



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 7/08 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 27/00 (2006.01)

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07K 7/06 (2019.08); C07K 7/08 (2019.08); A61K 38/08 (2019.08); A61K 38/10 (2019.08); A61P 35/00 (2019.08); A61P 27/00 (2019.08)

(21)(22) Заявка: 2017133101, 02.03.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
02.03.2016

Дата регистрации:  
06.12.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:  
02.03.2015 US 62/126,968

(43) Дата публикации заявки: 02.04.2019 Бюл. № 10

(45) Опубликовано: 06.12.2019 Бюл. № 34

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на  
национальной фазе: 02.10.2017

(86) Заявка РСТ:  
US 2016/020443 (02.03.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:  
WO 2016/141053 (09.09.2016)

Адрес для переписки:  
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,  
ООО "Юридическая фирма Городисский и  
Партнеры"

(72) Автор(ы):

КОМАРОВА Юлия А. (US),  
РОЗЕНБЛАТТ Марк (US),  
МАЛИК Асрар Б. (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ БОРД ОФ ТРАСТИЗ ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ИЛЛИНОЙС (US)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: WO 2012174028 A2, 20.12.2012. WO  
2006015385 A2, 09.02.2006. RU 2488592 C2,  
27.07.2013.

## (54) ПЕПТИДЫ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ АНГИОГЕНЕЗА

(57) Реферат:

Изобретение относится к использованию пептидов, содержащих аминокислотную последовательность K FARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), для ингибирования ангиогенеза и лечения нарушений, связанных с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, где пациент страдает нарушением зрения или потерей зрения (слепотой), дегенерацией макулы, окклюзией центральной вены сетчатки, окклюзией ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической

ретинопатией, неоваскулярной возрастной дегенерацией макулы (ВДМ), ретинопатией недоношенных, ишемической ретинопатией, внутриглазной неоваскуляризацией, неоваскуляризацией роговицы, неоваскуляризацией сетчатки, неоваскуляризацией хориоидеи, диабетическим отеком макулы, диабетической ишемией сетчатки, диабетическим отеком сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатией, рубцозом радужным оболочкой, неоваскулярной глаукомой,

ретинобластомой, увеитом и неоваскуляризацией  
трансплантата роговицы. 4 н. и 16 з.п. ф-лы, 12

ил., 5 табл., 10 пр.

R U 2 7 0 8 3 7 5 C 2

R U 2 7 0 8 3 7 5 C 2



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

*C07K 7/06* (2006.01)*C07K 7/08* (2006.01)*A61K 38/08* (2006.01)*A61K 38/10* (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*A61P 27/00* (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*C07K 7/06* (2019.08); *C07K 7/08* (2019.08); *A61K 38/08* (2019.08); *A61K 38/10* (2019.08); *A61P 35/00* (2019.08); *A61P 27/00* (2019.08)

(21)(22) Application: **2017133101, 02.03.2016**

(24) Effective date for property rights:  
**02.03.2016**

Registration date:  
**06.12.2019**

Priority:

(30) Convention priority:  
**02.03.2015 US 62/126,968**

(43) Application published: **02.04.2019** Bull. № 10(45) Date of publication: **06.12.2019** Bull. № 34(85) Commencement of national phase: **02.10.2017**

(86) PCT application:  
**US 2016/020443 (02.03.2016)**

(87) PCT publication:  
**WO 2016/141053 (09.09.2016)**

Mail address:  
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,  
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i  
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**KOMAROVA Yulia A. (US),  
ROSENBLATT Mark (US),  
MALIK Asrar B. (US)**

(73) Proprietor(s):

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE  
UNIVERSITY OF ILLINOIS (US)**

(54) **PEPTIDES FOR INHIBITING ANGIOGENESIS**

(57) Abstract:

FIELD: chemistry.

SUBSTANCE: invention relates to use of peptides containing amino acid sequence KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), for inhibiting angiogenesis and treating disorders associated with VEGF-induced vascular permeability, where the patient suffers from visual impairment or vision loss (blindness), macular degeneration, retinal central retinal occlusion, retinal vein occlusion, proliferative diabetic retinopathy, neovascular macular degeneration (NMD), premature retinopathy, ischemic retinopathy, intraocular

neovascularisation, corneal neovascularisation, retinal neovascularisation, choroid neovascularisation, diabetic macular oedema, diabetic retinal ischemia, diabetic retinal oedema and proliferative diabetic retinopathy, iris palpebral iris, neovascular glaucoma, retinoblastoma, uveitis and corneal graft neovascularization.

EFFECT: disclosed are peptides for inhibiting angiogenesis.

20 cl, 12 dwg, 5 tbl, 10 ex

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет согласно предварительной патентной заявки США № 62/126968, поданной 2 марта 2015 года, все содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

## ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

5 [0002] Данное изобретение относится к пептидам для ингибирования ангиогенеза. Данное изобретение также относится к способам ингибирования ангиогенеза и способам лечения нарушений, связанных с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, с использованием пептидов по изобретению.

## УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

10 [0003] Цитоскелет на основе микротрубочек (МТ) обеспечивает важную контрольную точку регуляции эндотелиального барьера; однако роль этого ключевого элемента цитоскелета недостаточно изучена. Было показано, что стабилизирующий МТ препарат таксол ослабляет эндотелиальную транссудацию на моделях воспаления легких мышей, что предполагает, что МТ могут иметь важное значение в опосредовании повышенной  
15 проницаемости сосудов легких. Однако таксол проявляет общую токсичность, что делает его неподходящим лекарством для врачей и их пациентов.

[0004] Концевые связывающие белки микротрубочек являются высококонсервативными плюс-концевыми дополнительными факторами отслеживания микротрубочек, которые связываются с растущими микротрубочками (МТ) и подавляют  
20 катастрофические события, связанные с МТ. Два таких концевых связывающих белка, EB1 и EB3, играют роль в регулировании динамики эндотелиального цитоскелета и изменении формы клетки, являются первичными детерминантами проницаемости эндотелиального барьера.

[0005]  $\text{Ca}^{2+}$  является универсальным вторичным посредником, который регулирует  
25 эндотелиальную проницаемость и сосудистый гомеостаз. Активация фосфолипазы C  $\beta$  (ФЛС $\beta$ ), снижение провоспалительных медиаторов, способствует гидролизу фосфатидилинозитол-бисфосфата (PIP2) в инозитол-1,4,5-трифосфат ( $\text{IP}_3$ ) и

30 диацилглицерин (ДАГ).  $\text{IP}_3$  стимулирует высвобождение  $\text{Ca}^{2+}$  из  $\text{IP}_3$ -чувствительных внутриклеточных хранилищ, то есть из эндоплазматического ретикулума (ЭР).

Опустошение  $\text{Ca}^{2+}$ -депо ЭР опосредуется активацией рецепторов  $\text{IP}_3\text{R}$  на мембране ЭР и приводит к временному увеличению внутриклеточного  $\text{Ca}^{2+}$ . Вход или "приток"  $\text{Ca}^{2+}$  опосредуется каналами транзитного рецепторного потенциала (TRPC), проницаемыми  
35 для различных катионов, включая  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ . TRPC1 и 4 представляют собой депо-управляемые  $\text{Ca}^{2+}$ -каналы (SOC) в эндотелиальных микрососудистых клетках легких, которые активируются опустошением ЭР.

[0006] Увеличение внутриклеточной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  повышает активность  
40 протеинкиназы Ca (PKC  $\alpha$ ). PKC  $\alpha$  является ключевым регулятором реакции эндотелиальной проницаемости на множественные медиаторы, включая фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС). PKC  $\alpha$  фосфорилирует p120-катенин и опосредует его диссоциацию из VE-кадгерина, что приводит к интернализации VE-кадгерина. PKC  $\alpha$  также действует перед активацией RhoA путем фосфорилирования p115RhoGEF и GDI-  
45 1. RhoA, в свою очередь, способствует индуцированному фосфорилированием ингибированию фосфатазы легкой цепи миозина (ФЛЦМ) путем активации Rho-киназы (ROCK). Ингибирование ФЛЦМ сопровождается  $\text{Ca}^{2+}$ / кальмодулинзависимой активацией КЛЦМ, что приводит к фосфорилированию ЛЦП и индуцирует сокращение

актомиозина в ответ на провоспалительные медиаторы, такие как тромбин и гистамин, и факторы роста.

[0007] Целостность МТ цитоскелета необходима для  $IP_3$ -индуцированного

высвобождения  $Ca^{2+}$  из депо ЭР. Изменение динамики МТ с помощью агентов, дестабилизирующих МТ или стабилизаторующих МТ, нокодазола, колхицина и таксола ингибирует  $IP_3$ -регулируемое высвобождение  $Ca^{2+}$ , предполагая, что динамика МТ необходима для полной активации  $IP_3R$ . МТ цитоскелет участвует в ремоделировании

ЭР, обеспечивая тем самым организацию и распространение  $Ca^{2+}$  в ответ на внешние раздражители. ЭР присоединяется и удлиняется вместе с растущими концами МТ посредством прямого взаимодействия EB1 и EB3 с молекулой стромального взаимодействия 1 (STIM1). Опустошение EB1 в HeLa (клетки HeLa не экспрессируют EB3) уменьшает выступы ЭР, однако не ингибирует активацию SOC тапсигаргином, предполагая, что некоторые другие механизмы участвуют в активации SOC и распространении кальциевой сигнализации в эпителиальных клетках. В эндотелиальных клетках локализация  $IP_3R$  в кавеолах имеет решающее значение как для опустошения

$Ca^{2+}$  депо ЭР, так и для активации SOC. Это означает, что активация  $IP_3R$  и/или их восприимчивость к  $IP_3$  является важным элементом кальциевой сигнализации. В соответствии с предыдущими результатами мы обнаружили, что МТ цитоскелет положительно регулирует активацию  $IP_3R$  в ответ на  $IP_3$  и, таким образом, передает внеклеточные сигналы по всей клетке, вызывая физиологический ответ. EB3, но не EB1, напрямую взаимодействует с  $IP_3R$  и это взаимодействие обеспечивает критическую контрольную точку для организации сигналов кальция в эндотелиальных клетках.

[0008] Известно, что фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС) способствует ангиогенезу с помощью прямых и непрямых способов. Известно, что ФРЭС делает микрососудистые эндотелиальные клетки гиперпроницаемыми таким образом, что белки плазмы разливаются в экстравазкулярное пространство, что приводит к свертыванию экстравазированного фибриногена с осаждением фибринового геля. Экстравазкулярный фибрин служит матрицей, которая поддерживает вращение новых кровеносных сосудов и других мезенхимальных клеток, которые генерируют зрелую, васкуляризованную строму. Таким образом, ингибирование ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости приведет к ингибированию ангиогенеза. Новая терапия необходима для предотвращения ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости и ингибирования ангиогенеза.

[0009] Образование сети кровеносных сосудов опухоли, то есть неоваскуляризация, играет существенную роль в развитии опухоли, помогая опухоли расти и метастазировать. Как только опухолевое поражение превышает несколько миллиметров в диаметре, гипоксия и депривация питательных веществ запускают "ангиогенный переключатель". Опухолевые клетки высвобождают фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), который стимулирует прорастание и пролиферацию эндотелиальных клеток. Несколько антиангиогенных препаратов в настоящее время одобрены Управлением по контролю за продуктами питания и лекарственными средствами США (FDA) для лечения рака, в том числе гуманизированный функционально-блокирующий фрагмент антитела к ФРЭС-А, авастин (бевацизумаб), и ингибиторы тирозинкиназы, сорафениб и сунитиниб, которые нацелены на несколько рецепторов роста. Таким образом, терапия, контролирующая связанный с опухолью ангиогенез, является многообещающей

тактикой для ограничения прогрессирования рака и метастазов.

[0010] Потеря внутреннего эндотелиального гематоретинального барьера и как следствие возникновение отека и повреждения макулы являются основными причинами нарушения зрения и слепоты у пожилых людей. В настоящее время эти патологические состояния, также известные как возрастная дегенерация макулы (ВДМ), являются неизлечимыми. Кроме того, неоваскулярная форма ВДМ характеризуется ростом кровеносных сосудов из сосудистой оболочки, которые проникают через мембрану Бруха в субретиальную область. Некоторые эффективные методы лечения для устранения общей основной причины неоваскулярной ВДМ являются ограниченными с целью предотвращения потери зрения путем уничтожения новых сосудов, возникающих в сосудистой оболочке. Хотя современные методы лечения с помощью интравитреальной инъекции кортикостероидов и анти-ФРЭС-агентов эффективны в замедлении прогрессирования заболевания глаз, они не полностью устраняют риск слепоты. Поэтому необходимы новые и более эффективные методы лечения или комбинационные терапии для лечения нарушений зрения и предотвращения потери зрения.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0011] В данном документе приведен выделенный пептид. Пептид может содержать KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), их фрагмент или их вариант. Пептид также может состоять из KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), их фрагмента или их варианта. Вариант может включать консервативную замену. Вариант может включать любую последовательность пептида, включающую последовательность Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5), минимальную последовательность EB-связывающего консенсусного мотива. Пептид может быть конъюгирован с жирной кислотой, то есть миристоилированным или связанным с пептидом-носителем. Пептид-носитель может быть пептидом антеннапедии (ПА), пептидом пенетратином, ТАТ, транспортаном или полиаргинином. Пептид может быть частью фармацевтической композиции, которая может включать фармацевтически приемлемый эксципиент.

