. 40, отличающееся тем, что концентрация введенного соединения или его фармацевтически приемлемой соли, гидрата или состава, такого как содержащий соединение состав для перорального применения, системного применения и с замедленным высвобождением, составляет в микроокружении глаза примерно 100 нМ.

10

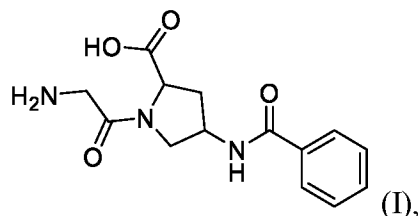
42. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что указанное соединение вводят пациенту один раз или два раза в сутки.

15

43. Соединение для применения в способе лечения или предотвращения по любому из п.п. 1-41, отличающееся тем, что указанное соединение вводят пациенту четыре раза в сутки.

20

44. Применение соединения формулы (I):



или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата,

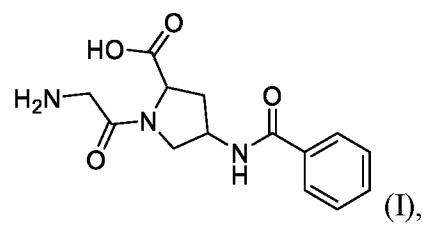
25

для получения лекарственного средства для лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, при этом предложенный способ включает введение указанному субъекту терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата.

30

45. Способ лечения или предотвращения возрастной макулярной дегенерации (AMD) у субъекта-человека, включающий введение указанному субъекту-человеку терапевтически эффективного количества соединения или его фармацевтически приемлемой соли или гидрата;

при этом указанное соединение представляет собой соединение формулы (I):

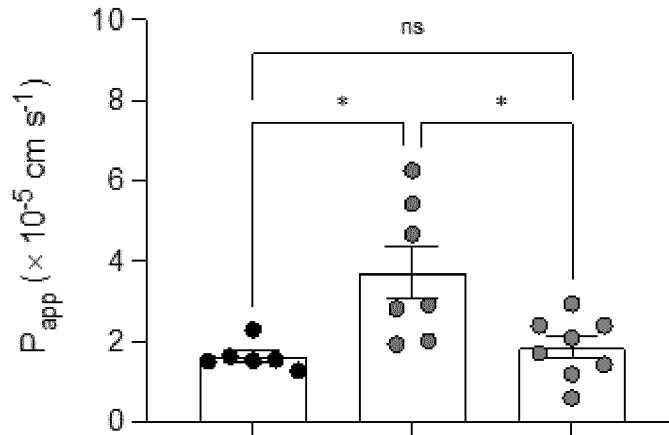


или его фармацевтически приемлемую соль или гидрат.

Фигура 1

А

6-CF 48 час



Высокий уровень глюкозы + 200 мкМ

tBHP

Данегапид (100 нМ)

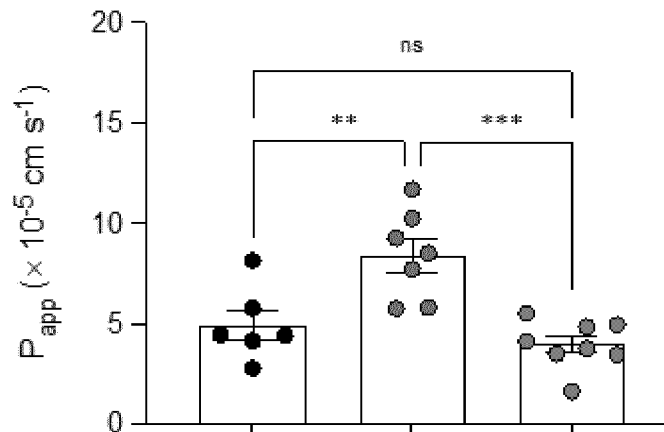
-

+

+

В

RhoB 48 час



Высокий уровень глюкозы + 200 мкМ

tBHP

Данегапид (100 нМ)

