



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118450892 A

(43) 申请公布日 2024.08.06

(21) 申请号 202280084727.5

(22) 申请日 2022.12.21

(30) 优先权数据

63/292,783 2021.12.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/087342 2022.12.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/118366 EN 2023.06.29

(71) 申请人 布雷耶疗法有限公司

地址 丹麦

(72) 发明人 乌尔里克·莫里岑

布拉德福德·扬

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张珊珊 吴晓静

(51) Int.Cl.

A61K 31/401 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

A61K 38/05 (2006.01)

权利要求书3页 说明书30页 附图16页

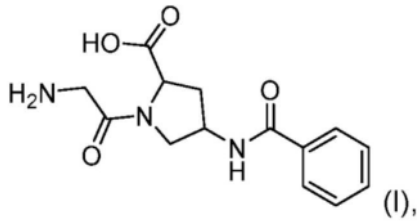
(54) 发明名称

缝隙连接调节剂及其用于治疗年龄相关性黄斑变性的用途

(57) 摘要

公开了缝隙连接依赖性细胞调节剂在治疗或预防年龄相关性黄斑变性 (AMD) 中的用途, 并且更特别是其用于治疗或预防干性AMD (d-AMD) 以及防止进展到湿性或新生血管性或晚期血管生成性AMD或者地图样萎缩 (GA) 的用途。

1. 式 (I) 化合物:



或者其可药用盐或水合物,

所述式 (I) 化合物或者其可药用盐或水合物用于在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的方法, 所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的所述化合物或者其可药用盐或水合物。

2. 根据权利要求1所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物是 (2S, 4R) -1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸, 或者其可药用盐或水合物。

3. 根据权利要求1或2所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物或者其可药用盐或水合物局部施用于眼。

4. 根据权利要求3所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物或者其可药用盐或水合物通过在眼中玻璃体内注射而局部施用。

5. 根据权利要求1或2所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物或者其可药用盐或水合物全身施用。

6. 根据权利要求5所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物或者其可药用盐或水合物通过经口、皮下、经皮或静脉内施用而全身施用。

7. 根据权利要求6所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物或者其可药用盐或水合物通过经口施用而全身施用。

8. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述方法用于在人对象中预防AMD。

9. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述方法用于在人对象中防止AMD的进展。

10. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述方法用于在人对象中防止干性AMD进展到湿性AMD。

11. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述方法用于在人对象中防止中期干性AMD进展到晚期形式的干性AMD。

12. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述AMD的特征在于为早期干性AMD。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述AMD的特征在于为中期干性AMD。

14. 根据权利要求1至11中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述AMD的特征在于为晚期干性AMD。

15. 根据权利要求14中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述晚期干性AMD是地图样萎缩。

16. 根据权利要求1至11中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述

AMD的特征在于为湿性、新生血管性或晚期血管生成性AMD。

17. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述方法用于在人对象中预防脉络膜新生血管形成的发生。

18. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者具有慢性高血糖水平,包括进行血糖控制的患者。

19. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者还患有1型糖尿病或2型糖尿病。

20. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者还患有高血压或慢性高血压,包括进行正常血压控制的患者。

21. 根据权利要求20所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者通过抗高血压治疗、血糖控制或降低胆固醇来进行正常血压控制。

22. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者患有高胆固醇。

23. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者还患有糖尿病性视网膜病变或糖尿病性黄斑水肿。

24. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者患有视网膜静脉阻塞(RVO)眼病。

25. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者患有伴有或不伴有病理性眼内压的青光眼病。

26. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者患有葡萄膜炎或其他形式的炎性眼病。

27. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中该患者在眼中具有或曾具有玻璃疣沉积物或蛋白质渗出物。

28. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制RPE(视网膜色素上皮)或外血视网膜屏障(oBRB)的功能障碍。

29. 根据权利要求28所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制RPE细胞之间屏障完整性的损失和RPE细胞的损失。

30. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制眼中视网膜或脉络膜层的应激诱导的功能障碍。

31. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制眼中光感受器的损失。

32. 根据权利要求31所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制视网膜中光感受器的损失。

33. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制视网膜中的血管渗漏。

34. 根据权利要求33所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物抑制导致黄斑水肿的血管渗漏。

35. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物,其中所述化合物改善经由视网膜色素上皮从视网膜组织的流体排出。

36. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物抑制视网膜内皮细胞、脉络膜内皮细胞、周细胞或上皮细胞的死亡或损失。

37. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物抑制病理性半通道开启。

38. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物抑制病理性半通道ATP释放。

39. 根据权利要求38所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述病理性半通道开启和/或ATP释放是连接蛋白43介导的开启和/或ATP释放。

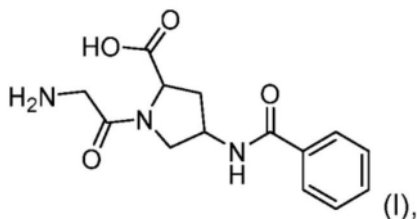
40. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所施用的化合物或者其可药用盐、水合物或制剂例如经口、全身和持续释放的化合物制剂, 在眼的微环境中的浓度达到约50nM至约150nM。

41. 根据权利要求40所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所施用的化合物或者其可药用盐、水合物或制剂例如经口、全身和持续释放的化合物制剂, 在眼的微环境中的浓度达到约100nM。

42. 根据前述权利要求中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物每日一次或两次施用于该患者。

43. 根据权利要求1至41中任一项所述应用于治疗或预防的方法的化合物, 其中所述化合物每日四次施用于该患者。

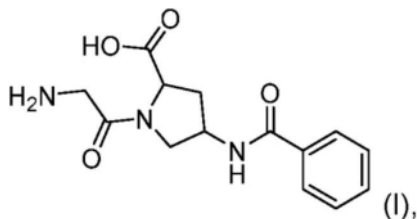
44. 式(I)化合物或者其可药用盐或水合物用于制备用于在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的药物的用途,



所述方法包括向所述对象施用治疗有效量的所述化合物, 或者其可药用盐或水合物。

45. 在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法, 所述方法包括向所述人对象施用治疗有效量的所述化合物, 或者其可药用盐或水合物;

其中所述化合物是式(I)化合物:



或者其可药用盐或水合物。

## 缝隙连接调节剂及其用于治疗年龄相关性黄斑变性的用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及缝隙连接依赖性细胞调节剂(gap junction-dependent cellular modulator)及其治疗或预防年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)的用途。本发明还涉及适于将缝隙连接依赖性细胞调节剂递送至眼的药物组合物。

### 背景技术

[0002] 年龄相关性黄斑变性(AMD)是老年人中视力损失的最重要的原因之一。AMD是中央视网膜的进行性和退行性病症,其在具有受损黄斑的患者中导致视敏度损失以及甚至失明。鉴于年龄是AMD的主要风险因素,因此该疾病的患病率和严重程度可随着人预期寿命增加而提高,例如在发达国家中(Bandello et al.,2017)。

[0003] AMD是具有多因素发病机制的中央视网膜的病症,并且可被分类为干性AMD(dry AMD,d-AMD;也称为非新生血管性AMD)或新生血管性AMD(neovascular AMD,n-AMD;也称为湿性AMD),这取决于脉络膜新生血管形成(choroidal neovascularization,CNV)的存在,所述脉络膜新生血管形成成为n-AMD的标志以及相对于非新生血管性干性AMD的区别特征。临床上,AMD通常以两种形式存在:非渗出性的“干性”形式(即d-AMD)和渗出性的、新生血管性的“湿性”(即湿性AMD)形式。超过80%的AMD患者存在d-AMD,也被称为萎缩性AMD,并且其特征在于视网膜中的黄斑变薄、玻璃疣沉积物和早期渗漏。干性AMD的晚期形式(称为地图样萎缩(geographic atrophy,GA)),存在视网膜色素上皮(retinal pigment epithelium,RPE)和光感受器的大量损失,并且严重期的该疾病可在高至20%的患者中导致不可逆的失明。目前,针对d-AMD没有有效的治疗,并且一旦RPE或光感受器遭受持续的实质性损伤或死亡(died-off),尤其是在疾病的晚期,则恢复它们是非常困难的(Bandello et al.,2017)。

[0004] d-AMD患者的亚群(10%至20%)通常由于视网膜中的异常血管生长而在疾病过程中的较晚期发生湿性AMD。针对湿性AMD的主要的眼注射治疗是与用于治疗患有糖尿病性黄斑水肿(diabetic macular edema,DME)的糖尿病性视网膜病变(diabetic retinopathy,DR)患者的市场治疗相同的市场治疗(例如Eylea<sup>®</sup>和Lucentis<sup>®</sup>)。可表征增殖性DR和湿性AMD二者的异常新生血管形成与损伤视网膜和黄斑导致衰弱性视力损失的血管渗漏和水肿的显著增加相关。如在患有增殖性DR和DME的患者中,已表明主要的抗VEGF注射治疗Eylea<sup>®</sup>和Lucentis<sup>®</sup>有效降低该病理性血管生成并改善视敏度,其中在仅约40%的患者中观察到了最佳治疗响应。另外,这些治疗需要数年的繁重注射,而且响应的持久性有限。因此,对于对患有湿性和干性AMD二者的患者更有效的治疗存在大量未满足的需求,该治疗可在疾病进展以及永久性和衰弱性视力损失发生之前的较早和较不严重的疾病阶段有效治疗这些疾病。

[0005] 没有明显的功能性或视力损失的临床病症(例如早期和/或中期的AMD)的特征在于黄斑区域中视网膜色素上皮(RPE)功能障碍或改变和/或玻璃疣的沉积。在晚期,该疾病可进展到地图样萎缩(GA)或新生血管性AMD(n-AMD)。继发于d-AMD的地图样萎缩(GA)发生

在当RPE开始在黄斑区域中变性时,导致由于眼中光感受器的显著损失而引起的视杆和视锥光感受器 (photoreceptor, PR) 细胞死亡以及最终的中央视力损失和失明 (Naylor et al., 2020)。

#### [0006] 发病机制

[0007] AMD背后确切的病理生理学机制还有待确定。然而,很明显AMD是多因素病理状况,其中遗传和环境的风险因素发挥至关重要的作用 (Bandello et al., 2017)。

[0008] 已鉴定到显示在d-AMD的发病机制中发挥重要作用的数种途径,包括氧化应激、脂褐素的沉积、慢性炎症和脉络膜血流不足。这些途径代表用于新的治疗的可能的靶标 (Bandello et al., 2017)。

[0009] 例如,血视网膜屏障 (blood retina barrier, BRB) 是建立和维持用于最佳视网膜功能的合适环境的基础 (Naylor et al., 2020)。BRB包含内血视网膜屏障 (inner blood retina barrier, iBRB) 和外血视网膜屏障 (outer blood retina barrier, oBRB)。iBRB由视网膜内皮细胞和周细胞构成,其通过内皮细胞与周细胞之间的特化蛋白质复合物来形成高度调节的细胞-细胞偶联以维持屏障功能。oBRB由视网膜色素上皮 (RPE) 细胞构成,其通过RPE之间的特化蛋白质复合物来形成高度调节的细胞-细胞偶联以维持屏障功能。定位于视网膜内皮细胞、周细胞和上皮细胞的质膜的这些特化蛋白质复合物包括缝隙连接、紧密连接 (Tight Junction, TJ) 和黏着连接。

[0010] RPE是oBRB的关键稳态组分,并将脉络膜的布鲁赫膜 (Bruch' smembrane) 与神经视网膜的光感受器层分开。形成RPE单层的上皮细胞是有色素、高度极化的上皮细胞,其中它们的顶端表面面向光感受器并且基底表面与布鲁赫膜连接。这些上皮细胞在肌动蛋白依赖性细胞-细胞连接 (特别是TJ) 的帮助下紧密排列。oBRB起到调节和过滤溶质和营养物从脉络膜至视网膜下空间的分子运动的作用,并且对维持视网膜稳态至关重要。形成oBRB的RPE细胞的紧密单层在视网膜的发育和维持中发挥重要作用,包括生长因子的分泌、限制大分子和毒性分子从血流进入视网膜中、调节营养物和流体进出视网膜的转运以及维持光感受器的生物源健康 (biogeneric health)。RPE完整性的损失和oBRB的功能障碍与数种眼部疾病包括AMD、DR和DME相关。这些屏障的任一者的损害均可导致视网膜内流体、血源性蛋白 (blood-borne protein) 和其他潜在毒性溶质积累 (Naylor et al., 2020)。

[0011] RPE可被分为顶端侧和基底侧。顶端表面与光感受器外段 (photoreceptor outer segment, POS) 直接接触,并且基底侧在其与脉络膜的高度渗透性和高度灌注的脉络膜毛细血管的相互作用中充当屏障 (Naylor et al., 2020)。RPE表现出三种胞间连接:TJ、黏着连接和缝隙连接。TJ形成调节RPE中溶质和营养物的细胞旁扩散的门或屏障。黏着连接提供相邻RPE细胞之间的强机械连接。缝隙连接允许细胞间通讯并通过与TJ联合来支持RPE细胞之间和RPE单层内的细胞-细胞偶联 (Obert et al., 2017)。

[0012] TJ连接相邻RPE细胞阻断了血浆组分和毒性分子移动到视网膜中并允许流体和溶质跨越渗透梯度从脉络膜脉管系统至外视网膜的受控流动。在身体中,视网膜的每重量的任意组织的耗氧量最高,并且BRB (外和内二者) 在提供不同的和受调节的营养物源以促进该高代谢率中是必不可少的。iBRB和oBRB二者的TJ均为复杂的动态结构,并且在这些屏障的环境中,这些TJ的完整性对于视力至关重要。

[0013] 具体地, oBRB通过支持基本功能允许光感受器 (PR) 的存活,所述基本功能包括过

滤和转运营养物以及光感受器外段 (POS) 吞噬作用。RPE 的另一一些重要功能包括吸收离焦 (out-of-focus) 和散射光、视网膜黏附、以及维生素 A 转运和加工、以及全反式视网膜再异构化 (re-isomerisation) 为 11-顺式视网膜, 这对于视觉循环至关重要 (Naylor et al., 2020)。因此, RPE 对于视觉功能是必不可少的——这些功能中任一者的失效均可导致视网膜的变性、视觉功能的损失、以及最终失明。

[0014] TJ 协同缝隙连接和黏着连接允许 iBRB 和 oBRB 二者中的细胞旁屏障功能具有高度的选择性。TJ 是跨膜蛋白和外周胞质蛋白的独特组件。跨膜蛋白包括密封蛋白、闭合蛋白、MARVEL (用于囊泡运输和膜连接的 Mal 和相关蛋白) 家族和连接黏附分子 (junctional adhesion molecule, JAM), 它们跨越质膜。外周胞质蛋白例如闭锁小带蛋白-1 (zonula occluden-1, ZO-1)、闭锁小带蛋白-2 (ZO-2) 和闭锁小带蛋白-3 (ZO-3) 将这些跨膜蛋白与缝隙连接和黏着连接一起锚定至细胞骨架, 并且在 TJ 的初始形成和不同组织中是至关重要的 (Naylor et al., 2020)。

[0015] 对于胞间通讯至关重要并且有助于细胞-细胞偶联的缝隙连接的连接蛋白 (connexin) 亚基是四跨膜蛋白。已在人基因组中鉴定出了二十一种连接蛋白同种型, 每种均具有不同的空间和时间表达模式 (Obert et al., 2017)。六个连接蛋白组装成一个连接子 (connexon) (半通道), 而来自相邻细胞的两个连接子对接以形成缝隙连接通道——缝隙连接本身是这样的通道的聚集体。不同连接蛋白的多种异源构型可组装成连接子半通道, 产生具有不同通讯特性的缝隙连接。例如, TJ 包含至少 40 种蛋白质, 其中的一些是跨膜和中间胞间黏附; 并且另一些是将连接组分与细胞骨架连接的胞间支架蛋白。黏着连接具有作为钙黏着蛋白受体的黏附元件, 所述钙黏着蛋白受体通过嗜同种相互作用来桥接相邻细胞膜之间的缝隙, 而联蛋白作为将机械连接系链至细胞骨架的主要的支架蛋白 (Obert et al., 2017)。

[0016] ZO-1 是对于所有三种连接类型通用的支架蛋白, 其将连接大分子复合物锚定至胞质肌动蛋白。ZO-1 属于膜相关鸟苷酸激酶样蛋白 (membrane-associated guanylate kinase-like protein, MAGUK) 家族, 并在 C 端包含三种 PDZ 结构域: SH3 结构域、GUK 结构域和富含脯氨酸的结构域 (Obert et al., 2017)。连接蛋白 43 (Connexin 43, Cx43) 与 ZO-1 的 PDZ2 结构域的结合调节缝隙连接通道聚集体的尺寸和稳定性。ZO-1 控制 Cx43 的细胞分布, 提供了用于在围结合斑 (perinexus) 处的缝隙连接通讯与非连接 (半通道) 通讯之间动态转换的控制点, 所述围结合斑为在缝隙连接通道聚集体的外周的特化膜结构域。功能性上皮单层中的 ZO-1 破坏导致屏障功能的损失以及顶端肌动蛋白和肌球蛋白的重组织 (Obert et al., 2017)。

[0017] Cx43 是负责视网膜内皮细胞、周细胞和上皮细胞中缝隙连接的形成的主要连接蛋白, 其通过允许小分子通行来调节细胞之间的通讯, 以用于稳态过程例如生长、修复和存活。六个连接蛋白单体形成半通道 (hemichannel, HC), 所述半通道在正常条件下未对接而关闭, 当来自相邻细胞的两个 HC 的对接导致缝隙连接形成时, 所述半通道在生理条件期间开启以允许细胞内容物的交换 (Coutinho et al., 2020)。然而, 在病理状况期间, 正常关闭、未对接的 HC 受到刺激而向胞外环境开启, 最终导致细胞死亡。在开启的 Cx43 HC 状态期间, 突然的组织再灌注显著提高了细胞死亡和组织损伤, 因为细胞不能够应对快速的离子流入。

[0018] 缺氧通常与促炎细胞因子的产生以及蛋白质例如血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、连接蛋白43 (Cx43) 和黏结蛋白聚糖-4的过表达相关 (Coutinho et al., 2020)。RPE将Cx43表达为最丰富表达的连接蛋白 (Obert et al., 2017)。此外, 已知VEGF破坏ZO-1组织, 导致紧密连接分解和单层渗透性提高。另外, 使用内皮细胞进行的体外研究表明VEGF介导的缝隙连接通讯的破坏与Cx43磷酸化的变化相关 (Coutinho et al., 2020)。

[0019] 例如, 在新生血管性AMD (n-AMD) 中, 不良形成的血管不受调节的生长被称为脉络膜新生血管形成 (CNV), 导致视网膜内出血, 以致组织缺血 (Coutinho et al., 2020)。为补偿血/氧供应的破坏, 视网膜色素上皮 (RPE) 过表达VEGF, 其有助于血管脉络膜与神经视网膜之间的血-视网膜屏障 (BRB) (Coutinho et al., 2020)。该VEGF过表达延续了渗漏血管的形成, 其将更多炎症因子引入至环境并且由于缺氧导致RPE屏障功能障碍和细胞死亡, 最终允许血管生长到视网膜中并导致视力损失。

[0020] 在衰老的眼中, 胞外物质沉积在布鲁赫膜中, 并且因此, 布鲁赫膜的厚度增加且渗透性降低 (Naylor et al., 2020)。衰老导致氧化损伤的累积和保护机制的伴随性降低。已表明RPE中脂褐素的累积充当起点 (Naylor et al., 2020)。氧化损伤被认为是年龄相关性退行性疾病 (例如AMD) 的初始诱因 (Naylor et al., 2020)。在患有AMD的患者中RPE对应激的适应性响应变得失调, 并且保护性和毒性因子失衡的日益提高促使了黄斑损伤和视网膜病变的发生 (Naylor et al., 2020)。RPE吸收光能的能力降低, 这被认为是导致AMD的事件的级联中的重要因素 (Naylor et al., 2020)。

[0021] 外血视网膜屏障 (oBRB) 的完整性防止脉络膜血管入侵视网膜以及防止d-AMD变成湿性AMD。该RPE-RPE连接的损失可诱导VEGF过表达 (Naylor et al., 2020)。年龄相关性RPE变性、泪、玻璃疣形成或凋亡也可导致RPE-RPE连接的损失。

#### [0022] 诊断和治疗

[0023] 对于诊断工具, 存在许多可用的临床检查以监测d-AMD患者的视网膜、RPE和脉络膜的形态变化。例如, 眼底自发荧光和光学相干断层扫描 (optical coherence tomography, OCT) 被认为是诊断和随访d-AMD改变 (包括监测萎缩区域进展) 的最有用的工具。另一个实例是OCT-血管造影, 其为新的成像工具, 可增加受d-AMD影响的患者的另外的信息。OCT还可用于诊断和监测如在湿性AMD中观察到的黄斑水肿 (Bandello et al., 2017)。