[0012] Изобретение относится к способам ингибирования ангиогенеза, включающим введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного пептида, содержащего аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты. Способы включают введение терапевтически эффективного количества пептида по изобретению, такого как количество, эффективное для ингибирования ангиогенеза. Кроме того, способы включают введение фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество пептида по изобретению. Изобретение относится к способу лечения, при котором нуждающийся пациент страдает от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая ретинопатия, рубец радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0013] Изобретение также относится к способам лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, включающих введение нуждающемуся в этом пациенту выделенного пептида, содержащего аминокислотную

последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты. Способы включают введение терапевтически эффективного количества пептида по изобретению, такого как количество, эффективное для ингибирования ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости. Кроме того, способы включают введение фармацевтических композиций, содержащих терапевтически эффективное количество пептида по изобретению. Изобретение относится к способу лечения, при котором нуждающийся пациент страдает от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая ретинопатия, рубцовый радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0014] В любом из вышеуказанных способов вводимый пептид может быть связан с пептидом-носителем, таким как пептид антеннапедии (ПА), пенетратин пептид, ТАТ, транспортан или полиаргинин. Кроме того, в любом из вышеперечисленных способов вводимый пептид может быть конъюгирован с жирной кислотой, например, миристоилирован.

[0015] В любом из вышеприведенных способов выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты, вводят в комбинации с одним или более ингибитором ФРЭС, причем "ингибиторы ФРЭС" относятся к анти-ФРЭС антителам и их фрагментам, антителам к ФРЭС-рецептору (анти-ФРЭСР) и их фрагментам, антагонистическим пептидам и небольшим молекулам, которые ингибируют активность или сигнальный путь ФРЭС и/или ФРЭСР. Типовые ингибиторы ФРЭС включают бевацизумаб (Авастин), ранибизумаб (Люцентис), пегаптаниб (Макуген), афлиберцепт (Айлия), Сорафениб (Нексавар), сунитиниб (Сутент), пазопаниб (Вотриент), акситиниб (Инлита), PTK787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3 или SU11248.

[0016] В любом из вышеперечисленных способов по изобретению, выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты может быть введен в комбинации с лазерным лечением заболевания глаз, причем "заболевание глаз" относится к нарушению зрения или потери зрения (слепоте), дегенерации макулы, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной возрастной дегенерации макулы (ВДМ), ретинопатии недоношенных, ишемической ретинопатии, внутриглазной неоваскуляризации, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, неоваскуляризации хориоидеи, диабетическому отеку макулы, диабетической ишемии сетчатки, диабетическому отеку сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатии, рубцову радужной оболочки, неоваскулярной глаукоме, ретинобластоме, увеиту и неоваскуляризации трансплантата роговицы.

[0017] В любом из вышеперечисленных способов по изобретению выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты, может быть введен в комбинации со стероидом или любым современным способом лечения заболевания глаз.

[0018] Кроме того, в любом из способов по изобретению выделенный пептид по изобретению, ингибитор ФРЭС, стероид или любое другое лечение может быть введено путем интравитреальной инъекции или местно, например, в форме глазных капель.

[0019] Изобретение также относится к использованию выделенного пептида для получения лекарственного средства с целью ингибирования ангиогенеза у нуждающегося пациента, причем пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты. Применение изобретения включает использование выделенного пептида по изобретению для получения лекарственного средства, содержащего терапевтически эффективное количество пептида по изобретению, такого как количество, эффективное для ингибирования ангиогенеза. Кроме того, данное изобретение относится к выделенному пептиду по изобретению для получения лекарственного средства, содержащего композицию, содержащую терапевтически эффективное количество пептида по изобретению. Изобретение относится к применению выделенного пептида по изобретению для получения лекарственного средства для введения страдающему от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая ретинопатия, рубцов радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0020] Изобретение также относится к использованию выделенного пептида для получения лекарственного средства для лечения сосудистого нарушения, индуцированного ФРЭС, причем пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты. Применение изобретения включает использование выделенного пептида по изобретению для получения лекарственного средства, содержащего терапевтически эффективное количество пептида по изобретению, такого как количество, эффективное для ингибирования ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости. Кроме того, данное изобретение относится к выделенному пептиду по изобретению для получения лекарственного средства, содержащего композицию, содержащую терапевтически эффективное количество пептида по изобретению. Изобретение относится к применению пептида по изобретению для получения лекарственного средства для введения субъекту, страдающему от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая ретинопатия, рубцов радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0021] В любом из вышеперечисленных применений вводимый выделенный пептид



может быть связан с пептидом-носителем, таким как пептид антеннапедии (ПА), пенетратин пептид, ТАТ, транспортан или полиаргинин. Кроме того, в любом из вышеперечисленных способов вводимый выделенный пептид может быть конъюгирован с жирной кислотой, например, миристоилирован.

5 [0022] В любом из вышеперечисленных применений выделенный пептид, содержащий аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты, вводят в комбинации с одним или более ингибиторами ФРЭС, причем "ингибиторы ФРЭС" относятся к анти-ФРЭС антителам и их фрагментам, анти-ФРЭСР антителам и их фрагментам, антагонистическим пептидам и небольшим  
10 молекулам, которые ингибируют активность или сигнальный путь ФРЭС или ФРЭСР. Типовые ингибиторы ФРЭС включают бевацизумаб (Авастин), ранибизумаб (Люцентис), пегаптаниб (Макуген), афлиберцепт (Айлия), Сорафениб (Нексавар), сунитиниб (Сутент), пазопаниб (Вотриент), акситиниб (Инлита), РТК787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3 или SU11248.

15 [0023] В любом из вышеперечисленных применений изобретения лекарственный препарат, содержащий аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты, может быть введен в комбинации с лазерным лечением заболевания глаз, причем "заболевание глаз" относится к нарушению зрения или потери зрения (слепоте), дегенерации макулы, окклюзии  
20 центральной вены сетчатки, окклюзии ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной возрастной дегенерации макулы (ВДМ), ретинопатии недоношенных, ишемической ретинопатии, внутриглазной неоваскуляризации, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, неоваскуляризации хориоидеи, диабетическому отеку макулы, диабетической ишемии  
25 сетчатки, диабетическому отеку сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатии, рубцову радужной оболочки, неоваскулярной глаукоме, ретинобластоме, увеиту и неоваскуляризации трансплантата роговицы.

[0024] В любом из вышеперечисленных применений изобретения лекарственное средство можно вводить в комбинации со стероидом или любым современным способом  
30 лечения заболевания глаз.

[0025] Кроме того, в любом из применений изобретения лекарственное средство может быть введено путем интравитреальной инъекции или местно, например, в форме глазных капель.

[0026] Изобретение относится к выделенному пептиду для ингибирования ангиогенеза, причем пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты.  
35

[0027] Изобретение также относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество пептида по изобретению для ингибирования ангиогенеза. Изобретение относится к выделенному пептиду или композиции, содержащей  
40 терапевтически эффективное количество пептида для ингибирования ангиогенеза у субъекта, страдающего от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная  
45 дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая

ретинопатия, рубец радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0028] Изобретение также относится к выделенному пептиду для использования при ингибировании ангиогенеза у пациента, страдающего расстройством, связанным с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, причем выделенный пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO:1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) или их фрагменты.

[0029] Изобретение также относится к композиции, содержащей терапевтически эффективное количество выделенного пептида по изобретению для ингибирования ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости. Изобретение относится к выделенному пептиду или композиции, содержащей терапевтически эффективное количество пептида для ингибирования ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости у субъекта, страдающего от рака или нарушения, связанного с проницаемостью, индуцированной ФРЭС, такого как нарушение зрения или потеря зрения (слепота), дегенерация макулы, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви вены сетчатки, пролиферативная диабетическая ретинопатия, неоваскулярная возрастная дегенерация макулы (ВДМ), ретинопатия недоношенных, ишемическая ретинопатия, внутриглазная неоваскуляризация, неоваскуляризация роговицы, неоваскуляризация сетчатки, неоваскуляризация хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическая ишемия сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативная диабетическая ретинопатия, рубец радужной оболочки, неоваскулярная глаукома, ретинобластома, увеит и неоваскуляризация трансплантата роговицы.

[0030] Изобретение также относится к выделенному пептиду для лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью. Например, связанное с ФРЭС сосудистое расстройство представляет собой нарушение зрения или потерю зрения (слепоту), дегенерацию макулы, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, неоваскулярную возрастную дегенерацию макулы (ВДМ), ретинопатию недоношенных, ишемическую ретинопатию, внутриглазную неоваскуляризацию, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, неоваскуляризацию хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическую ишемию сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативную диабетическую ретинопатию, рубец радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, ретинобластому, увеит и неоваскуляризацию трансплантата роговицы.

[0031] Любой из пептидов по изобретению используется для ингибирования ангиогенеза или для лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, может быть связан с пептидом-носителем, таким как пептид антеннапии (ПА), пенетратин пептид, ТАТ, транспортан или полиаргинин. Кроме того, любой из выделенных пептидов по изобретению для использования в ингибировании ангиогенеза или лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, может быть конъюгирован с жирной кислотой, например, миристоилирован.

[0032] Любой из выделенных пептидов или композиций по изобретению может быть введен в комбинации с одним или более ингибиторами ФРЭС, причем "ингибиторы ФРЭС" относятся к анти-ФРЭС антителам и их фрагментам, анти-ФРЭСР антителам и их фрагментам, антагонистическим пептидам и небольшим молекулам, которые ингибируют активность или сигнальный путь ФРЭС или ФРЭСР. Типовые ингибиторы ФРЭС включают Бевацизумаб (Авастин), Ранибизумаб (Люцентис), Пегаптаниб

(Макуген), Афлиберцепт (Айлия), Сорафениб (Нексавар), Сунитиниб (Сутент), Пазопаниб (Вотриент), Акситиниб (Инлита), РТК787/ZK222584, ZD-6474, SU6668, PD-547,632, VEGF-Trap, CEP-7055, NM-3 или SU11248. Кроме того, пептид или ФРЭСР вводят путем интравитреальной инъекции или местно, например, в форме глазных

капель.

[0033] Любой из выделенных пептидов или композиций по изобретению может быть введен в комбинации с лазерным лечением заболевания глаз, причем "заболевание глаз" относится к нарушению зрения или потери зрения (слепоте), дегенерации макулы, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной возрастной дегенерации макулы (ВДМ), ретинопатии недоношенных, ишемической ретинопатии, внутриглазной неоваскуляризации, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, неоваскуляризации хориоидеи, диабетическому отеку макулы, диабетической ишемии сетчатки, диабетическому отеку сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатии, рубезу радужной оболочки, неоваскулярной глаукоме, ретинобластоме, увеиту и неоваскуляризации трансплантата роговицы.

[0034] Выделенные пептиды или композиции по изобретению могут быть введены в комбинации со стероидом или любым современным способом лечения заболевания глаз.

[0035] Кроме того, выделенные пептиды или композиции по изобретению могут быть введены путем интравитреальной инъекции или местно, например, в форме глазных капель.

#### КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0036] На Фиг. 1 показана роль EB3 в воспалительно-индуцированной гиперпроницаемости эндотелиального барьера. EB3 устанавливает временные взаимодействия растущих концов MT с  $IP_3R_3$ , сенсibiliзирует  $IP_3R_3$  и положительно регулирует как высвобождение  $Ca^{2+}$  из депо, так и SOC-зависимый вход  $Ca^{2+}$  при воспалении. Это приводит к усилению  $Ca^{2+}$  сигналинга и повышенной проницаемости благодаря ПКСа-опосредованному фосфорилированию p120-катенина и сократительной способности актомиозина.

[0037] На Фиг. 2 показано выравнивание человеческих рецепторов  $IP_3$  рецепторов (794-814 а.к.  $IP_3R_3$  тип 3) с мотивом связывания EB (выделено). Пептид  $IP_3R_3$  (SEQ ID NO: 1) показан ниже выравнивания.

[0038] На Фиг. 3 показано ленточное представление структуры EB3 (пурпурный) и  $IP_3R_3$  пептида (SEQ ID NO: 1), присоединенного к гидрофобной связующей EB3; показано вращение на  $180^\circ$ .  $IP_3R_3$  производный пептид был присоединен с использованием программы Z-Dock вместе с программным обеспечением Discovery Studio 3.0. Энергия связи между пептидом и EB3 была рассчитана как -68,882 ккал/моль.

[0039] На Фиг. 4 показано ингибирование пептидом  $IP_3R_3$  (SEQ ID NO: 1) высвобождения  $Ca^{2+}$  из ЭР в ответ на активацию PAR-1. А. HMVEC, предварительно обработанные AP-прикрепленным  $IP_3R_3$  пептидом или контрольным пептидом (AP), был загружен с Fura 2-AM, и соотношение 340/380 было рассчитано после стимуляции клеток тромбином (50 нМ) в отсутствие и в присутствии внеклеточного  $Ca^{2+}$ . Стрелка, время добавления тромбина. На графике В показано среднее  $\pm$ СД для индуцированного тромбином высвобождения  $Ca^{2+}$ , и вход рассчитан как максимальное увеличение по

сравнению с исходным уровнем. Увеличение нормализуется для контроля необработанных клеток из того же эксперимента (n=4).

[0040] На Фиг. 5 показано ленточное представление EB3 в комплексе с EBIN (SEQ ID NO: 3) и пептидом IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 1). Вычисленная энергия связи составляет

-68,882 и -60,251 для IPR и EBIN соответственно.

[0041] На Фиг. 6A-6B, на панели A показана подкожная трансудация альбумин-связанного красителя голубого Эванса, которая была индуцирована внутрикожной инъекцией ФРЭС, и на панели B показана количественная оценка трансудации, измеренная спектрофотометрически при 620 нм.

[0042] На Фиг. 7A-7D на панели A показано, что EBIN ингибирует тубулогенез в лунках с покрытием из матригеля (масштабная панель 200 мкм). На панели B показано количество ветвей на площадь; НО=необработанный; контр=контрольный пептид; \*\* $p < 0,001$  (n=3 лунки на группу). На панели C показано окрашивание гемматоксилином и эозином (ГЭ) обработанных матригелем пробок. Группа 1 получала лечение контрольным пептидом, и группа 3 получала лечение Мур-EBIN на 0, 36 и 60 часу; группа 2 получала только 36 и 60-часовое лечение. На панели D показано количество сосудов на мм<sup>2</sup>; \*\*\* $p < 0,001$  (n=15 на группу). Масштабная панель, 200 мкм.

