

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(11) 035293

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента  
2020.05.26

(21) Номер заявки  
201792399

(22) Дата подачи заявки  
2016.04.29

(51) Int. Cl. A01N 25/00 (2006.01)  
A61K 38/00 (2006.01)

---

(54) ПЕПТИДНЫЕ КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

---

(31) 62/155,711

(32) 2015.05.01

(33) US

(43) 2018.05.31

(86) PCT/US2016/030098

(87) WO 2016/178993 2016.11.10

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:  
ОЭнЭл ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.;  
ДЗЕ РИДЖЕНТС ОФ ДЗЕ  
ЮНИВЕРСИТИ ОФ МИЧИГАН (US)

(72) Изобретатель:  
Бесирли Кагри Г., Бриджес  
Александр Дж., Фрешли Джон К.,  
Ханке Вильям А., Джонсон Линда Л.,  
Смит Френсис Х., Сильвен Итан, Закс  
Дэвид Н. (US)

(74) Представитель:  
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20100226878  
AMINO-ACIDS-WIKI-APRIL-2015, Amino  
acid - Wikipedia, Revised 30 April 2015  
(30.04.2015), [https://en.wikipedia.org/w/inriex.php?title=Amino\\_acid&oldid=660113451](https://en.wikipedia.org/w/inriex.php?title=Amino_acid&oldid=660113451).

(57) В изобретении представлены композиции, включающие пептиды, их фармацевтические препараты и способы предотвращения с их помощью смерти фоторецепторов и защиты клеток сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторные и пигментный эпителий сетчатки, от Fas- или TRAIL-опосредованного апоптоза.

B1

035293

035293

B1

### Родственные заявки

Настоящий патентный документ испрашивает приоритет даты подачи по 35 разделу свода законов США 119(e) предварительной патентной заявки США серийный номер 62/155711, поданной 1 мая 2015 года, которая включена в настоящее описание посредством ссылки.

Все патенты, патентные заявки и публикации и другие библиографические источники, процитированные в данном документе, включены настоящим посредством ссылки во всей своей полноте. Раскрытие этих публикаций во всей их полноте включены настоящим в эту заявку посредством ссылки с целью более полного описания уровня техники, который известен специалистам в данной области, на дату изобретения, описанного и заявленного в данном документе.

Спонсируемые федеральным правительством исследования или разработки.

Это изобретение было сделано при государственной поддержке по гранту № R44EY022512, присужденному Национальным институтом здравоохранения (NIH). Правительство обладает определенными правами на это изобретение.

### Уровень техники

Описаны пептидные композиции, которые защищают клетки, особенно клетки сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы, пигментный эпителий сетчатки (RPE) и ганглионарные клетки сетчатки, которые получают визуальную информацию от фоторецепторов, от клеточной смерти, опосредованной внешним путем, такой как Fas-опосредованный апоптоз, TRAIL-опосредованный апоптоз, TNF-опосредованный некроптоз и пироптоз, и способы применения композиций.

Некоторые основные причины потери зрения, такие как отслойка сетчатки, глаукома и макулярная дегенерация, имеют значительный компонент апоптотических сигналов, которые, в свою очередь, приводят к запрограммированной клеточной смерти у определенных очень важных клеток в сетчатке. Эти три типа клеток представляют собой пигментные эпителиальные клетки сетчатки, потеря которых наблюдается при обесцвечивании сетчатки, пигментном ретините и сухой форме возрастной макулярной дегенерации, ганглионарные клетки сетчатки, потеря которых наблюдается при глаукоме, и сами фоторецепторные клетки, клетки первичной зрительной сигнализации и потеря которых является основной причиной потери зрения вследствие заболеваний сетчатки.

Отслойка сетчатки (RD), определяемая как отслойка нейросенсорной сетчатки от подлежащего RPE, приводит к апоптотической смерти фоторецепторных клеток (Cook et al., 1995; 36(6):990-996; Hisatomi et al., Curr Eye Res. 2002; 24(3):161-172; Zacks et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(3):1262-1267. Yang et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45(2):648-654; включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). Моделирование RD на кошках и грызунах продемонстрировало активизацию проапоптотических путей сразу тотчас после отслойки сетчатки от RPE (Cook et al., 1995; 36(6):990-996; Hisatomi et al., Curr Eye Res. 2002; 24(3):161-172; Zacks et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44(3):1262-1267. Yang et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2004; 45(2):648-654; включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). Гистологические маркеры апоптоза, такие как окраска с терминальным дезоксиуридиновым мечением концов разорванной нити ДНК (TUNEL), достигают пика приблизительно через три дня после RD, с апоптотической активностью и прогрессирующей смертью клеток, продолжающихся в течение периода отслойки. Это также было подтверждено при отслойке сетчатки человека (Arroyo et al., Am J Ophthalmol. 2005 Apr; 139(4):605-10). Однако клинический опыт в лечении отслойки сетчатки продемонстрировал, что есть окно возможностей для восстановления с сохранением некоторой остроты зрения, но острота зрения значительно снижается по мере увеличения времени между отслойкой и лечением (Burton. Trans Am Ophthalmol Soc. 1982; 80:475-497; Ross et al., Ophthalmology. 1998; 105(11):2149-2153; Hassan et al., Ophthalmology. 2002; 109(1):146-152; включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). Высокая скорость активации проапоптотических путей и более низкая скорость потери зрения указывает на то, что внутри нейросетчатки могут активироваться внутренние нейропротективные факторы, которые могут служить для противодействия эффектам проапоптотических путей, активированных отслойкой сетчатки от RPE.