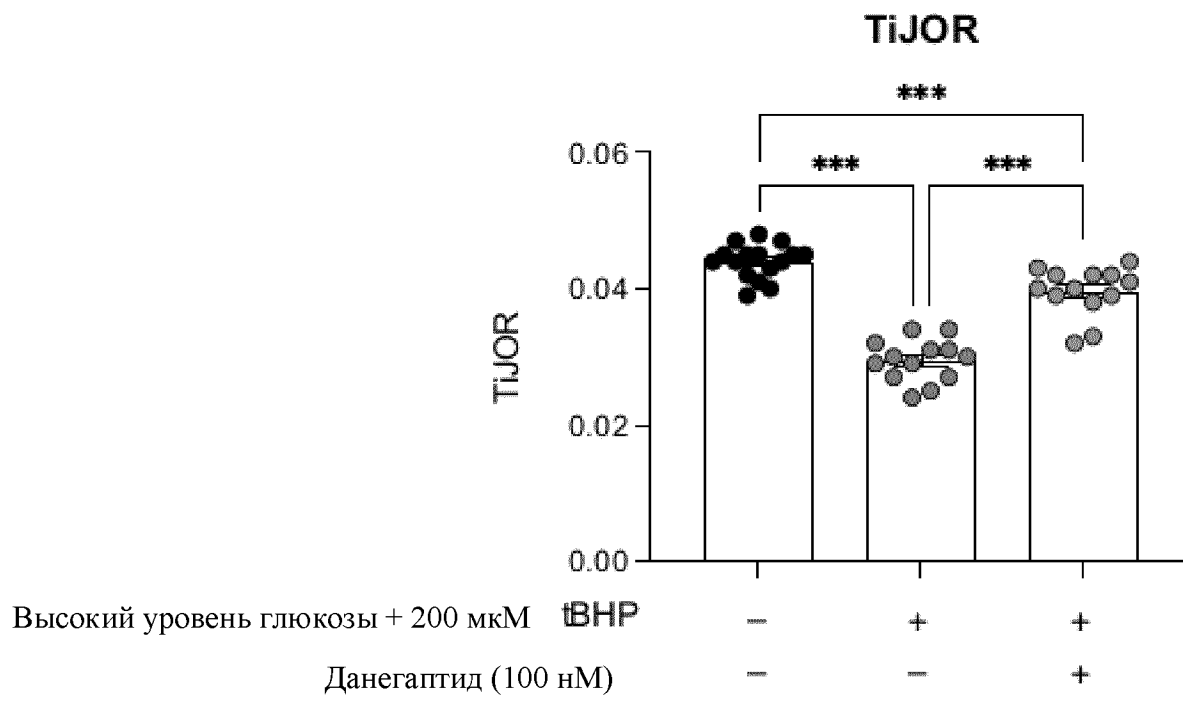
-

+

+

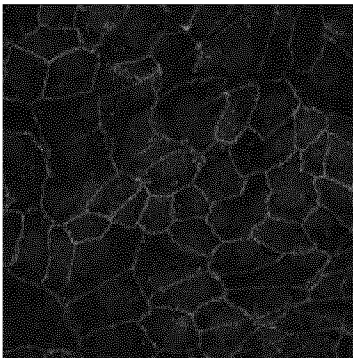
Фигура 2

А

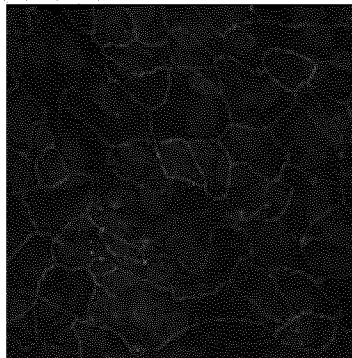


В

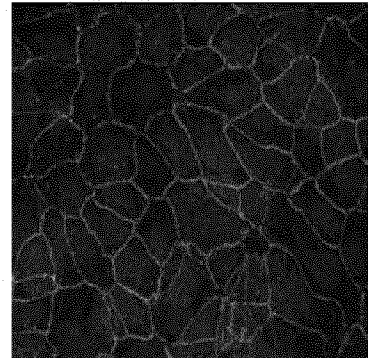
Контроль



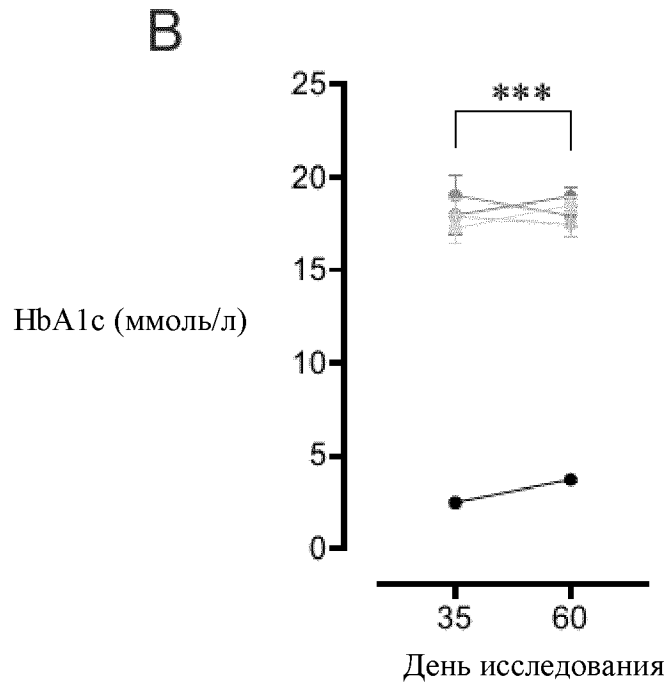
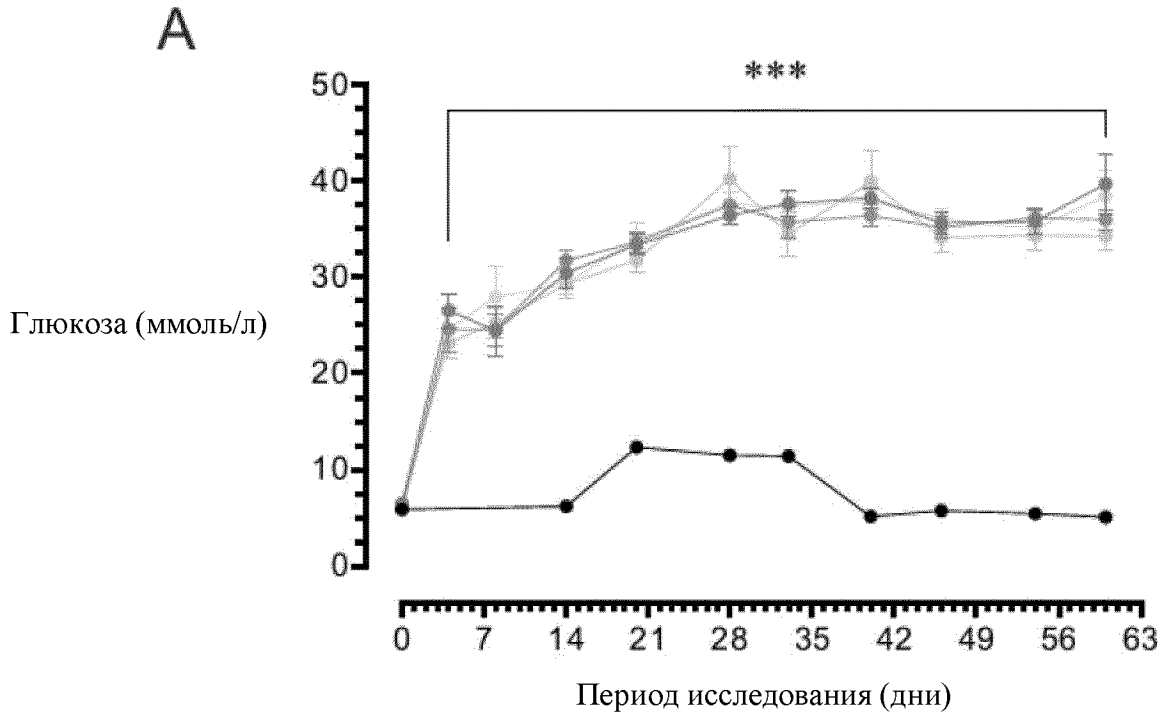
HG/tBHP