[0043] На Фиг. 8A-8B показано влияние лечения с помощью EBIN на кривую роста опухоли и неоваскуляризацию. На панели A отображена кривая роста опухоли в ксенотрансплантатной модели; показано среднее; n=8 мышей на группу. На панели B отображено количество сосудов на площадь, подсчитанных за пределами опухоли; n=25 полей/мышь; N=5 мышей; \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ .

[0044] На Фиг. 9 показана общая схема индукции хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) на модели животного на: (a) поперечном разрезе глаза, демонстрируя лазерный луч, сфокусированный на пигментном эпителии сетчатки, для индукции лазерного ожога и разрыва мембраны Бруха; (b) разрыв мембраны Бруха индуцирует пролиферацию кровеносного сосуда в сосудистой оболочке и ХНВ поражение в сетчатке.

[0045] На Фиг. 10 показана краткая схема для индуцированной лазером ХНВ, оптическая когерентная томография (ОКТ), флюоресцентная ангиография на фундус-камере, лечение и сбор ткани для групп 1-3 (как указано в таблице 4).

[0046] На Фиг. 11 показан эффект от EBIN для лечения ХНВ. Корреляционный анализ трансудации (a) и поражения (b-c) у мышей, получавших интравитреальную инъекцию контрольного пептида (Мур-FAEIPTI), EBIN (Мур-FTEIPTI) и мышинового анти-ФРЭС антитела (LEAF<sup>TM</sup>). Репрезентативные изображения Флюоресцентной Ангиографии на Фундус-камере (a) и соответствующей Оптической Когерентной Томографии (b) на 15-й день после лазерной фотокоагуляции; цифры в желтом обозначают соответствующие поражения ХНВ. Площадь трансудации коррелирует с размером поражения. (c) ХНВ поражение детектируется путем окрашивания изолектином B4 с использованием плоского препарата пигментного эпителия сетчатки/хороида/склеры. Количественная оценка площади трансудации флуоресцеина (d) и поражения (e) с использованием изображений, показанных в пунктах (a) и (c); n=6-9 мышей на группу; \*\*,  $p < 0,01$ . Масштабная панель, 200 мкм и 100 мкм в (a) и (c) соответственно. Сравнение групп проводили с использованием ANOVA. Лечение с помощью анти-ФРЭС значительно изменило процесс заживление ран/рубцов на поврежденной области, тогда как лечение с помощью EBIN не повлияло на процесс заживления.

[0047] На Фиг. 12 показано влияние 7-дневного исследования острой токсичности для EBIN. Репрезентативные изображения флюоресцентной ангиографии на фундус-камере (a) и соответствующей оптической когерентной томографии (b) на 8-й день

интравитреального лечения с помощью EBIN (1 мкг/глаз). Обратите внимание, что EBIN образует небольшие кристаллы/преципитат внутри стекловидного тела; не было обнаружено никаких видимых изменений в сосудистой сети сетчатки и эпителия сетчатки, сосудистой оболочки, склеры.

## ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0048] Изобретатели сделали удивительное открытие, что пептиды, полученные из взаимодействующего с EB3 домена рецептора типа 3 ( $IP_3R_3$ ) инозитол 1,4,5-трифосфата ( $IP_3$ ), уменьшают взаимодействие между концевым связывающим белком 3 (EB3) и  $IP_3R_3$ , и ингибируют ФРЭС-индуцированную сосудистую проницаемость или ФРЭС-индуцированную микрососудистую транссудацию. Пептиды по изобретению демонстрируют защитные барьерные свойства при различных воспалительных заболеваниях и демонстрируют антиангиогенные свойства *in vitro* и *in vivo*.

[0049] В предыдущей работе рассматривалась роль МТ цитоскелета в  $IP_3$ -регулируемом высвобождении  $Ca^{2+}$  из депо ЭП, и EB3 необходим для опустошения  $Ca^{2+}$  из ЭР.  $IP_3R_3$  содержит EB-связывающий консенсусный мотив, Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (SEQ ID NO: 5). Короткий пептид на основе последовательности  $IP_3R_3$  (KFARLWTEIPTAIT - SEQ ID NO: 1) показывает высокую связывающую активность для EB3 (см. Пример 1). Эти исследования показывают, что взаимодействие между  $IP_3R_3$  и EB3 критичны в механизме активации  $IP_3R$ .

[0050] Роль EB3 в воспалительно-индуцированной гиперпроницаемости эндотелиальных барьерных центров заключается в его способности устанавливать временные взаимодействия растущих концов МТ с  $IP_3R_3$ . В результате EB3 сенсibiliзирует  $IP_3R_3$  к  $IP_3$  и позитивно регулирует высвобождение  $Ca^{2+}$  из эндоплазматического ретикулума (ЭР). Это приводит к SOC-зависимому входу  $Ca^{2+}$  и усилению  $Ca^{2+}$  сигнализации. Повышенная концентрация цитоплазматического  $Ca^{2+}$  индуцирует опосредованное ПКС αфосфорилирование p120-катенина, что приводит к распаду спайки VE-кадгерин. Это также облегчает RhoA-зависимую сократительную способность актомиозина, приводящую к изменениям формы клетки. См. Фиг. 1. Эта работа подробно описана в международной заявке № PCT/US2012/042118 и Патенте США № 8,912,139, которые включены в качестве ссылки во всей их полноте.

[0051] Способы и материалы, описанные ниже, предотвращают или ингибируют индуцированную ФРЭС микрососудистую транссудацию и, следовательно, пригодны для ингибирования ангиогенеза и лечения расстройств, таких как дегенерация макулы, диабетическая ретинопатия, рак, окклюзия центральной вены сетчатки и окклюзия ветви вены сетчатки, называя некоторые из них.

## Определения

[0052] Терминология, используемая в данном документе, предназначена для описания конкретных вариантов реализации изобретения и не имеет ограничительного характера. Используемые в данном описании и формуле изобретения слова в единственном числе означают также и множественное число, если из контекста очевидно не следует иное.

[0053] В данном документе для декларирования числовых диапазонов каждое промежуточное число между ними с одинаковой степенью точности явно рассматривается. Например, для диапазона 6-9 номера 7 и 8 рассматриваются дополнительно к 6 и 9, а для диапазона 6,0-7,0 - числа 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 и 7,0 явно рассматриваются.

[0054] В данном контексте "ангиогенез" относится к процессу, посредством которого новые кровеносные сосуды формируются из уже существующих сосудов. Например, цитокины и протеазы внеклеточного матрикса индуцируют ремоделирование тканей при подготовке к миграции эндотелиальных клеток из существующих сосудов с

5 образованием новых сосудов.

[0055] В данном контексте "фрагмент" может означать часть эталонного пептида или полипептида или последовательность нуклеиновой кислоты.

[0056] В данном контексте "идентичная" или "идентичность" в контексте двух или более полипептидных или нуклеотидных последовательностей может означать, что

10 последовательности имеют определенный процент остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми в определенной области. Процент может быть рассчитан путем оптимального выравнивания двух последовательностей, сравнивая две последовательности по указанной области, определяя количество позиций, в которых одинаковый остаток присутствует в обеих последовательностях, чтобы получить

15 количество согласованных позиций, деля количество совпадающих позиций на общее количество позиций в указанной области и умножая результат на 100, чтобы получить процент идентичности последовательности. В случаях, когда две последовательности имеют разную длину или выравнивание приводит к получению одного или более ступенчатых концов, и указанная область выравнивания включает только одну

20 последовательность, остатки одной последовательности включают в знаменатель, но не числитель при вычислении.

[0057] В данном контексте "пептид" или "полипептид" может относиться к связанной последовательности аминокислот и может быть природным, синтетическим или модификацией, или комбинацией натурального и синтетического.

25 [0058] В данном контексте "по существу идентичная" может означать, что первая и вторая белковая или нуклеотидная последовательности являются идентичными по меньшей мере на 50% - 99% в области 6-100 или более аминокислотных (нуклеотидных) остатков.

[0059] Каждое определение "врачевание", "лечение" или "лечить" может означать

30 облегчение, ослабление, подавление, устранение, предотвращение или замедление появления симптомов, клинических признаков или основной патологии состояния или нарушения на временной или постоянной основе. Предотвращение патологического состояния или нарушения включает введение агента по данному изобретению субъекту до манифестации заболевания. Ослабление патологического состояния или нарушения

35 включает введение агента по данному изобретению субъекту после индукции состояния или нарушения, но до его клинического проявления. Подавление патологического состояния или нарушения включает введение агента по данному изобретению субъекту после клинического проявления заболевания.

[0060] Термин "терапевтически эффективный" зависит от состояния субъекта и

40 конкретного вводимого соединения. Этот термин относится к количеству, эффективному для достижения желаемого клинического эффекта. Терапевтически эффективное количество варьируется в зависимости от характера состояния, подлежащего лечению, промежутка времени, в течение которого требуется данная активность, а также возраста и состояния субъекта, и в конечном итоге определяется поставщиком медицинских

45 услуг. В одном аспекте терапевтически эффективное количество пептида или композиции представляет собой количество, эффективное для ингибирования, уменьшения или предотвращения ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемости и/или ангиогенеза.

[0061] "Вариант" означает пептид или полипептид, который отличается вставкой

аминокислотной последовательности, делецией или консервативной заменой аминокислот, но сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Типичные примеры "биологической активности" включают способность связываться с концевым связывающим белком, с Toll-подобным рецептором (TLR) и быть связанным

5 специфическим антителом. Вариант может также означать белок с аминокислотной последовательностью, которая по существу идентична эталонному белку с аминокислотной последовательностью, которая сохраняет по меньшей мере одну биологическую активность. Консервативная аминокислотная замена, то есть замена аминокислоты другой аминокислотой со сходными свойствами (например,

10 гидрофильностью, степенью и распределением заряженных областей) признана в данной области техники, как правило, с незначительным изменением. Эти незначительные изменения могут быть идентифицированы, в частности, путем рассмотрения индекса гидрофобности аминокислот, как понимается в данной области техники. Kyte *et al.*, *J. Mol. Biol.* 157: 105-132 (1982). Индекс гидрофобности аминокислоты основан на учете

15 ее гидрофобности и заряда. В данной области техники известно, что аминокислоты со сходными гидрофобными индексами могут быть замещены и все еще сохранять функцию белка. В одном аспекте замещены аминокислоты, имеющие гидрофобные индексы  $\pm 2$ . Гидрофильность аминокислот также может быть использована для выявления замещений, которые приведут к сохранению биологических функций белков.

20 Рассмотрение гидрофильности аминокислот в контексте пептида позволяет рассчитывать наибольшую локальную среднюю гидрофильность этого пептида, полезную меру, которая, как сообщается, хорошо коррелирует с антигенностью и иммуногенностью. Патент США № 4,554,101 полностью включенный в данный документ посредством ссылки. Замена аминокислот, имеющих сходные значения гидрофильности, может

25 привести к тому, что пептиды сохраняют биологическую активность, например, иммуногенность, как известно в данной области техники. Замены могут быть выполнены с использованием аминокислот, имеющими значения гидрофильности в пределах  $\pm 2$ . Как индекс гидрофобности, так и значение гидрофильности аминокислот зависят от конкретной боковой цепи этой аминокислоты. В соответствии с этим наблюдением,

30 аминокислотные замены, которые совместимы с биологической функцией, как известно зависят от относительного сходства аминокислот и, в частности, боковых цепей этих аминокислот, как видно из гидрофобности, гидрофильности, заряда, размера и других свойств.

[0062] В данном документе представлен пептид, который может включать

35 аминокислотную последовательность K FARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), K FARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2) (также упоминается в данном документе как пептид IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) (также упоминается в данном документе как концевой связывающий ингибирующий пептид или "EBIN"), пептид, описанный в Таблице 1

данного документа, его фрагмент или его вариант. Вариант может включать

40 консервативную замену. Пептид может содержать последовательность EB-связывающего консенсусного мотива, такую как EB-связывающая консенсусная последовательность IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> или ее фрагмент. EB-связывающая консенсусная последовательность IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> может быть Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5). Пептид может состоять из K FARLWTEIPTAIT

45 (SEQ ID NO: 1), K FARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), консенсусной последовательности, содержащей Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ ID NO: 5), пептида, описанного в Таблице 1 данного документа, фрагмента вышеупомянутого или консервативного варианта вышеупомянутого пептида. Вариант может включать любую последовательность пептида, включающую последовательность Ser/Thr-x-Ile-Pro (SEQ

ID NO: 5), минимальную последовательность ЕВ-связывающего консенсусного мотива.

[0063] Пептид может включать аминокислотную последовательность K<sub>F</sub>ARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), K<sub>F</sub>ARLWAEIPTAIT (SEQ ID NO: 2) (также упоминается в данном документе как пептид IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3) (также

упоминается в данном документе как концевой связывающий ингибирующий пептид или "EBIN"), пептид, описанный в Таблице 1 данного документа, его фрагмент или его вариант, причем пептид или полипептид, включающий пептид, представляет собой 7 аминокислотных остатков, 8 аминокислотных остатков, 9, аминокислотные остатки, 10, аминокислотные остатки, 11, аминокислотные остатки, 12 аминокислотных остатков, 13 аминокислотных остатков, 14 аминокислотных остатков, 15 аминокислотных остатков, 16 аминокислотных остатков, 17 аминокислотных остатков, 18 аминокислотных остатков, 19 аминокислотных остатков, 20 аминокислотных остатков, 21 аминокислотный остатков, 22 аминокислотных остатка, 23 аминокислотных остатка, 24 аминокислотных остатка, 25 аминокислотных остатков, 26 аминокислотных остатков, 27 аминокислотных остатков, 28 аминокислотных остатков, 29 аминокислотных остатков, 30 аминокислотных остатков, 35 аминокислотных остатков, 40 аминокислотных остатков, 45 аминокислотных остатков, 50 аминокислотных остатков, 55 аминокислотных остатков, 60 аминокислотных остатков, 65 аминокислотных остатков, 70 аминокислотных остатков, 75 аминокислотных остатков, 80 аминокислотных остатков, 85 аминокислотных остатков, 90 аминокислотных остатков, 95 аминокислотных остатков или 100 аминокислотных остатков.