Возрастная макулярная дегенерация (AMD) является ведущей причиной постоянной потери зрения в соединенных Штатах (Bourne et al., Br J Ophthalmol. 2014; 98:629-638; Klein et al., Arch Ophthalmol. 2011; 129:75-80; Cruchian et al., Clin Ter. 2011; 162:e35-42). Смерть наружной сетчатки (определяемой в данном документе как комплекс пигментного эпителия сетчатки (RPE) и фоторецепторных (PR) клеток) является основной причиной потери зрения при AMD и ограничивает эффективность существующих на сегодня методов лечения (Murakami et al., Prog Retin Eye Res. 2013; 37:114-140; Huckfeldt и Vavvas. Int Ophthalmol Clin. 2013; 53:105-117). Нарушение гомеостаза PR-RPE приводит к смерти PR. Fas был значительно экспрессирован в глазах людей с прогрессирующим AMD, определяемой как влажная или атрофическая, по сравнению со здоровыми представителями контрольной группы, и был наиболее сконцентрирован вокруг участков активных неоваскулярных и атрофических поражений (Dunaief et al., Arch Ophthalmol. 2002; 120:1435-1442). RPE чувствителен к Fas-опосредованному апоптозу в условиях стресса, который возникает во время прогрессирования AMD, такой как воспаление или окислительный стресс, и более высокие концентрации растворимого Fas-лиганда были выявлены у больных AMD по сравнению с их сопоставимыми по возрасту здоровыми участниками (Jiang et al., Invest Ophthalmol Vis

Sci. 2008; 37:114-140). Аналогично, окислительный стресс, который возникает во время прогрессирования AMD, приводит к увеличенной экспрессии Fas в RPE (Lin et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011; 52:6308-6314), и смерть RPE, которая происходит в условиях окислительного стресса, является зависимой от передачи сигнала Fas (Wang et al. Apoptosis. 2012; 17:1144-1155). Более того, Fas непосредственно связан со смертью клеток RPE, индуцированной накоплением Alu PHK, другого признанного фактора патологии AMD (Kim et al., Proc Natl Acad Sci USA. 2014; 111:16082-16087). Было показано, что TRAIL-R1 рецептор (DR4), который функционирует частично по тому же пути, является генетическим фактором риска для возрастной макулярной дегенерации (Miyake et al., Invest Ophthalmol Vis Sci 56, 5353 (2015)).

Fas также участвует в ассоциированной с глаукомой смерти ганглионарных клеток сетчатки (Gregory et al., PLoS One. 2011; 6(3):e17659). Кроме того, внутриглазное давление (IOP) является основным фактором риска для прогрессирования глаукомы, и животные модели IOP демонстрируют увеличенную экспрессию Fas и FasL (Ju et al., Brain Res. 2006; 1122(1): 209-221) и смерть ганглионарных клеток сетчатки посредством апоптоза (Ji et al., Vision Res. 2005; 45(2): 169-179). При том, что регулирование IOP является основным принципом клинического лечения глаукомы, имеется значительное количество больных, у которых продолжается прогрессирование болезни даже после надлежащего контроля IOP, и дополнительная работа укрепила идею о том, что может потребоваться рассмотрение дополнительных способствующих глаукоме факторов (Kamat et al., Semin Ophthalmol. 2016; 31(1-2):147-154).

Апоптоз (запрограммированная смерть клеток) играет центральную роль в развитии и гомеостазе всех многоклеточных организмов. Изменения путей апоптоза участвуют во многих типах патологии человека, включая нарушения развития, рак, аутоиммунные заболевания, а также нейродегенеративные нарушения и дегенерацию сетчатки. Это четко регулируемый путь, управляющий процессами смерти отдельных клеток, и он может быть инициирован как извне, так и изнутри. Последнее представляет собой внутриклеточный механизм, запускаемый митохондриями, тогда как первое затрагивает взаимодействие "рецептора смерти" с его соответствующим лигандом на клеточной мембране. Таким образом, пути запрограммированной смерти клеток становятся привлекательной мишенью для разработки терапевтических агентов. В частности, поскольку концептуально легче убить клетки, нежели поддерживать клетки, внимание сфокусировано на противораковых видах терапии с использованием проапоптотических агентов. Однако имеется много заболеваний, при которых нецелесообразная активизация апоптотических путей приводит к дегенерации тканей, и необходимо разработать методы лечения, чтобы при этой конкретной болезни или патологии блокировать активацию какого бы то ни было апоптотического пути, внутреннего или внешнего.

Fas-рецептор является наиболее распространенным из рецепторов смерти, задействованных в апоптозе при дегенеративных заболеваниях сетчатки (Chinsky et al., Curr Opin Ophthalmol. 2014 25(3); 228-233). Fas представляет собой типичный цитокиновый рецептор поверхности клетки, и он активируется посредством тримеризации, когда он связывается со своим тримерным когнатным лигандом FasL. В условиях стресса клетки сетчатки, например, фоторецепторные вслед за RD, повышающе регулируют Fas-рецептор. Проникающие иммунные клетки, привлеченные стрессовой реакцией, экспрессируют трансмембранный белок Fas-лиганд (FasL) на их поверхности. FasL связывается с Fas-рецепторами на клетках сетчатки, приводя к быстрой активации внешнего пути клеточной смерти с передачей сигнала через каспазный каскад. Сначала "инициатор" каспаза-8 расщепляется до активной формы, которая, в свою очередь, активирует каспазу-3, последующего "исполнителя" пути апоптотической клеточной смерти. Однако было продемонстрировано, что в глазах мышей, инфицированных мышинным цитомегаловирусом, активируются Fas, а также родственные рецепторы смерти TNFR1 и TRAIL, и эта активность может приводить к апоптозу, некроптозу и пироптозу в клетках глаза (Chien и Dix J Virol 86, 10961 (2012)).

Было продемонстрировано, что фоторецепторные клетки в культуре весьма чувствительны к апоптозу, индуцированному FasL, предполагая, что FasL-индуцированный апоптоз является основным способствующим потере зрения фактором при заболеваниях сетчатки (Burton. Trans Am Ophthalmol Soc. 1982; 80:475-497; Ross et al., Ophthalmology. 1998; 105 (11):2149-2153; Hassan et al., Ophthalmology. 2002; 109(1):146-152). Кроме того, было показано, что небольшой пептидный ингибитор Fas-рецептора, Met-12, H<sup>60</sup>NIYLGAVNYIY<sup>71</sup> (SEQ ID NO: 2), производное Fas-связывающего внеклеточного домена онкопротеина Met (Zou et al., Nature Medicine 13, 1078 (2007) защищает фоторецепторы как в экспериментах с клеточными культурами, так и при установлении отслойки сетчатки и пигментного эпителия сетчатки и других патологических состояний или заболеваний глаза (Besirli et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 51(4):2177-84 (2010); патент США № 8343931; включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). Кроме того, было продемонстрировано, что с-Met, по-видимому, использующий тот же связывающий домен с гомологией к Met-12, FasL, TNFα и TRAIL, блокирует TRAIL-индуцированный апоптоз в ряде опухолей (Du et al., PLoS One 9, e95490 (2014)).