[0024] 最近, 已经引入了玻璃体内注射抗血管内皮生长因子 (抗VEGF) 药物的临床方案 (clinic), 并且已经开发了靶向血管成熟和重塑的新的治疗, 这彻底改变了该疾病的自然史。这些阻断VEGF的玻璃体内药剂彻底改变了患有湿性AMD的患者的护理, 降低了生长和来自CNV病变的渗漏, 并防止了中度和重度的视力损失 (Naylor et al., 2020)。

[0025] 然而, 目前针对地图样萎缩 (GA) (d-AMD的晚期形式) 没有经批准的治疗, 因为没有可恢复视网膜色素上皮 (RPE) 或光感受器的损伤的治疗。出于该原因, 目前d-AMD的治疗方法仅可能防止和/或减缓现有萎缩的进展 (Bandello et al., 2017)。

[0026] 已经表明Cx43半通道 (HC) 阻断剂在多种动物模型中防止血管渗漏、支持渗漏血管的修复并促进组织修复 (Coutinho et al., 2020)。在慢性缺氧或炎症条件下, Cx43 HC被称为“病理孔 (pathologic pore)”, 因为其负责通过nod样受体家族含热蛋白结构域3 (nod-

like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎症小体复合物来激活炎症级联, 导致炎性细胞因子的产生, 并从而维持炎症环境 (Coutinho et al., 2020)。已经表明使用Cx43模拟肽 (例如Gap27和Pepide5) 在损伤期间对开启Cx43 HC进行阻断在心脏损伤、脊髓损伤和眼模型中促进了细胞存活和组织修复。然而, 关于这些肽的一个问题是它们对Cx43的胞外基序的作用, 当以高浓度和/或长暴露期使用时, 可能影响细胞存活所需的缝隙连接功能 (Coutinho et al., 2020)。

[0027] Gap19是来源于Cx43的第二胞质环的HC阻断剂, 其不干扰缝隙连接功能。然而, 它需要进入细胞以便与Cx43的胞质尾的相应序列结合 (Coutinho et al., 2020)。由于其细胞穿透性差, 先前已使用过高浓度, 但效力有限。因此, 已经探索了细胞穿透肽 (cell-penetrating peptide, CPP) 以改善载物分子跨细胞膜的转运。例如, Xentry是来源于乙型肝炎病毒的X蛋白的CPP, 已经表明其通过与细胞表面表达的黏结蛋白聚糖-4结合, 通过内吞机制改善一系列分子向细胞中的转运 (Coutinho et al., 2020)。由于黏结蛋白聚糖-4不在循环单核细胞和红细胞上表达, 因此如果全身递送的话, 则可防止循环螯合 (sequestration), 同时提高黏结蛋白聚糖-4过表达细胞对其的摄取。Coutinho et al. 发现Xentry与Gap19 (XG19) 的缀合可提高Gap19的细胞摄取以在低肽浓度下在缺氧细胞中阻断Cx43 HC介导的损伤 (Coutinho et al., 2020)。

[0028] Obert et al. (2017) 假设靶向ZO-1信号传导将通过使缝隙连接和/或TJ稳定来维持BRB完整性并降低RPE病理生理。他们开发了基于连接蛋白43的肽模拟物—— $\alpha$ 连接蛋白羧基端1 (Alpha Connexin carboxy-Terminall,  $\alpha$ CT1) 以竞争性阻断ZO-1的PDZ2结构域处的相互作用, 从而抑制与该结构域选择性结合的配体。 $\alpha$ CT1模拟Cx43 COOH端PDZ结合结构域, 其不同于被认为导致Cx43通道活性降低或靶向Cx43微管结合结构域而降低半通道活性的数种其他Cx43模拟物。 $\alpha$ CT1被认为通过使缝隙连接和/或TJ稳定来维持BRB完整性和降低RPE病理生理。在一些实验中, 使用触发脉络膜新生血管形成 (CNV) 的激光-光凝固术或导致形态损伤的强光暴露, 来在鼠中产生RPE-细胞屏障功能障碍。 $\alpha$ CT1处理减少了CNV发生和流体渗漏, 如通过光学相干断层扫描所确定的, 并且损伤与周围RPE细胞的细胞完整性的破坏相关。通过滴眼剂 (eyedrop) 用 $\alpha$ CT1进行预处理预防了光损伤, 所述光损伤通常显著破坏RPE细胞形态。使用RPE和马丁-达比犬肾 (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK) 单层进行的体外实验表明 $\alpha$ CT1独立于其对Cx43的作用而使紧密连接稳定。综上所述,  $\alpha$ CT1对胞间连接的稳定在AMD样病理状况的模型中有效改善了RPE功能障碍。Obert et al. 总结了 $\alpha$ CT1介导的对紧密连接的稳定可用作用于湿性和d-AMD二者的新的治疗。

[0029] King et al. (2021) 还提供了不同Cx43靶向分子的综述并提及danegaptide。然而, 本文中公开的另一些肽在AMD中在应激条件下不能同时地有效阻断半通道并使通过缝隙连接的细胞-细胞偶联稳定。

[0030] 因此, 本领域需要针对年龄相关性黄斑变性 (AMD), 并且尤其是干性AMD (d-AMD), 特别是在其进展到晚期地图样萎缩 (GA) 或湿性AMD或新生血管性AMD (n-AMD) 之前的另外的治疗。

## 发明内容

[0031] 大体上, 本发明涉及化合物, 即缝隙连接依赖性细胞调节剂, 例如缝隙连接胞间通

讯(Gap Junction intercellular communication,GJIC)调节剂和细胞-细胞偶联调节剂,其用于治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法,通常在人患者中进行。AMD可以是干性AMD(d-AMD)、晚期GA、湿性AMD或新生血管性AMD(n-AMD)。在一些优选方面中,本发明特别涉及治疗或预防干性AMD(d-AMD),特别是就在病症恶化至患者发生湿性AMD或晚期GA的地步之前。

[0032] 尽管已在多种组织中广泛研究缝隙连接胞间通讯(GJIC)的作用,但本发明涉及其参与患有AMD的患者中的细胞-细胞偶联的结构完整性以及外BRB的功能障碍,包括RPE的屏障完整性。缝隙连接通道允许离子、营养物和其他信号传导分子(至多1kDa)在相邻细胞之间通行。重要的是,连接蛋白43(Cx43)介导的GJIC在调节视网膜中的细胞生长、血管紧密性、屏障完整性和细胞死亡中发挥关键作用,并因此是维持视网膜代谢和血管稳态的不可或缺的因素。Cx43在视网膜中丰富地表达,这表明有大量的缝隙连接依赖性偶联,尤其是在iBRB和oBRB结构二者中。然而,在氧化应激、缺血性应激、缺氧、高葡萄糖和糖尿病条件下,Cx43依赖性细胞-细胞偶联下调并且功能受损,从而损害视网膜血管细胞和RPE中的缝隙连接活性。此外,氧化应激、缺血性应激、缺氧、高葡萄糖和糖尿病诱导的Cx43下调以及降低的GJIC活性在以下中发挥关键作用:糖尿病小鼠、大鼠和人的视网膜中的提高的RPE和血管细胞死亡,表现出非细胞毛细管和周细胞损失的数目显著提高。

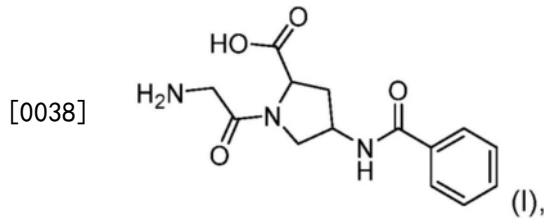
[0033] 此外,已知血管包括存在于眼中的血管由两种相互作用的细胞类型构成(Song et al., 2005)。因此,内皮细胞形成血管壁的内衬,而周细胞围绕在血管的表面,支持并维持血管结构和屏障完整性,并帮助抑制从血管渗漏。因此周细胞在功能上很重要,因为当血管失去周细胞时,它们会出血并过度扩张(hyperdilate),导致病症例如血管渗漏和水肿,随着流体渗漏增加超出RPE的再吸收能力,这导致视力的损失和最终的失明。除了缝隙连接调节剂对视网膜内皮细胞和RPE的作用之外,本申请表明RPE的屏障完整性可保护其不受氧化应激和高葡萄糖应激,并且通过施用缝隙连接调节剂可显著改善大鼠糖尿病性视网膜病变模型中的外视网膜厚度膨胀。

[0034] 此外,维持结构上细胞-细胞偶联和半通道关闭的组合提供了本文中所述化合物的独特和改善的优点,所述化合物例如danegaptide,其超越了先前公开的主要靶向半通道关闭的分子的治疗益处(例如Peptide5和Tonabersat)。

[0035] 不希望受理论的束缚,本发明人在AMD和DME的BRB模型中观察到了表明本文中所述化合物(例如danegaptide)的作用的MoA(mode-of-action,作用方式)主要是由于该化合物在存在高葡萄糖、活性氧物质(reactive oxygen species,RoS)和代谢/生物能(即氧化磷酸化(oxidative phosphorylation,OxPos)、三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle,TCA)和糖酵解)以及其他细胞应激物的情况下对缝隙连接(与TJ协同)依赖性细胞-细胞偶联的治疗/保护作用。本文中所述化合物还可防止可导致细胞损失和细胞-细胞解偶联的AMD中缝隙连接半通道的病理性开启。认为当某些组织中的胞间协调至关重要时(例如心脏的心肌细胞),该MoA除了与小离子(例如Ca<sup>2+</sup>)和其他小分子的经典缝隙连接胞间通讯(GJIC)信号传导作用之外,还对维持BRB完整性具有另外的和重要的结构上的作用。该MoA处于主要抗VEGF治疗的上游,并在DR、DME和AMD的核心病理状况中发挥作用。因此,本文中所述的化合物例如danegaptide可用于预防这样的疾病的发生,以及可用于这样的疾病一旦发生时就进行的治疗。

[0036] 本文中所述的化合物是缝隙连接调节剂。本文中所述的danegaptide是化合物(2S,4R)-1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸(Butera et al.,2009)。

[0037] 因此,在第一个方面中,本发明提供了式(I)化合物:



[0039] 或者其可药用盐或水合物,

[0040] 所述式(I)化合物或者其可药用盐或水合物用于在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法,所述方法包括向对象施用治疗有效量的化合物;或其可药用盐。

[0041] 优选地,所述化合物是(2S,4R)-1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸;或者其可药用盐或水合物。

[0042] 在一些实施方案中,所述化合物或者其可药用盐或水合物局部施用于眼。在一些实施方案中,所述化合物或者其可药用盐或水合物通过在眼中玻璃体内注射而局部施用。

[0043] 在一些实施方案中,所述化合物或者其可药用盐或水合物全身施用。在一些实施方案中,所述化合物或者其可药用盐或水合物通过经口、皮下、经皮或静脉内施用而全身施用。优选地,所述化合物或者其可药用盐或水合物通过经口施用而全身施用。

[0044] 在一些实施方案中,所述方法用于在人对象中预防AMD。在一些实施方案中,所述方法用于在人对象中防止AMD的进展。

[0045] 优选地,所述化合物用于在人对象中防止干性AMD进展到湿性AMD的方法。优选地,所述方法用于在人对象中防止中期干性AMD进展到晚期形式的干性AMD。优选地,所述AMD的特征在于为早期干性AMD。优选地,所述AMD的特征在于为中期干性AMD。优选地,所述AMD的特征在于为晚期干性AMD。优选地,晚期干性AMD是地图样萎缩(GA)。这些实施方案是有利的,因为针对干性AMD没有已知的治疗。

[0046] 在一些实施方案中,所述AMD的特征在于为湿性、新生血管性或晚期血管生成性AMD。在一些实施方案中,所述方法用于在人对象中防止脉络膜新生血管形成的发生。

[0047] 在一些实施方案中,该患者患有合并症(comorbidity)。例如,在一些实施方案中,该患者具有慢性高血糖水平,包括进行血糖控制的患者。在一些实施方案中,该患者还患有1型糖尿病或2型糖尿病。

[0048] 在一些实施方案中,该患者还患有高血压或慢性高血压,包括进行正常血压控制的患者。在一些实施方案中,该患者通过高血压治疗、血糖控制或降低胆固醇来进行正常血压控制。在一些实施方案中,该患者患有高胆固醇。

[0049] 在一些实施方案中,该患者还患有糖尿病性视网膜病变或糖尿病性黄斑水肿。在一些实施方案中,该患者患有视网膜静脉阻塞(retinal vein occlusion,RVO)眼病。在一些实施方案中,该患者患有伴有或不伴有病理性眼内压的青光眼病。在一些实施方案中,该患者患有葡萄膜炎或其他形式的炎性眼病。

[0050] 在一些实施方案中,该患者在眼中具有或曾具有玻璃疣沉积物或蛋白质渗出物。

[0051] 在一些实施方案中,所述化合物抑制RPE(视网膜色素上皮)或外血视网膜屏障

(oBRB) 的功能障碍,包括RPE细胞之间屏障完整性的损失和RPE细胞的损失。在一些实施方案中,所述化合物抑制眼中视网膜或脉络膜层的应激诱导的功能障碍。在一些实施方案中,所述化合物抑制眼中例如视网膜中光感受器的损失。在一些实施方案中,所述化合物抑制视网膜中的血管渗漏,包括导致黄斑水肿的血管渗漏。在一些实施方案中,所述化合物改善经由视网膜色素上皮从视网膜组织的流体排出。在一些实施方案中,所述化合物抑制视网膜内皮细胞、脉络膜内皮细胞、周细胞或上皮细胞的死亡或损失。

[0052] 在一些实施方案中,所述化合物抑制病理性半通道开启和/或ATP释放,例如连接蛋白43介导的开启和/或ATP释放。半通道开启和ATP释放(或其他这样的小的、<1kDa的信号传导分子)的病理作用可以是自分泌和旁分泌二者。

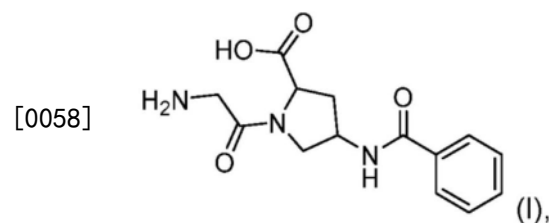
[0053] 在一些实施方案中,所施用的化合物或者其可药用盐、水合物或制剂例如经口、全身和持续释放的化合物制剂,在眼的微环境中的浓度达到约50nM至约150nM,例如约100nM。

[0054] 在一些实施方案中,所述化合物每日一次或两次施用于患者。在一些实施方案中,所述化合物多至每日四次施用于患者。

[0055] 在另一个方面中,本发明提供了适于将化合物递送至眼的药物组合物。

[0056] 本文中所述的化合物可在年龄相关性黄斑变性(AMD)期间使得细胞能够保护它们自己。不希望受任何特定理论的束缚,本发明人推测所述化合物可对细胞具有稳定作用,降低线粒体发生渗漏的趋势以及/或者降低细胞形成渗漏的外细胞膜的趋势以及/或者改善细胞的胞间和/或结构偶联。所述化合物可导致细胞之间更好的偶联,使得细胞能够共享可用的能量(ATP)并能够进行胞间信号传导,包括钙信号传导。所述化合物还可引起减少的病理性应激诱导的ATP渗漏到胞外区室中而导致炎症。所述化合物还可在功能上改善iBRB和oBRB的屏障完整性和/或改善RPE的流体吸收能力。

[0057] 在另一个方面中,本发明提供了式(I)化合物:

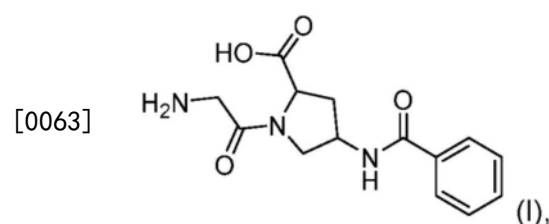


[0059] 或者其可药用盐或水合物,

[0060] 用于制备用于在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的药物的用途,所述方法包括向对象施用治疗有效量的化合物,或者其可药用盐或水合物。

[0061] 在另一个方面中,本发明提供了在人对象中治疗或预防年龄相关性黄斑变性(AMD)的方法,所述方法包括向人对象施用治疗有效量的化合物或者其可药用盐或水合物,

[0062] 其中所述化合物是式(I)化合物:



[0064] 或者其可药用盐或水合物。

[0065] 在另一个方面中,本发明提供了包含如本文中所述化合物的药物组合物,其用于本文中所述的方法中,该药物组合物包含所述化合物和可药用赋形剂。优选地,所述化合物用于通过全身施用、经口施用、皮下施用、经皮施用、鼻喷雾剂、滴眼剂、或滴眼剂制剂中的接触镜,通过接触镜、通过鼻喷雾剂或通过注射(例如玻璃体内注射)来施用。

[0066] 现在将参考附图以实例而非限制的方式描述本发明的实施方案。然而,鉴于本公开内容,本发明的多个另外的方面和实施方案对于本领域技术人员而言将是明显的。

[0067] 本文中使用的“和/或”应被视为具体公开了两个指定特征或组分中的每一者,两者兼具或者单独具有。例如,“A和/或B”应被视为具体公开了(i)A、(ii)B、以及(iii)A和B中的每一者,就像每一者在本文中单独列出一样。

[0068] 除非上下文中另有指示,否则对上述特征的描述和限定不限于本发明的任何特定方面或实施方案,并且等同地适用于所描述的所有方面和实施方案。

## 附图说明

[0069] 图1. Danegaptide在降低受到应激的人视网膜色素上皮细胞单层中的渗透性时防止所介导的DR和AMD模拟损伤。生长成汇合的细胞单层的人RPE(视网膜色素上皮)细胞系ARPE-19在高葡萄糖条件下用亚致死性tBHP(叔丁基过氧化氢)氧化损伤48小时之后显示出渗透性提高,其被danegaptide处理阻止,使用了两种不同的渗透性标志物(6-CF和RhoB)。数据以平均值±S.E.M.表示,其中每个数据点代表单独的实验条件,并且使用单因素ANOVA与Holm-Šidák多重比较检验进行分析; $P_{app}$ (表观渗透系数),6-CF(6-羧基荧光素;顶部图A),RhoB(罗丹明-B;底部图B),\* $p<0.05$ ,\*\* $p<0.01$ ,\*\*\* $p<0.001$ , $n=6$ 至8。

[0070] 图2. Danegaptide在受到应激的单层人视网膜色素上皮细胞之间通过改善细胞-细胞偶联和改善紧密连接组织率(tight junction organization rate, TiJOR)来防止所介导的DR和AMD模拟损伤。生长成汇合的细胞单层的人RPE(视网膜色素上皮)细胞系ARPE-19,在高葡萄糖中用亚致死性tBHP(叔丁基过氧化氢)氧化损伤48小时之后显示出细胞-细胞解偶联提高和紧密连接(TJ)紊乱,如通过使用抗闭锁小带蛋白-1(ZO-1)免疫染色进行的免疫细胞化学(底部图B;左=对照;中间=高葡萄糖和200 $\mu$ M tBHP;右=高葡萄糖、200 $\mu$ M tBHP和100nM danegaptide),和紧密连接组织指数(TiJOR;顶部条形图A)(在细胞应激下降低)所测量的,这可通过danegaptide处理来阻止。数据以平均值±S.E.M.表示,其中每个数据点代表单独的TiJOR分析,并且使用单因素ANOVA与Holm-Šidák多重比较检验进行分析;TiJOR(紧密连接组织指数);HG(高血糖);tBHP(叔丁基过氧化氢);DGP(Danegaptide),\*\*\* $p<0.001$ , $n=13$ 至16。

[0071] 图3. 体内研究期间的A. 血糖水平(mmol/l)和B. 血糖化血红蛋白(HbA1c)水平(mmol/mol)。数据以来自每组15至18只大鼠的平均值±SD表示。数据通过双因素ANOVA(血糖, $p<0.001$ ;以及血HbA1c, $p<0.001$ ),随后相对于原初组(Naïve group)的Tukey事后检验来分析。\*\*\* $p<0.001$ 。

[0072] 图4. 体内研究期间的白内障评分。从0(正常晶状体)至3(覆盖超过75%的晶状体的严重混浊)对白内障进行评分。数据以来自每组15至18只大鼠的平均值±S.E.M.表示。数据通过双因素ANOVA( $p<0.001$ ),随后相对于原初组的Tukey事后检验来分析。\*\*\* $p<0.001$ 。