[0064] Пептид может быть модифицирован таким образом, что аминокислотная последовательность имеет одну или более аминокислотных замен, аминокислотных вставок, аминокислотных делеций, усечение карбоксильного конца или усечение аминоконца.

[0065] Пептид также может быть гликозилированным, фосфорилированным, сульфатированным, гликозилированным, анимированным, карбоксилированным, ацетилованным. Например, С-конец может быть модифицирован амидированием, добавлением пептидных спиртов и альдегидов, добавлением сложных эфиров, добавлением п-нитроанилина и тиоэфиров, и мультипелентигенных пептидов. N-концевые и боковые цепи могут быть модифицированы путем ПЭГилирования, ацетилования, формилирования, добавления жирной кислоты, добавления бензоила, добавления бромацетила, добавления пироглутамила, сукцинилования, добавления тетрабутилоксикарбонила и добавления 3-меркаптопропила, ацилирования (например, липопептиды), биотинилирования, фосфорилирования, сульфатирования, гликозилирования, введения малеимидогруппы, хелатирующих фрагментов, хромофоров и флуорофоров.

[0066] Пептид может быть конъюгирован с жирной кислотой, например, быть миристоилированным. Например, жирная кислота может быть конъюгирована с N-концом пептида, такие жирные кислоты включают каприловую кислоту (C8), каприновую кислоту (C10), лауриновую кислоту (C12), миристиновую кислоту (C14), пальмитиновую кислоту (C16) или стеариновую кислоту (C18) и т.д. Кроме того, цистеины в пептидах могут быть пальмитоилированы.

[0067] Пептид может быть конъюгирован или связан с другим пептидом, таким как пептид-носитель. Пептид-носитель может способствовать проникновению клеток, такой как пептид антеннапедии, пентратин пептид, ТАТ, транспортан или полиаргинин.

[0068] Пептиды могут быть циклическими. Пептид, описанный в данном документе, может быть циклизирован путем добавления одного или более дисульфидных мостиков,



добавления одной или более амидных связей между N- и C-концом, нагревом для циклизации хвоста, циклизации боковой цепи (например, лактамный мост, тиоэфир), углеводород-стабильных пептидов.

[0069] Пептид может быть помечен с помощью мечения тяжелыми изотопами, например,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ , FITC, конъюгации с белком-носителем, конъюгации с визуализирующим агентом, субстратов FRET с парой флюорофор/гаситель флуоресценции, конъюгации пептид-ДНК, конъюгации пептид-РНК и мечения пептид-фермент.

[0070] Пептид может находиться в слитом белке, таком как слитый с полипептидом или пептидом, который способствует олигомеризации, такой как домен лейциновая "молния"; полипептидом или пептидом, который повышает стабильность или увеличивает период полувыведения, такой как константная область иммуноглобулина; и полипептидом, который имеет терапевтическую активность, отличную от пептида или изобретения, химиотерапевтическим агентом, антителом или белком для тканеспецифического таргетирования.

[0071] Слияния могут быть сделаны либо на amino-конце, либо на карбоксильном конце полипептида. Слитые белки могут быть прямыми без линкерной или адаптерной молекулы или непрямыми с использованием линкерной или адаптерной молекулы. Линкерная или адаптерная молекула может представлять собой один или более аминокислотных остатков, как правило вплоть до от около 20 до около 50 аминокислотных остатков. Линкерная или адаптерная молекула также может быть сконструирована с сайтом расщепления для протеазы, чтобы обеспечить отделение слитых фрагментов. Например, пептид может быть слит с одним или более доменами Fc-области человеческого IgG для увеличения периода полувыведения пептида или добавления вариабельного домена Fab, чтобы сократить период полувыведения пептида.

#### Способы лечения

[0072] Приведенный в данном документе представляет собой способ ингибирования, предотвращения или уменьшения ангиогенеза. Ангиогенез связан с ростом опухоли, прогрессированием рака и метастазами, слепотой и дегенерацией макулы, диабетической ретинопатией, называя некоторые из них.

[0073] Изобретение относится к способу ингибирования ангиогенеза, связанного с ростом опухоли, прогрессированием рака и метастазами. Изобретение также относится к способам лечения, ингибирования и предотвращения роста опухоли и рака, таких как, например, опухоли головного мозга (включая менингиомы, мультиформную глиобластому, анапластические астроцитомы, астроцитомы мозжечка, другие астроцитомы высокого или низкого уровня, глиомы головного мозга, олигодендроглиомы, смешанные глиомы, другие глиомы, церебральные нейробластомы, краниофарингиомы, диэнцефальные глиомы, герминомы, медуллобластомы, эпендимомы, опухоли хориоидного сплетения, паренхиматозные опухоли шишковидного тела, ганглиоглиомы, нейроэпителиальные опухоли, нейронные или смешанные нейронные глиальные опухоли), опухоли легких (включая мелкоклеточные карциномы, эпидермоидные карциномы, аденокарциномы, крупноклеточные карциномы, карциноидные опухоли, опухоли бронхиальной железы, мезотелиомы, саркомы или смешанные опухоли), рак предстательной железы (включая аденокарциномы, плоскоклеточный рак, карциному переходных клеток, карциному предстательной маточки или карциносаркомы), рак молочной железы (включая аденокарциномы или карциноидные опухоли) или рак желудка, кишечника или толстой кишки (включая аденокарциному, инфильтративно-протоковую карциному, инфильтрирующую или

инвазивную дольковую карциному, медуллярную карциному, протоковую карциному in situ, лобулярную карциному in situ, коллоидную карциному или рак соска молочной железы Педжета), рака кожи (включая меланому, плоскоклеточный рак, прогрессирующее опухоль кератиноцитов кожи человека, карциному базальных клеток, гемангиоперицитому и саркому Карпоши), лимфомы (включая болезнь Ходжкина и Неходжкинскую лимфому), саркомы (включая остеосаркому, хондросаркому и фибросаркому), а также для лечения расстройств нервной системы.

[0074] Введение пептидов по изобретению может быть объединено с другими противораковыми препаратами, противоопухолевыми агентами и

химиотерапевтическими агентами, такими как ингибитор ароматазы, антиэстроген, антиандроген, агонист гонадотропина, ингибитор топоизомеразы I, ингибитор топоизомеразы II, активный агент микротрубочек, алкилирующий агент, ретиноид, каротиноид, токоферол, ингибитор циклооксигеназы, ингибитор MMP, ингибитор mTOR, антиметаболит, соединение платины, ингибитор метионин-аминопептидазы, бисфосфонат, антипролиферативное антитело, ингибитор гепараназы, ингибитор онкогенных изоформ Ras, ингибитор теломеразы, ингибитор протеасомы, соединение, используемое в лечении гематологических злокачественных новообразований, ингибитор Flt-3, ингибитор Hsp90, ингибитор белка веретена кинезина, ингибитор MEK, противоопухолевый антибиотик, нитрозомочевина, соединение, направленное/уменьшающее активность белка или липидкиназы, соединение, направленное/уменьшающее активность белка или активность липид фосфатазы, любое дополнительное антиангиогенное соединение и их комбинации. Конкретные примеры противоопухолевых агентов включают, но не ограничиваются ими, азацитидин, аксатиоприн, бевацизумаб, блеомицин, капецитабин, карбоплатин, хлорабуцил, цисплатин, циклофосфамид, цитарабин, даунорубин, доцетаксел, доксифлуридин, доксорубин, эпирубин, этопозид, фторурацил, гемцитабин, герцептин, идарубин, мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурин, метотрексат, митоксантрон, оксалиплатин, паклитаксел, тафлупозид, тенипозид, тиогуанин, ретиноевая кислота, валрубин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, рецепторные ингибиторы тирозинкиназы и их комбинации. Дополнительные примеры противоопухолевых или химиотерапевтических средств известны в данной области техники.

[0075] Изобретение относится к способам лечения дегенерации макулы, включая влажную макулодистрофию и сухую макулодистрофию, включающим введение пептида по изобретению. Влажная макулодистрофия возникает, когда аномальные кровеносные сосуды растут за макулой. Эти сосуды являются хрупкими и могут пропускать жидкость и кровь, что приводит к образованию рубцов на макуле и повышению вероятности скоротечного и тяжелого повреждения. Мембрана Бруха разрушается, как правило, вблизи отложений друз. Именно здесь происходит новый рост кровеносных сосудов или неоваскуляризация. Центральное зрение может быть искажено или полностью потеряно за короткий промежуток времени, иногда в течение нескольких дней.

[0076] Для способов лечения макулярной дегенерации предполагается офтальмологическое введение пептидов по изобретению. Кроме того, введение пептидов может быть объединено с другими терапевтическими агентами, такими как другие антиангиогенные лекарственные средства, такие как бевацизумаб (Авастин), ранибизумаб (Люцентис), пегаптаниб (Макуген), афлиберцепт (Айлия), лодамин (полимерная композиция TNP-470), вертепорфин (Визудин) (фотодинамическая терапия или ФДТ), олигонуклеотидная терапия, антитела к Dr5, модуляторы малой молекулы киназы, нацеленные на c-Met, производные хинолона, конденсированные производные

бициклического пиридина и пиразина, или пирролопиримидиновые соединения в качестве ингибиторов CDK4/6. Дополнительные терапевтические агенты известны в данной области техники. Кроме того, введение пептидов по изобретению для лечения дегенерации макулы может быть объединено с другими процедурами, такими как имплантируемый телескоп, лазерная фотокоагуляция и операция по транслокации макулы.

[0077] Приведенный в данном документе является способ лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью. Например, изобретение относится к способам лечения нарушения зрения или потери зрения (слепоты), дегенерации макулы, окклюзии центральной вены сетчатки, окклюзии ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатии, неоваскулярной возрастной дегенерации макулы (ВДМ), ретинопатии недоношенных, ишемической ретинопатии, внутриглазной неоваскуляризации, неоваскуляризации роговицы, неоваскуляризации сетчатки, неоваскуляризации хориоидеи, диабетического отека макулы, диабетической ишемии сетчатки, диабетического отека сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатии, рубцеоза радужной оболочки, неоваскулярной глаукомы, ретинобластомы, увеита и неоваскуляризации трансплантата роговицы.

#### Объект

[0078] Объектом может быть млекопитающее, которое может быть человеком. Перед диагностикой объект может подвергаться риску заболевания раком из-за воздействия одного или более факторов риска или иметь генетический риск развития рака. Один или более факторов риска могут включать, например, объект, имеющий семейную историю рака, возраст, курение табака, воздействие солнца, употребление алкогольных напитков, отсутствие физической активности, ожирение и/или дефицита питания.

[0079] Перед диагностикой у объекта может возникнуть риск развития дегенерации макулы, поскольку он подвергается воздействию одного или более факторов риска или имеет генетический риск развития дегенерации макулы. Один или более факторов риска могут включать, например, объект, имеющий семейную историю дегенерации макулы, возраст, курение табака, длительное пребывание на солнце, диету с высоким содержанием жиров, недостаточность питания, высокое кровяное давление, ожирение и/или светлые цветные глаза.

#### Введение

[0080] Подходящие способы введения физиологически приемлемой композиции, такой как фармацевтическая композиция, содержащая соединение и/или мицеллу, описанные в данном документе, хорошо известны в данной области техники. Хотя для введения пептида можно использовать более одного пути, конкретный путь может обеспечить более непосредственную и эффективную реакцию, чем другой путь. В зависимости от обстоятельства, фармацевтическая композиция, содержащая пептид, наносится или вводится в полости тела, абсорбируется через кожу или слизистые оболочки, попадает внутрь, вводится в дыхательные пути и/или вводится в кровоток. Например, при определенных обстоятельствах желательно доставить фармацевтическую композицию перорально; посредством инъекции или инфузии внутривенными, внутриопухолевыми, интраперитонеальными, внутрицеребральными (интрапаренхиматозными), интрацеребровентрикулярными, внутримышечными, внутриокулярными, внутриартериальными, интрапортальными, внутриочаговыми, интрамедуллярными, интратекальными, интравентрикулярными, трансдермальными, подкожными, интраперитонеальными, интраназальными, энтеральными, локальными,

сублингвальными, уретральными, вагинальными или ректальными способами; с контролем, задержкой, замедлением или иным образом модифицированной системой высвобождения или с помощью имплантационных устройств. В одном аспекте воздействие лекарственного средства можно оптимизировать, поддерживая постоянные концентрации лекарственного средства в плазмы с течением времени. Такое стабильное состояние обычно достигается в клинических условиях путем непрерывной инфузии лекарственного средства в дозах в зависимости от выведения лекарственного средства и поддержания концентрации в плазме. При желании композицию вводят регионально путем внутриопухолевого введения, интратекального введения, интрацеребрального (интрапаренхиматозного) введения, интрацеребровентрикулярного введения или внутриартериального или интраартериального или интравенозного введения, ориентированного на область интереса. Альтернативно, пептид вводят локально посредством имплантации матрицы, мембраны, губки или другого подходящего материала, в которое желаемое соединение было абсорбировано или инкапсулировано. Когда используется имплантационное устройство, в одном аспекте устройство имплантируется в любую подходящую ткань или орган, а доставка желаемого соединения осуществляется, например, посредством диффузии, болюса с временным высвобождением или непрерывного введения.

[0081] Окулярное введение пептидов может осуществляться с использованием внутриглазных имплантатов, интравитреальных инъекций, системного введения, местного применения, наночастиц, микрочастиц, глазных капель, биоадгезивных гелей или фибринового герметика, полисахаридов для модуляции проницаемости комплекса барьеров эпителиальных клеток, пептида, улучшающего корнеальную доставку лекарственного средства, введения через слизистую оболочку, такого как введение с использованием биовекторного полимера, водных офтальмологических спреев и лечения с помощью электродинамического глазного распыления. В одном конкретном варианте реализации изобретения пептид может вводиться путем интравитреальной инъекции или местно, например, в виде глазных капель.