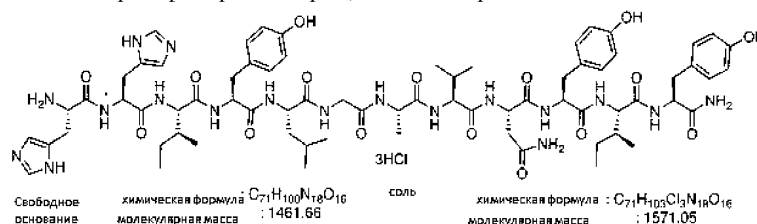
Сам по себе пептид Met-12 обладает биофармацевтическими свойствами, в которых преобладает его крайне слабая растворимость в воде. Эксперименты ясно показали, что чтобы продемонстрировать оптимальную активность, Met-12 следует вводить дозами в виде раствора как *in vitro*, так и *in vivo*, а получение таких растворов в основном в водной среде оказалось очень сложным, особенно в условиях, приемлемых для интравитреальной инъекции. Введение доз суспензий или гелей Met-12 приводит к зна-

чительным потерям эффективности. Например, даже внешне прозрачный 10 мг/мл раствор Met-12 в 20 мМ цитратного буфера с pH 2,8 показал значительную потерю материала при фильтрации, а при использовании как в анализах *in vitro* и *in vivo*, описанных ниже, привел по меньшей мере к пятикратной потере активности. Несмотря на обширные разработки, единственные составы Met-12 в виде раствора, которые были обнаружены, включают в себя несколько растворов для инъекций с весьма низким pH ( $\leq$ pH 2,8) или инъекций чистого DMSO, которые все являются субоптимальными для интравитреальных инъекций.

В связи с этим, чтобы помочь защитить зрение, все еще необходимы пептидные композиции, которые защищают клетки сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы, ганглионарные клетки сетчатки и пигментный эпителий сетчатки, от клеточной смерти по внешнему пути, включая Fas- и TRAIL-опосредованный апоптоз, которые легко получить в виде раствора или суспензии, которые можно доставлять в глаз способом, создающим достаточное воздействие, без использования эксципиентов, которые могут оказывать токсичность на глаз (либо другую токсичность) и которые легко использовать.

### Сущность изобретения

В данном документе предоставлены фармацевтические препараты биологически активных водных составов защищающего фоторецепторы пептида, его фармацевтические препараты и способы предотвращения с их помощью смерти фоторецепторов, а также терапевтические способы



Соединение I. His-His-Ile-Tyr-Leu-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Ile-Tyr-амид (SEQ ID NO: 1).

Некоторые варианты осуществления относятся к С-концевому амидному пептиду, соединению I (выше), или его фармацевтически приемлемой соли. Некоторые другие варианты осуществления относятся к триацетатной соли соединения I. Соединения можно использовать в фармацевтическом составе для предотвращения Fas- или TRAIL-опосредованного апоптоза в фоторецепторах глаза. Соединения можно использовать в фармацевтическом составе для предотвращения Fas-опосредованного апоптоза в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза. Соединения можно использовать в фармацевтическом составе для лечения отслойки сетчатки. Соединения можно использовать в фармацевтическом составе для лечения заболеваний ганглионарных клеток сетчатки, таких как глаукома. В некоторых других вариантах осуществления соединения можно использовать в фармацевтическом составе для лечения глазных заболеваний или патологических состояний, включая следующее: макулопатии/дегенерацию сетчатки, такие как макулярная дегенерация, включая возрастную макулярную дегенерацию (AMD), такую как неэкссудативная возрастная макулярная дегенерация и экссудативная возрастная макулярная дегенерация; хориоидальную неоваскуляризацию; ретинопатию, включая диабетическую ретинопатию, острую и хроническую макулярную нейроретинопатию, центральную серозную хориоретинопатию; и макулярный отек, включая кистозный макулярный отек, и диабетический макулярный отек; увеит/ретинит/хориоидит, такой как острая мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, болезнь Бехчета, ретинохориоидопатию "выстрел дробью", инфекционные (сифилис, болезнь Лайма, туберкулез, токсоплазмоз), увеит, включая срединный увеит (парспланит) и передний увеит, мультифокальный хориоидит, синдром множественных переходящих белых точек (MEWDS), саркоидоз глаз, задний склерит, ползучий хориоидит, субретинальный фиброз, увеит-синдром, и синдром Фогта-Коянаги-Харада; сосудистые заболевания/экссудативные заболевания, такие как окклюзионное поражение артерий сетчатки, окклюзия центральной вены сетчатки, диссеминированная внутрисосудистая коагулопатия, окклюзия ветви вены сетчатки, гипертензивные изменения дна глаза, глазной ишемический синдром, артериальные микроаневризмы сетчатки, болезнь Коутса, парафовеальные телеангиэктазии, окклюзия вены полусферы сетчатки, папиллофлебит, окклюзия центральной артерии сетчатки, окклюзия ветви артерии сетчатки, поражение сонной артерии (CAD), ангиит по типу "замерзшей ветви", серповидно-клеточная ретинопатия и другие гемоглинопатии, ангиоидные полосы сетчатки, семейная экссудативная витреоретинопатия, болезнь Илза, травматические/хирургические заболевания: симпатическая офтальмия, увеитическая болезнь сетчатки, отслойка сетчатки, травма, лазер, PDT, фотокоагуляция, гипоперфузия во время операции, лучевая ретинопатия, ретинопатия после трансплантации костного мозга; пролиферативные расстройства, такие как пролиферативная витреоретинопатия и эпиретинальная мембрана, пролиферативная диабетическая ретинопатия. Инфекционные расстройства: гистоплазмоз глаз, токсокароз глаз, синдром глазного гистоплазмоза (OHS), эндофтальмит, токсоплазмоз, заболевания сетчатки, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией, заболевание сосудистой оболочки глаза, ассоциированное с ВИЧ-инфекцией, увеитическая болезнь, ассоциированное с ВИЧ-инфекцией, вирусный ретинит, острый некроз сетчатки, прогрессирующий некроз наружных слоев сетчатки, грибковые заболевания сетчатки, сифилис глаз, туберкулез

глаз, диффузный односторонний подострый нейроретинит и миаз; генетические расстройства, такие как пигментный ретинит, системные расстройства с ассоциированными дистрофиями сетчатки, врожденная стационарная ночная слепота, колбочковые дистрофии, дегенерация желтого пятна Штаргардта и желтопятнистая абитрофия сетчатки, болезнь Вебера, узорчатая дистрофия пигментного эпителия сетчатки, Х-сцепленный ретиношизис, дистрофия глазного дна Сорсби, доброкачественная концентрическая макулопатия, кристаллическая дистрофия Биетти, эластическая псевдоксантома; разрывы/перфорации сетчатки: отслойка сетчатки, макулярная перфорация, гигантский разрыв сетчатки; опухоли, такие как заболевание сетчатки, ассоциированное с опухолями, врожденная гипертрофия RPE, задняя увеальная меланома, хориоидальная гемангиома, хориоидальная остеома, хориоидальный метастаз, комбинированная гамартома сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, ретинобластома, вазопрлиферативные опухоли глазного дна, астроциты сетчатки, внутриглазные лимфоидные опухоли; и другие заболевания и патологические состояния, такие как точечная внутренняя хориопатия, острая задняя мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, миопическая дегенерация сетчатки, острый ретинальный пигментный эпителиит, дистрофии или дисплазии роговицы и т.п.