HG/tBHP + DGP

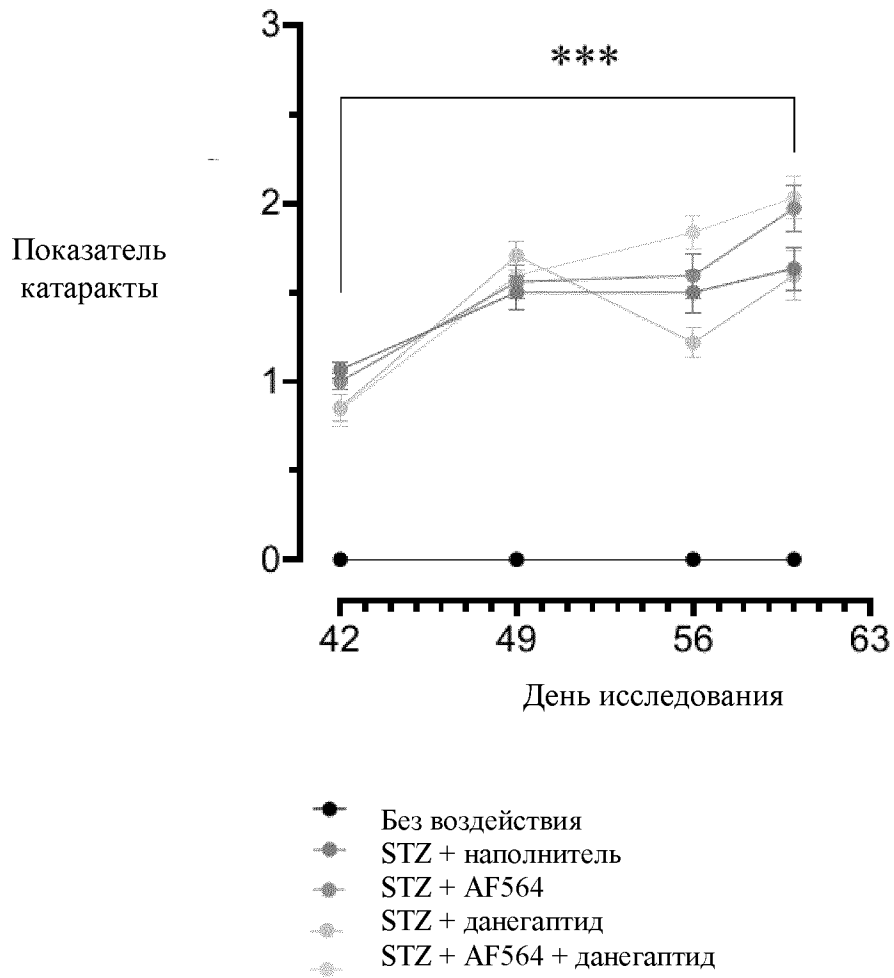


Фигура 3

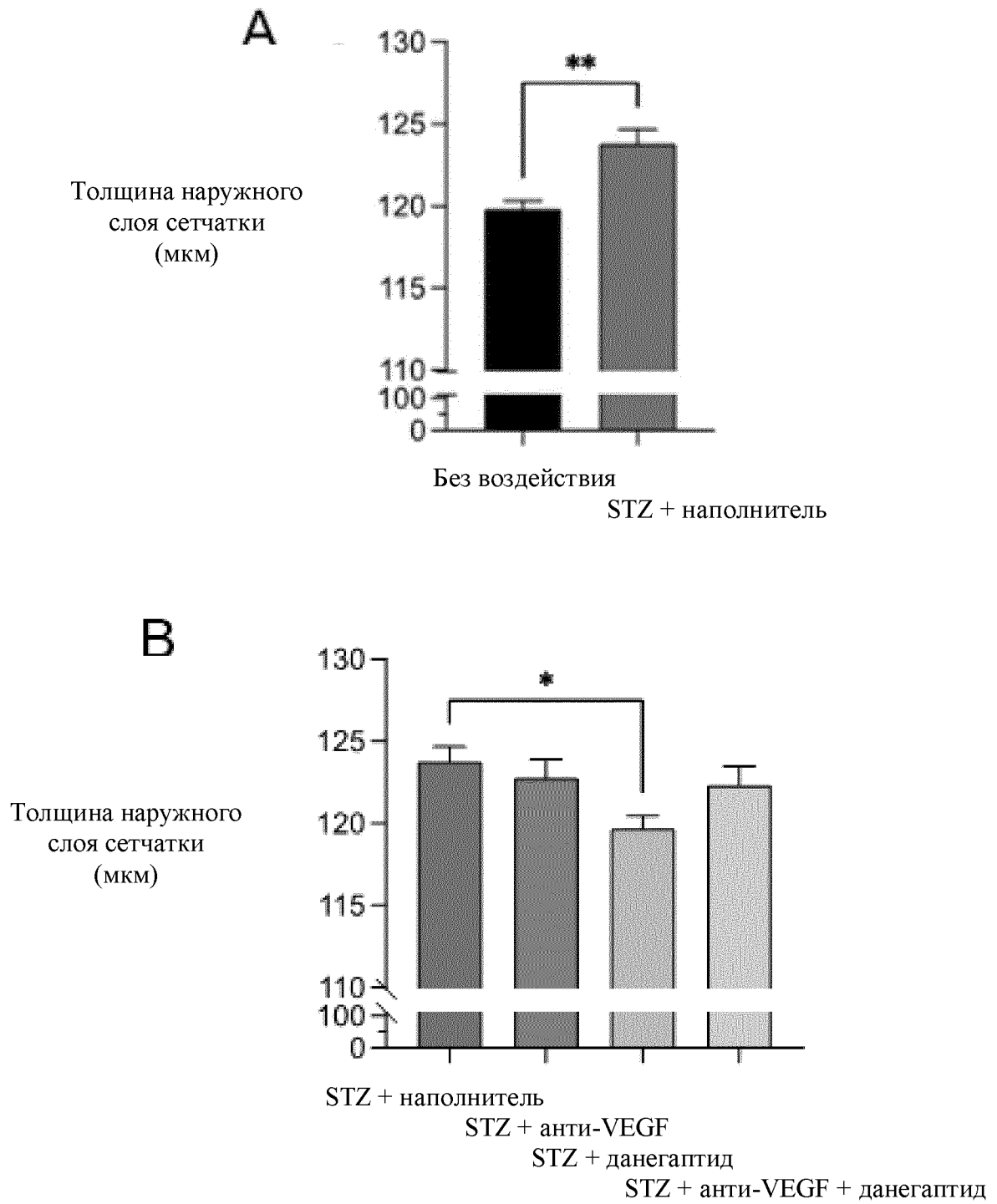


- Без воздействия
- STZ + наполнитель
- STZ + AF564
- STZ + данегапид
- STZ + AF564 + данегапид

Фигура 4



Фигура 5

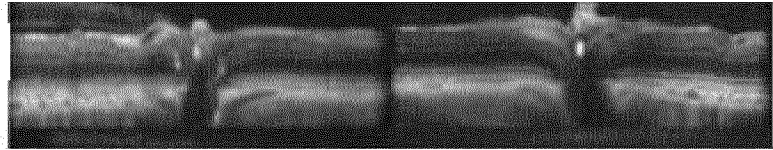


Фигура 1 (продолжение)