[0073] 图5. Danegaptide在链脲霉素 (Streptozotocin, STZ) 诱导之后患有DR的大鼠中防止外视网膜增厚。Danegaptide防止外血视网膜屏障增厚, 这使用谱域光学相干断层扫描 (Spectral Domain Optical Coherence Tomography, SD-OCT) 成像来测量外丛状层和核层、内段和外段以及RPE/脉络膜层而取得。SD-OCT视网膜扫描是分段的, 并且外视网膜层的厚度通过卷积神经网络算法进行分析。A. 在9周的诱导之后, 棕色挪威大鼠 (Brown Norway rat) 中的STZ诱导导致STZ+载剂 (n=21) 视网膜中的外视网膜厚度与原初 (n=16; t检验 $p < 0.01$ ) 相比在统计学上显著提高。B. 通过局部眼注射进行目标为每周100nM持续三周的danegaptide处理阻止了该外视网膜厚度增加 ( $p < 0.05$ ), 而抗VEGF和抗VEGF+Danegaptide IVT注射处理没有作用。数据表示为平均值 $\pm$ S.E.M.。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ 。C. 在STZ诱导之后九周, 来自左和右眼的外视网膜厚度的代表性SD-OCT扫描。

[0074] 图6. 示出了用于视网膜厚度的区域分析的区域示意图。ST, 颞上 (superior temporal); SN, 鼻上 (superior nasal); IT, 颞下 (inferior temporal); IN, 鼻下 (inferior nasal)。

[0075] 图7. Danegaptide防止整个视网膜的外视网膜增厚。A至D. 与原初大鼠相比, 经STZ+载剂处理的大鼠在以下所有区域中的外视网膜厚度在统计学上显著增加: 颞上 (A)、鼻上 (B)、颞下 (C) 和鼻下 (D)。数据通过未配对t检验来分析。E至H. Danegaptide防止以下所有区域中的外视网膜的增厚: 颞上 (E)、鼻上 (F)、颞下 (G) 和鼻下 (H), 如通过单因素ANOVA或Kruskal-Wallis ( $p < 0.01$ ), 随后Tukey或Dunn多重比较检验所确定的。数据以来自每组n=12至18只大鼠的平均值 $\pm$ S.E.M.表示。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。

[0076] 图8. 内视网膜厚度的区域分析。虽然与原初动物相比, 经STZ诱导的动物表现出较薄视网膜 (A至D), 但在处理组之间未鉴定出统计学上显著的差异 (E至H)。颞上 (A和E)、鼻上 (B和F)、颞下 (C和G) 和鼻下 (D和H)。数据以来自每组12至18只大鼠的平均值 $\pm$ SD表示。通过未配对t检验来分析原初和STZ+载剂的数据。 $*p < 0.05$ ;  $**p < 0.01$ ;  $***p < 0.001$ 。通过单因素ANOVA或Kruskal-Wallis ANOVA来分析STZ处理组数据, 并且所有区域的 $p$ 值 $> 0.05$ 。

[0077] 图9. Danegaptide和抗VEGF处理降低了糖尿病性视网膜中的伊文思蓝 (Evans Blue, EB) 外渗。A. 在诱导之后9周, 通过STZ诱导高血糖导致EB外渗显著提高, 倍数为6.28倍 (原初中 $100 \pm 13.5\%$  vs. STZ+载剂中 $628 \pm 212.5\%$ , n=10至11, t检验 $p < 0.01$ )。B. 抗VEGF ( $p < 0.01$ )、Danegaptide ( $p < 0.05$ ) 及组合处理 ( $p < 0.05$ ) 导致EB外渗分别在统计学上显著降低82.3%、68.9%和65.6%。来自经STZ诱导的组的数据通过了使用D'Agostino&Pearson检验的正态性检验, 并且通过单因素ANOVA ( $p < 0.01$ ), 随后Holm-Šidák多重比较检验来分析。数据示出为平均值 $\pm$ S.E.M.。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ 。

[0078] 图10. Danegaptide防止STZ诱导之后9周时的周细胞损失。A. 通过STZ诱导DR导致在9周之后周细胞血影在统计学上显著增加 (t检验,  $p < 0.05$ , n=45至67)。B. 使用单因素ANOVA ( $p < 0.001$ ), 随后Dunnnett多重比较检验对STZ组中周细胞血影的数目进行比较。AF564 ( $p < 0.01$ , n=45) 和Danegaptide ( $p < 0.001$ , n=58) 二者均导致周细胞血影在统计学上显著减少。AF564和Danegaptide的组合处理对周细胞血影的存在没有作用 ( $p = 0.11$ ; n=61)。数据表示为平均值 $\pm$ S.E.M.。 $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$ 。

[0079] 图11. 来自胰蛋白酶消化的代表性图像, 其示出了Danegaptide保护免于周细胞损失。PAS染色用于评价血管异常, 包括无细胞毛细血管 (箭号) 和周细胞血影 (箭头)。未指出周

细胞。比例尺=100 $\mu$ m。

## 具体实施方式

### [0080] 定义

[0081] 除非另有说明,否则为具体术语提供以下定义。

[0082] 在本说明书和权利要求书中,使用了用于天然氨基酸的标准三字母和单字母代码。本文中的术语“肽”指示通过肽键连接的两个或更多个氨基酸部分(氨基酸残基)的链。一般而言,肽可包含一个或更多个天然存在的氨基酸和/或一个或更多个非天然存在的氨基酸。

[0083] 在本发明上下文中,术语“天然存在的氨基酸”是指以下20种氨基酸之一: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), 和Pro (P)。

[0084] 在天然存在的肽分子中,这些氨基酸(Gly除外,其缺少手性中心)通常以L-氨基酸残基的形式存在,但适用于本发明的化合物包含含有D-氨基酸残基的肽。

[0085] 氨基酸三字母代码如本领域中所使用。Hyp是指4-羟脯氨酸。

[0086] 用于本发明的化合物可含有两个或更多个非对称原子(也称为手性中心),这产生了出现非对映体的可能性。适用于本发明的化合物包含这样的非对映体。

[0087] 本文中使用的术语“血管细胞”包括内皮细胞和周细胞,包括视网膜内皮细胞和视网膜脉络膜内皮细胞。

### [0088] 年龄相关性黄斑变性(AMD)

[0089] AMD是中央视网膜(其中中央视觉在被称为黄斑的区域中进行加工)的退行性疾病。黄斑对于用于阅读、识别面部和驾驶的清晰、直视视觉而言是重要的。AMD可被分类为干性AMD(d-AMD;也被称为非新生血管性AMD或非渗出性AMD)或新生血管性AMD(n-AMD;也被称为湿性AMD或渗出性AMD)。

[0090] 通常来说,湿性AMD通常始于干性类型的AMD。AMD的典型阶段为:

[0091] 1. 早期干性AMD。其特征在中等的玻璃疣(63至125微米或 $\mu$ m),但无色素变化或异常(Ferris et al., 2013)。该阶段也称为早期AMD。

[0092] 2. 中期干性AMD。其特征在于大的玻璃疣(大于125微米或 $\mu$ m),或者色素变化/异常伴有至少中等的玻璃疣。该阶段也称为中期AMD。

[0093] 3. 晚期干性AMD。其特征在于与黄斑内或附近的组织萎缩和/或萎缩区域的进行性发展相关的病变。该d-AMD阶段包含地图样萎缩(GA),其特征在于外视网膜组织、视网膜色素上皮、光感受器和/或脉络膜毛细血管的萎缩。该阶段也称为晚期AMD。地图样萎缩(GA)是黄斑的慢性进行性变性,作为晚期年龄相关性黄斑变性(AMD)的一部分。该疾病的特征在于外视网膜组织、视网膜色素上皮和脉络膜毛细血管的局部、明显分界的萎缩。

[0094] 4. 湿性或新生血管性或晚期血管生成性AMD。其特征在于脉络膜新生血管形成(CNV)。新生血管形成是新的血管生长或血管生成。这些新的血管不成熟、易损并且容易渗漏流体和血液。它们还可产生瘢痕组织,并因此降低视力或导致视网膜脱落。湿性AMD是指渗漏的血管的组分,其中过量的血管渗漏可导致视网膜水肿的形成。新的血管形成可在有或没有大量水肿的情况下发生,并且水肿可在没有大量新生血管形成或血管生成的情况下

发生。这些疾病阶段也被称为渗出性AMD和晚期AMD。

[0095] 由于本发明以缝隙连接的作用为目标,因此在一些优选方面中,本发明涉及患有AMD,即上述阶段1至4,更优选上述阶段1至3(即干性AMD)的患者的治疗,或者作为可防止AMD向更晚期或晚期疾病阶段进一步恶化的治疗。本发明还涉及其他的血管应激因素例如针对处于发生AMD的风险之中的患有糖尿病的患者的预防性治疗。

[0096] 处于发生AMD的风险之中的糖尿病患者包括患有所有类型的糖尿病(1型、2型和妊娠性)的患者。人患糖尿病越久,则发生AMD的风险提高。因此,本发明可用于治疗所有的这些患者类型。尽管糖尿病与AMD之间的病理生理学关联尚未完全了解,但在糖尿病中观察到的经高葡萄糖应激和更多渗漏的血管可导致增加的玻璃疣沉积、ROS和缺氧状况,并且VEGF是这两种疾病中的共同且重要的病理生长因子。

[0097] 另外,本发明的医学用途和方法可用于进行血糖控制的患者中的预防性用途。在这样的治疗中,当具有慢性高血糖水平的患者在进行血糖控制时,眼组织可能已经习惯于高葡萄糖可用性,并且在达到正常葡萄糖水平时发生应激。这些患者处于经历AMD恶化的风险之中并且可在血糖得到控制时受到保护。因此,本发明可用作当患者在进行血糖控制时的保护性治疗。

[0098] 糖尿病性视网膜病变(DR)涉及视网膜血管的变化,其可引起视网膜血管出血或渗漏流体、扭曲视觉。糖尿病性视网膜病变是患有糖尿病的人中视力损失的最常见原因,并且是工作年龄的成年人中失明的主要原因。糖尿病性黄斑水肿是引起视网膜的黄斑区域中肿胀的糖尿病性视网膜病变的结果。

[0099] 糖尿病性黄斑水肿(DME)是黄斑中流体的积聚(水肿)。DME是患有糖尿病性视网膜病变的人中视力损失的最常见原因。所有患有糖尿病性视网膜病变的人中的约一半将在其生命中的某个时间点发生DME。尽管DME更可能发生在糖尿病性视网膜病变恶化时,但也可发生在疾病的任何阶段。

[0100] 患有糖尿病性视网膜病变和/或糖尿病性黄斑水肿的患者也处于发生AMD的风险之中。如上所述,患有糖尿病的患者发生AMD的风险提高,并且如果患者还发生了糖尿病性视网膜病变或糖尿病性黄斑水肿,则该风险进一步提高。在两种条件下,内血视网膜屏障和外血视网膜屏障由于病理性应激状态而受到挑战并发生渗漏。因此,本发明可用作还患有糖尿病性视网膜病变或糖尿病性黄斑水肿的患者中的治疗或预防。

[0101] 视网膜静脉阻塞(RVO)是控制血流进出视网膜的动脉或静脉中发生动脉或静脉中的阻塞(称为阻塞或卒中)。这通常在血凝块阻塞视网膜静脉时发生。患有视网膜静脉阻塞(RVO)的患者也处于发生AMD的风险之中。已知由RVO导致的缺血性状况驱动病理上的高VEGF水平,并且眼中VEGF水平升高可刺激AMD发生或使AMD发展恶化,包括新生血管性AMD或湿性AMD。已知在患有RVO的患者的眼中观察到的VEGF水平高度升高引起显著的血管渗漏和水肿的形成,并且使用缝隙连接调节剂在此将有益于抑制血管渗漏和加强iBRB和oBRB二者,如本文中所公开。因此,本发明可用作还患有视网膜静脉阻塞(RVO)眼病的患者中的治疗或预防。

[0102] 青光眼是常见的其中将眼与脑连接的视神经受到损伤的眼病。其通常由眼的前部中的流体积聚引起,该流体积聚提高了眼内部的压力。然而,青光眼可在眼内压不提高的情况下发生。如果不及早诊断和治疗,则青光眼可导致视力损失。患有具有或不具有病理性眼

内压的青光眼病的患者均处于发生AMD的风险之中。视网膜色素上皮(RPE)通常发挥将流体从视网膜和从眼中移出的重要作用。如果从眼的前部的流体排出减少(如在青光眼中经常观察到的),则通过RPE将流体从眼的后段移出对于避免眼压提高变得越来越重要。因此,可使RPE细胞的偶联稳定并改善其功能包括从眼中移出流体的治疗性干预(例如本文中所述的化合物,包括danegaptide)对患有青光眼的患者和处于发生AMD的风险之中的患有青光眼的患者是有益的。另外,在患有青光眼和具有随时间发展的神经元组织的萎缩的风险的患者中观察到神经元组织和视神经受到应激。同样,此处的可保护RPE和外血-视网膜屏障(oBRB)的治疗性干预,例如本文中所述的化合物包括danegaptide将有助于RPE向神经元组织(包括光感受器、视杆和视锥)提供功能和代谢支持。因此,本发明可用作还患有具有或不具有病理性眼内压的青光眼病的患者中的治疗或预防。

[0103] 炎性眼病,例如葡萄膜炎,响应于对眼、眼睑或周围组织的感染、变态反应、自身免疫病、刺激、损伤或创伤而发生。葡萄膜炎是其中在眼壁中组织的中间层(葡萄膜)中发生炎症。患有葡萄膜炎或其他形式的炎性眼病的患者处于发生AMD的风险之中。已知在葡萄膜炎中观察到的炎性病刺激数种细胞因子和生长因子(包括VEGF)的水平在病理上升高。这些信号传导分子还可使RPE应激并降低RPE的屏障完整性和功能,并因此降低外视网膜层的屏障完整性和功能。另外,已知RPE的病理性应激可导致基于Cx43的半通道开启以及过量ATP漏出至胞外基质,其中ATP负责嘌呤受体刺激,这也在炎症和血管生成中具有主导作用(Clapp et al., 2019)。因此,可使RPE细胞的胞间偶联稳定并防止基于Cx43的半通道病理性开启的治疗性干预,例如本文中所述的化合物,包括danegaptide,对患有葡萄膜炎的患者和处于发生AMD的风险之中的患有葡萄膜炎的患者是有益的。因此,本发明可用作还患有葡萄膜炎或其他形式的炎性眼病的患者中的治疗或预防。

[0104] 玻璃疣是黄斑变性的特征。玻璃疣是在眼的布鲁赫膜与视网膜色素上皮(RPE)之间积聚的胞外物质的微小黄色或白色累积。玻璃疣包含蛋白质和脂质(包含脂肪的天然存在的分子)。在眼中具有玻璃疣沉积物或其他蛋白质渗出物的患者处于发生AMD的风险之中。玻璃疣的沉积降低了RPE与视网膜脉络丛之间的氧、营养物和废产物交换的效力。鉴于视网膜和光感受器具有非常高的能量消耗和对有效氧合的需求,因此RPE支撑光感受器和神经元组织的能力的任何降低均可导致视网膜组织的应激和发生AMD风险提高。因此,可使RPE稳定并改善RPE与视网膜脉络丛之间的氧、营养物和废产物的代谢功能和交换的治疗性干预,例如本文中所述的化合物,包括danegaptide,将对具有玻璃疣或正处于增加的玻璃疣沉积(例如在AMD中观察到的玻璃疣沉积)的风险之中的患者有益。因此,本发明可用作还在眼中具有玻璃疣沉积物或蛋白质渗出物或者处于增加的玻璃疣沉积的风险之中的患者中的治疗或预防。

[0105] 多种施用途径可与本发明的方法结合使用,包括但不限于眼内注射、全身施用、经口施用、皮下施用、经皮施用、鼻喷雾剂、滴眼剂或接触镜。在一些实施方案中,所述化合物或者其可药用盐或水合物是针对其治疗用途在眼中局部施用(例如玻璃体内注射)或全身施用(例如经口、皮下、经皮或静脉内施用)的药物制剂。优选地,所述化合物或者其可药用盐或水合物通过经口施用而全身施用。

[0106] 在这方面,施用的化合物(或者其可药用盐或水合物)在对象的血浆中的浓度达到50nM至5 $\mu$ M可以是期望的。本文中提供的体外研究表明,当缝隙连接调节剂化合物在RPE细

胞培养基的微环境中达到100nM的目标浓度时观察到了对RPE细胞的最佳作用。另外,在糖尿病大鼠中进行的体内研究支持了:以经选择在视网膜组织中达到100nM的剂量IVT注射 danegaptide还赋予了外视网膜层(包括RPE)的保护作用。举例来说,当通过渗透泵以50至150nM的血浆浓度为目标,或者通过以在玻璃体中更高浓度为目标局部注射到眼中,从而允许浓度梯度朝向视网膜血管时,可实现这些治疗和保护作用。这些数据教导了在视网膜组织(包括RPE)的微环境中待施用的有效剂量达到50至150nM。

[0107] 适合于根据本发明使用的化合物

[0108] 非常适合于根据本发明使用的化合物的一个实例为1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸,例如其(2S,4R)非对映体[即(2S,4R)-1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸],或者其可药用盐或水合物。该化合物的替代名称的一个实例为(2S,4R)-1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰胺基吡咯烷-2-羧酸。

[0109] 后者化合物的其他非对映体(即2S4S、2R4R、2S4R或2R4S非对映体)在本发明的背景下也可具有使用价值。

[0110] 特定形式的该化合物也可称为danegaptide。

[0111] danegaptide的可药用盐包括danegaptide盐酸盐。

[0112] 本文中所述的化合物是缝隙连接依赖性细胞调节剂。在一些实施方案中,所述化合物可抑制RPE(视网膜色素上皮)屏障的功能障碍,包括RPE细胞之间屏障完整性的损失和RPE细胞的损失。在一些实施方案中,所述化合物可抑制眼中视网膜或脉络膜层的功能障碍。在一些实施方案中,所述化合物可抑制视网膜中光感受器的损失。在一些实施方案中,所述化合物可抑制视网膜中的血管渗漏,包括导致黄斑水肿的血管渗漏。在一些实施方案中,所述化合物可通过改善RPE的屏障完整性和功能来改善从视网膜组织的流体再吸收,从而帮助治疗和减轻黄斑水肿。在一些实施方案中,所述化合物可抑制视网膜内皮细胞、脉络膜内皮细胞、周细胞或上皮细胞(包括RPE细胞)的死亡或损失。在一些实施方案中,所述化合物可抑制病理性半通道开启和/或ATP释放,例如连接蛋白43介导的半通道开启和/或ATP释放。半通道开启和/或ATP释放(或其他这样的小的信号传导分子)的病理作用可以是自分泌和旁分泌二者。

[0113] 例如,Squires et al.,2021已表明danegaptide可减少ATP从肾上皮细胞渗漏。Mugisho et al.,2019表明Peptide5(连接蛋白43半通道阻断剂)减少了炎性细胞因子和ATP释放,这可用于治疗炎性疾病,例如AMD和DR。González-Casanova et al.,2021表明增强缝隙连接胞间通讯(GJIC)的连接蛋白半通道阻断剂或药物可用于治疗DR。Subauste,2019研究了CD40-ATP-P2X<sub>7</sub>受体途径并将其与诱导炎性应答和内皮细胞死亡联系起来。Clapp et al.,2019表明在DR和/或AMD中阻断P2X<sub>7</sub>受体的保护作用可能是由于炎性细胞因子释放的抑制和VEGF释放的抑制引起。

[0114] King et al.(2021)的综述公开了不同的Cx43靶向分子,然而这些分子在AMD中的应激条件下不能同时阻断半通道并使缝隙连接稳定。相比之下,本文中公开的化合物(包括danegaptide)具有以下竞争性优势:其在AMD中的应激条件下不仅阻断半通道而且还有效地使缝隙连接依赖性胞间偶联稳定。

[0115] 除了以上列举的化合物之外,可适用于本发明的背景下的另外的化合物包括某些其他缝隙连接调节化合物,例如抗心律失常肽AAP(Aonuma et al.,1980)、AAP10(Dhein et

al.,1994;Muller et al.,1997)、HP5(在美国专利No.4,775,743中公开)和在WO 02/077017、WO 2007/078990或WO 2018/202865中公开的其他抗心律失常肽。