[0082] Пептид можно вводить в виде монотерапии или одновременно, или метронически с другими методами лечения, которые могут представлять собой хирургическое вмешательство или удаление опухоли. В данном контексте термин "одновременный" или "одновременно" означает, что пептид и другое лечение вводят в пределах 48 часов, предпочтительно 24 часов, более предпочтительно 12 часов, еще более предпочтительно 6 часов и наиболее предпочтительно 3 часов или менее от друг друга. В данном контексте термин "метронически" означает введение пептида в разное время относительно другого лечения и с определенной частотой относительно повторного введения. Например, пептид по изобретению можно вводить с одним или более ингибиторами ФРЭС. Например, пептид по изобретению можно вводить с одним или более ингибиторами ФРЭС или в комбинации с лазерным лечением потери зрения.

[0083] Пептид можно вводить в любой момент перед другим лечением, включая около 120 ч, 118 ч, 116 ч, 114 ч, 112 ч, 110 ч, 108 ч, 106 ч, 104 ч, 102 ч, 100 ч, 98 ч, 96 ч, 94 ч, 92 ч, 90 ч, 88 ч, 86 ч, 84 ч, 82 ч, 80 ч, 78 ч, 76 ч, 74 ч, 72 ч, 70 ч, 68 ч, 66 ч, 64 ч, 62 ч, 60 ч, 58 ч, 56 ч, 54 ч, 52 ч, 50 ч, 48 ч, 46 ч, 44 ч, 42 ч, 40 ч, 38 ч, 36 ч, 34 ч, 32 ч, 30 ч, 28 ч, 26 ч, 24 ч, 22 ч, 20 ч, 18 ч, 16 ч, 14 ч, 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч, 4 ч, 3 ч, 2 ч, 1 ч, 55 мин, 50 мин, 45 мин, 40 мин, 35 мин, 30 мин, 25 мин, 20 мин, 15 мин, 10 мин, 9 мин, 8 мин, 7 мин, 6 мин, 5 мин, 4 мин, 3 мин, 2 мин и 1 мин. Пептид можно вводить в любой момент перед вторым лечением с помощью пептида, включая около 120 ч, 118 ч, 116 ч, 114 ч, 112 ч, 110 ч, 108 ч, 106 ч, 104 ч, 102 ч, 100 ч, 98 ч, 96 ч, 94 ч, 92 ч, 90 ч, 88 ч, 86 ч, 84 ч, 82 ч, 80

ч, 78 ч, 76 ч, 74 ч, 72 ч, 70 ч, 68 ч, 66 ч, 64 ч, 62 ч, 60 ч, 58 ч, 56 ч, 54 ч, 52 ч, 50 ч, 48 ч, 46 ч, 44 ч, 42 ч, 40 ч, 38 ч, 36 ч, 34 ч, 32 ч, 30 ч, 28 ч, 26 ч, 24 ч, 22 ч, 20 ч, 18 ч, 16 ч, 14 ч, 12 ч, 10 ч, 8 ч, 6 ч, 4 ч, 3 ч, 2 ч, 1 ч, 55 мин, 50 мин, 45 мин, 40 мин, 35 мин, 30 мин, 25 мин, 20 мин, 15 мин, 10 мин, 9 мин, 8 мин, 7 мин, 6 мин, 5 мин, 4 мин, 3 мин, 2 мин и 1 мин.

5 [0084] Пептид можно вводить в любой момент перед другим лечением, включая около 1 мин, 2 мин, 3 мин, 4 мин, 5 мин, 6 мин, 7 мин, 8 мин, 9 мин, 10 мин, 15 мин, 20 мин, 25 мин, 30 мин, 35 мин, 40 мин, 45 мин, 50 мин, 55 мин, 1 ч, 2 ч, 3 ч, 4 ч, 6 ч, 8 ч, 10 ч, 12 ч, 14 ч, 16 ч, 18 ч, 20 ч, 22 ч, 24 ч, 26 ч, 28 ч, 30 ч, 32 ч, 34 ч, 36 ч, 38 ч, 40 ч, 42 ч, 44 ч, 46 ч, 48 ч, 50 ч, 52 ч, 54 ч, 56 ч, 58 ч, 60 ч, 62 ч, 64 ч, 66 ч, 68 ч, 70 ч, 72 ч, 74 ч, 76 ч, 78  
10 ч, 80 ч, 82 ч, 84 ч, 86 ч, 88 ч, 90 ч, 92 ч, 94 ч, 96 ч, 98 ч, 100 ч, 102 ч, 104 ч, 106 ч, 108 ч, 110 ч, 112 ч, 114 ч, 116 ч, 118 ч и 120 ч. Пептид можно вводить в любой момент перед вторым лечением с помощью пептида, включая около 120 ч, 118 ч, 116 ч, 114 ч, 112 ч, 110 ч, 108 ч, 106 ч, 104 ч, 102 ч, 100 ч, 98 ч, 96 ч, 94 ч, 92 ч, 90 ч, 88 ч, 86 ч, 84 ч, 82 ч, 80 ч, 78 ч, 76 ч, 74 ч, 72 ч, 70 ч, 68 ч, 66 ч, 64 ч, 62 ч, 60 ч, 58 ч, 56 ч, 54 ч, 52 ч, 50 ч, 48 ч, 46 ч, 44 ч, 42 ч, 40 ч, 38 ч, 36 ч, 34 ч, 32 ч, 30 ч, 28 ч, 26 ч, 24 ч, 22 ч, 20 ч, 18 ч, 16 ч, 14 ч, 12 ч, 10 ч, 8  
15 ч, 6 ч, 4 ч, 3 ч, 2 ч, 1 ч, 55 мин, 50 мин, 45 мин, 40 мин, 35 мин, 30 мин, 25 мин, 20 мин, 15 мин, 10 мин, 9 мин, 8 мин, 7 мин, 6 мин, 5 мин, 4 мин, 3 мин, 2 мин и 1 мин.

#### Композиция

[0085] Способ может включать введение пептида. Пептиды, представленные в данном документе, могут быть в форме таблеток или пастилок для рассасывания, 20 приготовленных обычным способом. Например, таблетки и капсулы для перорального введения могут содержать обычные эксципиенты, которые могут быть связывающими агентами, наполнителями, смазывающими веществами, разрыхлителями и смачивающими агентами. Связывающие агенты включают, но не ограничиваются ими, 25 сироп, камедь, желатин, сорбитол, трагакант, слизь крахмала и поливинилпирролидон. Наполнителями могут быть лактоза, сахар, микрокристаллическая целлюлоза, кукурузный крахмал, фосфат кальция и сорбитол. Смазывающие вещества включают, но не ограничиваются ими, стеарат магния, стеариновую кислоту, тальк, полиэтиленгликоль и диоксид кремния. Разрыхлителем может быть картофельный 30 крахмал и натрия крахмал гликолят. Смачивающим агентом может быть лаурилсульфат натрия. Таблетки могут быть покрыты в соответствии со способами, известными в данной области техники.

[0086] Пептиды, представленные данным документе, также могут представлять собой жидкие композиции, такие как водные или масляные суспензии, растворы, эмульсии, 35 сиропы и эликсиры. Пептиды также могут быть приготовлены в виде сухого продукта для сушки с использованием воды или другого подходящего носителя перед использованием. Такие жидкие препараты могут содержать добавки, такие как суспендирующие агенты, эмульгаторы, неводные носители и консерванты. Суспендирующим агентом может быть сорбитовый сироп, метилцеллюлоза, глюкоза/ 40 сахарный сироп, желатин, гидроксиэтилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, гель стеарата алюминия и гидрогенизированные пищевые жиры. Эмульгирующими агентами могут быть лецитин, сорбитанмоноолеат и камедь. Неводными носителями могут быть пищевые масла, миндальное масло, фракционированное кокосовое масло, жирные сложные эфиры, пропиленгликоль и этиловый спирт. Консервантами могут быть метил 45 или пропил-п-гидроксibenзоат и сорбиновая кислота. В частности, пептиды по изобретению могут быть в водных композициях для местного введения, например, в форме глазных капель.

[0087] Пептиды, представленные в данном документе, также могут быть изготовлены

в виде суппозиторий, которые могут содержать суппозиторные основы, такие как масло какао или глицериды. Пептиды, представленные в данном документе, также могут быть изготовлены для ингаляции, которые могут находиться в такой форме, как раствор, суспензия или эмульсия, которую можно вводить в виде сухого порошка или в форме аэрозоля с использованием пропеллента, такого как дихлордифторметан или трихлорфторметан. Пептиды, представленные в данном документе, также могут быть изготовлены в виде трансдермальных препаратов, содержащих водные или неводные носители, такие как кремы, мази, лосьоны, пасты, медицинский пластырь, пластырь или мембрана. Пептиды, представленные в данном документе, также могут быть изготовлены для парентерального введения, такого как инъекция, внутривенная инъекция или непрерывная инфузия. Препараты для инъекций могут быть в форме суспензий, растворов или эмульсий на масляных или водных носителях и могут содержать рецептурные агенты, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие и диспергирующие агенты. Пептид также может быть представлен в виде порошка для восстановления с подходящим носителем, включая, но не ограничиваясь этим, стерильную воду без пирогена.

[0088] Пептиды, представленные в данном документе, также могут быть изготовлены в виде депо-препарата, который может вводиться путем имплантации или внутримышечной инъекции. Пептиды могут быть изготовлены с использованием подходящих полимерных или гидрофобных материалов (например, в виде эмульсии в приемлемом масле), ионообменных смол или в виде малорастворимых производных (например, в виде малорастворимой соли).

#### Дозировка

[0089] Способ может включать введение терапевтически эффективного количества пептида пациенту, нуждающемуся в этом. Терапевтически эффективное количество, необходимое для использования в терапии, варьирует в зависимости от характера состояния, подлежащего лечению, продолжительности времени, необходимого для активации активности TLR, и возраста/состояния пациента. В общем, однако, дозы, используемые для лечения взрослых людей, как правило, находятся в диапазоне от 0,001 мг/кг до около 200 мг/кг в день. Доза может составлять от около 0,05 мг/кг до около 10 г/кг в день. Желаемую дозу можно удобно вводить в виде разовой дозы или в виде нескольких доз, вводимых через соответствующие интервалы, например, в виде двух, трех, четырех или более субдоз в день. Многократная доза может быть желательной или необходимой.

[0090] Дозировка может быть любой, такой как около 0,05 мкг/кг, 0,06 мкг/кг, 0,07 мкг/кг, 0,08 мкг/кг, 0,09 мкг/кг, 0,1 мкг/кг, 0,2 мкг/кг, 0,3 мкг/кг, 0,4 мкг/кг, 0,5 мкг/кг, 0,6 мкг/кг, 0,7 мкг/кг, 0,8 мкг/кг, 0,9 мкг/кг, 1 мкг/кг, 1,5 мкг/кг, 2 мкг/кг, 3 мкг/кг, 4 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 15 мкг/кг, 20 мкг/кг, 25 мкг/кг, 50 мкг/кг, 75 мкг/кг, 100 мкг/кг, 125 мкг/кг, 150 мкг/кг, 175 мкг/кг, 200 мкг/кг, 225 мкг/кг, 250 мкг/кг, 275 мкг/кг, 300 мкг/кг, 325 мкг/кг, 350 мкг/кг, 375 мкг/кг, 400 мкг/кг, 425 мкг/кг, 450 мкг/кг, 475 мкг/кг, 500 мкг/кг, 525 мкг/кг, 550 мкг/кг, 575 мкг/кг, 600 мкг/кг, 625 мкг/кг, 650 мкг/кг, 675 мкг/кг, 700 мкг/кг, 725 мкг/кг, 750 мкг/кг, 775 мкг/кг, 800 мкг/кг, 825 мкг/кг, 850 мкг/кг, 875 мкг/кг, 900 мкг/кг, 925 мкг/кг, 950 мкг/кг, 975 мкг/кг.

[0091] Дозировка может быть любой, такой как около 0,05 мг/кг, 0,06 мг/кг, 0,07 мг/кг, 0,08 мг/кг, 0,09 мг/кг, 0,1 мг/кг, 0,2 мг/кг, 0,3 мг/кг, 0,4 мг/кг, 0,5 мг/кг, 0,6 мг/кг, 0,7 мг/кг, 0,8 мг/кг, 0,9 мг/кг, 1 мг/кг, 25 мг/кг, 50 мг/кг, 75 мг/кг, 100 мг/кг, 125 мг/кг, 150 мг/кг, 175 мг/кг, 200 мг/кг, 225 мг/кг, 250 мг/кг, 275 мг/кг, 300 мг/кг, 325 мг/кг, 350 мг/кг, 375 мг/кг, 400 мг/кг, 425 мг/кг, 450 мг/кг, 475 мг/кг, 500 мг/кг, 525 мг/кг, 550 мг/кг,

575 мг/кг, 600 мг/кг, 625 мг/кг, 650 мг/кг, 675 мг/кг, 700 мг/кг, 725 мг/кг, 750 мг/кг, 775 мг/кг, 800 мг/кг, 825 мг/кг, 850 мг/кг, 875 мг/кг, 900 мг/кг, 925 мг/кг, 950 мг/кг, 975 мг/кг, 1 г/кг, 2 г/кг, 3 г/кг, 4 г/кг, 5 г/кг, 6 г/кг, 7 г/кг, 8 г/кг, 9 г/кг или 10 г/кг.

#### Комплект

5 [0092] Приведенный в данном документе является комплект, который может быть использован для лечения расстройства, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью или ангиогенезом. Комплект может содержать один или более пептидов. Пептиды могут быть частью фармацевтической композиции. Комплект может дополнительно содержать инструкции для использования комплекта и проведения введения пептида или препарата.