C

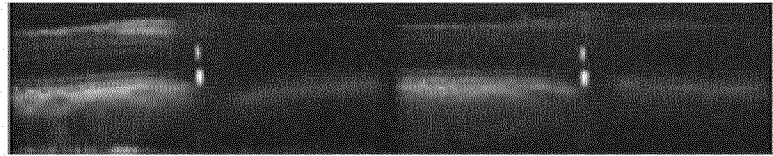
Без воздействия

Animal ID: V16220-029



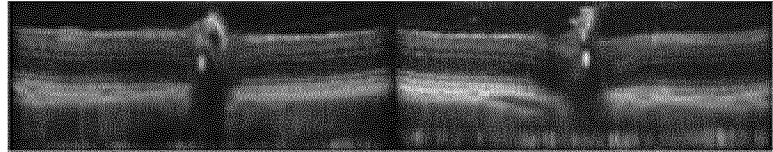
STZ + наполнитель

Animal ID: V16220-061



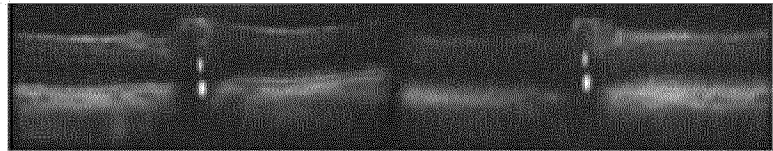
STZ + AF564

Animal ID: V16220-100