[0116] 应当理解,本文中所述的化合物可组合使用。例如,超过一种的缝隙连接调节剂化合物可以以本文中所述的方法同时或顺序地施用。

#### [0117] 可药用盐

[0118] 具有酸性部分的适合根据本发明使用的化合物的可药用盐可使用有机或无机碱来形成。与碱一起形成的合适的盐包括金属盐,例如碱金属盐或碱土金属盐(例如钠盐、钾盐或镁盐);铵盐和有机胺盐,例如与以下一起形成的盐:吗啉、硫代吗啉、哌啶、吡咯烷、单低级烷基胺、二低级烷基胺或三低级烷基胺(例如,乙基叔丁基胺、二乙基胺、二异丙基胺、三乙基胺、三丁基胺或二甲基丙基胺)、或单羟基低级烷基胺、二羟基低级烷基胺或三羟基低级烷基胺(例如,单乙醇胺、二乙醇胺或三乙醇胺)。还可形成内盐。当适合根据本发明使用的化合物含有碱部分(如在例如1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸及所列举的其非对映体的情况下)时,可使用有机酸或无机酸来形成盐。例如,盐可由以下酸形成:乙酸、丙酸、乳酸、柠檬酸、酒石酸、琥珀酸、富马酸、马来酸、丙二酸、扁桃酸、苹果酸、邻苯二甲酸、盐酸、氢溴酸、磷酸、硝酸、硫酸、甲磺酸、萘磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸或樟脑磺酸。还可使用其他已知的可药用酸。如已经提及的(参见上文),1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸的(2S,4R)非对映体的优选盐形式是盐酸盐一水合物。

[0119] 本发明的教导还可延伸至适合根据本发明使用的本文中所公开化合物的前药的使用。本文中使用的“前药”是指这样的部分:当施用于哺乳动物对象(特别是人对象)时,产生、生成或释放所公开类型之一的化合物。前药可通过以这样的方式修饰化合物中存在的官能团来制备:将修饰通过常规操作或在体内从母体化合物中切割。前药的一些实例包括本文中公开的化合物,其含有一个或多个与化合物的羟基、氨基、巯基或羧基连接(键合)的分子部分,并且当施用于待治疗的对象时,其在体内被切割以分别形成游离的羟基、氨基、巯基或羧基。前药的一些实例包括但不限于根据本发明使用的本文中公开的化合物中的醇和胺官能团的乙酸酯、甲酸酯和苯甲酸酯衍生物。优选前药的一些实例包括咪唑烷酮或咪唑烷酮前药。酯前药可由低级醇例如C<sub>1-6</sub>醇形成。前药的制备和使用在T.Higuchi and V.Stella,“Pro-drugs as Novel Delivery Systems,”Vol.14of the A.C.S.Symposium Series;和Bioreversible Carriers in Drug Design,ed.Edward B.Roche,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,1987中进行讨论。

#### [0120] 药物组合物

[0121] 根据本发明使用的化合物或者其可药用盐或水合物可以以合适的药物组合物的形式施用,其可通过本领域已知的任何可接受的方法单独或组合施用。在本发明上下文中相关的药物组合物可包含与一种或更多种可药用载体、稀释剂、载剂或赋形剂混合的根据本发明使用的本文中公开的化合物。一般而言,根据本发明使用的药物组合物可适用于以滴眼剂、接触镜、鼻喷雾剂,玻璃体内或全身施用所述化合物。

[0122] 可用的制剂可包括提供持续释放本发明教导化合物的制剂。这些可特别用于后续施用(在第一次施用之后)。所述组合物优选为液体制剂的形式,并且其制备方法一般描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”,17th Ed.,Alfonso R.Gennaro(Ed.),Mark Publishing Company,Easton,PA,U.S.A.,1985中。这样的组合物通常包含有效量的一种或

更多种本发明教导的活性化合物以及合适的载体,以便以与所选施用途径相容的形式提供剂量。优选地,所述载体为载剂、稀释剂、缓冲剂、张力调节剂、防腐剂、抑制剂和/或稳定剂的形式。构成载体的赋形剂必须与活性药物成分相容并且优选能够稳定所述化合物而对治疗的对象无害。

[0123] 可使用储库或持续释放制剂的形式,使得在施用化合物或组合物(例如,通过经皮注射或沉积)之后数小时或数天内将治疗有效量的制剂递送到血流中。适用于持续释放的制剂可包含可生物降解聚合物,例如L-乳酸、D-乳酸、DL-乳酸、乙交酯、乙醇酸、及其异构体。类似地,载体或稀释剂可包含本领域已知的任何持续释放材料,例如单独的或与蜡混合的单硬脂酸甘油酯或二硬脂酸甘油酯。

[0124] 另一些持续释放制剂可包括但不限于这样的制剂,其包含与脂质体、微球、乳剂或胶束和液体稳定剂组合的本文中所公开化合物中的至少一种。

[0125] 根据本发明的化合物(或者其可药用盐或水合物)的施用可以以单个单位剂型(例如,以丸剂的形式),或者作为随时间推移的多剂量形式的连续治疗进行。或者,可使用连续输注系统或缓慢释放贮库制剂。根据本发明使用的两种或更多种化合物(或其药物组合物)可同时或以任何顺序顺序地共施用。另外,化合物和组合物可以以类似的方式施用用于预防性目的,例如在糖尿病患者或具有玻璃疣沉积物的患者被认为处于发生AMD或AMD恶化或与AMD相关的黄斑水肿的风险之中时。最终,最佳给药方案将由主治医师为每位患者单独决定。

#### [0126] 治疗用途

[0127] 根据本发明使用本文中指定的化合物可治疗或预防的病症包括年龄相关性黄斑变性(AMD),尤其是在人对象中。

[0128] 根据本发明,一种或更多种所述化合物或者其可药用盐或水合物(例如,以合适的药物组合物的形式)可以以治疗有效量施用于有此需要的个体。

[0129] 本文中使用的“治疗有效量”是指能够减轻眼中的给定神经血管病症或病理状况的症状的量,并且优选能够部分或完全使具有所述病症或病理状况的对象中的生理响应正常化的量。症状的减轻或生理响应的正常化可使用本领域已知的方法来确定,并且可随着给定的病症或病理状况而变化。有效量将由技术人员考虑这样的因素如药物的效力、患者的年龄和体质、体重、药物的药代动力学谱来确定,并且该药物一般而言将针对每位患者或每组患者开具处方。

[0130] 化合物的有效量可以为至少约10 $\mu$ g/kg体重/天,例如至少约100 $\mu$ g/kg体重/天,至少约300 $\mu$ g/kg体重/天,并且至少约1000 $\mu$ g/kg体重/天。在另一个方面中,化合物或二聚体的有效量可以为至多约100mg/kg体重/天,例如至多约50mg/kg体重/天,并且至多约10mg/kg体重/天。预期化合物的有效量将为约100 $\mu$ g/kg体重/天、约300 $\mu$ g/kg体重/天或约1000 $\mu$ g/kg体重。

[0131] 本文中所述的体外系统中提供的实验在体外系统中进行的给药结果(细胞偶联测定/SLDT)表明,在微环境中浓度为50至150nM最佳,并且体内初步研究(pilot study)表明,当目标为在眼的微环境中100nM时,1000nM注射优于200nM注射。

[0132] 在一些实施方案中,所述化合物每日一次或两次施用于患者,这有时分别被称为QD(quaque die,每日一次)或BID(bis in die,每日两次)。在其中所述化合物每日两次

(BID)施用于患者的一些实施方案中,剂量为每次施用约75mg/kg。在一些实施方案中,所述化合物每日四次施用于患者,这有时被称为QID(quarter in die,每日四次)。在其中所述化合物每日四次(QID)施用于患者的一些实施方案中,剂量为每次施用约75mg/kg至约125mg/kg。

[0133] 实验例

[0134] 缝隙连接和半通道调节剂化合物

[0135] 根据本发明使用的化合物(肽)可适当地通过固相或溶液相合成的方式来合成。在这种情况下,可参考例如Fields et al.,“Principles and practice of solid-phase peptide synthesis”,Synthetic Peptides(2002,第2版)。

[0136] 关于1-(2-氨基乙酰基)-4-苯甲酰基氨基-吡咯烷-2-羧酸(例如其(2S,4R)非对映体)的制备、其合适的合成和纯化方法描述于WO 2007/078990中,其中(2S,4R)异构体表示为“化合物2”(WO 2007/078990通过引用以其整体并入)。

[0137] (2S,4R)非对映体的可用盐形式的一个实例是盐酸盐一水合物,其制备描述于WO 2008/079266中,并且其在本说明书中也称为化合物X(WO 2008/079266通过引用以其整体并入)。

[0138] 体外研究——图1和2

[0139] 细胞系和细胞培养

[0140] 使用人视网膜色素上皮细胞(ARPE-19,CRL-2302<sup>TM</sup>,American Tissue Type Collection,ATTC,Manassas,VA)。根据供应商说明对细胞进行传代和维持。简言之,将细胞在含有1.2g/L碳酸氢钠、2.5mM L-谷氨酰胺、15mM HEPES和0.5mM丙酮酸钠以及终浓度为10%的胎牛血清的Dulbecco改良Eagle培养基与Ham's F12培养基的1:1混合物中培养,并在37°C下在5% CO<sub>2</sub>/95%湿度的气氛中培养。对细胞培养物补充了终浓度为100U/ml的青霉素/链霉素。

[0141] 将细胞维持在T25和T75组织培养瓶(TPP Techno Plastic Products AG,Trasadingen,Switzerland)中。对于实验,将细胞接种在transwell插入物(150,000至260,000个细胞/孔;具有0.4μm孔聚酯膜插入物的12mm **Transwell**®,Corning,Corning,NY)或多室载片(100,000个细胞/孔;**Nunc**® Lab-Tek IT 8孔室载片,Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)中。

[0142] 渗透性研究

[0143] 对于渗透性实验,使ARPE-19细胞在transwell插入物中生长至汇合持续48至72小时。然后将细胞用Danegaptide(DGP;100nM;溶解于盐水)或载剂对照预处理24小时。随后,在持续存在100nM DGP或载剂的情况下用亚致死性氧化应激(250uM叔丁基过氧化氢;Millipore Sigma,St.Louis,MO)和高血糖(30mM葡萄糖;Millipore Sigma,St.Louis,MO)的组合攻击细胞48小时。

[0144] 为评估渗透性,分别对低渗透性和高渗透性染料6-羧基荧光素(6-CF;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)和罗丹明B(RhoB;Thermo Fisher Scientific,Waltham,MA)从顶端至基底侧的移动进行定量。为此,将稀释在汉克平衡盐溶液(Hank's Balanced Salt Solution,HBSS,Corning,Corning,NY)中的染料添加至细胞的顶端区室(顶部插入物,供体室;6-CF:100μM,RhoB:50μM)。以固定间隔(10、20、30、45、60、90和120分钟)从基底

侧区室(底部孔,接收室)收集样品(100 $\mu$ l)。将取样体积替换为新鲜缓冲液。

[0145] 使用利用微板读出器(Cytation5,Agilent,Santa Clara,CA)建立的标准曲线(0至10 $\mu$ M)计算6-CF和RhoB的累积浓度,在最终计算中考虑移出的和用培养基替换的体积。使用激发490nm/发射520nm对6-CF进行定量,而使用激发533nm/发射627nm对RhoB进行定量。参见图1。

[0146] 紧密连接组织的定量

[0147] 对于免疫细胞化学,使ARPE-19细胞在室载片中生长至汇合持续72小时。然后将细胞用Danegaptide(DGP;100nM)或载剂对照预处理24小时。随后,在持续存在100nM DGP或载剂的情况下用亚致死性氧化应激(250 $\mu$ M叔丁基过氧化氢;Millipore Sigma,St.Louis,MO)和高血糖(30mM葡萄糖;Millipore Sigma,St.Louis,MO)的组合攻击细胞48小时。

[0148] 将细胞用4%多聚甲醛固定15分钟,并随后在封闭溶液(pH 7.4的0.1M磷酸盐缓冲液中10%正常山羊血清、1%牛血清白蛋白、0.5% Triton X-100)中封闭和透化。将细胞在室温下用抗体溶液(pH 7.4的0.1M磷酸盐缓冲液中3%正常山羊血清、1%牛血清白蛋白、0.5% Triton X-100、0.05%叠氮化钠)中的抗ZO-1抗体(小鼠抗人ZO-1,1 $\mu$ g/ml,目录号339100,Invitrogen,Thermo Fisher Scientific,Carlsbad,CA)标记2小时。在磷酸缓冲盐水中洗涤3 $\times$ 之后,将细胞在室温下用荧光缀合的山羊抗小鼠IgG(H+L)交叉吸收的二抗(AlexaFluor<sup>®</sup>488,1:2,000稀释)标记1小时。将核用0.1 $\mu$ g/ml 4',6-二脒基-2-苯基吲哚二盐酸盐(DAPI,Sigma-Aldrich)进行共标记染色并用磷酸缓冲盐水洗涤。使用Aqua/Poly-Mount(Polysciences,Inc.,Warrington,PA)对室载片进行盖玻片处理。使用Leica SPE共聚焦显微镜(Leica Microsystems,Buffalo Grove,IL)获取图像。参见图2。

[0149] 数据分析

[0150] 根据以下方程(Ziniauskaitė et al.,2019)计算表观渗透系数( $P_{app}$ ,cm/秒):

$$[0151] \quad P_{app} = \frac{\Delta Qr/\Delta t}{A \times C_d}$$

[0152] 其中:

[0153]  $\Delta Qr/\Delta t$ =接收室中研究化合物的累积量相对于时间的图的线性区域的斜率

[0154]  $C_d$ =研究化合物的初始供体浓度

[0155] A=表面积

[0156] 参见图1。

[0157] 根据共聚焦图像计算紧密连接组织率(TiJOR),如先前所描述的(Terryn et al.,2013)。参见图2。

[0158] 在Prism 9(GraphPad,Inc.,La Jolla,CA)中绘制和分析数据。数据以平均值 $\pm$ S.E.M.表示,其中每个数据点代表单独的实验条件。使用单因素ANOVA(组分析)与Holm-Šidák多重比较检验一起来分析数据。

[0159] 体内研究——图3至11

[0160] 动物

[0161] 所有动物均根据在眼科和视力研究中动物使用的ARVO声明(欧洲议会和理事会关于保护用于科学目的动物的EC指令2010/63/EU)以及使用由芬兰的动物实验委员会(动物

许可证编号ESAVI-9520-2020)批准和监督的方案处理。

[0162] 对于这些动物研究,在诱导的时间将9至10周龄的棕色挪威大鼠(品系:BN/Cr1大鼠;Charles River Laboratories,Germany)安置在具有充足的白杨垫料(aspen bedding)、筑巢材料(Populus tremula, Tapvei®, Estonia OÜ)和聚碳酸酯红色管(Datesand group)的单独通风的笼中,在恒定温度( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ )、相对湿度( $50 \pm 10\%$ )下以及在暗光控制的环境(光照从7am至7pm)中随意获取食物(大鼠/小鼠维持V1534-000,ssniff Spezialdiäten GmbH)和自来水。在动物饲养所中进行一周的隔离和适应之后开始实验。

[0163] 将所有动物的体重在基线处监测并在整个研究期间每周两次监测。

[0164] 每天进行动物健康检查(welfare check)。若鉴定出动物有健康问题,在监督兽医连同研究负责人的指导下提供医疗护理。

[0165] 为防止诱导之后过度体重减轻,每天为大鼠提供湿饲料(与自来水水合的定期饲料)和支持性饲料(固体饮品——Diet Bio Cup, Triple A Trading)。体重减轻超过15%的动物采用每天的皮下(subcutaneous, s.c.)注射(Ringer-Lactat Animalcare, Ecuphar NV)接受额外的水合。用利多卡因(lidocaine)盐酸盐一水合物(2%, Xylocain, AstraZeneca)治疗嵌顿包茎和尿潴留。出现了小的皮肤感染,并将其用夫西地酸(1%, Isathal®, Dechra)进行治疗。

[0166] 在研究期间未对动物使用其他医学治疗。

[0167] 在目前的研究中使用了总共111只大鼠。在这些中,将28只大鼠在终点之前处死,这是由于多种健康问题,主要由于严重的体重减轻(相对于基线 $>25\%$ ),如通常在经STZ处理的糖尿病棕色挪威大鼠中观察到的。基于葡萄糖水平和眼部健康将动物随机化成处理组。在研究结束时(第9周),研究中包含了总共83只大鼠,分布在五个处理组中:

[0168] 组1:用于组织取样的原初( $n=18$ );

[0169] 组2:STZ+载剂( $n=15$ );

[0170] 组3:STZ+AF564(或抗VEGF)( $n=17$ );

[0171] 组4:STZ+Danegaptide( $n=17$ );

[0172] 组5:STZ+AF564(或抗VEGF)+Danegaptide( $n=16$ )。

[0173] 麻醉和逆转

[0174] 对于所有程序,通过皮下注射包含氯胺酮( $30\text{mg}/\text{kg}$ ;Ketaminol vet  $50\text{mg}/\text{ml}$ , Intervet)和美托咪定(medetomidine)盐酸盐( $0.2\text{mg}/\text{kg}$ ;Cepetor vet  $1\text{mg}/\text{ml}$ ;CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH)的混合物来麻醉大鼠。通过用于美托咪定的 $\alpha_2$ 拮抗剂,阿替美唑(medetomidine)( $1.0\text{mg}/\text{kg}$ ;Revertor™,  $5\text{mg}/\text{mL}$ ;CP-Pharma Handelsgesellschaft mbH)来逆转麻醉。将所有麻醉试剂稀释成生理盐水溶液中的工作储备物以使得能够给药。在麻醉恢复期间施用乳酸林格氏液(Ringer's Lactate solution)以防止脱水。

[0175] 糖尿病性视网膜病变诱导和血糖测量

[0176] 在诱导之前将动物称重,并且用快速仪(rapid meter)(AlphaTRAK 2;Zoetis)测量血糖。在诱导之前使大鼠禁食四小时。

[0177] 通过单剂的在pH 4.5, 10mM柠檬酸钠缓冲液中的链脲霉素(STZ;  $65\text{mg}/\text{kg}$ , Sigma)来在棕色挪威大鼠(9至10周龄)中诱导糖尿病。在STZ注射之后,将大鼠置于它们的笼中48

小时,随意获取食物和自来水中的10% (w/v) 蔗糖溶液。次日早晨,向所有经诱导的大鼠腹膜内注射或皮下注射5%葡萄糖(1ml)。在第一次STZ注射之后的四天,通过从隐静脉测量血糖水平来监测诱导的成功。当由快速仪测量的血糖值等于或高于16mmol/l (288mg/dl)时,则认为糖尿病的诱导成功。在第一次STZ注射之后96小时基于该标准未得糖尿病的动物接受第二次STZ注射。

[0178] 监测选定大鼠的血糖水平和动物健康持续6周,并随后以每周玻璃体内(intravitreal, IVT)注射载剂或测试化合物持续三周进行处理,每只动物每个眼总共3×IVT眼注射。

[0179] 在整个随访时间段期间每周监测血糖水平。在血糖测量值落在快速仪的范围之外(>41.7mmol/l)的情况下,收集血浆样品并使用比色测定(大鼠葡萄糖测定试剂盒(Rat Glucose Assay Kit), Crystal Chem)进行分析。参见图3A。

[0180] 在诱导DR之后五和九周收集用于糖化血红蛋白(HbA1c)测量的血浆样品。使用商业比浊免疫测定(Konelab Prime 60i; Thermo Scientific)测量HbA1c。参见图3B。

[0181] 测试溶液的制备

[0182] 载剂溶液

[0183] 如下制备含有D-甘露糖醇和柠檬酸三钠二水合物的载剂溶液:

[0184]

项目	浓度	单位	名称	量
1	50	mg/ml	D-甘露糖醇	50.00g
2	0.71	mg/ml	柠檬酸三钠二水合物	710mg
3	q.s.	-	氢氧化钠	q.s.
4	q.s.	-	盐酸	q.s.
5	-	-	注射用水	填充至1000ml*

[0185] (\*) 密度:1.079g/ml, 如果与制备程序相关。

[0186] 将无菌溶液等分在15ml falcon管中,将另外两份0.5ml的样品储存在标准amber管中作为保留样品。将所有等分试样在+4℃下避光储存。

[0187] Danegaptide溶液

[0188] 在给药的第一天开始每周如下制备0.3mg/ml Danegaptide储备溶液。

[0189]

项目	浓度	单位	名称	量
1	0.3	mg/ml	Danegaptide <sup>#</sup>	

[0190]

2	-	-	柠檬酸三钠二水合物	
3	q.s.	-	氢氧化钠	q.s.
4	q.s.	-	盐酸	q.s.
5	-	-	注射用水	填充至 20.0 ml

[0191] (<sup>#</sup>) 作为HCl盐/一水合物提供,可接受的重量范围[6.94至7.34]mg距离目标值约±3%

[0192] (2.8) %

[0193] 将两个0.5ml的等分试样储存在标准amber管中作为保留样品。其余的溶液用于制

备该周(待在两天内施用)的给药溶液。将储备溶液和等分试样在+4℃下避光储存。

[0194] 0.3mg/ml Danegaptide储备溶液将如下稀释至9μg/ml。

制备	
[0195]	1.00 ml 的 Danegaptide 储备溶液 (0.3 mg/ml)
	32.3 ml 的载剂制剂
	33.3 ml

[0196] 将两个0.5ml的等分试样储存在标准amber管中作为保留样品。将等分试样在+4℃下避光储存。将9μg/ml Danegaptide溶液进一步用于如下制备0.3μg/ml工作溶液,并丢弃剩余物。