Дополнительные варианты осуществления относятся к композиции, содержащей соединение I или его фармацевтически приемлемую соль (например, полиацетатную соль и триацетатную соль) и фармацевтический носитель, выполненный с возможностью доставки в глаз. Композиция может быть составлена для внутриглазного, интравитреального или периокулярного введения. Соединение I или его фармацевтически приемлемая соль в композиции защищает отслоившиеся фоторецепторные клетки сетчатки. Соединение I или его фармацевтически приемлемая соль в композиции предотвращает клеточную смерть по внешнему пути, включая апоптоз в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза. Соединение I или его фармацевтически приемлемая соль в композиции предотвращает заболевания ганглионарных клеток сетчатки, такие как глаукома. Композиция стерильна, апиrogenна и не токсична для глаза. Композиция может дополнительно содержать по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество. По меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество может представлять собой полисорбат 80, полисорбат-20, полксамер или тилоксапол, но без ограничения этими примерами. По меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество может образовывать приблизительно 0,01-20 мас./мас.% композиции; в качестве альтернативы приблизительно 0,05-10 мас./мас.% композиции и в качестве альтернативы приблизительно 0,1-3 мас./мас.% композиции. В качестве альтернативы можно использовать смесь неионных поверхностно-активных веществ, где по меньшей мере два из указанных выше или другие неионные поверхностно-активные вещества используются вместе в пропорции, которая оптимизирует желаемую фармакокинетику состава, где общие количества поверхностно-активных веществ находятся в пределах вышеописанных ограничений. Композиция может дополнительно содержать органический соразтворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид. Органический соразтворитель может образовывать приблизительно 1-50% мас./мас. композиции; в качестве альтернативы приблизительно 1-20% мас./мас. композиции и в качестве альтернативы приблизительно 1-5% мас./мас. композиции. Обеспечивающий изотоничность агент, такой как трегалоза, или маннитол, или сорбитол, или растворимая неорганическая соль, такая как NaCl, также могут быть добавлены для приведения тоничности раствора в диапазон 250-400 мОсм/л. Композиция может иметь pH в диапазоне 2,5-6,0 и забуферена с помощью средств, известных специалисту в данной области.

Другой вариант осуществления относится к способу лечения патологического состояния, заболевания глаз или патологического состояния или заболевания, поражающих здоровье глаз, включающему введение композиции, содержащей соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и фармацевтический носитель, выполненный с возможностью доставки в глаз больному, страдающему от патологического состояния заболевания глаз, или патологического состояния или заболевания, поражающего здоровье глаз. Патологическим состоянием, заболеванием глаз, или патологическим состоянием, или заболеванием, поражающим здоровье глаз, может являться отслойка сетчатки, макулярная дегенерация, возрастная макулярная дегенерация, неэкссудативная возрастная макулярная дегенерация, экссудативная возрастная макулярная дегенерация, хориоидальная неоваскуляризация, ретинопатия, диабетическая ретинопатия, острая и хроническая макулярная нейроретинопатия, центральная серозная хориоретинопатия, макулярный отек, кистозный макулярный отек, диабетический макулярный отек, увеит/ретинит/хориоидит, мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, болезнь Бехчета, ретинохориоидопатия "выстрел дробью", инфекционные (сифилис, болезнь Лайма, туберкулез, токсоплазмоз), увеит, срединный увеит (парспланит), передний увеит, мультифокальный хориоидит, синдром множественных переходящих белых точек (MEWDS), саркоидоз глаз, задний склерит, ползучий хориоидит, субретинальный фиброз, увеит-синдром, синдром Фогта-Коянаги-Харада; окклюзионное поражение артерии сетчатки, окклюзия центральной вены сетчатки, диссеминированная внутрисосудистая коагулопатия, окклюзия ветви вены сетчатки, гипертензивные изменения дна глаза, глазной ишемический синдром, артериальные микроаневризмы сетчатки, болезнь Коутса, парафовеальные телеангиэктазии, окклюзия вены полусферы сетчатки, папиллофлебит, окклюзия центральной артерии сетчатки, окклюзия ветви артерии сетчатки, поражение сонной артерии (CAD), ангиит по типу "замерзшей ветви", серповидно-клеточная ретинопатия и другие гемоглинопатии, ангиоидные полосы сетчатки, семейная экссуда-

тивная витреоретинопатия, болезнь Илза, симпатическая офтальмия, увеитическая болезнь сетчатки, отслойка сетчатки, травма, лазер, PDT, фотокоагуляция, гипоперфузия во время операции, лучевая ретинопатия, ретинопатия после трансплантации костного мозга, пролиферативная витреоретинопатия и эпиретинальная мембрана, пролиферативная диабетическая ретинопатия, гистоплазмоз глаз, токсокароз глаз, синдром гистоплазмоза глаз (OHS), эндофтальмит, токсоплазмоз, заболевания сетчатки, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией, заболевание сосудистой оболочки глаза, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией, увеитическая болезнь, ассоциированная с ВИЧ-инфекцией, вирусный ретинит, острый некроз сетчатки, прогрессирующий некроз наружных слоев сетчатки, грибковые заболевания сетчатки, сифилис глаз, туберкулез глаз, диффузный односторонний подострый нейроретинит, миаз, пигментный ретинит, системные расстройства с ассоциированными дистрофиями сетчатки, врожденная стационарная ночная слепота, колбочковые дистрофии, дегенерация желтого пятна Штаргардта, желтопятнистая абнотрофия сетчатки, болезнь Веста, узорчатая дистрофия пигментного эпителия сетчатки, X-сцепленный ретиношизис, дистрофия глазного дна Сорсби, доброкачественная концентрическая макулопатия, кристаллическая дистрофия Биетти, эластическая псевдоксантома, отслойка сетчатки, макулярная перфорация, гигантский разрыв сетчатки, заболевание сетчатки, ассоциированное с опухолью, врожденная гипертрофия RPE, задняя увеальная меланома, хориоидальная гемангиома, хориоидальная остеома, хориоидальный метастаз, комбинированная гамартома сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, ретинобластома, вазопротрофирующие опухоли глазного дна, астроцитомы сетчатки, внутриглазные лимфоидные опухоли, точечная внутренняя хориопатия, острая задняя мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, миопическая дегенерация сетчатки, аномальный гомеостаз пигментного эпителия сетчатки, острый ретинальный пигментный эпителиит, глаукома, дистрофии или дисплазии роговицы и т.п. Композицию можно вводить в количестве, достаточном для ослабления клеточной смерти у больного. Композицию вводят в количестве, достаточном для повышения выживаемости фоторецепторных клеток у указанного больного. Композицию вводят в количестве, достаточном для защиты клеток пигментного эпителия сетчатки у указанного больного. Композицию вводят в количестве, достаточном для защиты ганглионарных клеток сетчатки у указанного больного.