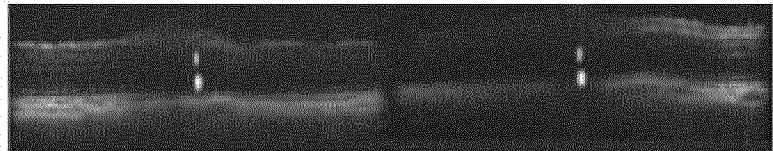
STZ + данегапид

Animal ID: V16220-093

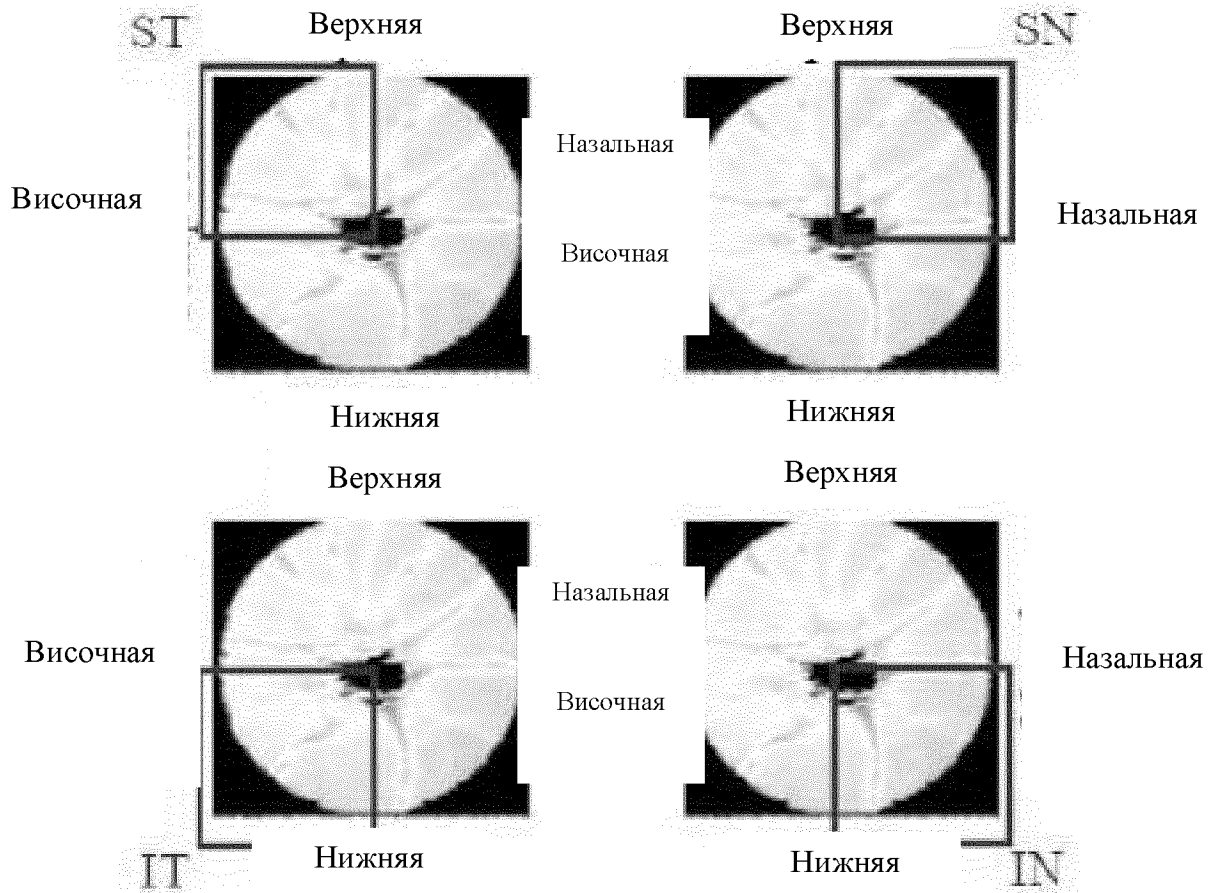


**STZ + AF564
+ данегапид**

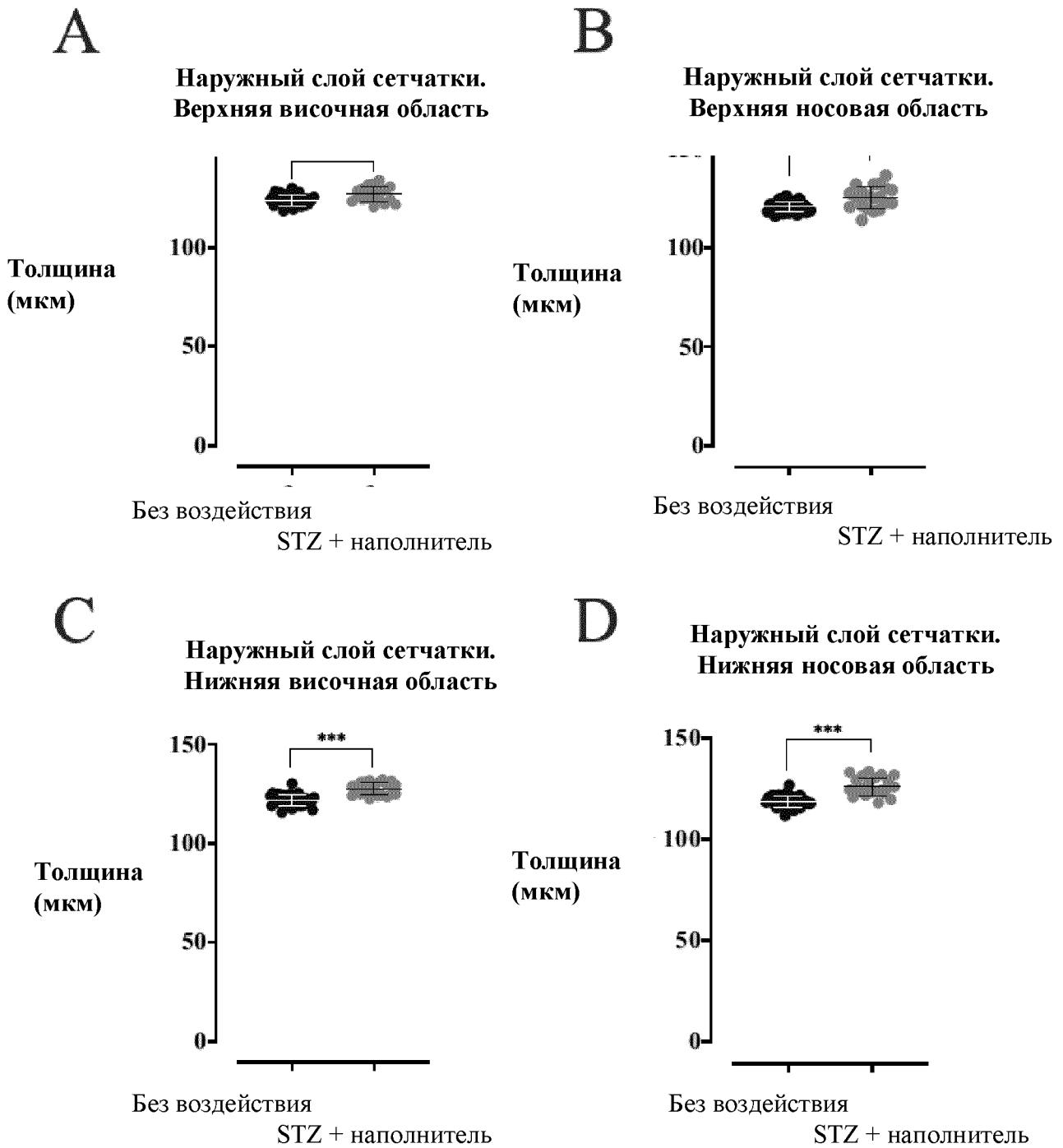
Animal ID: V16220-085