制备	
[0197]	0.700 ml 的 Danegaptide 储备溶液 (9.0 μg/ml)
	20.3 ml 的载剂制剂
	21.0 ml 的 Danegaptide 0.3 μg/ml 给药制剂

[0198] 将两个0.5ml的等分试样储存在标准amber管中作为保留样品。将等分试样在+4℃下避光储存。每天丢弃来自工作溶液的剩余物。

[0199] 将9μg/ml Danegaptide溶液进一步用于制备0.6μg/ml溶液,所述溶液用来制备用于组“STZ+AF564+Danegaptide”(参见例如,图3B、4、5C、9B和10B)、“STZ+抗VEGF+Danegaptide”(参见例如,图5B)或“STZ+AF564+Dgp”(参见例如,图7E至H和8E至H)的处理。

制备	
[0200]	0.670 ml 的 Danegaptide 储备溶液 (9.0 μg/ml)
	9.330 ml 的载剂制剂
	10.0 ml 的 Danegaptide 0.6 μg/ml 给药制剂

[0201] 将两个0.5ml的等分试样储存在标准amber管中作为保留样品。将等分试样在+4℃下避光储存。每天丢弃来自工作溶液的剩余物。

[0202] 大鼠VEGF抗体(AF564)溶液

[0203] 为了施用抗VEGF治疗(图3B、4、5C、7E至H、8E至H、9B和10B中的“STZ+AF564”或图5B中的“STZ+抗VEGF”),将大鼠抗VEGF抗体(AF564;R&D Systems)以0.675mg/ml的浓度溶解在载剂溶液中。将一个小瓶的100μg抗体溶解在150μl的载剂溶液中以制备给药溶液。

[0204] 为了共施用Danegaptide和抗VEGF抗体(图3B、4、5C、9B和10B中的“STZ+AF564+Danegaptide”;图5B中的“STZ+抗VEGF+Danegaptide”;或图7E至H和8E至H中的“STZ+AF564+Dgp”),将一个小瓶的抗体(100μg)溶解在75μl的载剂中以制备2×AF564储备溶液并随后与等体积的Danegaptide的2×工作储备物(0.6μg/ml)组合,以实现给药溶液中0.675mg/ml AF564抗体和0.3μg/ml Danegaptide的终浓度。

[0205] 通过玻璃体内注射将五微升的给药溶液递送至大鼠眼。大鼠眼含有约20至25μl的

玻璃体液。因此,递送5 $\mu$ l的测试品导致稀释至眼中抗VEGF抗体的终浓度为0.135至0.1125mg/ml,与0.125mg/ml的人临床剂量类似,根据Filek et al.2019。

[0206] 玻璃体内 (IVT) 处理

[0207] 对于IVT处理施用,动物为经麻醉动物,将动物置于体视镜(Leica Microsystems)下,并且将碘滴施加在角膜上并使其均匀铺展(Minims Povidone Iodine 5%,Bausch&Lomb)。在角膜缘附近使用30G针在脉络膜中做暴露玻璃体腔的小切口。使用附有33G针(Hamilton Bonaduz AG,Bonaduz)的微量注射器将化合物注射到玻璃体内空间中。将测试溶液注射到玻璃体内空间中10秒,将针保持在原位持续另外30秒之后移出以避免化合物回流。在注射之后施加氯霉素软膏(Oftan Chlora,Santen Oy)。在STZ诱导之后的第六、七和八周,通过双侧玻璃体内施用5 $\mu$ l的体积来三次施用不同的处理。

[0208] 体内成像

[0209] 发生糖尿病性视网膜病变和相关的血管渗漏之后,在DR诱导之后第九周进行谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)。对研究动物的子集(每个处理组9至14只)进行体内成像分析。除了体内成像之外,在诱导之后第六、七、八和九周评价所有动物的糖尿病性白内障的发展。

[0210] 谱域光学相干断层扫描(SD-OCT)

[0211] 在第九周用SD-OCT(Envisu R2200.Bioptigen Inc./Leica Microsystems)视网膜扫描对经麻醉大鼠进行成像,如图5C所示。扫描的区域覆盖了以视神经为中心的2.4 $\times$ 2.4mm<sup>2</sup>的视网膜。每次扫描由100次B扫描构成,每次B扫描由1000次A扫描构成。在DR诱导之后第九周,在处死和取样之前,对双眼进行SD-OCT。

[0212] 使用迁移学习方法通过基于U-net体系结构的卷积神经网络来分析第九周的视网膜厚度。所得分割掩模用于测量每个像素宽度列中的层厚度,即a扫描,导致每一次b扫描的每层有1000个测量点。在计算中仅使用通过自动质量控制标准集的测量点。厚度结果表示为内视网膜(包含神经节细胞层、内丛状层和内核层);以及外视网膜(包含外丛状层、外核层、内段和外段、和RPE/脉络膜)的SD-OCT测量值。通过计算每次扫描的所有测量值的平均值或通过颞上、鼻上、颞下和鼻下区域进行亚分析来获得视网膜厚度测量值,例如视网膜厚度测量值的变化(示出这些眼区域的示意图参见图6)。SD-OCT的结果参见图5、7和8。

[0213] 动物处死和组织收集

[0214] 不从在研究终点之前发现死亡或被处死的动物中收集样品。

[0215] 用于视网膜脉管系统分析的样品

[0216] 在终点,通过过量麻醉处死每个处理组的六只大鼠,并经心脏灌注0.9% NaCl溶液(10ml/分钟持续3分钟,120S/DV人工控制变速泵,Watson-Marlow泵)。将眼(n=12)摘除并标记方向并置于4% PFS中,然后制备视网膜平封片。

[0217] 伊文思蓝视网膜渗漏测量

[0218] 在处死之前,将每个处理组的五只大鼠在尾静脉中静脉内注射4%伊文思蓝溶液(100 $\mu$ l/100g)。2小时之后,收集血浆样品,并将动物以10ml/分钟的流量经心脏灌注生理盐水溶液30分钟(120S/DV人工控制变速泵)。将眼(n=10)摘除,将视网膜切下并快速冷冻并储存在-80 $^{\circ}$ C下,直至分析伊文思蓝外渗。结果参见图9。

[0219] 组织处理

[0220] PAS组织学染色及无细胞毛细管和周细胞分析

[0221] 将视网膜平封片经胰蛋白酶消化以分离视网膜脉管系统,并使用高碘酸-希夫(Periodic Acid-Schiff,PAS)进行染色。简言之,将视网膜平封片置于蒸馏水中过夜并用0.1M Tris-HCl缓冲液(pH 7.8)中的4%胰蛋白酶在+37°C下孵育1.5小时。用蒸馏水小心地洗涤样品以将视网膜细胞层从脉管系统分离。将血管平封片在显微镜载片上干燥并处理用于PAS染色。将样品氧化,用dH<sub>2</sub>O冲洗,置于席夫试剂(Schiff's reagent)中,洗涤,用苏木精复染,用酸醇分化,脱水,并用Depex封固。

[0222] 使用Leica Thunder 3D组织成像仪(Leica Microsystems)获取从视网膜脉管系统的中心区域和外周区域获得的四至六个单独的图像。无细胞毛细管的数目、周细胞的数目和周细胞血影的数目由对实验组分配不知情的研究者人工计数。

[0223] 每组数据点的数目如下:原初(n=67),STZ+载剂(n=59),STZ+AF564(n=45),STZ+Danegaptide(n=58),STZ+AF564+Danegaptide(n=61)。

[0224] 代表性PAS图像参见图11,并且结果参见图10。

[0225] 伊文思蓝视网膜外渗测量

[0226] 将视网膜在甲酰胺中以1:10的比例(w/v)均质化,并在+70°下孵育过夜。将匀浆以20,800×g离心45分钟,并将上清液转移到干净的管中。将30μl的上清液一式三份地吸移到384孔板中。使用读板仪(Cytation 3,BioTek Instruments Inc.,Winooski,VT)测量样品的吸光度( $\lambda=620\text{nm}$ ),并且针对伊文思蓝的标准曲线计算每个样品中伊文思蓝的浓度并将其相对于组织重量归一化。结果参见图9。

[0227] 数据分析

[0228] 将定量数据进行作图、分析并表示为平均值±标准偏差(standard deviation,SD)或标准误差(SEM),如所指出的。评估正态性,并且如有需要,对数据进行对数转换以实现高斯分布。使用ROUT方法(Q系数为1%)识别异常值。在 $p<0.05$ 水平的差异被认为是统计学上显著的。使用GraphPad Prism软件(v9.1.2.GraphPad Inc.,La Jolla,CA)使用所指出的合适的统计学检验来分析数据。

[0229] 结果

[0230] 实验研究的结果示于图1至11中。

[0231] 图1:Danegaptide在降低受到应激的人视网膜色素上皮细胞单层中的渗透性时防止所介导的DR和AMD模拟损伤。

[0232] 将transwell板中的人视网膜上皮细胞(ARPE-19)的汇合单层用载剂(完全培养基)或danegaptide(DGP,100nM)处理24小时。随后,将培养基用以下替换:(i)载剂(完全培养基;图1A和1B,左列“-,-”);(ii)补充有30mM的高葡萄糖(高血糖应激)和亚致死浓度为200μM的叔丁基过氧化氢(tert-butyl hydroperoxide,tBHP)(氧化应激)的培养基(图1A和1B,中间列,+,-);或(iii)补充有30mM葡萄糖、亚致死浓度的叔丁基过氧化氢(tBHP,200μM)加100nM danegaptide的培养基(图1A和1B,右列,+,+);并孵育48小时的时间段。

[0233] 30mM高葡萄糖(高血糖应激)和氧化应激的组合引起RPE屏障功能障碍和跨RPE单层渗透性提高,如使用两种荧光渗透性标志物6-羧基荧光素(6-CF;图1A)或罗丹明B(RhoB;图1B)所示。通过在将渗透性标志物添加至transwell室插入物和RPE单层的顶端侧之后10、20、30、45、60、90和120分钟取得样品并测量存在于transwell板的底部室和RPE单层的基底

侧的渗透性标志物的外排量或量,来测量由于高血糖和氧化应激条件引起的RPE单层渗透性的提高以及danegaptide的保护。

[0234] 通过基于使用微板读出器(Cytation5,Agilent,Santa Clara,CA)建立的标准曲线测量荧光信号量来计算存在于底部室中的6-CF和RhoB的累积浓度。细胞旁渗透性的量被定量为表观渗透系数( $P_{app}$ ),并通过确定稳态通量来计算。高血糖和氧化应激的DR和AMD模拟损伤显著提高了6-CF和RhoB( $n=6$ 至8)二者跨RPE单层的渗透性(图1A和1B,中间列,“+,-”;与左列对照“-,-”相比),并且用100mM的danegaptide处理完全阻止了由这些RPE屏障应激物引起的该渗透性提高( $n=6$ 至8)(图1A和1B,右列,“+,+”)。

[0235] 图2:Danegaptide在受到应激的单层人视网膜色素上皮细胞之间通过改善细胞-细胞偶联和改善紧密连接组织率(TiJOR)来防止所介导的DR和AMD模拟损伤。

[0236] 将人视网膜上皮细胞(ARPE-19)接种并培养在显微镜室载片中,并使其生长至汇合以形成紧密的单层,如通过在载剂(完全培养基)或danegaptide(DGP,100nM)处理条件下进行24小时的RPE细胞-细胞偶联所显现的。随后,将培养基用以下替换:(i)载剂(完全培养基;图2A,左列“-,-”;图2B,左图);(ii)补充有30mM葡萄糖(高血糖应激)和亚致死浓度的叔丁基过氧化氢(tBHP,200 $\mu$ M)(氧化应激)的培养基(图2A,中间列“+,-”;图2B,中间图);或(iii)补充有30mM葡萄糖、亚致死浓度的叔丁基过氧化氢(tBHP,200 $\mu$ M)加100nM Danegaptide的培养基(图2A,右列“+,+”;图2B,右图);并孵育48小时的时间段。结果在图2的顶部图(图2A)中示出。

[0237] 通过使用抗闭锁小带蛋白1(ZO-1)免疫染色的免疫细胞化学来评估紧密连接组织(图2的底部图;即图2B),所述抗闭锁小带蛋白1是紧密连接的主要组分,其结合缝隙连接跨膜蛋白(Cx43)和TJ跨膜蛋白(闭合蛋白和密封蛋白)二者的胞质结构域。紧密连接组织指数(TiJOR)根据Terryn et al.,2013计算并测量TJ依赖性细胞-细胞偶联的程度。高血糖和氧化应激的DR和AMD模拟损伤显著降低了TiJOR( $n=13$ 至16)。用100nM的danegaptide的处理完全阻止了该紧密连接组织损失( $n=13$ 至16)和RPE细胞-细胞解偶联,这与danegaptide阻止由这些高血糖和氧化细胞应激物的组合引起的RPE屏障功能障碍和病理性RPE细胞旁渗透性的能力相关。

[0238] 高葡萄糖和氧化应激(即,细胞应激)导致紧密连接紊乱(即,降低的TiJOR)和细胞-细胞偶联的破坏。这些结果表明Danegaptide可阻止这种在应激条件下的细胞解偶联。即danegaptide可改善TiJOR和维持受到应激的RPE细胞之间的细胞-细胞偶联。

[0239] 图3:体内研究期间的血糖水平(mmol/l)和血糖化血红蛋白(HbA1C)水平(mmol/mol)。

[0240] 在所有动物中用STZ进行DR诱导之后,每隔一周通过快速仪测量血糖水平。在快速仪上的读出超出范围的那些情况下,收集另外的血浆样品并使用荧光光度测定方法进行测量。与原初组相比,到诱导之后的第四天,血糖水平显著提高(双因素ANOVA, $p<0.001$ )(图3A)。

[0241] 在研究第35天,糖化血红蛋白(HbA1C)水平显著提高,并在研究结束时(第60天)保持相似的水平(双因素ANOVA, $p<0.001$ )(图3B)。图4:体内研究期间的白内障评分。

[0242] 出现高血糖诱导的白内障是STZ模型的常见表型,并在测试品施用当天和研究期结束时进行评分。从0(正常晶状体)至3(当混浊覆盖超过75%的晶状体时)对白内障表现进

行评分。原初动物在研究期间的任何时间点都不具有任何白内障或混浊。在IVT施用之后的整个研究中,多个STZ诱导组显示出相似程度的白内障,其中轻度白内障在第42天出现,其变得更加严重,到第60天达到中度严重(图4)。然而,STZ处理组之间的白内障无显著差异。

[0243] 图5:Danegaptide在STZ诱导之后患有DR的大鼠中防止外视网膜增厚。

[0244] 在棕色挪威大鼠中经STZ诱导的DR的早期阶段期间通常观察到外视网膜厚度的增加。尽管绝对增加很小,通常在3%至5%的范围内,但使用SD-OCT的最先进的体内成像可显示出这些生物学相关的差异,这些差异指示水肿或细胞肿胀,从而指示外血视网膜屏障受损。

[0245] SD-OCT扫描在采样之前第九周进行。视网膜扫描是分段的,并且厚度通过卷积神经网络算法进行分析。

[0246] 从来自24个位置的SD-OCT图像中量化外视网膜厚度,以生成外视网膜厚度的平均厚度。使用GROUT方法(Q=1%)去除异常值,导致去除总共5个异常值(原初:0;STZ+载剂:1;STZ+AF564:1;STZ+Danegaptide:1;STZ+AF564+Danegaptide:2)。当检验正态性时,SD-OCT数据显示出正态分布。

[0247] 棕色挪威大鼠中的链脲霉素(STZ)诱导导致高血糖、DR,以及在9周诱导之后,与未接受STZ诱导并患有DR的原初动物( $119.8 \pm 0.5 \mu\text{m}$ ;  $n=16$ ; t检验 $p<0.01$ )相比,STZ+载剂( $123.8 \pm 0.9 \mu\text{m}$ ;  $n=21$ ; t检验 $p<0.01$ )视网膜中外视网膜厚度的统计学上显著增加,如通过对外丛状层、外核层、内段和外段、以及RPE/脉络膜层进行SD-OCT成像以及用神经网络算法对它们的变化进行量化所测量的(图5A)。

[0248] 以眼中100nM的danegaptide为目标通过局部玻璃体内(IVT)眼注射进行的danegaptide处理,持续三周的每周处理防止了外视网膜厚度的这种增加( $119.7 \pm 0.8 \mu\text{m}$ ;  $n=27$ ;  $p<0.05$ ),如由SD-OCT成像测量的;而用抗VEGF化合物(AF564;  $122.7 \pm 1.2 \mu\text{m}$ ;  $n=25$ ;  $p=0.60$ )的处理和抗VEGF+danegaptide注射处理( $122.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ;  $n=17$ ;  $p=0.60$ )没有保护作用(图5B)。oBRB的病理性增厚由RPE屏障功能障碍引起,并且这是DME和AMD的标志。danegaptide在这些患有DR的糖尿病大鼠中防止外视网膜层这种增厚的能力表明danegaptide可作为用于AMD以及DR和DME(如先前所示)的有效治疗。

[0249] 在STZ诱导之后九周来自左和右眼的外视网膜厚度的代表性SD-OCT扫描在图5C中示出。

[0250] 不希望受理论的束缚,本发明人认为由STZ诱导引起的外视网膜厚度的增加表明细胞肿胀是细胞应激的结果。认为这是由于Cx43半通道开启引起的,这将允许水渗透到细胞中。Danegaptide可关闭Cx43半通道,因此保护对象免于细胞肿胀并从而免于外视网膜层增厚。

[0251] 图7:Danegaptide防止整个视网膜的外视网膜增厚。

[0252] 对视网膜的不同区域,特别是鼻上(SN)、颞上(ST)、鼻下(IN)和颞下(IT)(位置参见图6)的外视网膜厚度进行分析,其中每次测量涉及8个位置(图7和表1)。

[0253] 表1. 每个处理组和象限的外视网膜厚度的平均值(以 $\mu\text{m}$ 计)

	ST	SN	IT	IN
原初	123.99	120.83	121.62	118.56
<b>STZ + 载剂</b>	<b>126.95</b>	<b>125.40</b>	<b>127.44</b>	<b>126.09</b>
<b>STZ + AF564</b>	<b>123.85</b>	<b>123.49</b>	<b>126.55</b>	<b>123.62</b>
<b>STZ + Danegaptide</b>	<b>118.14</b>	<b>117.36</b>	<b>123.61</b>	<b>121.17</b>
<b>STZ + AF564 + Danegaptide</b>	<b>124.33</b>	<b>123.45</b>	<b>126.39</b>	<b>123.25</b>

[0254] 在所有区域中,与原初大鼠相比,经STZ+载剂处理的大鼠的外视网膜厚度在统计学上显著增加(图7A至D;还参见表1“STZ+载剂”与“原初”相比)。Danegaptide防止了所有区域中外视网膜的增厚(图7E至H;还参见表1“STZ+Danegaptide”与“STZ+载剂”相比)。

[0255] 图8. 内(和总)视网膜厚度的区域分析。

[0256] SD-OCT扫描在采样之前第九周进行。视网膜扫描是分段的并且厚度通过卷积神经网络算法进行分析。根据区域分析内视网膜厚度(图8)。分析的区域为鼻上(SN)、颞上(ST)、鼻下(IN)和颞下(IT)(位置参见图6)。

[0257] 与原初动物相比,经STZ诱导的眼中视网膜显著变薄(图8A至D)。然而,在处理组之间未鉴定出统计学上显著的差异(图8E至H)。

[0258] 在STZ动物中的总视网膜厚度的分析因内视网膜厚度减少和伴随的外视网膜厚度增加而混淆,并因此通常不能提供足够的颗粒度来剖析治疗的药理作用。总视网膜厚度测量值汇总于表2中。

[0259] 表2. 从SD-OCT图像中定量的区域的总视网膜厚度(以 $\mu\text{m}$ 计)