Другой вариант осуществления относится к способу предотвращения смерти фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки, включающему введение больному композиции, содержащей соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и стерильный апиригенный фармацевтический носитель. Смерть фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки представляет собой Fas-опосредованный апоптоз фоторецепторных или RPE-клеток. У больного может быть риск смерти фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Композицию можно вводить больному интраокулярно, интравитреально или периокулярно.

Еще один другой вариант осуществления относится к способу увеличения выживаемости фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки, включающему введение композиции, защищающей фоторецепторные, RPE или ганглионарные клетки сетчатки, содержащей соединение I или его фармацевтически приемлемую соль. Увеличение выживаемости фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки включает ингибирование апоптоза фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Смерть фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки включает Fas-опосредованный апоптоз фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Смерть фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки включает TRAIL-опосредованный апоптоз фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Смерть фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки включает TNFR-опосредованный некроптоз фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Смерть фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки включает опосредованный внешним путем пироптоз фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки. Композицию можно вводить больному системно посредством внутривенной, подкожной или внутримышечной инъекции, или перорально, или местно, т.е. интраокулярно, интравитреально, локально, супрахориоидально, субконъюнктивально, субретинально или периокулярно.

#### Краткое описание чертежей

Фиг. 1 демонстрирует график, изображающий блокирование Fas-индуцированной активации каспазы-8 посредством тригидрохлорида Met-12 и соединения I в клетках 661W. Клетки 661W предварительно обрабатывали различными количествами либо Met-12, либо соединения I, растворенного в DMSO, оба при 20 мг/мл в течение 1 ч. Затем добавляли FasL (500 нг/мл), и активность каспазы-8 измеряли через 48 ч после обработки FasL.

Фиг. 2 демонстрирует график, изображающий блокирование Fas-индуцированной активации каспазы-8 посредством тригидрохлорида Met-12 и соединения I в клетках 661W. Клетки 661W предварительно обрабатывали в течение 1 ч различными количествами Met-12 в DMSO (кружок), соединения I в DMSO (20 мг/мл ромб) и соединения I в составе с 2% полисорбатом (PS)-20, 2% пропиленгликолем (PG) с pH 4 (треугольник), все составы в концентрации 10 мг/мл. Затем клетки обрабатывали FasL (500 нг/мл), и активность каспазы-8 измеряли через 48 ч после обработки FasL.

Фиг. 3 демонстрирует график, изображающий блокирование Fas-индуцированной активации каспазы-8 посредством тригидрохлорида соединения I в клетках 661W. Клетки 661W предварительно обраба-

тывали в течение 1 ч различными количествами соединения I в DMSO (20 мг/мл) (кружок), и в составе с 3% полисорбатом-20, 3% пропиленгликолем (треугольник) с pH 4, и в составе с 1% полисорбатом 20, 3% пропиленгликолем (ромб) с pH 4, все составы в концентрации 10 мг/мл. Затем клетки обрабатывали FasL (500 нг/мл), и активность каспазы-8 измеряли через 48 ч после обработки FasL.

Фиг. 4 демонстрирует график, изображающий блокирование Fas-индуцированной активации каспазы-8 посредством тригидрохлорида соединения I в клетках 661W. Клетки 661W предварительно обрабатывали различными количествами тригидрохлорида соединения I в DMSO (20 мг/мл) (кружок), и в составе с 0,4% полисорбатом-20, 4,5% маннитолом, 10 mM ацетата с pH 4 (треугольник), в концентрации 2 мг/мл. Затем клетки обрабатывали FasL (500 нг/мл), и активность каспазы-8 измеряли через 48 ч после обработки FasL.

Фиг. 5a изображает логарифмический график концентрации соединения I в сетчатке кролика, доставленного интравитреально в трех составах с полксамером.

Фиг. 5b изображает логарифмический график концентрации соединения I в сетчатке кролика, доставленного интравитреально, для сравнения состава на основе полксамера 407 с составом на основе полисорбата-20.

Фиг. 6a изображает линейный график концентрации с течением времени соединения I стекловидного тела (VH) кролика, доставленного интравитреально, в трех составах с полксамером с различными концентрациями поверхностно-активного вещества (0,4 или 0,1%) и различными концентрациями соединения I (2 мг/мл в сравнении с 0,5 мг/мл).

Фиг. 6b изображает линейный график концентрации в VH кролика с течением времени с различным выбором поверхностно-активного вещества (0,4% полксамер 407 в сравнении с 0,4% полисорбатом-20) и различными количествами соединения I (2 мг/мл в сравнении с 1 мг/мл).

Фиг. 7 демонстрирует общие количества триацетата соединения I в стекловидном теле (темное) и концентрации в сетчатке (светлое) серых крыс через 24 и 72 ч после номинальной инъекции 300 нг триацетата соединения I (5 мкл 0,06 мг/мл) в 4,5% маннитол, 10 mM уксусной кислоты, 0,4% полксамере (PX) 407, pH 4,5.

Фиг. 8 демонстрирует столбиковую диаграмму, изображающую количество апоптозных клеток через 72 ч после обработки *in vivo* отслоенной сетчатки у крыс тригидрохлоридом Met-12 (светлые полосы) (5 мкг в 5 мкл DMSO), и тригидрохлоридом соединения I (темная) (0,5, 1,0, 5 и 10 мкг в 5 мкл DMSO), или несущей средой DMSO (светлая). Столбик слева представляет контрольную неотслоенную сетчатку без инъекции.