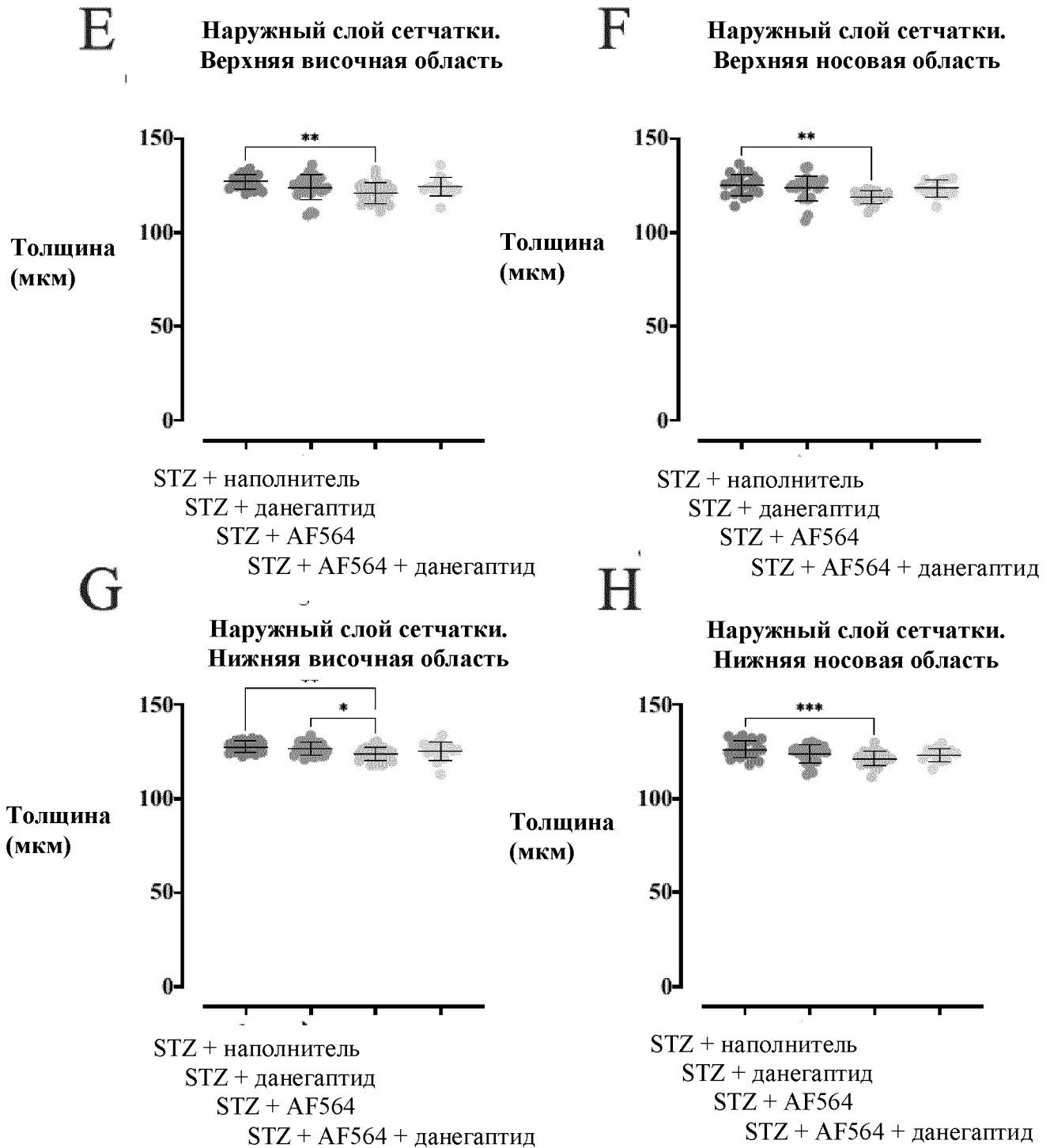
Фигура 6



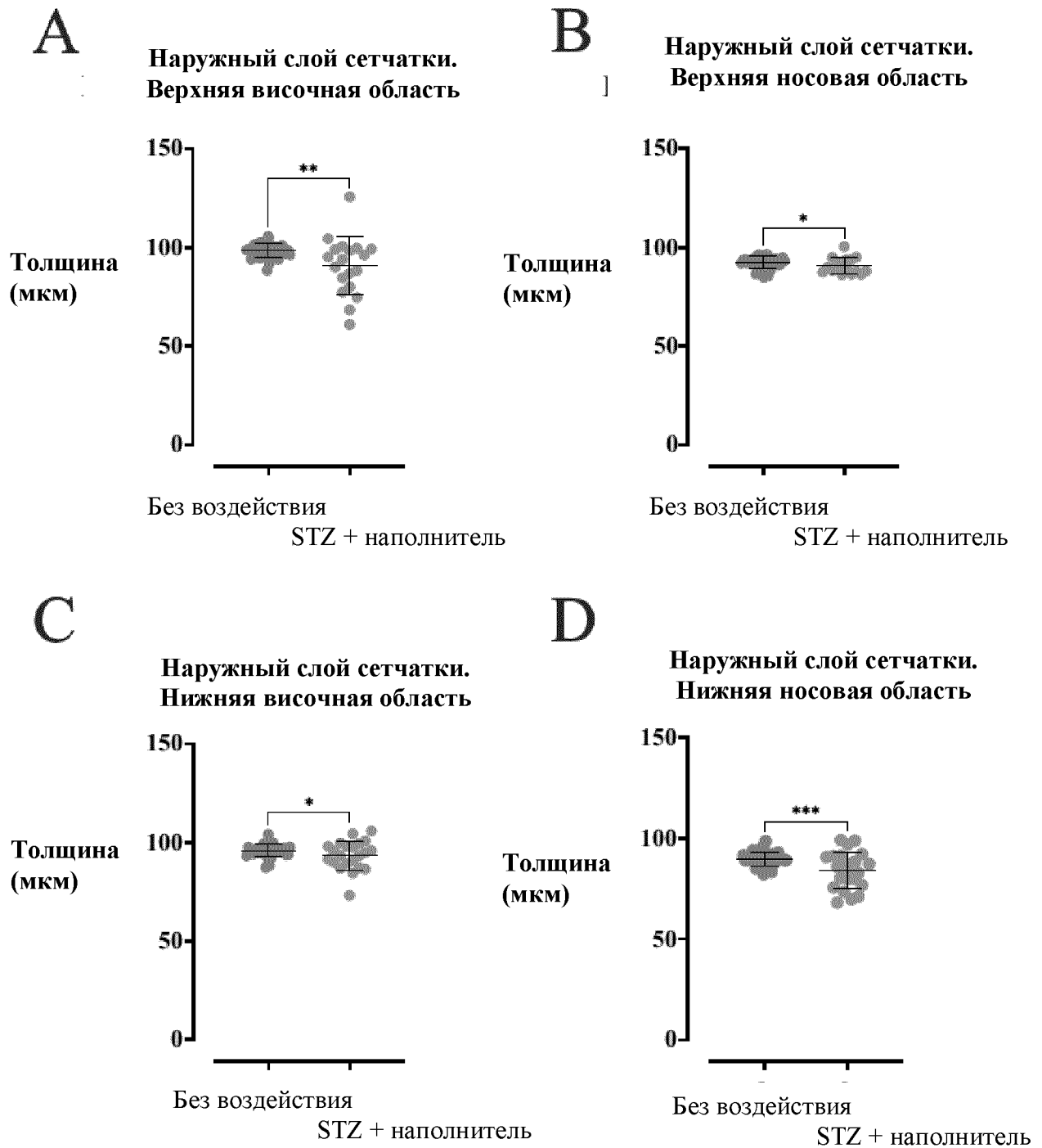
Фигура 7



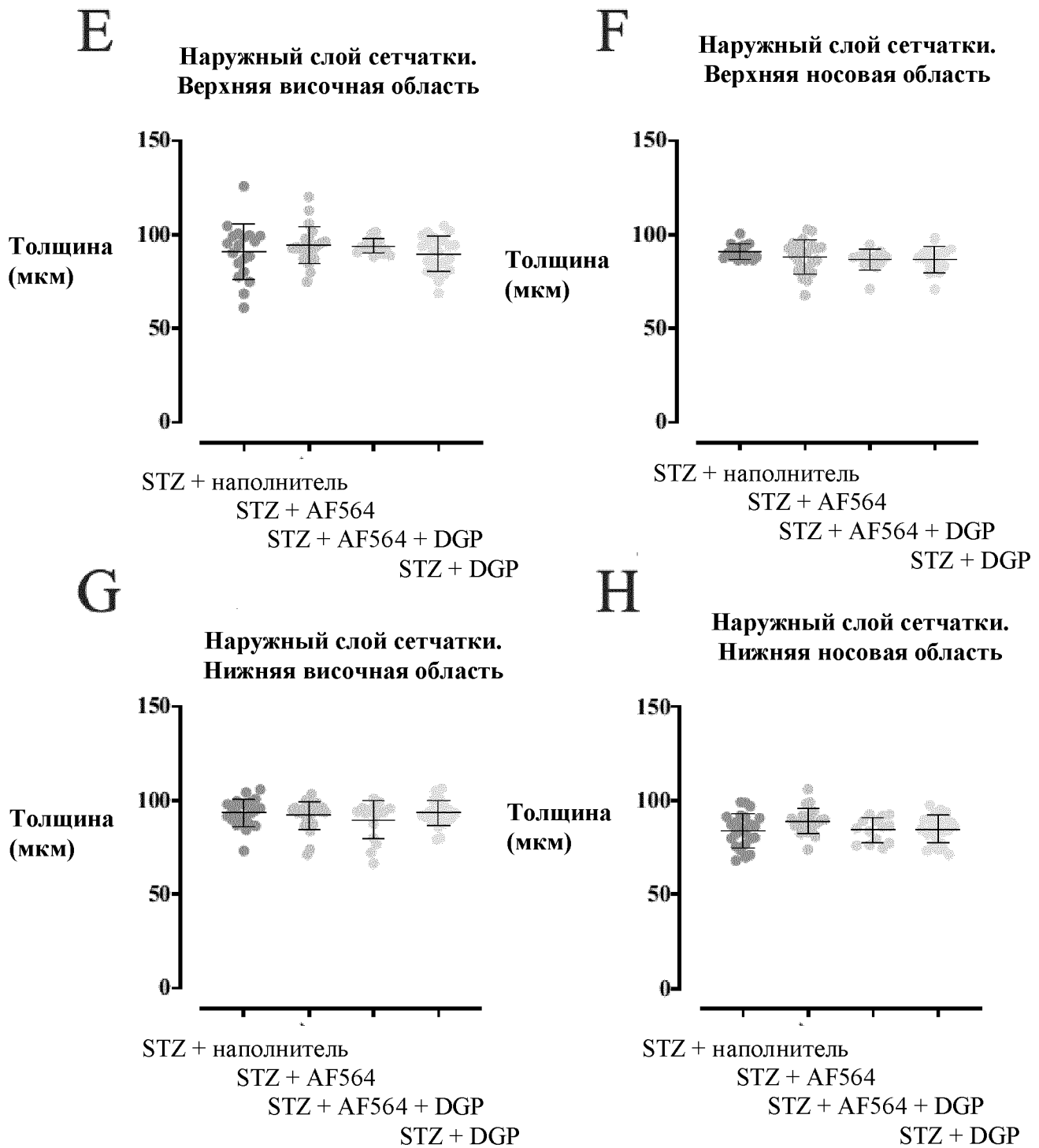
Фигура 7 (продолжение)



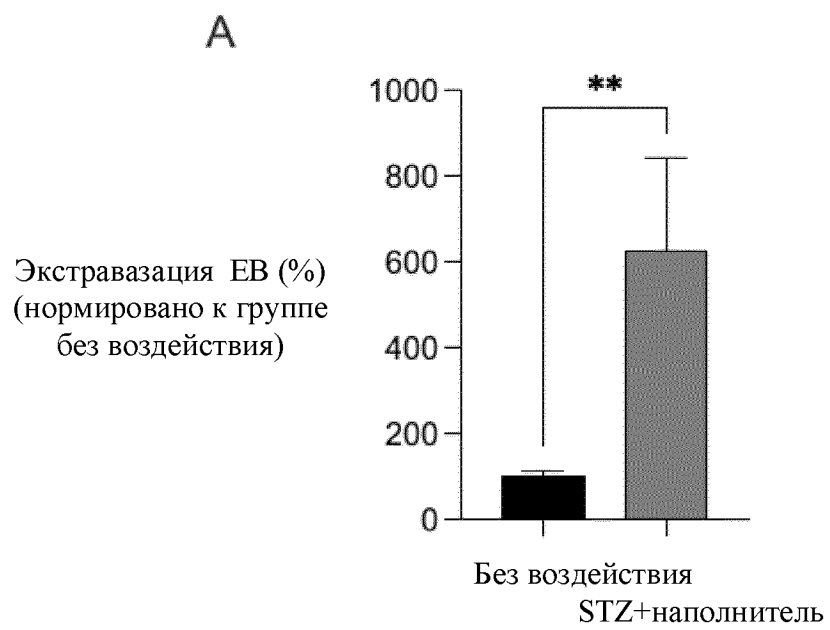
Фигура 8



Фигура 8 (продолжение)