	整个视网膜	ST	SN	IT	IN
--	-------	----	----	----	----

原初	215 ± 0.6	220 ± 0.7	214 ± 0.7	217 ± 0.7	209 ± 0.8
<b>STZ + 载剂</b>	<b>215 ± 1.8</b>	<b>218 ± 3.6</b>	<b>211 ± 3.5</b>	<b>221 ± 1.8</b>	<b>210 ± 2.3</b>
<b>STZ + AF564</b>	<b>213 ± 2.0</b>	<b>218 ± 2.6</b>	<b>211 ± 2.6</b>	<b>219 ± 2.0</b>	<b>210 ± 2.6</b>
<b>STZ + Danegaptide</b>	<b>212 ± 2.2</b>	<b>210 ± 2.6</b>	<b>205 ± 1.9</b>	<b>217 ± 1.6</b>	<b>206 ± 1.8</b>
<b>STZ + AF564 + Danegaptide</b>	<b>207 ± 2.3</b>	<b>218 ± 1.9</b>	<b>210 ± 2.0</b>	<b>220 ± 1.4</b>	<b>208 ± 2.3</b>

[0261] 图9: Danegaptide和抗VEGF处理减少了糖尿病性视网膜中的伊文思蓝(EB)外渗。

[0262] 伊文思蓝外渗是公认的量化多个器官系统中的血管渗漏的措施。在视网膜的情况下,当内或外视网膜血屏障其一(或二者)受损时,在组织裂解物中可检测到伊文思蓝外渗。

[0263] 为确定Danegaptide单独或与抗VEGF抗体组合的作用,将伊文思蓝静脉内注射并

允许灌注2小时。在该时间段之后,收集血液样品以确定血浆中伊文思蓝的量,其用作用于量化视网膜中伊文思蓝外渗的归一化因子。示出的值是归一化的伊文思蓝的量,由每毫克组织重量的伊文思蓝浓度(ng/ml)除以血浆中的伊文思蓝浓度得出。

[0265] 基于使用GROUT方法(Q值为1%)的异常值分析将一个数据点(在“STZ+Danegaptide”组中)从整个数据集排除。单个异常值被认为是技术假象,因为该单个值相对于同一样品的两个另外技术重复的测量值偏离了大于30倍。随后使用Kolmogorov-Smirnov检验对数据的正态性进行分析。大多数的实验组不遵循正态分布(表3),并因此对数据进行对数转换。

[0266] 表3. 正态分布和对数正态分布的Kolmogorov-Smirnov检验的P值

	原初	STZ + 载剂	STZ + AF564	STZ + Danegaptide	STZ + AF564 + Danegaptide
[0267] P 值正态分布	> 0.10	0.02	0.05	> 0.10	0.02
P 值对数正态分布	> 0.10	> 0.10	> 0.10	> 0.10	> 0.10

[0268] 考虑到EB外渗的可变性(这对于棕色挪威大鼠中的STZ模型是典型的),因此分析了多个处理组的作用大小。首先,为确定STZ之后EB外渗的倍数增加,将数据相对于原初组进行归一化(图9A)。STZ的诱导导致在诱导之后9周EB外渗增加,倍数为大于5倍(原初组中 $100 \pm 13.5\%$  vs. STZ+载剂组中 $628 \pm 212.5\%$ ,  $n=10$ 至 $11$ , t检验 $p<0.01$ )。

[0269] 随后,将数据相对于STZ+载剂组进行归一化以确定IVT处理干预的相对作用大小。对于相对数据集使用D'Agostino&Pearson检验对数据的正态性进行评估,并且所有STZ组均通过了正态性。

[0270] 采用AF564的抗VEGF处理导致EB外渗在统计学上显著减少(STZ+载剂的 $17.8 \pm 4.3\%$ ,  $n=10$ , 单因素ANOVA  $p<0.01$ , Holm-Šidák 多重比较检验 $p<0.01$ ),相当于82.3%减少(图9B,“STZ+AF564”与“STZ+载剂”相比)。

[0271] 类似地,Danegaptide显示出EB外渗在统计学上显著减少(STZ+载剂的 $31.1 \pm 5.3\%$ ,  $n=9$ , 单因素ANOVA  $p<0.01$ , Holm-Šidák 多重比较检验 $p<0.05$ ),相当于68.9%减少(图9B,“STZ+Danegaptide”与“STZ+载剂”相比)。

[0272] 抗VEGF和Danegaptide的组合处理的作用显示出与单独的Danegaptide相似的作用( $34.4 \pm 10.3\%$ ,  $n=10$ ,  $p<0.05$ ),相当于65.6%减少(图9B,“STZ+AF564+Danegaptide”与“STZ+载剂”相比)。

[0273] 图10&11:Danegaptide防止STZ诱导之后9周时的周细胞损失。

[0274] 还通过对经胰蛋白酶消化的视网膜全封片(whollemount)上的无细胞毛细管、周细胞和周细胞血影进行定量来评估通过STZ诱导的对DR的诱导作用和血管异常。对于定量,对每只动物的4至15张单独图像进行定量,并且来自每张图像的数据包括在分析中。

[0275] 基于本发明人先前在棕色挪威大鼠中经STZ诱导的DR模型中进行的研究,确定血管异常的最可靠读出是对周细胞血影的定量,周细胞血影出现在疾病的早期并对应于视网膜周细胞损失,而无细胞毛细管通常在较晚的时间点观察到。具体地,在初步研究中,已经

确定了通过STZ的DR诱导导致12周之后周细胞血影在统计学上显著增加。因此,我们预期在第9周在正常周细胞计数的情况下检测到周细胞血影的存在。

[0276] 这些观察结果在本研究中得到确定,因为在经STZ诱导的动物中未观察到周细胞(有生存力的周细胞和周细胞血影的总和)或无细胞毛细管的总数目的差异(表4;“STZ+载剂”与“原初”相比)。此外,在多个处理组之间未鉴定出显著的差异(表4)。

[0277] 表4. 周细胞和细胞毛细管的定量

	原初	STZ + 载剂	STZ + AF564	STZ + Danegaptide	STZ + AF564 + Danegaptide
[0278] 周细胞*	52 ± 2	52 ± 2	47 ± 3	49 ± 2	51 ± 2
无细胞毛细管	22 ± 1	22 ± 1	18 ± 2	20 ± 1	25 ± 1

[0279] (\*) 周细胞和周细胞血影的数目的总和

[0280] 周细胞的总数目(定量为周细胞和周细胞血影的数目的总和)没有统计学上显著的差异(单因素ANOVA,  $p=0.51$ )。类似地,与经载剂处理的眼(STZ+载剂)相比,经抗VEGF处理的组(STZ+AF564;  $p=0.06$ )中除了有朝着更少的无细胞毛细管的统计学趋势外,无细胞毛细管的数目没有显著差异(单因素ANOVA,  $p<0.001$ ,随后Holm-Šidák多重比较检验)。

[0281] 随后,对周细胞血影的数目进行定量。使用GROUT方法( $Q=1\%$ )从数据集去除异常值,这导致在收集的总共324个数据点中去除了19个。

[0282] 为了基于周细胞血影的存在来验证模型,首先将原初组的视网膜中周细胞血影的数目与经载剂处理的经STZ诱导的动物的视网膜中的数目进行比较。与原初大鼠相比,STZ诱导导致视网膜中周细胞血影的数目在统计学上显著提高(图10A)。

[0283] 随后,通过单因素ANOVA( $p<0.05$ )随后Dunnnett多重比较检验对STZ组进行比较(图10B)。采用抗VEGF抗体(AF564;  $p<0.01$ )和Danegaptide( $p<0.001$ )二者的处理导致周细胞血影在统计学上显著减少,而组合处理未显示出统计学作用( $p=0.11$ )。

[0284] 经胰蛋白酶消化、经PAS染色的视网膜全封片的一些代表性实例在图11中示出,其示出了无细胞毛细管(箭号)、周细胞(未指出)和周细胞血影(箭头)。

[0285] 结论

[0286] 将ARPE-19细胞暴露于亚致死性氧化应激和高血糖(48小时)导致 $P_{app}$ 在统计学上显著提高(图1A和1B,中间列,“+,-”;与左列对照,“-,-”相比)和伴随的TiJOR降低(图2A,中间列,“+,-”;与左列对照,“-,-”相比)。用danegaptide(100nM)预处理完全防止了该渗透性提高(图1A和1B,右列,“+,+”;与左列对照“-,-”和中间列“+,-”相比)。类似地,danegaptide显示出针对紧密连接紊乱和细胞-细胞偶联的破坏的部分保护,如通过TiJOR的定量所评估的(图2A,右列,“+,+”;与左列对照“-,-”和中间列“+,-”相比)。

[0287] STZ导致可靠地诱导高血糖,如在整个研究中通过持续升高的葡萄糖(图3A)和血红蛋白A1c水平(图3B)所定量的。经STZ诱导的白内障在该模型中常见,并在研究结束时发展为中度严重(图4)。所有测试品耐受性良好,并且通过宏观眼科检查未鉴定出眼部毒性迹象。测试品未对白内障发展发挥不同作用(图4)。

[0288] 通过STZ的DR诱导导致外视网膜厚度在统计学上显著增加(图5B;“STZ+载剂”与

“原初”相比),这被Danegaptide完全逆转 ( $p < 0.05$ ) (图5B; “STZ+Danegaptide”)。相比之下, AF564 ( $p = 0.60$ ) (图5B; “STZ+AF564”)和组合处理 ( $p = 0.60$ ) (图5B; “STZ+AF564+Danegaptide”)没有作用。在整个视网膜中均显示出由Danegaptide引起的该外视网膜厚度减少(图7)。

[0289] 阳性对照,抗VEGF抗体AF564导致EB外渗的统计学上显著的82.3%减少 ( $p < 0.01$ ) (图9B; “STZ+AF564”与“STZ+载剂”相比)。类似地,Danegaptide导致EB外渗的68.9%减少 ( $p < 0.05$ ) (图9B; “STZ+Danegaptide”与“STZ+载剂”相比)。AF564和Danegaptide的组合处理在EB外渗方面显示出与单独的Danegaptide相似的作用(65.6%减少,  $p < 0.05$ ) (图9B; “STZ+AF564+Danegaptide”与“STZ+载剂”和“STZ+Danegaptide”相比)。

[0290] 在STZ大鼠中周细胞血影的数目显著提高 ( $p < 0.05$ ) (图10A; “STZ+载剂”与“原初”相比)。AF564 ( $p < 0.01$ ) (图10B; “STZ+AF564”)和Danegaptide ( $p < 0.001$ ) (图10B; “STZ+Danegaptide”)二者均引起周细胞血影在统计学上显著减少,而组合处理没有作用 ( $p = 0.11$ ) (图10B; “STZ+AF564+Danegaptide”)。

[0291] 未鉴定出Danegaptide对内视网膜厚度的生物学上相关的作用。

[0292] 这些组合发现(图1至11): danegaptide可防止RPE屏障功能障碍(如danegaptide以TJ相关的方式防止由于高血糖和氧化应激引起的RPE单层渗透性提高的能力,以及其防止患有DR的大鼠的外视网膜层增厚的能力所显示)表明,danegaptide可以是用于患有d-AMD、湿性AMD或新生血管性AMD的患者的有效治疗。

[0293] Danegaptide通过以下,部分通过缝隙连接中的连接蛋白43(Cx43)来防止血视网膜屏障(BRB)完整性的损失:

[0294] ●内BRB:防止周细胞和内皮细胞的损失和血管渗漏,其不仅在DR中观察到,而且最近在患有AMD的患者中也发现(参见例如Hudson et al.,2020和Hadziahmetovic et al.,2021);以及

[0295] ●外BRB:防止视网膜色素上皮细胞偶联屏障完整性的损失,该损失导致降低的RPE细胞层的屏障完整性和相关功能,包括主动将水转运出视网膜下空间和导致湿性AMD的血管渗漏。

[0296] 因此,danegaptide针对模拟与紧密连接和细胞-细胞偶联的破坏相关的糖尿病性视网膜病变(DR)和年龄相关性黄斑变性(AMD)的已知病理状况的实验条件发挥了强效的保护。另外,danegaptide通过防止基于病理性Cx43的半通道开启,可防止细胞肿胀、外视网膜细胞层增厚以及ATP病理性泄漏到胞外区室(已知ATP会在其中引起炎症)中。Danegaptide在大鼠中的耐受性更好,并且导致针对应激和DR相关的周细胞损失、视网膜血管渗漏和血-视网膜屏障(内和外BRB二者)的破坏的显著保护。由danegaptide引起的对血管渗漏和周细胞损失的保护的水平与通过抗VEGF治疗所观察到的类似。另外,danegaptide防止应激和DR诱导的外视网膜厚度增加,这在采用抗VEGF的处理中未显示。

[0297] 参考文献

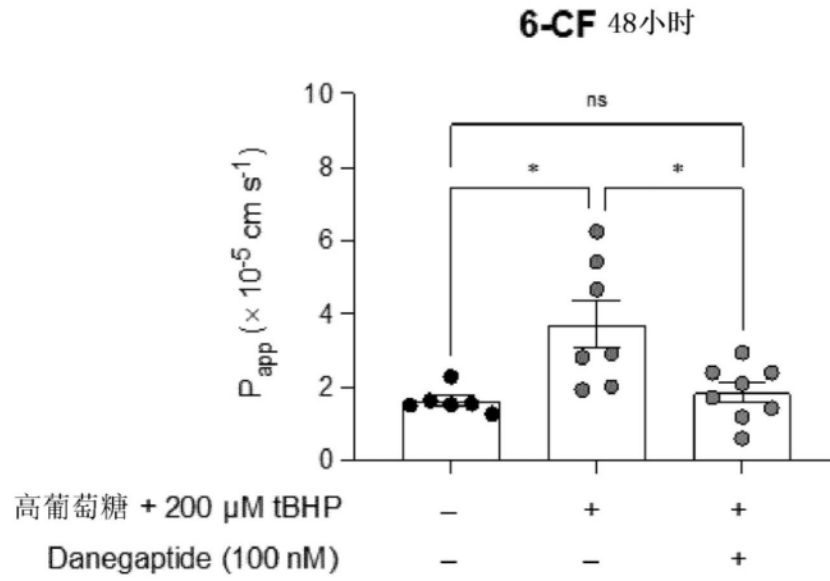
[0298] 本文中引用的或与本申请一起提交的所有出版物、专利和专利申请,包括作为信息公开声明的一部分提交的参考文献均通过引用以其整体并入。

[0299] Aonuma et al.,Chem.Pharm.Bull.(Tokyo),1980,28,3332-3339.

[0300] Bandello et al.,F1000Research,2017,6,245.

- [0301] Butera et al., *J. Med. Chem.*, 2009, 52(4), 908-911.
- [0302] Clapp et al., *Acta Diabetologica*, 2019, 56, 1031-1036.
- [0303] Coutinho et al., *Drug Deliv. Transl. Res.*, 2020, 10(3), 751-765.
- [0304] Dhein et al., *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1994, 350, 174-184.
- [0305] Ferris et al., *Ophthalmology*, 2013, 120(4), 844-851.
- [0306] Fields et al., "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis", *Synthetic Peptides* (2002, 2nd Edition)
- [0307] Filek et al., *Clin. Ophthalmol.*, 2019, 13, 1087-96.
- [0308] González-Casanova et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(6), 3194.
- [0309] Hadziahmetovic et al., *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, 8, 612812.
- [0310] Hudson et al., *Neural Regen. Res.*, 2020, 15(9), 1656-1657.
- [0311] King et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22, 10186.
- [0312] Mugisho et al., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 2019, 1862, 3, 385-393.
- [0313] Muller et al., *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 327, 65-72.
- [0314] Naylor et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2020, 21(1), 211.
- [0315] Obert et al., *J. Mol. Med. (Berl)*, 2017, 95(5), 535-552.
- [0316] Song et al., *Neuro-Oncology*, 2005, 7(4), 453-464.
- [0317] Squires et al., *Int. J. Mol. Sci.*, 2021, 22(6), 2809.
- [0318] Terryn et al., *Cytometry A*, 2013; 83, 235-241.
- [0319] 美国专利No. 4,775,743
- [0320] W002/077017
- [0321] W02007/078990
- [0322] W02008/079266
- [0323] W02018/202865
- [0324] Ziniauskaitė et al., *Ocul Surf.*, 2019, 17, 257-264.

**A**



**B**

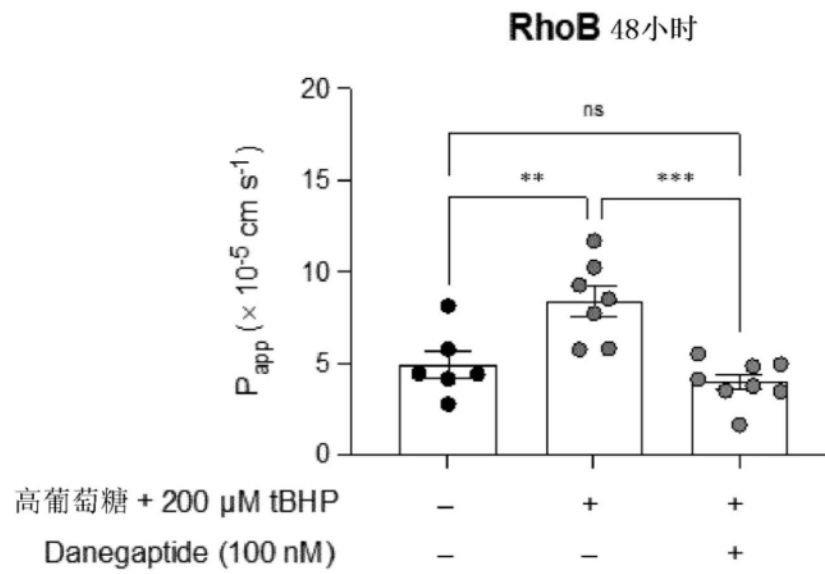
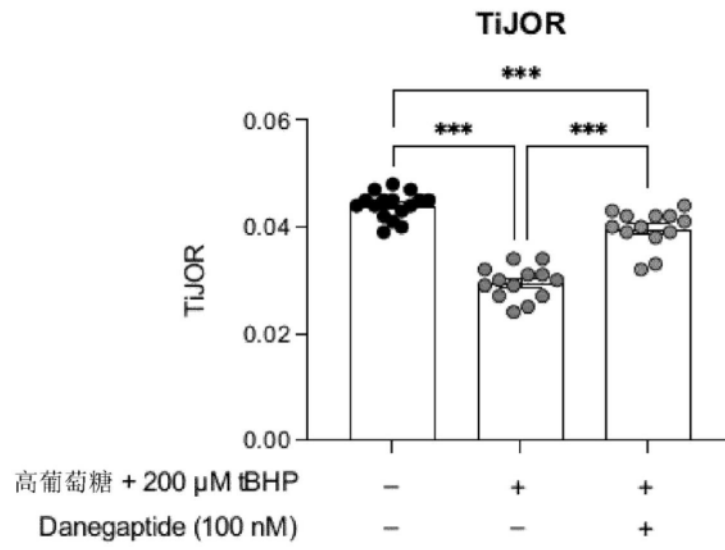