10 [0093] Комплект также может содержать один или более контейнеров, таких как флаконы или бутылки, причем каждый контейнер содержит отдельный реагент. Комплект может дополнительно содержать письменные инструкции, которые могут описывать, как выполнять или интерпретировать описанный в данном документе способ.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1. Роль взаимодействия EB3 с IP3R в механизме IP3-регулируемого высвобождения Ca<sup>2+</sup>

20 [0094] Было определено, ингибирует ли аллостерическая модуляция функции EB3 с пептидами по изобретению (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3) как ФРЭС-индуцированную транссудацию, так и ангиогенез. Мышей подвергали воздействию ФРЭС или вызывали ангиогенез путем подкожной инъекции матригеля, опухолевых клеток или лазерного ожога мембраны Бруха.

25 [0095] IP<sub>3</sub>R<sub>5</sub> содержит EB-связывающий консенсусный мотив, Ser/Thr-x-Ile-Pro (SxIP) (SEQ ID NO: 5). Короткий пептид, основанный на IP<sub>sub.3</sub>R<sub>sub.3</sub> последовательности (KFARLWTEIPTAIT - SEQ ID NO: 1) (Фиг. 2) демонстрирует высокую связывающую активность для EB3 со свободной энергией связывания -68,882 ккал/моль (Фиг. 3). Роль взаимодействия между EB3 и IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> была недавно описана в Geyer *et al.*, *Cell Rep* 12(1): 79-89; 2015. Предварительная обработка клеток с помощью последовательности IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>, 30 присоединенной к С-концу проникающего в клетку пептида антеннапии (ПА) при 10 нМ заметно уменьшала высвобождение Ca<sup>2+</sup> из депо в ответ на тромбин (Фиг. 4А), что указывает на то, что взаимодействие между IP<sub>3</sub>R<sub>sub.3</sub> и EB3 имеет решающее значение в механизме активации IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>. Эффекты пептида IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> и таксола сравнивали 35 в регуляции высвобождения Ca<sup>2+</sup>. Было обнаружено, что предварительная обработка клеток с помощью 5 мкг/мл таксола в течение 20 мин до стимуляции тромбином ингибирует высвобождение Ca<sup>2+</sup> из ЭР до такой же степени, что и пептид IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (Фиг. 4В).

40 Пример 2 Структурный дизайн ингибирующего концевой пептида (EBIN)

[0096] Концевой связывающий ингибирующий пептид, а именно EBIN, и полностью гибкое присоединение пептида IPR к связывающему карману EB были разработаны на основе моделируемого *in silico* аланинового сканирования (Таблицы 2 и 3). Свободная энергия связывания ( $\Delta G$ ) использовалась для определения вклада каждого остатка в стабилизацию взаимодействия пептида с белком EB.

45 [0097] Использовались следующие критерии:  $\Delta G$  value.gtoreq.1=стабилизирующий остаток  $\Delta G$  value.gtoreq.-1=Дестабилизирующий остаток  $\Delta G$  значение от <-1 до 0 до <1=Нейтральный остаток аланиновое сканирование обнаруживает стабилизирующие (с

положительной энергией связывания 0,50 КJ/моль или более, показано черным) и дестабилизирующие (с отрицательной энергией связывания - 1, показано синим цветом) остатки.

Таблица 1: Вычисленные изменения свободной энергии связывания после усечения аминокислотных остатков, которые окружают мотив Thr-x-Pro IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>

Пептидная последовательность	Свободная энергия связывания (- ккал/моль)	SEQ ID NO
KFARLWTEIPTAIT (пептид IP <sub>3</sub> R <sub>3</sub> )	-68,882	1
FARLWTEIPTAIT	-68,809	6
RLWTEIPTAIT	-46,571	7
LWTEIPTAIT	-54,443	8
WTEIPTAIT	-42,886	9
TEIPTAIT	-37,16	10
TEIPTAI	-39,337	11
TEIPTA	-41,234	12
TEIPT	-34,5	13
FARLWTEIPTAI	-51,42	14
TEIP	-45,071	15
RTEIPTI	49,74	16
FRTEIPTI	-40,728	17
FTKIPTI	-55,469	18
KFARTKIPTAIT	-57,32	19
FARTEIPTAI	-33,415	20
KFARTEIPTAIT	-55,736	21

Таблица 2: Вычисленные изменения свободной энергии связывания после мутации каждого аминокислотного остатка IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> для аланина:

K<sub>1</sub>F<sub>2</sub>A<sub>3</sub>R<sub>4</sub>L<sub>5</sub>W<sub>6</sub>T<sub>7</sub>E<sub>8</sub>I<sub>9</sub>P<sub>10</sub>T<sub>11</sub>A<sub>12</sub>I<sub>13</sub>T<sub>14</sub>

Аминокислота	ΔG
K1	0,25
F2	0,52
R4	0,01
L5	-1,03
W6	-1,08
T11	0,91
I13	1,33
T14	0,40

Таблица 3: Вычисленные изменения свободной энергии связывания после мутации каждого аминокислотного остатка EBIN для аланина.

Аминокислота	ΔG
F1	1,64
T2	1,07
E3	0,02
I4	0,68
T11	0,98
I7	0,94

[0098] В результате, пептид IPR, состоящий из с 14 аминокислот, восстанавливали до 7-аминокислотного концевой связывающего ингибирующего пептида (EBIN, FTEIPTI (SEQ ID NO: 3). Фиг. 5 демонстрирует взаимодействие между EB3 и EBIN. Аналогично IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub> (показан в виде желтой палочке на Фиг. 5), EBIN связывается с гидрофобной канавкой между EB-кислым хвостом и спиральным доменом. Вычисленная энергия



связывания EBIN с EB3 составляет -60,251 ккал/моль, что соответствует энергии связывания между IPR и EB3. Треонин в положении 2 EBIN играет критическую роль в связывании с поверхностью контакта EB3, поскольку мутация этого остатка на аланин полностью прекращает связывание. Поэтому в качестве контроля потери связывания в пептиде использовали одну аминокислотную мутацию T → A FAEIPTI (SEQ ID NO: 4).

Пример 6 EBIN предотвращает индуцированную ФРЭС-индуцированную микрососудистую транссудацию

[0099] VE-кадгерин является основным адгезионным белком межэндотелиальных соединений, который соединяет эндотелиальную клетку в непрерывный монослой, чтобы поддерживать ограничивающий барьер стенки сосуда для жидкостей, богатых на белок. Как ФРЭС, так и Ang2 дестабилизируют адгезию VE-кадгерина либо напрямую, путем индуцирования фосфорилирования тирозина VE-кадгерина и нацеливания на VE-кадгерин для интернализации и деградаци, либо косвенно, путем нарушения адгезии VE-кадгерина в результате ответа на реакции на внутриклеточные силы.

[00100] Недавно было описано критическое перекрестное взаимодействие между адгезией VE-кадгерина и цитоскелетом микротрубочек (Komarova *et al. Molecular Cell* 48(6): 914-25; 2012.). Было обнаружено, что кальцинеурин, кальций-зависимая фосфатаза, является основным сигнальным игроком в этом перекрестном взаимодействии, поскольку он дефосфорилирует EB3, способствует EB3-зависимой реорганизации МТ цитоскелета и, таким образом, обеспечивает механизм прямой подачи для нарушения VE-адгезии кадгерина.

[00101] Было проведено исследование, изучающее роль инъекции EBIN для предотвращенной микрососудистой транссудации, индуцированной фактором роста эндотелия сосудов (ФРЭС). Мышей Balb/cJ предварительно обрабатывали пептидом EBIN (1 мкМ/кг) или контрольным пептидом (2T → A мутация), а затем человеческий ФРЭС (50 нг/кг массы тела) вводили интрадермально для индуцирования транссудации альбумин-связанного Эванса голубого (см. Фиг. 6А). Кроме того, экстрагированный формамидом Эванс голубой определяли количественно спектрофотометрически при 620 нм и корректировали на гемоглобин (740 нм) и вес кожи (см. Фиг. 6В). Данные, представленные на Фиг. 6, продемонстрировали, что обработка животных пептидом EBIN значительно ингибирует подкожную транссудацию, вызванную интрадермальной инъекцией человеческого ФРЭС, и, таким образом, это полностью поддерживает идею, что EBIN может представлять собой новую мощную терапию для ингибирования ангиогенеза и для лечения расстройств, связанных с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью.

Пример 7 EBIN прекращает рост кровеносных сосудов на моделях ангиогенеза

[00102] Эффект EBIN на *in vitro* тубулогенезе и на *in vivo* ангиогенезе был исследован с использованием матригельных моделей. Суспензию отдельных эндотелиальных клеток из пуповидной вены человека высевали на лунки, покрытые матригелем, в присутствии 1 мкМ EBIN или контрольного пептида; образование трубчатых структур оценивали через 16 часов. Как продемонстрировано на Фиг. 7А и 7В, EBIN в значительной степени прекращал образование трубчатых структур на этой *in vitro* 2D матригельной модели.

[00103] Также был изучен эффект EBIN на вращение кровеносных сосудов на *in vivo* матригельной модели эктопического ангиогенеза. Кровеносный сосуд, растущий в матригеле, предварительно смешивали с гепарином и ФРЭС, но не с эндотелиальными клетками, и вводили в брюшную полость мышей. На каждую мышь было по две 400

мкл пробки. У мышей, получавших контрольный пептид (группа 1), вновь образованные кровеносные сосуды врастали в матригель (Фиг. 7С, 1). Эти сосуды были функциональными и перфузированными кровью, что очевидно из-за присутствия эритроцитов внутри сосудов. Кроме того, мышей обрабатывали EBIN во время инъекции матригеля (Фиг. 7С, 2; группа 2) или через 36 часов после матригеля (Фиг. 7С, 3; группа 3). Пробки матригеля удаляли через 96 часов, фиксировали и окрашивали ГЭ для оценки образования сосудов. Количество сосудов значительно уменьшилось, что свидетельствует о значительном сокращении врастания кровеносных сосудов с 99% уровнем достоверности. Следует отметить, что фаза после лечения было столь же эффективной, как и лечение, что указывает на то, что подобно терапии с помощью анти-ФРЭС и таксола, EBIN может вызвать регрессию сосудов. Тем не менее EBIN не индуцирует гибель эндотелиальных клеток или остановку клеточного цикла (данные не показаны).

Пример 8 Ингибированный EBIN рост опухолевой клетки

[00104] Был исследован эффект EBIN на скорость роста трижды негативных (рецептор эстрогена [РЭ], рецептор прогестерона [РП] и рецептор человеческого эпидермального фактора роста 2 типа [HER-2] не экспрессируется в этой клеточной линии) раковых клеток молочной железы человека с использованием модели ксенотрансплантата.

Голым мышам (n=8 мышей на группу) вводили  $3 \times 10^6$  MDA-MB-231 раковые клетки молочной железы человека в верхнее левое молочное жировое тело. У всех мышей развивалась опухоль на 13-й день. В этот момент мышей рандомизировали и делили на 5 групп, и каждая группа получала лечение. Исследование прекращали на 24-й день, когда опухоль достигла  $2000 \text{ мм}^3$  в размере. Лечение контрольным пептидом и EBIN проводилось ежедневно в течение 7 дней. Доставку EBIN и контрольного пептида осуществляли путем инъекции в хвостовую вену. Контрольный пептид вводили при 5 мкМ/кг массы тела. EBIN вводили при 1 мкМ/кг и 5 мкМ/кг массы тела.

[00105] Лечение таксолом проводили путем интраперитонеальной инъекции при 10 мкМ/кг массы тела в течение 4 дней. Размер опухоли измеряли 3 раза в неделю. Как показано на Фиг. 8А, наблюдалась значительная задержка роста опухоли в группе таксола и наблюдалось уменьшение размера опухоли в группе, получающей лечение EBIN, после 4 обработок. Этот эффект был довольно преходящим, хотя размер опухолей в группе, получающей лечение EBIN, был значительно меньше по сравнению с контрольной не получающей лечение группой. Мыши, получающие лечение 1 мкМ/кг EBIN, развивали опухоль с той же скоростью, что и не получающие лечения мыши, из чего следует, что низкая доза не была эффективной.

[00106] Чтобы соотнести эффект лечения с помощью EBIN с неоваскуляризацией опухоли, опухолевую ткань собирали, фиксировали и окрашивали гематоксилином и эозином (Г&Э). Количество клеток за пределами массы опухоли было оценено и нормировано на каждую область. В соответствии с кривой роста опухоли количество сосудов за пределами опухоли было значительно снижено только в группах таксола и EBIN (5 мкМ/кг). EBIN показал превосходный эффект по сравнению с таксолом (см. Фиг. 8В). Все остальные группы не отличались по сравнению с группой, не получающей лечение. Эти данные свидетельствуют о том, что EBIN демонстрирует антиангиогенные свойства и может использоваться для лечения патологического ангиогенеза. Только лечение таксолом и EBIN в дозе 5 мкМ/кг массы тела значительно уменьшало количество сосудов за пределами опухоли.

Пример 9 Определение эффективности EBIN для лечения на модели *in vivo* индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ)

[00107] Неоваскулярная ВДМ характеризуется ростом кровеносных сосудов из сосудистой оболочки, которые проникают через мембрану Бруха в субретинальную область. Мышиная модель индуцированной лазером хориоидальной неоваскуляризации (ХНВ) представляет собой хорошо зарекомендовавшую себя модель экссудативной формы ВДМ. Разрушение мембраны Бруха лазерным лучом способствует росту новых хориоидальных сосудов в сетчатке, таким образом имитируя патологические состояния ВДМ (Фиг. 9). Эта модель была успешно использована для прогнозирования клинической эффективности терапии с помощью ФРЭС для неоваскулярных ВМД.

[00108] Для оценки защитно-барьерной и антиангиогенной активности EBIN, EBIN испытывался на мышинных моделях ХНВ. В дополнение к лечению с помощью EBIN, антитело LEAF<sup>TM</sup> (моноклональное крысиное антитело против мышинового ФРЭС-А) и контрольный пептид (Mug-FAEIPPI) использовались в качестве положительного и отрицательного экспериментального контроля.