Фиг. 9 демонстрирует столбиковую диаграмму, изображающую количество апоптозных клеток через 72 ч после обработки *in vivo* отслоенной сетчатки у крыс тригидрохлоридом соединения I (1,0 и 5 мкг в 5 мкл F1 или F2) по сравнению с ним же (5 мкг в 5 мкл) в DMSO или несущей средой DMSO (серое). Столбик слева представляет контрольную неотслоенную сетчатку без инъекции. F1 (5/1 мкг) представляет 1,0/0,2 мг/мл тригидрохлорида соединения I в 3% PG/3% PS-20 при pH 4,0 (черное), и F2 (5/1 мкг) представляет 1,0/0,2 мг/мл тригидрохлорида соединения I в 2% PG/2% PX-407 при pH 4,0 (вертикальные полосы).

Фиг. 10 демонстрирует столбиковую диаграмму, изображающую процент апоптозных клеток через 72 ч после обработки *in vivo* отслоенной сетчатки у крыс. Столбик 1 представляет контроль несущей средой в отслоенных сетчатках. Столбик 2 представляет 1 мкг триацетата соединения I в виде 0,2 мг/мл раствора DMSO. Столбик 3 представляет 1 мкг тригидрохлорида соединения I в виде 0,2 мг/мл раствора DMSO. Столбик 4 представляет контрольную неотслоенную сетчатку без инъекции.

#### Подробное описание

Все патенты, патентные заявки и публикации и другие литературные источники, цитируемые в данном документе, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте. Раскрытие этих публикаций во всей их полноте включено настоящим в данную заявку посредством ссылки с целью более полного описания состояния уровня техники, который известен специалистам в данной области на дату изобретения, описанного и заявленного в данном документе.

Описаны биологически активные пептидные композиции, фармацевтические препараты биологически активных пептидных композиций и способы применения пептидных композиций.

Термин "терапевтически эффективное количество" обозначает количество лекарственного препарата или агента (например, соединения I), эффективное для обеспечения требуемого терапевтического эффекта у конкретного класса больных (например, младенца, ребенка, подростка, взрослого). Как используется в данном документе, термин "субтерапевтическое" относится к количеству лекарственного препарата или агента, которое является недостаточным для достижения требуемого и/или ожидаемого терапевтического результата/исхода после введения среднестатистическому и/или типичному больному (например, среднего размера, не принимающему противопоказанных фармацевтических агентов, имеющему такую же реакцию на дозу, как и большая часть населения, и т.д.). На терапевтическую дозу указывают дозировки, рекомендуемые Управлением по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) США.

Как используется в данном документе, термины "лекарственный препарат" или "фармацевтический агент" относятся к соединению, пептиду, макромолекуле или другому соединению, которое вводят (на-

пример, в контексте фармацевтической композиции) больному для получения требуемого биологического ответа. Фармацевтический агент может представлять собой "лекарственный препарат" или любой другой материал (например, пептид, полипептид), биологически активный у человеческого существа или другого млекопитающего местно и/или системно. Примеры лекарственных препаратов раскрыты в справочнике Мерк и Настольном справочнике врача, полное раскрытие которых включено в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтический состав" относится по меньшей мере к одному фармацевтическому агенту (например, соединению I) в комбинации с одним или более дополнительными компонентами, которые помогают сделать фармацевтический агент (агенты) пригодным для достижения требуемого эффекта после введения больному. Фармацевтический состав может содержать одну или более добавок, например фармацевтически приемлемые эксципиенты, носители, средства, улучшающие проникновение, покрывающие средства, стабилизаторы, буферы, кислоты, основания или другие материалы, физически связанные с фармацевтическим агентом для улучшения введения, высвобождения (например, времени высвобождения), доставляемости, биодоступности, эффективности и т.д. лекарственной формы. Состав может представлять собой, например, жидкость, суспензию, твердую форму, наночастицу, эмульсию, мицеллу, мазь, гель, эмульсию, покрывающее средство и т.д. Фармацевтический состав может содержать единственный фармацевтический агент (например, соединение I) или множество фармацевтических агентов. Фармацевтическая композиция может содержать единственный фармацевтический состав или множество фармацевтических составов. В некоторых вариантах осуществления фармацевтический агент (например, соединение I) составлено для конкретного способа введения (например, глазного введения (например, интравитреального введения и т.д.) и т.д.). Фармацевтический состав стерилен, апирогенен и не токсичен для глаза.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтическая композиция" относится к комбинации одного или более фармацевтических агентов с одним или более носителями, инертными или активными, делающими композицию особенно пригодной для диагностического или терапевтического использования *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*. Фармацевтическая композиция представляет собой физическую субстанцию, которую вводят больному, и может иметь форму твердой, полутвердой или жидкой лекарственной формы, такой как таблетка, капсула, таблетка, распадающаяся в полости рта, пилюля, порошок, суппозиторий, раствор, эликсир, сироп, суспензия, крем, леденец, паста, спрей и т.д. Фармацевтическая композиция может содержать единственный фармацевтический состав (например, с замедленным высвобождением, с немедленным высвобождением, с отсроченным высвобождением, в форме наночастиц и т.д.) или множество составов (например, с немедленным высвобождением и с отсроченным высвобождением, в форме наночастиц и не в форме наночастиц и т.д.). Термины "фармацевтическая композиция" и "фармацевтический состав" могут использоваться взаимозаменяемо.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к любому из стандартных фармацевтических носителей, таких как фосфатно-солевой буферный раствор, вода, эмульсии (например, такие эмульсии как масло/вода или вода/масло) и различные типы увлажняющих агентов. Композиции также могут содержать стабилизаторы и консерванты. Примеры носителей, стабилизаторов и адъювантов см., например, в Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15<sup>th</sup> Ed., Mack Publ. Co., Easton, Pa. [1975]; включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемая соль" относится к любой кислоте или основанию фармацевтического агента или активного метаболита или его остатка. Как известно специалистам в данной области, "соли" соединений настоящего изобретения могут быть производными неорганических или органических кислот и оснований. Примеры кислот включают, без ограничения, хлористоводородную, бромистоводородную, серную, азотную, перхлорную, фумаровую, малеиновую, фосфорную, гликолевую, молочную, салициловую, янтарную, п-толуолсульфоновую, винную, уксусную, лимонную, метансульфоновую, этансульфоновую, муравьиную, бензойную, малоновую, нафталин-2-сульфоновую, бензолсульфоновую кислоту и т.п. Другие кислоты, такие как шавелевая, сами по себе пока не являющиеся фармацевтически приемлемыми, можно использовать при получении солей, пригодных в качестве промежуточных при получении соединений изобретения и их фармацевтически приемлемых солей присоединения кислоты.