图1

**A**



**B**

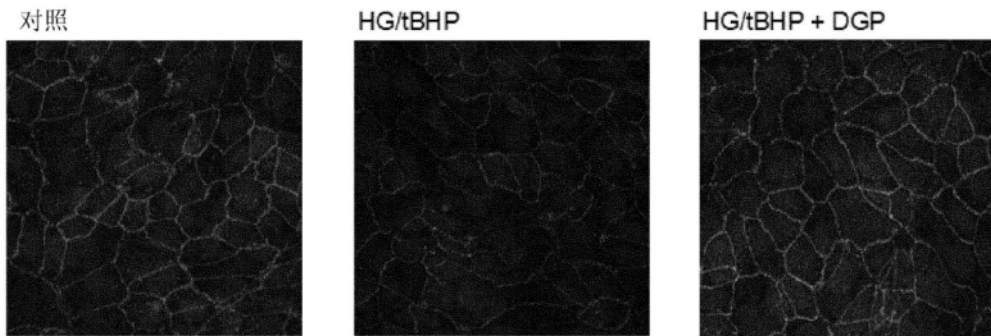


图2

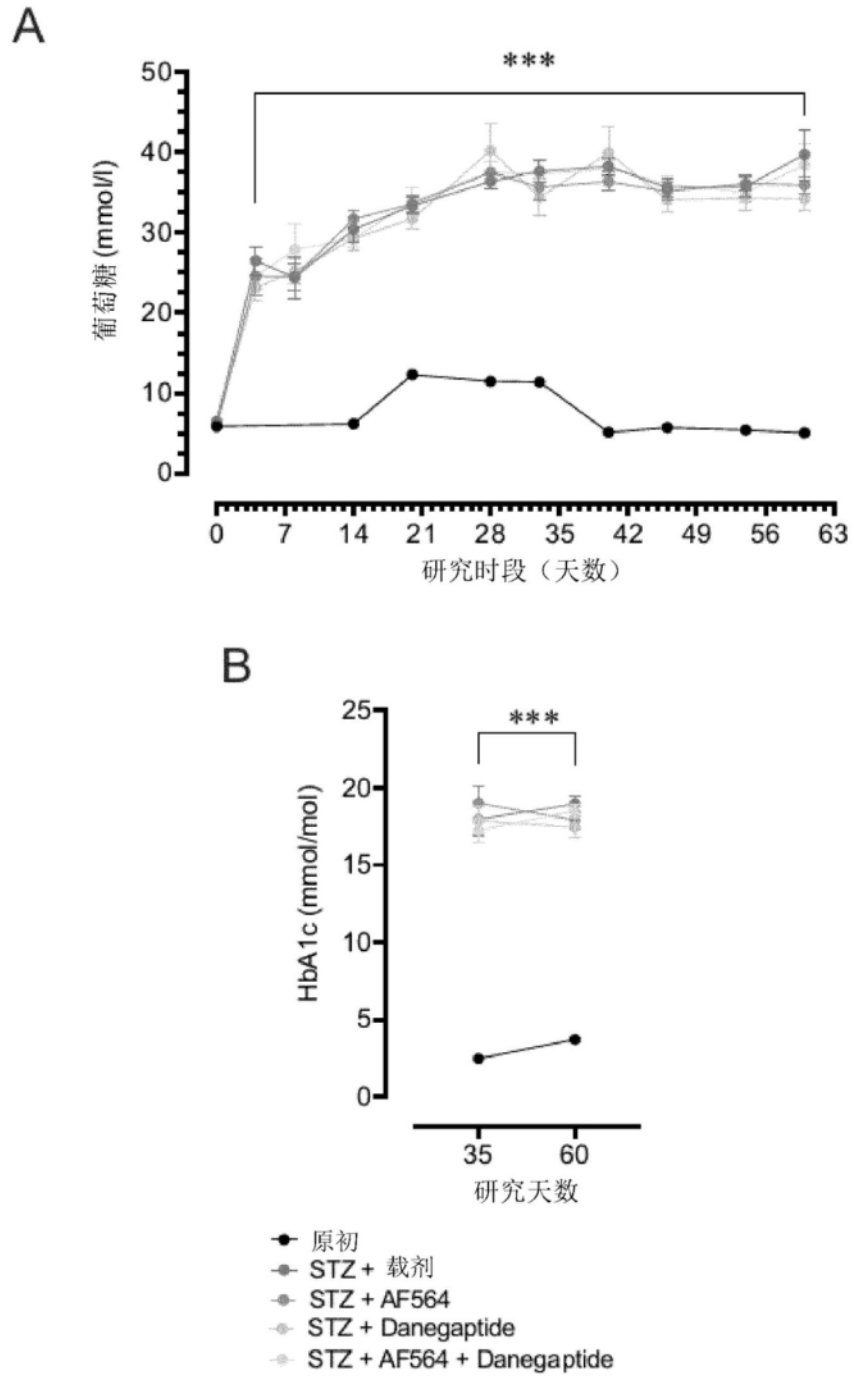


图3

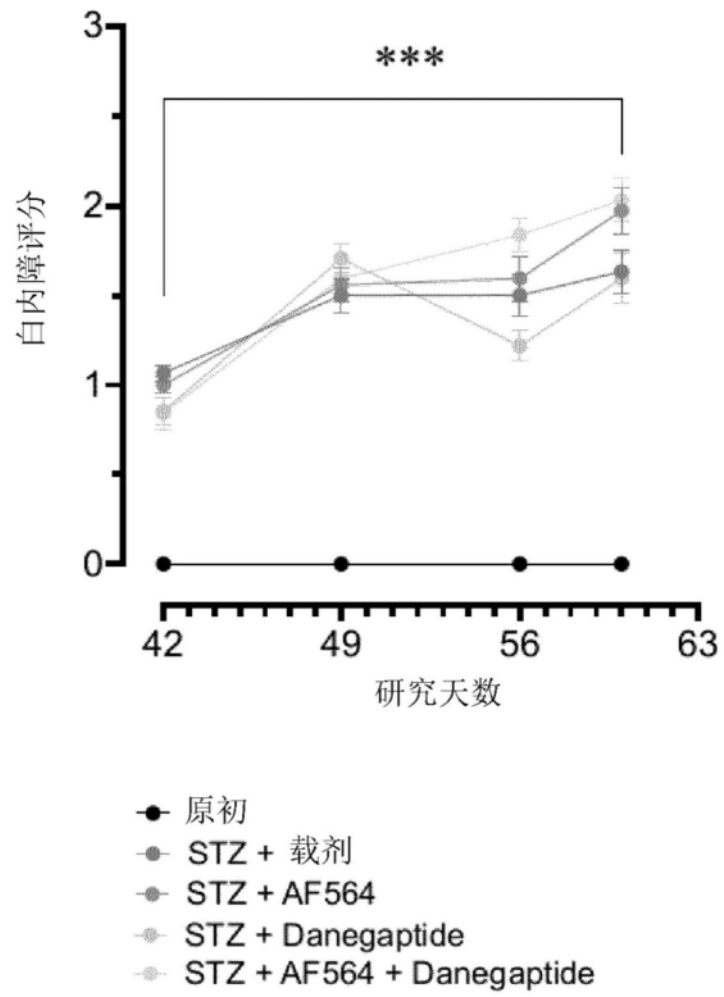


图4

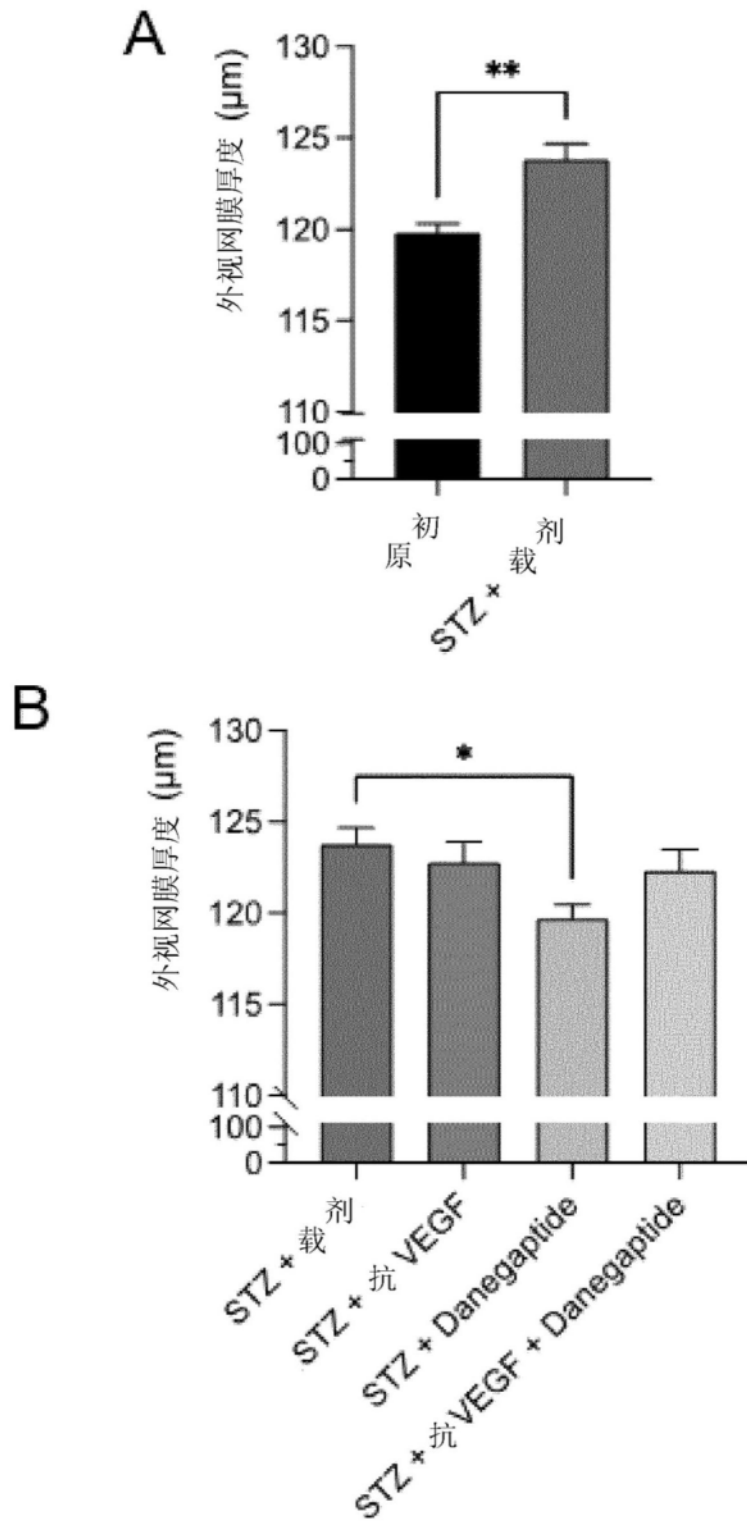


图5

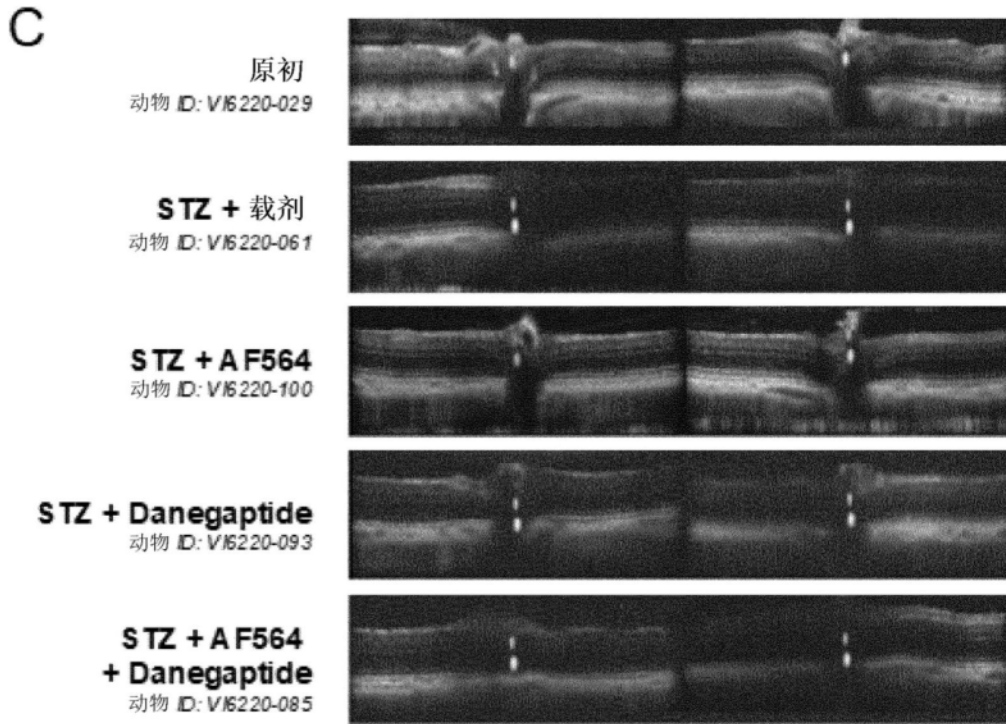


图5 (续)

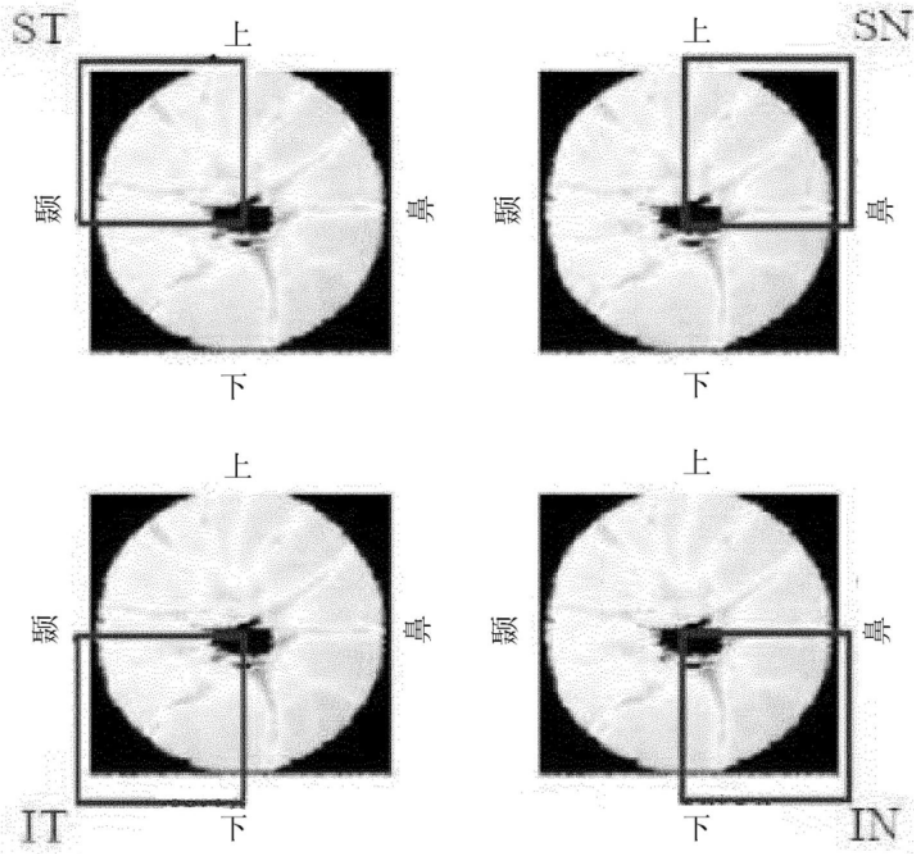


图6

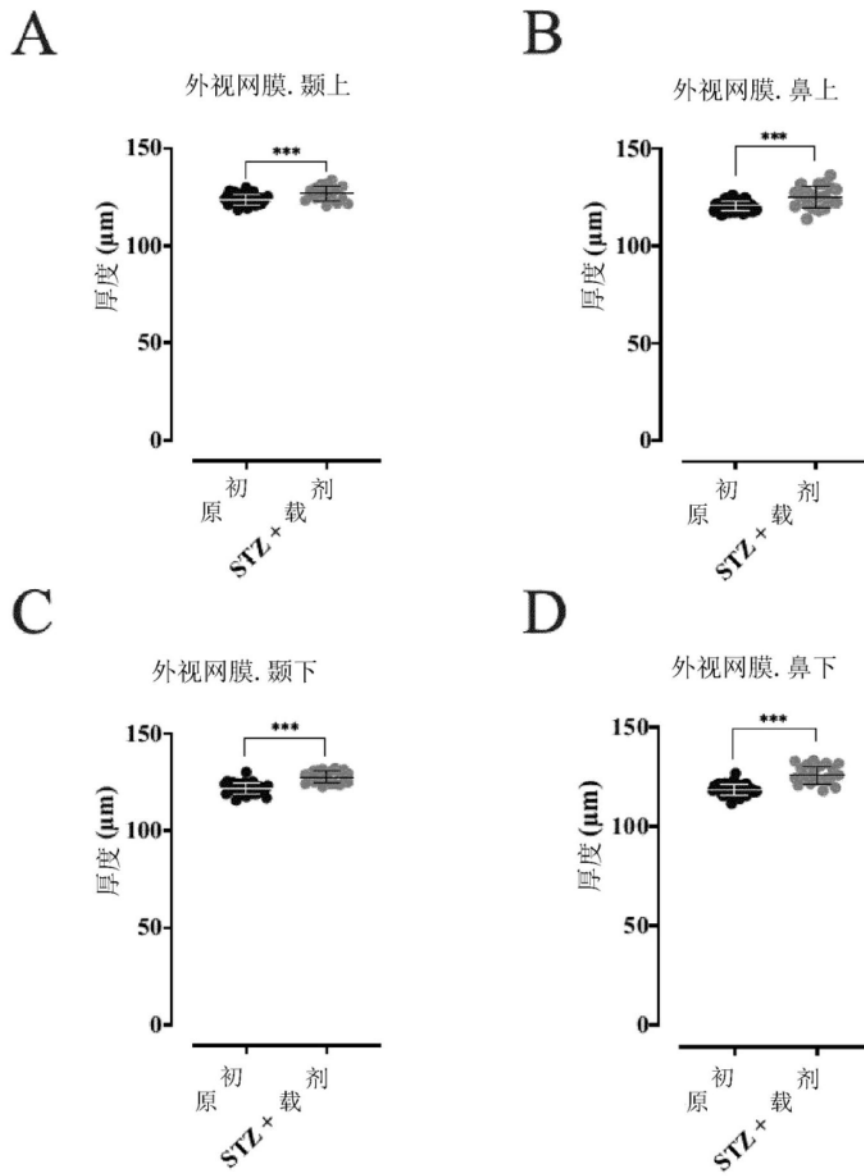


图7

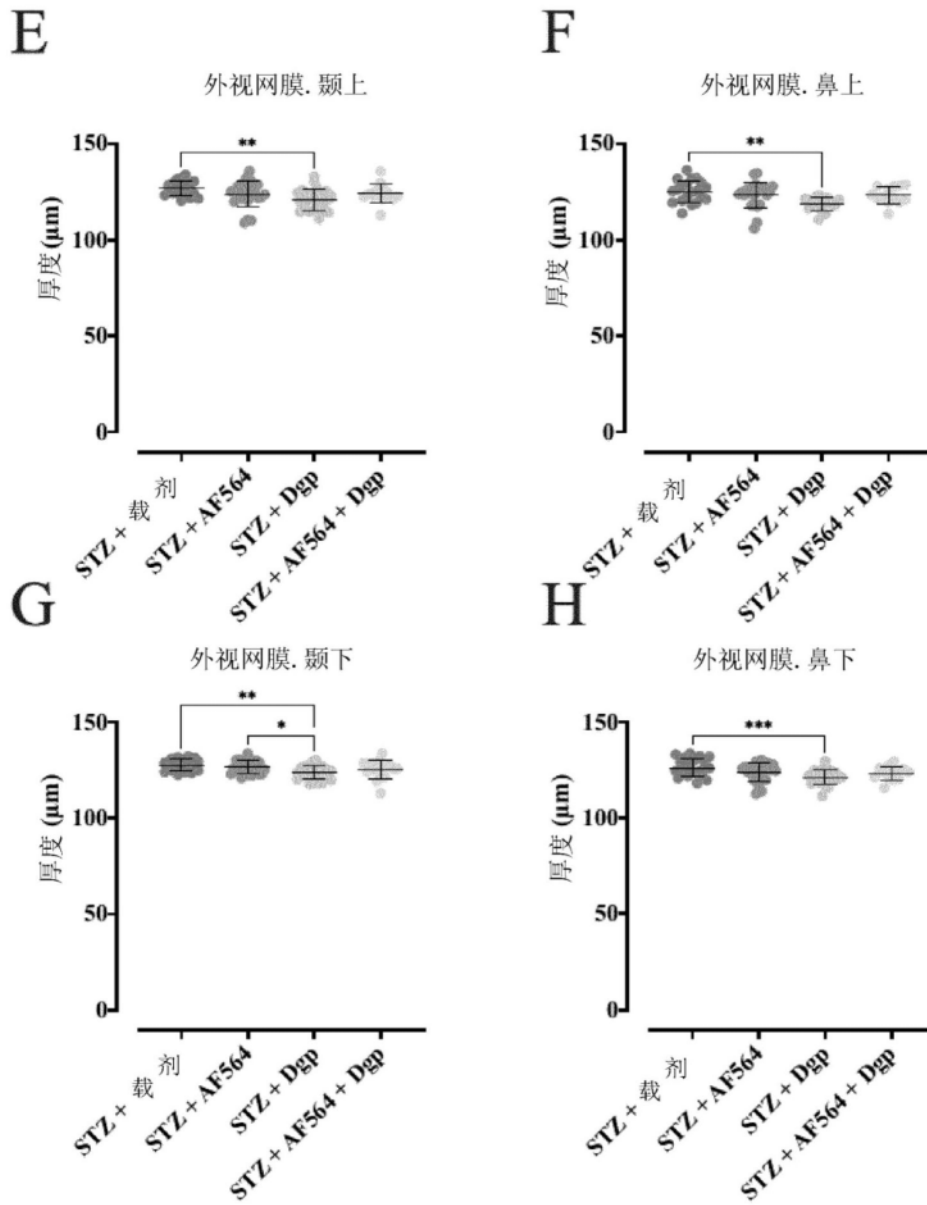


图7 (续)