[00109] Мыши C57/BL6 (6-8 недель) были закуплены в лаборатории Charles River и использованы в соответствии с утвержденным протоколом. Мышей анестезировали смесью кетамин/ксилазин (100 мг /5 м /кг IP), и их зрачки были расширены с помощью местного применения Цикломидрила (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX). Глазное дно рассматривали с помощью камеры, и лазерная фотокоагуляция была индуцирована лазерной системой с визуальным контролем (Micron IV, Phoenix Research Laboratories, Pleasanton, CA). Четыре лазерных ожога на равном расстоянии от зрительного нерва были индуцированы один за другим в правом глазу с помощью зеленого импульса аргонного лазера с длиной волны 532 нм, фиксированным диаметром 50 мкм, длительностью 70 мс и уровнями мощности от 210 до 250 мВт. Возникновение пузырька или небольшого субретинального кровоизлияния (диаметр <1 мм) на лазерном пятне служит для указания разрыва мембраны Бруха и как подтверждение ХНВ, индуцированного лазером. Эта процедура была выполнена только на правом глазу каждой мыши. Схема лазерной фотокоагуляции и протокола лечения показана на Фиг. 10. Лечение с помощью контроля и пептидов EBIN (1 мкг/глаз) и антитела против мышинового ФРЭС-А (2 мкг/глаз, LEAF<sup>TM</sup>, низкая эндотоксичность, без азида) вводили один раз в правый глаз с помощью интравитреальной инъекции (2 мкл) после лазерной фотокоагуляции. Глаза осторожно промывали стерильным физиологическим раствором для удаления смазывающих глазных капель и обрабатывали антибиотической мазью, эритромицином (Fougera, Melville, NY). Затем после лазерной обработки мышей помещали на предварительно нагретую нагревательную плитку при 35 ° C до их пробуждения. Антиангиогенную эффективность EBIN оценивали с помощью оптической когерентной томографии (ОКТ) на 8-й и 15-й день, ангиограмму проводили только на 15-й день (Фиг. 10). Флуоресцентная ангиография и ОКТ проводятся для визуализации сосудистой сети сетчатки, аналогично процедуре, обычно применяемой в клинических условиях для пациентов. Это осуществляется путем внутривенной инъекции 10 мкл 0,2% флуоресцентного красителя через хвостовую вену мышей. Размер выборки из 10 мышей на группу лечения является достаточным для обнаружения гипотетической 10% разницы в трансудации (область повреждения) на основе параметров, определенных в Gong et al., *PLoS One* 2015, 10(7): e 0132643.

[00110] В таблице 4 перечислены десять групп лечения (n=10 мышей с ХНВ на группу лечения, всего 30 мышей), схема приема лекарственного средства и предполагаемые конечные показатели для измерения реакции на лечение. Мыши группы 1 получали Mug-контрольный пептид, мышей группы 2 обрабатывали Mug-EBIN, а мышей 3-й группы обрабатывали антителом LEAF<sup>TM</sup> в качестве положительного контроля. Все

средства для лечения доставляются в виде однократной инъекции во время ХНВ интравитреально, как показано на Фиг. 10.

[00111] Таблица 4: Группы лечения, схема приема лекарственного средства и анализ конечных показателей для измерения ответа на лечение ХНВ у мышей.

Группа	N	Лекарственное средство	Схема приема	Анализ конечных показателей
1	10	Муг-контрольный пептид (1 мкг/глаз)	Интравитреальная инъекция 1 мкг/глаз в 1 мкл; на 1-й день (во время ХНВ)	1. Флюоресцеиновая ангиография на 15-й день и ОКТ в дни 8 и 15 2. Сбор глаз для гистопатологического исследования на 15-й день
2	10	Муг-EBIN интравитреально (1 мкг/глаз)	Интравитреальная инъекция 1 мкг/глаз в 1 мкл; на 1-й день (во время ХНВ)	
3	10	Антитело LEAF™	Интравитреальная инъекция 2 мкг/глаз в 1 мкл (эквивалентно дозе 2,5 мг у человека); в 1-й день (во время ХНВ)	
Общее количество	30			

[00112] На Фиг. 11a и 11b показаны изображения флюоресцентной ангиографии на фундус-камере (a) и соответствующей оптической когерентной томографии (b) на 15-й день после лазерной фотокоагуляции (цифры обозначают соответствующие поражения ХНВ) для мышей с ХНВ, обработанных EBIN, антителом против ФРЭС или контрольным пептидом. EBIN уменьшал поражения ХНВ, похожим образом как и при лечении с помощью анти-ФРЭС, и, следовательно, обеспечивает убедительную альтернативу нынешнему лечению глазных заболеваний, таких как дегенерация макулы. Эксперименты были прекращены на 15-й день, и в это время животных умерщвляли кетамин/ксилазином (100 мг/5 мг/кг IP) с последующей цервикальной дислокацией, и ткань глаза собирали для иммунофлуоресцентного окрашивания и патологического анализа. Плоские препараты сетчатки/хориоида/склеры были использованы для окрашивания с помощью Alexa594-меченного лектина из *Bandeiraea simplicifolia* (B4) для посмертного анализа области ХНВ (Фиг. 11c).

[00113] Анализ данных проводили с использованием критериев исключения, установленных в предыдущих исследованиях (Gong et al., *PLoS One* 2015, 10(7): e 0132643). Случаи тяжелых кровоизлияний, такие как чрезмерные лазерные ожоги, которые повреждают не только мембрану Бруха, но также сосудистый и сетчатый пигментный эпителий, слитые поражения, поражение, которые более чем в 5 раз превышают среднее из поражений в тех же условиях эксперимента, были исключены. Площадь транссудации и ХНВ определяли количественно с использованием изображений флюоресцеиновой ангиографии и конфокальных изображений окрашивания ФНВ для лектина B4 с использованием программного обеспечения MetaMorph. Данные были представлены графически с использованием программного обеспечения Sigma Plot (Фиг. 11d и 11e) и проанализированы с помощью одностороннего ANOVA с использованием Prism 6 (GraphPad, SanDiego, CA).

#### Дальнейшие исследования

[00114] Лечение мышей с помощью EBIN значительно уменьшала как транссудацию, так и поражения ХНВ по сравнению с мышами, получавшими контрольный пептид (Фиг. 11). Эффект EBIN был аналогичен лечению с помощью LEAF™, из чего можно заключить, что EBIN может обеспечить экономически эффективную и эффективную альтернативу имеющейся в настоящее время анти-ФРЭС терапии ВМД, такой как бевацизумаб и афлиберцепт.

[00115] В качестве альтернативы доставка EBIN осуществляется с помощью глазных капель. В этом случае лечение начинается за один день до лазерной фотокоагуляции, и мышей обрабатывают дважды в день до 15 дней после лазерного фотокоагуляции.

Продолжительность лечения и наблюдения составляет 15 дней. Кроме того, EBIN доставляется в комбинации с антителом LEAF™ с помощью интравитреальной инъекции и/или с помощью глазных капель. Во всех случаях антитело LEAF™ вводят с помощью интравитреальной инъекции. Как было описано ранее, антиангиогенную эффективность EBIN оценивают с помощью флюоресцентной ангиографии и оптической когерентной томографии (ОКТ) на 8-й и 15-й день после индуцированной лазером ХНВ. Кроме того, глазную ткань собирают на 15-й день.

[00116] В таблице 5 перечислены десять групп лечения (n=10 мышей с ХНВ на группу лечения, всего 100 мышей), схема приема лекарственного средства и предполагаемые конечные показатели для измерения реакции на лечение для будущих исследований. Мышей группы 1 обрабатывают антителом LEAF™ в качестве положительного контроля, а мыши группы 2 получают очищенный крысиный IgG2a LEAF™, к изотип Ctrl, в качестве контроля для группы 1. Группы 3 и 4 обрабатывают рецептор-ловушкой для мышинового ФРЭС (положительный контроль 2) или отрицательным Муг-контрольным пептидом, соответственно. Все антитела LEAF™, рецептор-ловушка и контрольный пептид доставляются в виде однократной инъекции во время ХНВ интравитреально. Группы 5 и 6 получают Муг-EBIN интравитреально, 0,1 мкг/глаз или 1 мкг/глаз соответственно. Группы 7 и 8 получают Муг-EBIN в виде глазных капель, 0,5 мкг/глаз или 5 мкг/глаз, два раза в день соответственно. Мышей группы 9 обрабатывают Муг-EBIN (0,1 мкг/глаз) в комбинации с антителом LEAF™, которые доставляют интравитреально. Группу 10 обрабатывают глазными каплями Муг-EBIN (0,5 мкг/глаз) в комбинации с антителом LEAF™ посредством интравитреальной доставки.

[00117] Таблица 5: Группы лечения, схема приема лекарственного средства и анализ конечных показателей для измерения ответа на лечение ХНВ у мышей.

Группа	N	Лекарственное средство	Схема приема	Анализ конечных показателей
1	10	Антитело LEAF™	Интравитреальная инъекция 2 мкг/глаз в 1 мкл (эквивалентно дозе 2,5 мг у человека); в 1-й день (во время ХНВ)	1. Флюоресцеиновая ангиография на 15-й день и ОКТ в дни 8 и 15 2. Сбор глаз для гистопатологического исследования на 15-й день
2	10	Очищенный крысиный IgG2a LEAF™, к изотип Ctrl	Интравитреальная инъекция 2 мкг/глаз в 1 мкл (эквивалентно дозе 2,5 мг у человека); в 1-й день (во время ХНВ)	
3	10	Рецептом-ловушка для мышинного ФРЭС	Интравитреальная инъекция 2 мкг/глаз в 1 мкл в 1-й день (во время ХНВ)	
4	10	Муг-контрольный пептид (1 мкг/глаз)	Интравитреальная инъекция 1 мкг/глаз в 1 мкл; на 1-й день (во время ХНВ)	
5	10	Муг-EBIN интравитреально (0,1 мкг/глаз)	Интравитреальная инъекция 0,1 мкг/глаз в 1 мкл; в 1-й день (во время ХНВ)	
6	10	Муг-EBIN интравитреально (1 мкг/глаз)	Интравитреальная инъекция 1 мкг/глаз в 1 мкл; на 1-й день (во время ХНВ)	
7	10	Глазные капли Муг-EBIN (0,5 мкг/глаз)	Глазные капли, 0,5 мкг/глаз; два раза в день	
8	10	Глазные капли Муг-EBIN (5 мкг/глаз)	Глазные капли, 5 мкг/глаз; два раза в день	
9	10	Муг-EBIN интравитреально (0,1 мкг/глаз) + антитело LEAF™ антитело интравитреально	Группа #1 в комбинации с группой #5	
10	10	Глазные капли Муг-EBIN (0,5 мкг/глаз) + антитело LEAF™ антитело интравитреально	Группа #1 в комбинации с группой #7	
Общее количество	100			

Пример 10 Исследование острой токсичности EBIN *in vivo*

Кратковременное исследование предназначено для оценки безопасности введения *in vivo*. Мышей C57BL/6 (n=10, 5 мышей на группу/путь лечения) рандомизировали и делили на две группы. Первая группа получала лечение EBIN в правый глаз посредством  
 5 глазных капель, доставленные два раза в день, по 5 мкг на глаз (10 мкл), а вторая группа получала лечение инъекцией EBIN в правый глаз в максимальной дозе, 1 мкг/глаз (2 мкл) в первый день. Интравитреальная инъекция проводилась под анестезией кетамин/ксилазином (100 мг/ 5 мг/кг). Обе группы ежедневно контролировались на общее  
 10 состояния здоровья, включая массу тела, а также любые аномалии глаз, в том числе непрозрачность, экзофтальмию, энофтальмию, конъюнктивит, аномальные выделения или образование корки и язвы роговицы в течение 8 дней. Затем животных подвергали флюоресцентной ангиографии и ОКТ визуализации. Не наблюдалось никакой токсичности после лечения EBIN, как с индукцией ХНВ, так и без нее (Фиг. 12).

## (57) Формула изобретения

1. Способ ингибирования ангиогенеза, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного пептида, содержащего аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), где пептид или его фрагмент снижает взаимодействие между концевым  
 20 связывающим белком 3 (EB3) и рецептором типа 3 инозитол 1,4,5-трифосфата(IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), где пациент страдает нарушением зрения или потерей зрения (слепотой), дегенерацией макулы, окклюзией центральной вены сетчатки, окклюзией ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатией, неоваскулярной возрастной дегенерацией макулы (ВДМ), ретинопатией недоношенных, ишемической ретинопатией,  
 25 внутриглазной неоваскуляризацией, неоваскуляризацией роговицы, неоваскуляризацией сетчатки, неоваскуляризацией хориоидеи, диабетическим отеком макулы, диабетической ишемией сетчатки, диабетическим отеком сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатией, рубецом радужной оболочки, неоваскулярной глаукомой, ретинобластомой, увеитом и неоваскуляризацией трансплантата роговицы.

2. Способ лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества выделенного пептида, содержащего аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), где пептид или его фрагмент снижает взаимодействие между концевым связывающим  
 35 белком 3 (EB3) и рецептором типа 3 инозитол 1,4,5-трифосфата(IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), где расстройство представляет собой нарушение зрения или потерю зрения (слепоту), дегенерацию макулы, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, неоваскулярную возрастную дегенерацию макулы (ВДМ), ретинопатию недоношенных, ишемическую ретинопатию,  
 40 внутриглазную неоваскуляризацию, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, неоваскуляризацию хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическую ишемию сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативную диабетическую ретинопатию, рубец радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, ретинобластому, увеит и неоваскуляризацию трансплантата роговицы.

3. Способ по п. 1 или 2, отличающийся тем, что пептид связан с пептидом-носителем.

4. Способ по п. 3, отличающийся тем, что пептид-носитель является пептидом антеннапедии (ПА), пептидом пенетратинном, ТАТ, транспортаном или полиаргинином.

5. Способ по пп. 1-4, отличающийся тем, что пептид конъюгирован с жирной

кислотой.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что пептид является мирисоилированным.

7. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в комбинации с одним или более ингибиторами ФРЭС.

5 8. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в сочетании с лазерным лечением заболеваний глаз.

9. Способ по любому из пп. 1-6, отличающийся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в комбинации со стероидом.

10 10. Способ по любому из пп. 1-9, отличающийся тем, что выделенный пептид, ингибитор ФРЭС или стероид вводят с помощью инъекции в стекловидное тело или местно.

11. Применение выделенного пептида для получения лекарственного средства с целью ингибирования ангиогенеза у нуждающегося пациента, при этом пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), где пептид или его фрагмент снижает взаимодействие между концевым связывающим белком 3 (EB3) и рецептором типа 3 инозитол 1,4,5-трифосфата (IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), где пациент страдает нарушением зрения или потерей зрения (слепотой), дегенерацией макулы, окклюзией центральной вены сетчатки, окклюзией ветви вены сетчатки, пролиферативной диабетической ретинопатией, неоваскулярной возрастной дегенерацией макулы (ВДМ), ретинопатией недоношенных, ишемической ретинопатией, внутриглазной неоваскуляризацией, неоваскуляризацией роговицы, неоваскуляризацией сетчатки, неоваскуляризацией хориоидеи, диабетическим отеком макулы, диабетической ишемией сетчатки, диабетическим отеком сетчатки и пролиферативной диабетической ретинопатией, рубцозом радужным оболочкой, неоваскулярной глаукомой, ретинобластомой, увеитом и неоваскуляризацией трансплантата роговицы.

12. Применение выделенного пептида для получения лекарственного средства с целью лечения нарушения, связанного с ФРЭС-индуцированной сосудистой проницаемостью, при этом выделенный пептид содержит аминокислотную последовательность KFARLWTEIPTAIT (SEQ ID NO: 1), FTEIPTI (SEQ ID NO: 3), где пептид или его фрагмент снижает взаимодействие между концевым связывающим белком 3 (EB3) и рецептором типа 3 инозитол 1,4,5-трифосфата (IP<sub>3</sub>R<sub>3</sub>), где расстройство представляет собой нарушение зрения или потерю зрения (слепоту), дегенерацию макулы, окклюзию центральной вены сетчатки, окклюзию ветви вены сетчатки, пролиферативную диабетическую ретинопатию, неоваскулярную возрастную дегенерацию макулы (ВДМ), ретинопатию недоношенных, ишемическую ретинопатию, внутриглазную неоваскуляризацию, неоваскуляризацию роговицы, неоваскуляризацию сетчатки, неоваскуляризацию хориоидеи, диабетический отек макулы, диабетическую ишемию сетчатки, диабетический отек сетчатки и пролиферативную диабетическую ретинопатию, рубцоз радужной оболочки, неоваскулярную глаукому, ретинобластому, увеит и неоваскуляризацию трансплантата роговицы.

13. Применение по п. 11 или 12, отличающееся тем, что пептид связан с пептидом-носителем.

14. Применение по п. 13, отличающееся тем, что пептид-носитель является пептидом антеннапии (ПА), пептидом пенетратинном, ТАТ, транспортаном или полиаргинином.

15. Применение по любому из пп. 11-14, отличающееся тем, что пептид конъюгирован с жирной кислотой.

16. Применение по п. 15, отличающееся тем, что пептид является мирисоилированным.

17. Применение по любому из пп. 11-16, отличающееся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в комбинации с одним или более ингибиторами ФРЭС.

18. Применение по любому из пп. 11-16, отличающееся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в сочетании с лазерным лечением заболеваний глаз.

5 19. Применение по любому из пп. 11-16, отличающееся тем, что выделенный пептид или его фрагмент вводят в комбинации со стероидом.

20. Применение по любому из пп. 11-19, отличающееся тем, что выделенный пептид, ингибитор ФРЭС или стероид вводят с помощью инъекции в стекловидное тело или местно.

10

15

20

25

30

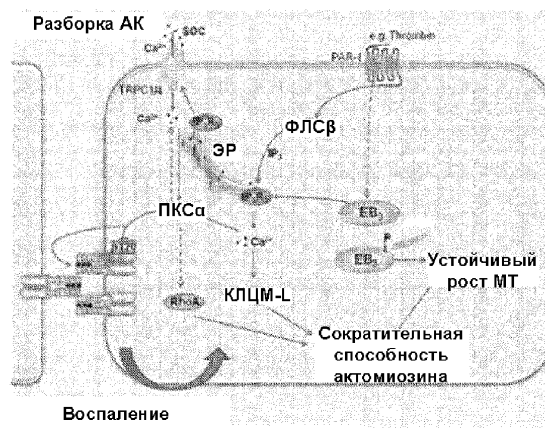
35

40

45



1/12



ФИГ. 1

2

2/12

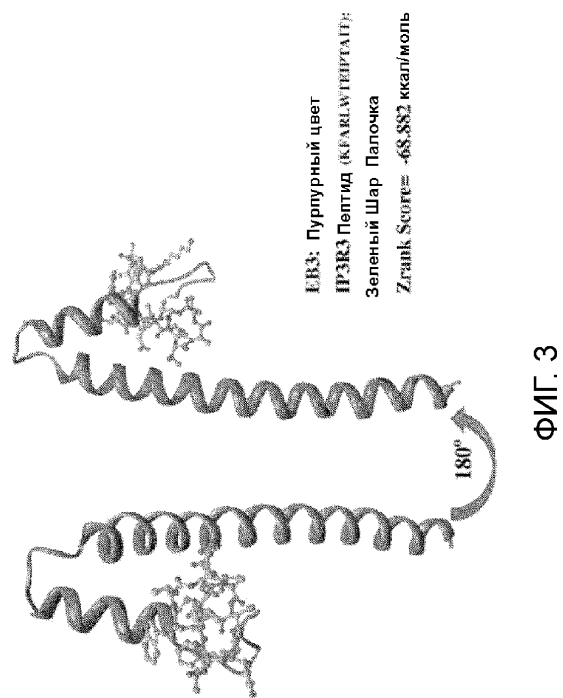
```

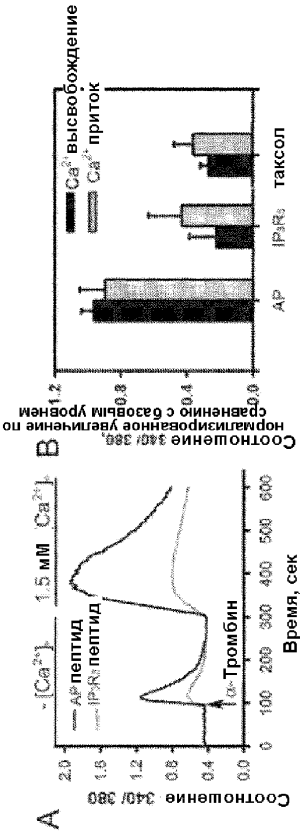
IP3R4изоформа1  VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
IP3R1изоформа2  VTPVKYARLWSEIPSEIAIDD
                VVPVRYARLWTEIPTKITHH
IP3R2
IP3R3  VTPVKFARLWTEIPTAITIKD
Связывание EB  -----S/TxIP-----
SEQ ID NO: 1 IP3R3 пептид      KFARLWTEIDTAIT

```

ФИГ. 2

3/12





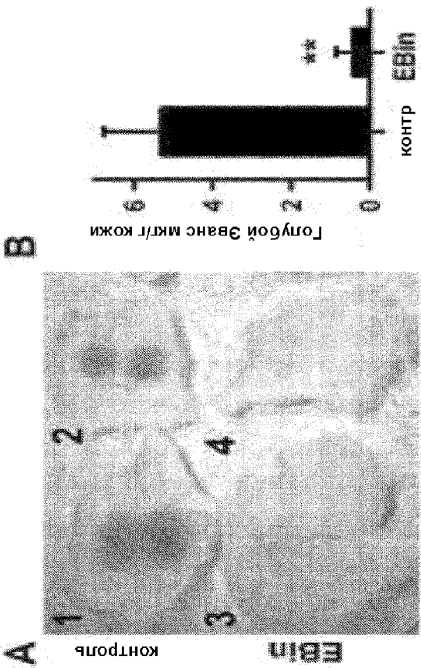
ФИГ. 4

5/12

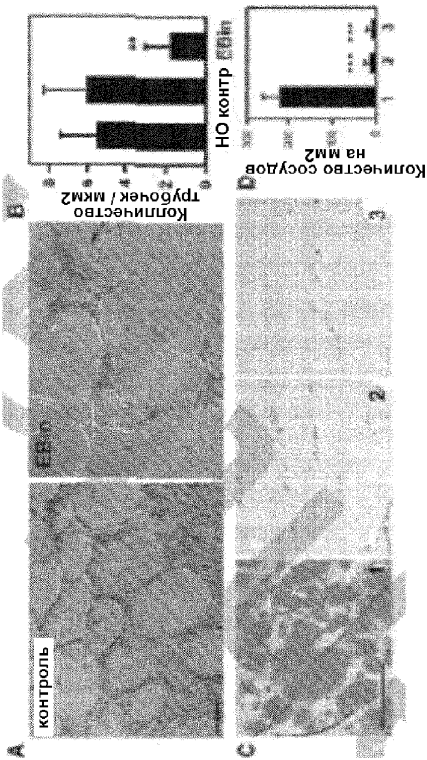


ФИГ. 5

6/12

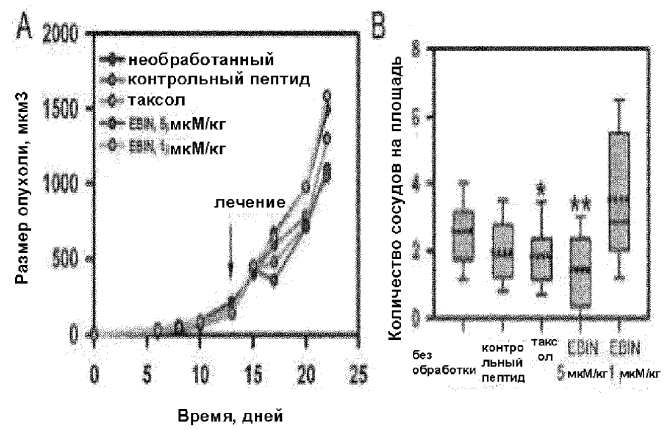


ФИГ. 6



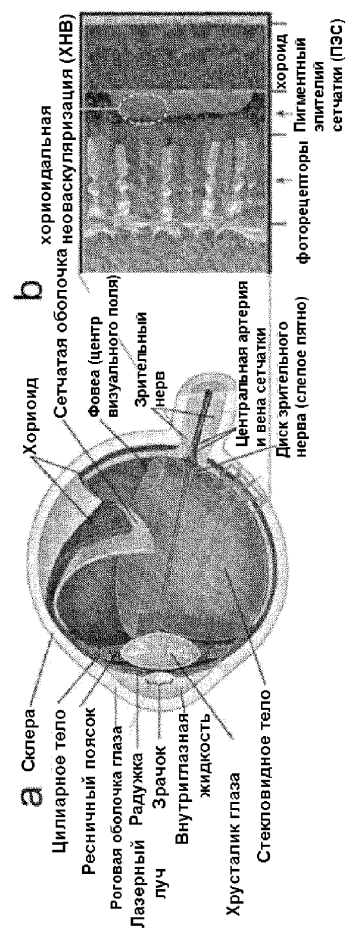
ФИГ. 7

8/12

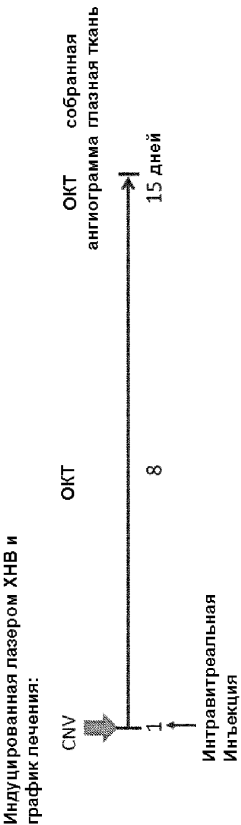


ФИГ. 8



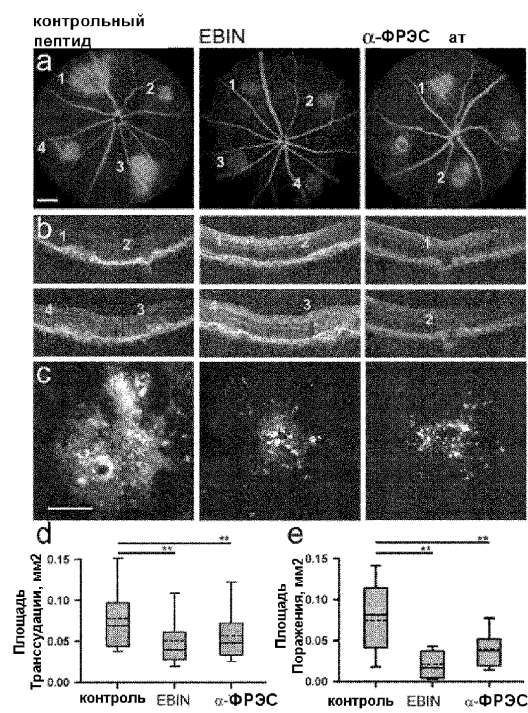


ФИГ. 9



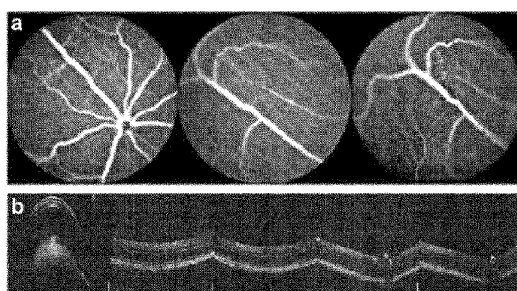
ФИГ. 10

11/12



ФИГ. 11

12/12



ФИГ. 12