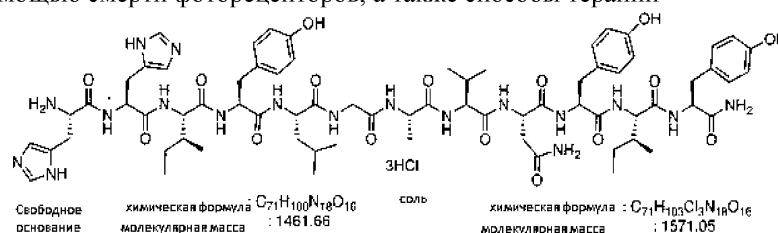
Как используется в данном документе, термин "введение" относится к акту применения лекарственного препарата, пролекарства или другого агента или терапевтического лечения (например, композиций настоящего изобретения) больному (например, больному или в клетки, ткани и органы *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*). Иллюстративные пути введения в организм человека могут быть через глаза (офтальмический), рот (пероральный), кожу (трансдермальный), нос (назальный), легкие (ингаляционный), слезистую полость рта (буккальный), ухо, прямую кишку, посредством инъекции (например, внутривенной, подкожной, интратуморальной, интраперитонеальной и т.д.) и т.п.

Как используется в данном документе, термин "совместное введение" относится к введению по меньшей мере двух агентов (например, соединения I и одного или более дополнительных терапевтических средств) или видов терапии больному. В некоторых вариантах осуществления совместное введение



двух или более агентов/видов терапии является одновременным. В других вариантах осуществления совместное введение двух или более агентов/видов терапии является последовательным (например, первый агент/терапию вводят перед вторым агентом/терапией). В некоторых вариантах осуществления два или более вида терапии применяют одновременно, но они высвобождаются (например, всасываются, становятся биодоступными и т.д.) последовательно. Специалисты в данной области понимают, что составы и/или пути введения различных агентов/видов используемой терапии могут варьировать. Специалист в данной области может легко определить подходящую дозу для совместного введения. В некоторых вариантах осуществления, когда агенты/виды терапии вводят совместно, соответствующие агенты/виды терапии вводят в более низких дозах, чем необходимо для их раздельного введения.

В данном документе предоставлены фармацевтические препараты биологически активных, водных составов пептида, защищающего фоторецепторы, его фармацевтические препараты и способы предотвращения с их помощью смерти фоторецепторов, а также способы терапии



Соединение I. His-His-Ile-Tyr-Leu-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Ile-Tyr-амид (SEQ ID NO: 1), формула I.

Некоторые варианты осуществления относятся к с-концевому амидному пептиду, соединению I (выше) или его фармацевтически приемлемой соли. Некоторые варианты осуществления относятся к полиацетатной соли соединения I. Некоторые дополнительные варианты осуществления относятся к триацетатной соли соединения I.

Соединения можно использовать в фармацевтическом составе для предотвращения Fas- или TRAIL-опосредованного апоптоза в фоторецепторных клетках глаза. В FasL-индуцированной модели токсичности для фоторецепторов, в клетках 661W, соединение I в 10 раз мощнее в предотвращении активизации каспазы-8, чем Met-12, по  $IC_{50}$ , и приблизительно в 3 раза мощнее, чем Met-12, измеренном посредством эффективности дозы при максимальном ингибировании. В крысиной модели отслойки сетчатки *in vivo* соединение I по меньшей мере в 10 раз мощнее при защите фоторецепторных клеток от апоптоза, чем Met-12, и в отличие от Met-12 может эффективно доставляться в клинически приемлемых составах.

Как продемонстрировано в примерах, ингибирование Fas посредством соединения I привело к значительному сохранению фоторецепторных клеток *in vivo*. В клетках 661W обработка соединением I приводила к полному ингибированию активации каспазы-8. Собственно, можно полагать, что введение соединения I больному с патологическим состоянием, заболеванием глаз или патологическим состоянием или заболеванием, поражающим здоровье глаз, может обеспечить улучшенную защиту клеток сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы, клетки пигментного эпителия сетчатки и ганглионарные клетки сетчатки, от Fas-опосредованного апоптоза, приводя к улучшению и/или лечению патологического состояния, заболевания глаз или патологического состояния или заболевания, поражающего здоровье глаз.

В клинической практике обычно присутствуют больные с уже произошедшей отслойкой. Животные модели отслойки RPE сетчатки продемонстрировали, что активация пути Fas происходит рано и остается повышенной на протяжении всей продолжительности отслоения (Zacks et al., Arch Ophthalmol 2007; 125:1389-1395, Zacks et al., IOVS 2004; 45(12):4563-4569.8). Отслойка сетчатки и RPE также встречается при широком спектре заболеваний сетчатки. Предполагается, что клиническая значимость анти-Fas терапии в выживаемости клеток сетчатки не ограничивается отслойкой сетчатки. Например, Fas-опосредованный апоптоз может иметь значение в смерти фоторецепторных клеток при возрастной макулярной дегенерации (AMD) (Dunaief et al., Arch Ophthalmol. 2002; 120 (11):1435-1442; Zacks et al., Arch Ophthalmol 2007; Petrukhin K. New therapeutic targets in atrophic age-related macular degeneration. Expert Opin Ther Targets. 2007. 11:625-639; Miller J.W. Treatment of age-related macular degeneration: beyond VEGF. Jpn J Ophthalmol. 2010. 54:523-528; Rogala J., Zangerl B., Assaad N., Fletcher E.L., Kalloniatis M., Nivison-Smith L. In Vivo Quantification of Retinal Changes Associated with Drusen in Age-Related Macular Degeneration. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2015. 56:1689-1700, включенные в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Возрастная макулярная дегенерация характеризуется прогрессирующей дегенерацией RPE и вызывает дегенерацию и реорганизацию наружной сетчатки, аналогичные тем, которые возникают после отслойки сетчатки (Jager et al., N Engl J Med. 2008; 358:2606-17, Johnson et al., Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44:4481-4488, включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). При неоваскулярной форме AMD также имеется экссудация жидкости под сетчаткой, создающая фактическую отслойку данной ткани от расположенного ниже RPE (Jager et al., N Engl J Med. 2008; 358:260 6-17, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Неоваскулярная AMD может приводить к пролонгированным периодам отслойки RPE сетчатки и активации