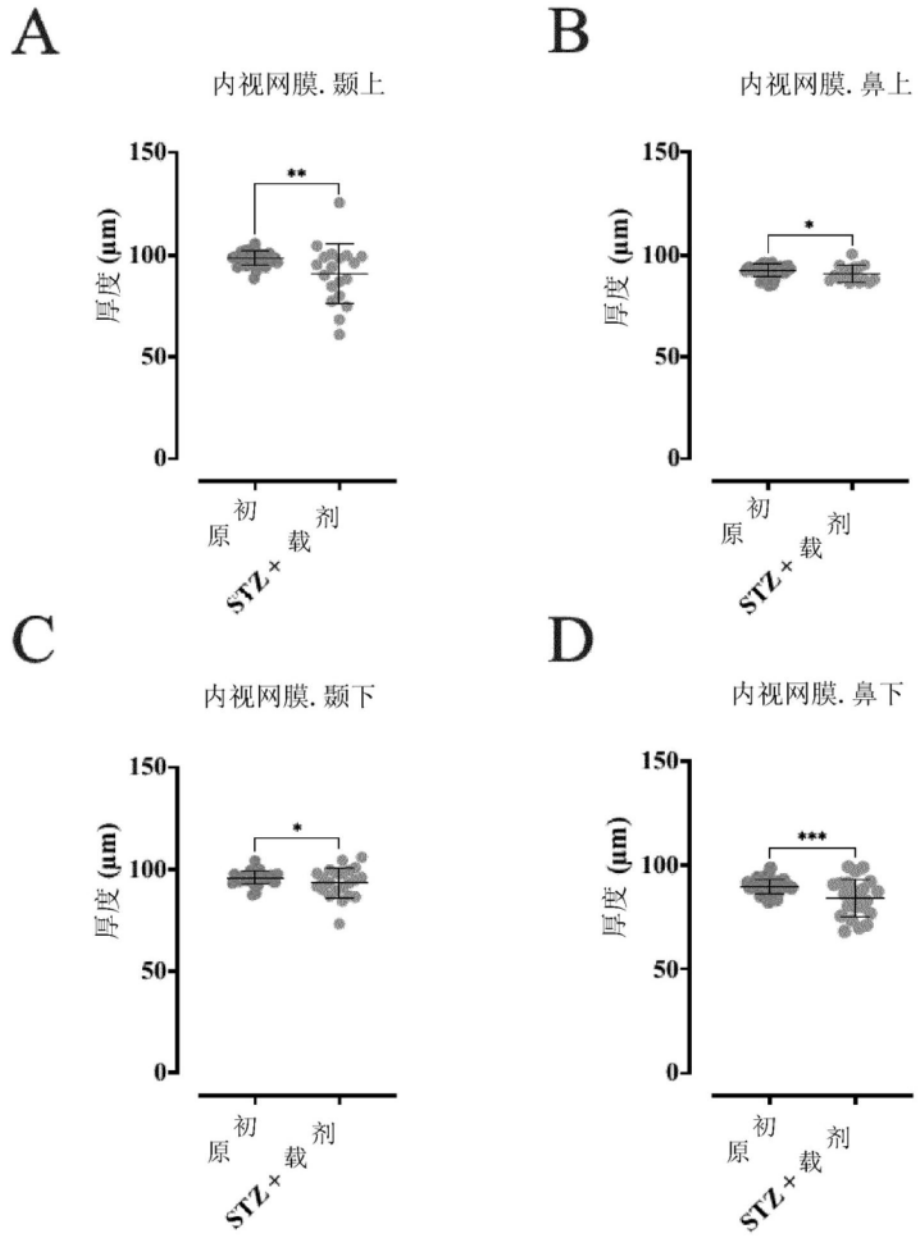


图8

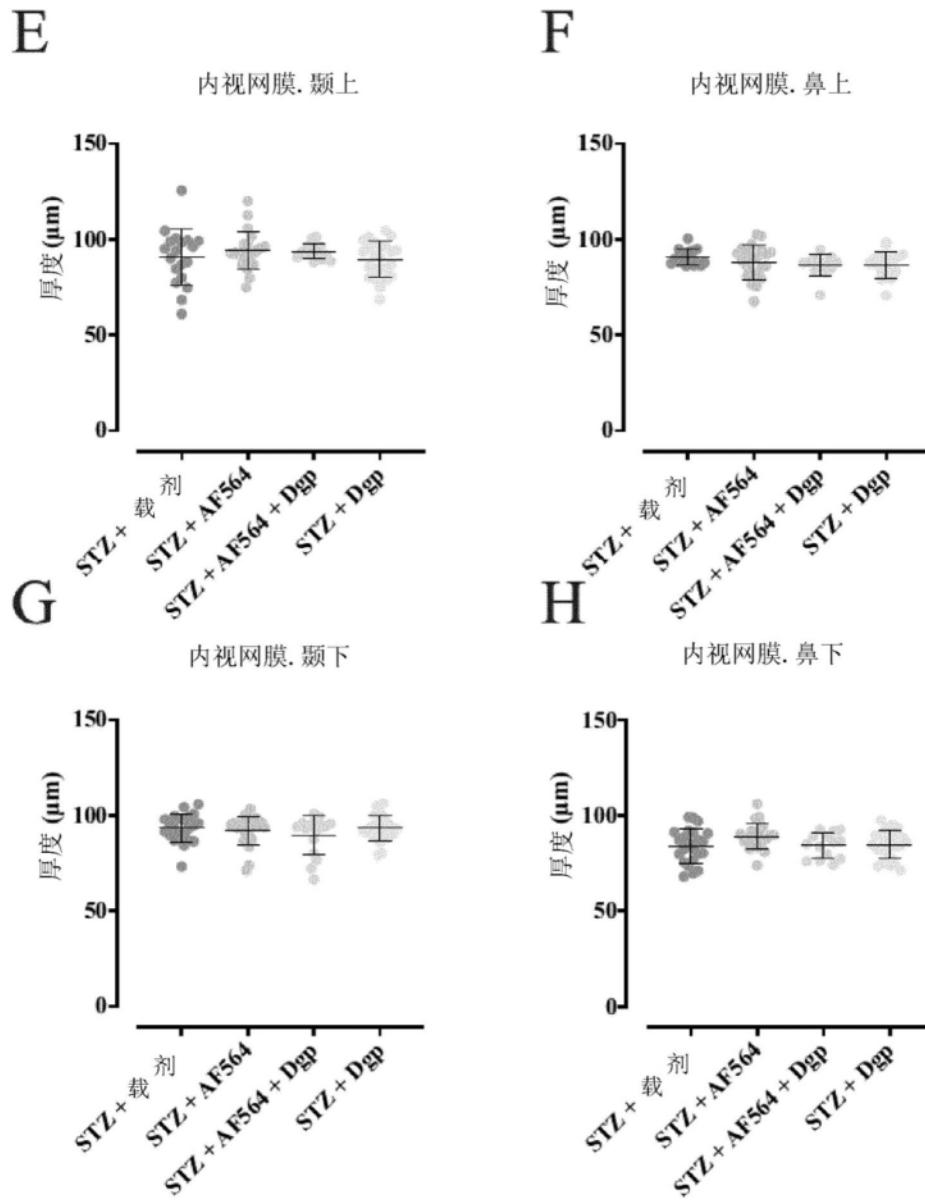


图8(续)

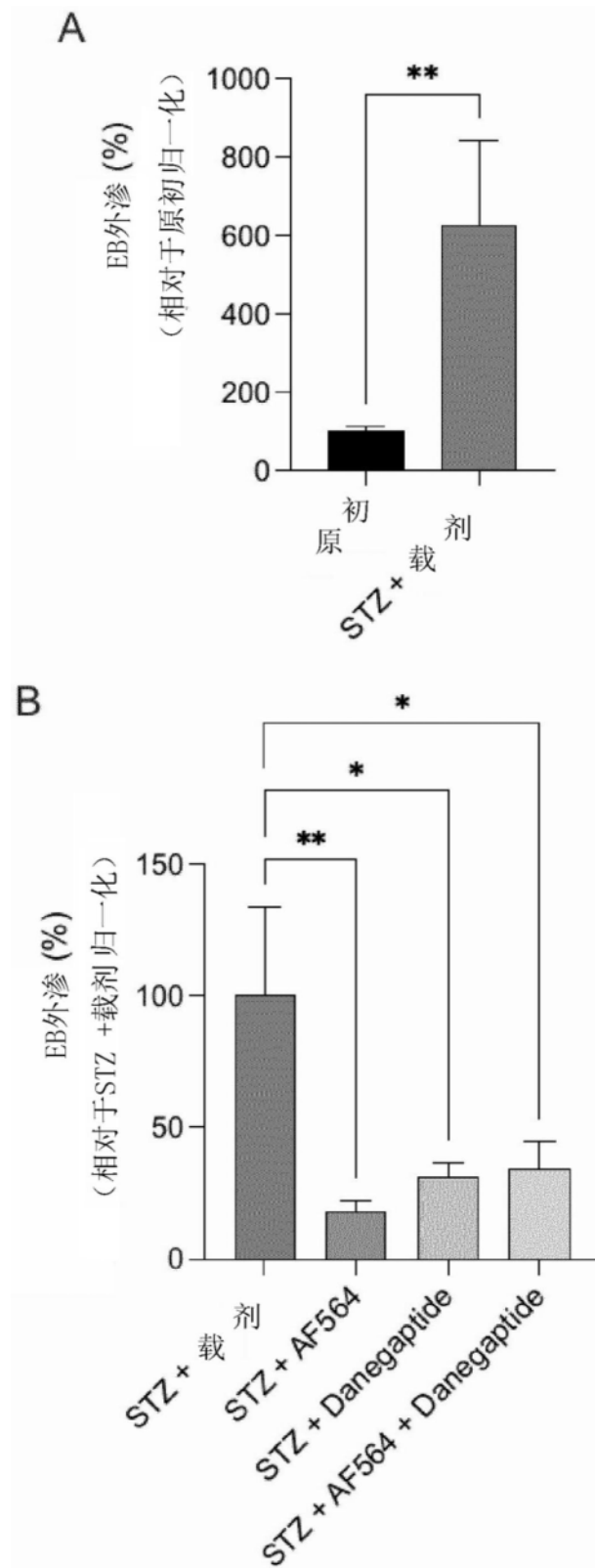


图9

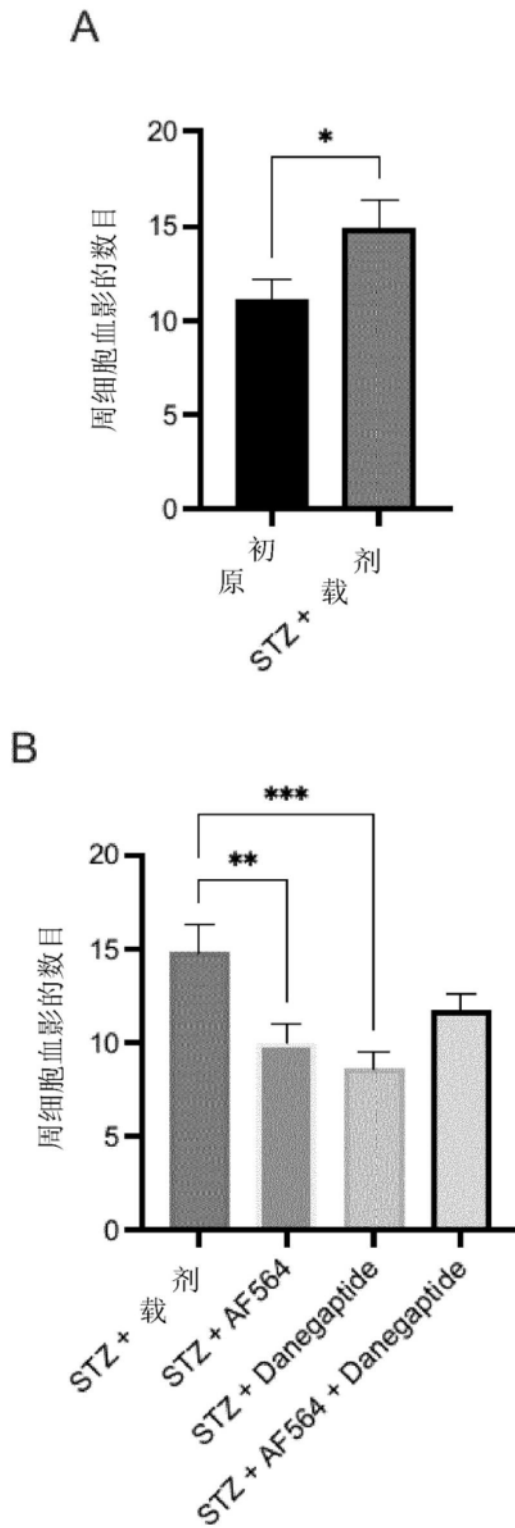


图10

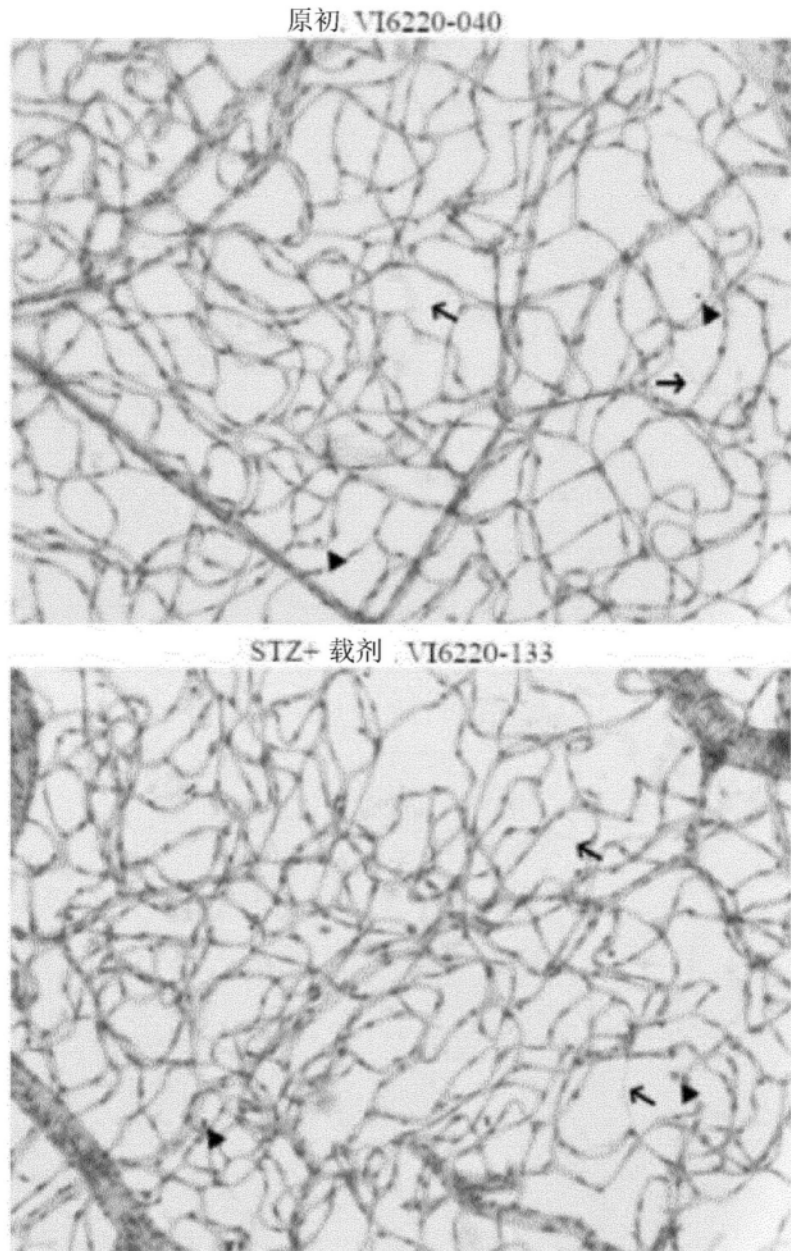


图11

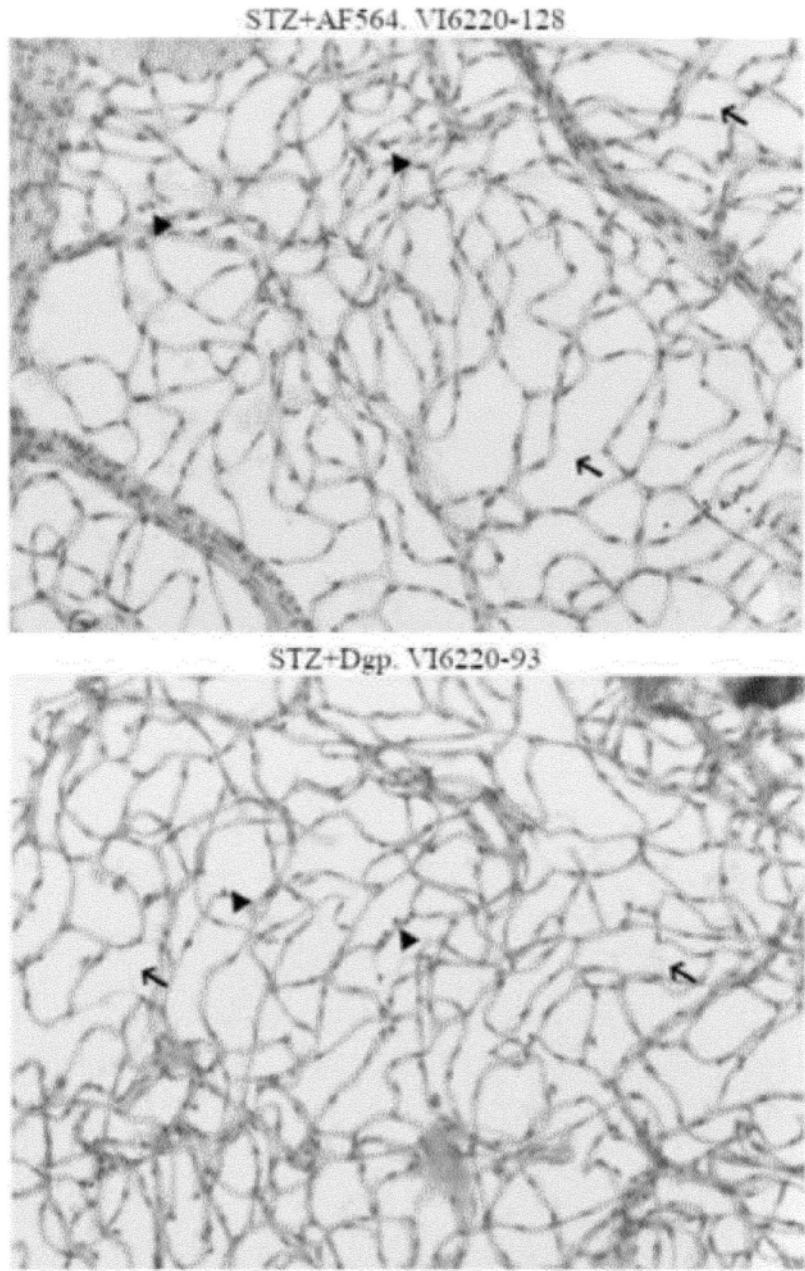


图11(续)

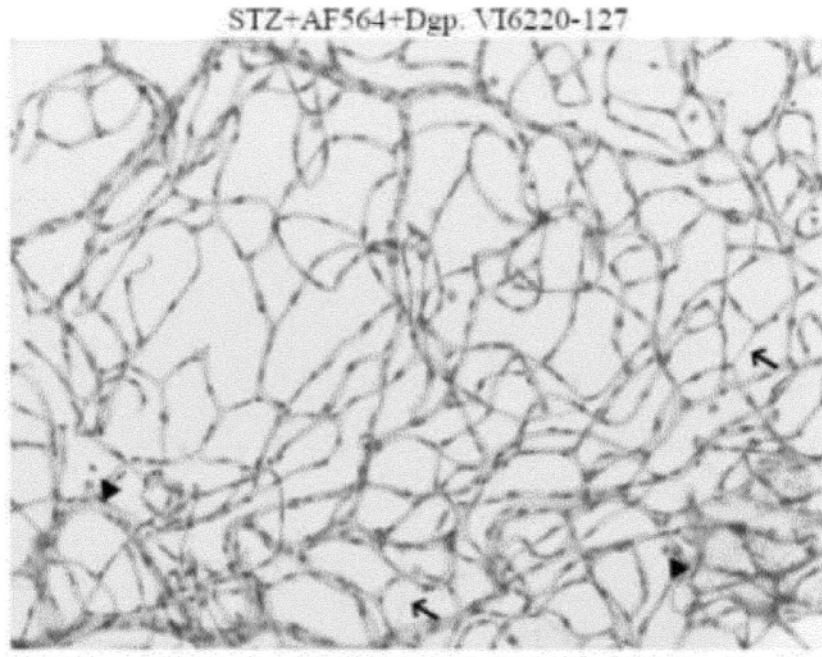


图11(续)