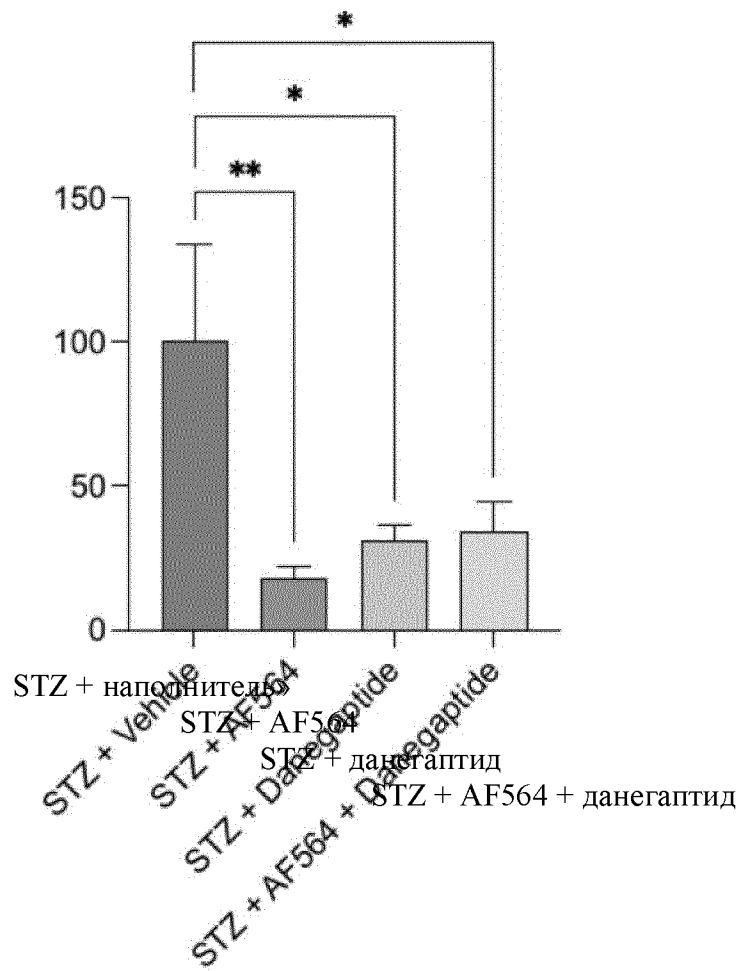


Фигура 9



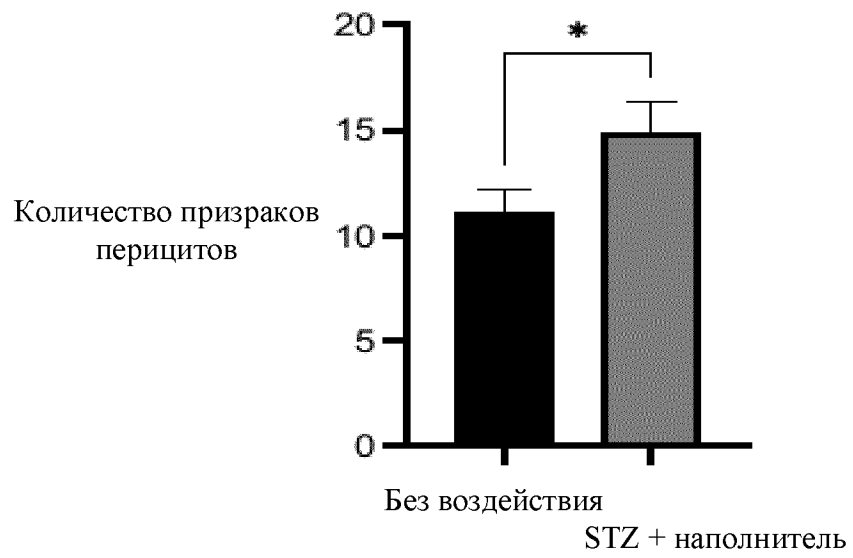
B

Экстравазация EB (%)
(нормировано к группе
STZ + наполнитель)

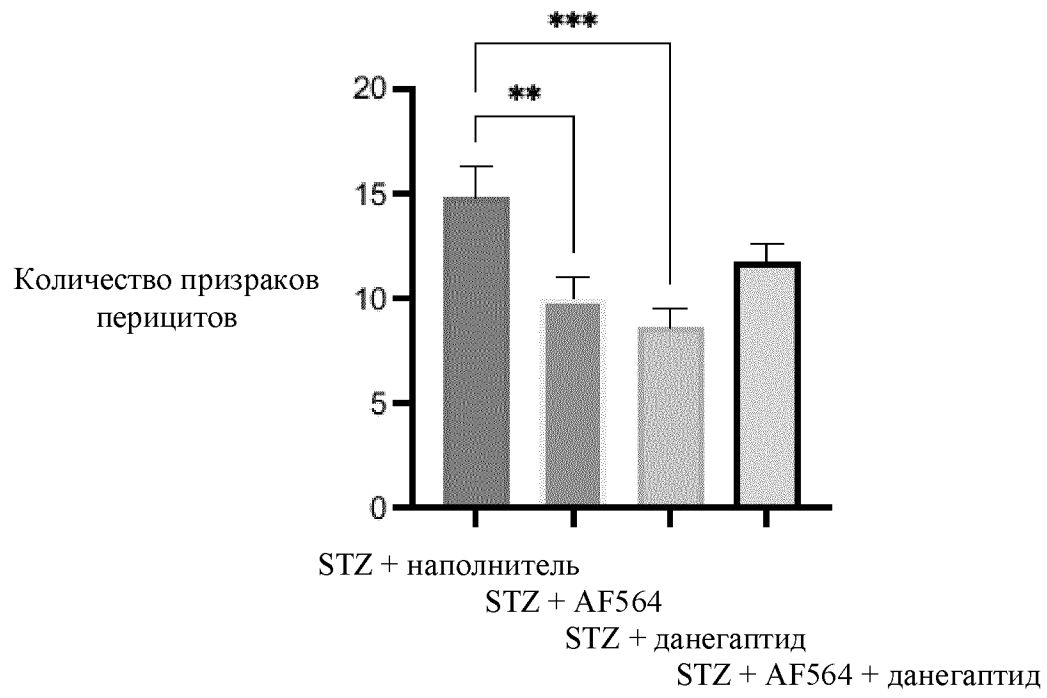


Фигура 10

А

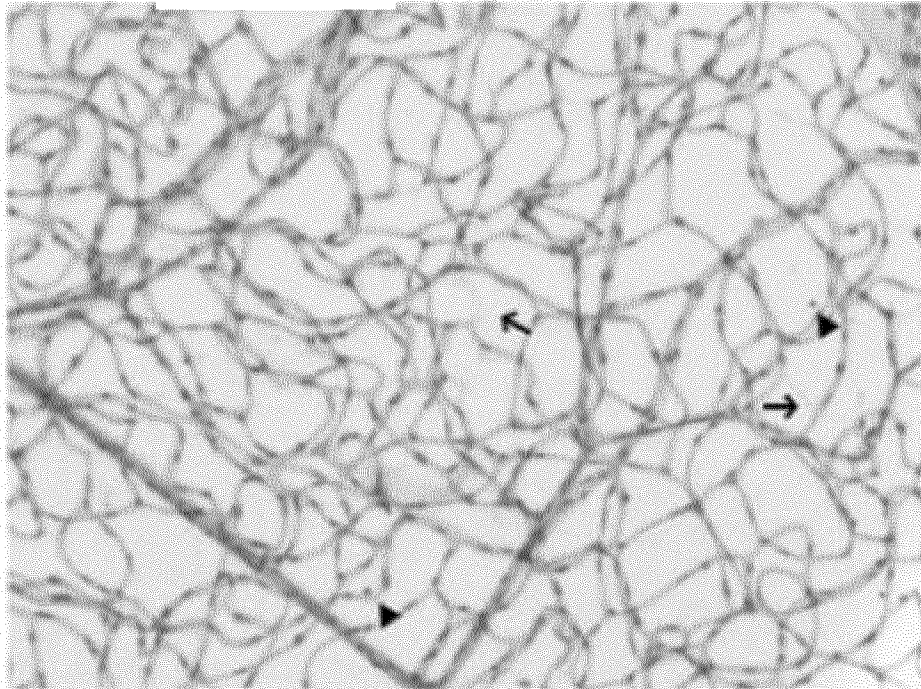


B

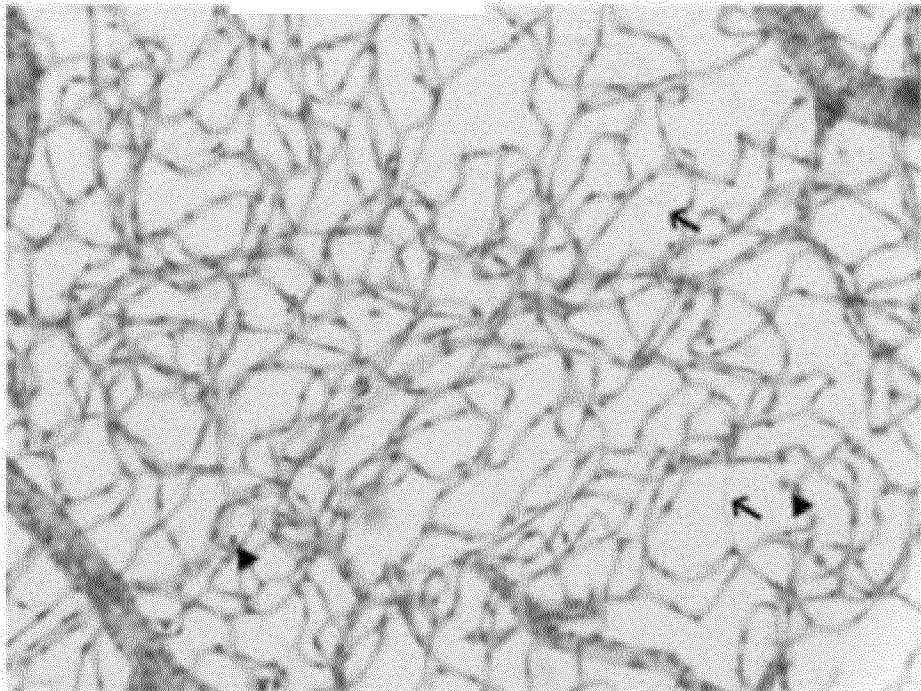


Фигура 11

Без воздействия. VI6220-040

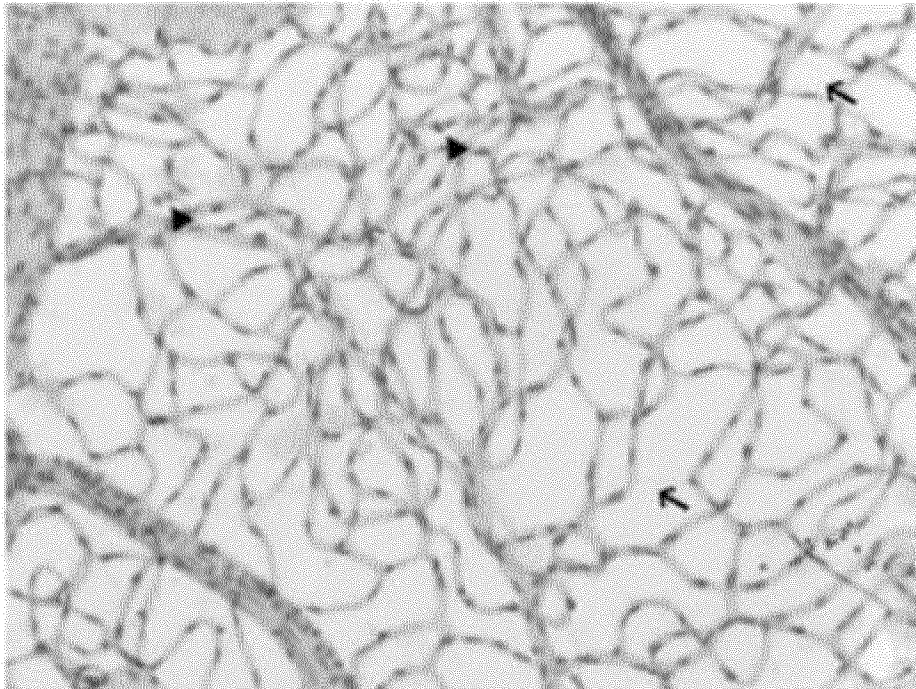


STZ+наполнитель. VI6220-133

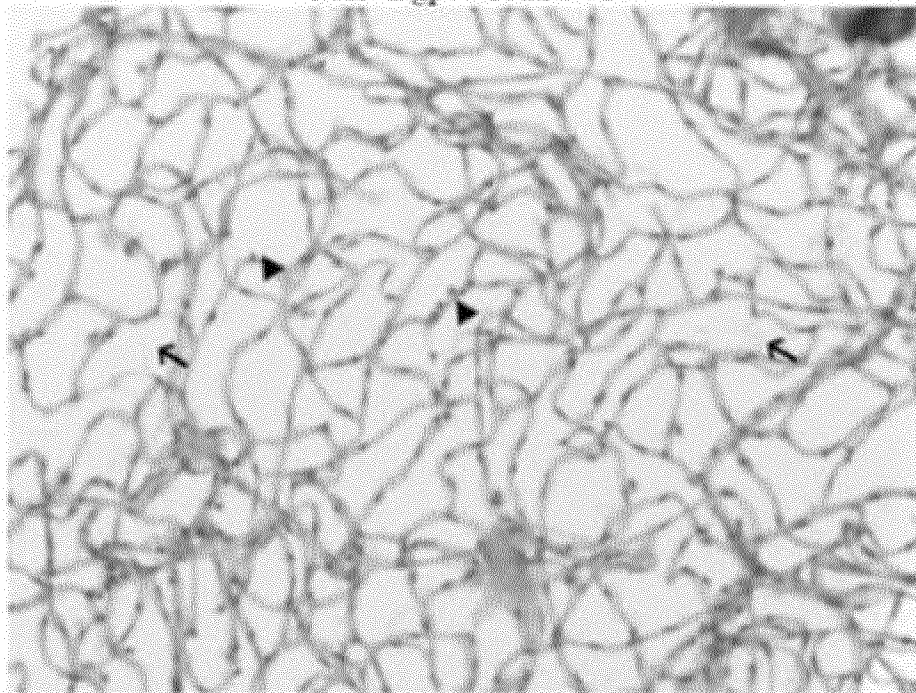


Фигура 11 (продолжение)

STZ+AF564. VI6220-128



STZ+Dgp. VI6220-93



Фигура 11 (продолжение)

S1Z+AF564+Dgp. V16220-127