Fas-пути. Полезность лечения анти-Fas, скорее всего, будет служить дополнением, направленным на защиту клеток сетчатки (таких как фоторецепторы и пигментный эпителий сетчатки) при лечении в то же время лежащего в основе расстройства (Brown et al., *N Engl J Med.* 2006 Oct. 5; 355(14):1432-44, включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Глаукома представляет собой прогрессирующее дегенеративное глазное патологическое состояние, которое характеризуется смертью ганглионарных клеток сетчатки (RGC), и ранее опубликованные исследования показали, что RGC умирают вследствие апоптоза (Ji et al., *Vision Res.* 2005; 45(2): 169-179). Внутриглазное давление (IOP) является основным фактором риска для развития глаукомы, и чтобы защитить RGC от апоптоза, на уменьшение IOP были направлены значительные усилия с использованием аналогов простагландина (Doucette и Walter. *Ophthalmic Genet.* 2016; 12:1-9). Fas также участвует в смерти RGC (Gregory et al., *PLoS One.* 2011; 6 (3): e17659), и животные модели IOP демонстрируют увеличенную экспрессию Fas и FasL (Ju et al., *Brain Res.* 2006; 1122(1):209-221), что указывает на потенциальную полезность ингибирования Fas как средства защиты жизнеспособности RGC и уменьшения дегенеративной природы глаукомы.

В некоторых вариантах осуществления описанный полипептид можно получить посредством способов, известных специалистам в данной области. Например, заявленное соединение I может быть синтезировано с использованием стандартных методик твердофазного синтеза полипептидов (например, Fmoc). В качестве альтернативы полипептид может быть синтезирован с использованием методики рекомбинантной ДНК (например, с использованием бактериальных или эукариотических экспрессионных систем), которая сверхэкспрессирует как пептид, так и соответствующий амидазный фермент для выполнения С-концевого амидирования.

Конкретно, как описано в примере 1, соединение может быть получено путем сборки последовательности пептида Met-12, H<sup>60</sup>HIYLGAVNYIY<sup>71</sup> (SEQ ID NO: 2) на аминокислоте, как это известно специалистам в данной области, для получения соединения I (SEQ ID NO: 1) после снятия защиты и расщепления смолы его С-концевого амидного H<sup>60</sup>HIYLGAVNYIY<sup>71</sup>-NH<sub>2</sub>. Конкретно, теоретически соединение может быть получено из с-Met последовательности посредством гидролиза нормальных амидов между остатками 59 и 60, и неестественного разрушения пептидной цепи между азотом пептида и α-углеродом остатка 72, а не карбонильным углеродом остатка 71. Это не естественно происходящее расщепление. Met-12 был ранее описан в патенте США № 8343931, который включен в данный документ во всей своей полноте.

Использование амидированного на С-конце пептида, т.е. соединения I, основано на убеждении, что данная специфическая модификация может повышать pH, при котором пептид растворим в воде или поддается смешиванию в мицеллах посредством удаления свободной карбоновой кислоты, которая значительно депротонирована при pH выше 3. Полученная в результате разновидность может не иметь С-концевого аниона при любом физиологически релевантном pH, или представляет собой цвиттер-ион при любых физиологически релевантных условиях, и может представлять собой трикатионную разновидность при pH ниже приблизительно 5. Этого изменения легче всего можно достичь посредством превращения в амид или сложный эфир, ни один из которых не депротонируется при физиологических условиях. Амиды являются более биологически и химически стабильными, чем сложные эфиры, а также менее гидрофобными, поэтому был выбран простой первичный амид.

В некоторых вариантах осуществления соединения I может быть получено посредством превращения Met-12 в его С-концевой первичный амид, для образования соединения I, хотя в целом более практично создать пептид из уже аминированного первого аминокислотного остатка, посредством применения аминокислоты, знакомой специалисту в данной области. Как отмечено в разделе примеров ниже, соединение I было получено и протестировано изначально в виде тригидрохлорида, хотя позднее триацетатную соль сочли более предпочтительной для составов.

Имеются определенные преимущества применения соединения I по сравнению с Met-12. Конкретно, как продемонстрировано в примерах ниже, соединение I может быть составлено с поверхностно-активными веществами для получения мицеллярных растворов с pH и количествами добавок, которые имеют прецедент в глазных составах. Второе, исходя из анализа эффективности *in vitro*, соединение I неожиданно является в 10 раз мощнее, чем Met-12, при определении IC<sub>50</sub>, и приблизительно в 3 раза мощнее при измерении концентрации максимального ингибирования. Конкретно, когда Met-12 и соединение I протестировали в одном и том же составе *in vitro*, соединение I имело более выраженную эффективность дозы, чем Met-12. Это позволяет обеспечить такое же физиологическое действие, которое будет достигнуто с более низкими количествами соединения I, чем Met-12. Третье, при тестировании *in vivo* в крысиной модели отслойки сетчатки соединение I неожиданно оказалось по меньшей мере в пять раз более мощным, чем Met-12, в предотвращении апоптоза фоторецепторных клеток в отслоенном участке сетчатки. Четвертое, у некоторых из раскрытых составов соединения I эффективность в крысиной модели отслойки сетчатки достигалась при уровнях, более чем в 10 раз более низких, чем наблюдаемые у Met-12. В итоге, соединение I демонстрирует весьма продолжительные периоды полужизни как в стекловидном теле, так и в сетчатке кроликов, при обработке интравитреально, и эти периоды полужизни можно до различной степени удлинять посредством использования различных составов, обеспечивая

возможность общего воздействия на сетчатку соединения I, подлежащего регулированию посредством выбранного состава.

В некоторых вариантах осуществления соединение I эффективно в одном или более из следующего: предотвращение/ингибирование/уменьшение Fas-опосредованного апоптоза фоторецепторов, предотвращение апоптоза в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза, увеличение выживаемости фоторецепторов, предотвращение смерти клеток, связанной с возрастной макулярной дегенерацией (AMD), предотвращение смерти клеток, связанной с отслойкой сетчатки, и т.д. В некоторых дополнительных вариантах осуществления соединение I эффективно в защите ганглионарных клеток сетчатки, которые получают зрительную информацию от фоторецепторов посредством двух типов промежуточных нейронов: биполярных клеток и амакринных клеток сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления терапевтически активное количество соединения I или его препарата (т.е. состава или композиции) вводят больному млекопитающему, нуждающемуся в лечении (например, для конкретного патологического состояния глаз) и в локализации, достаточной для ингибирования или ослабления апоптоза у пациента (например, в пределах желаемой ткани). Предпочтительным больным является человек с патологическим состоянием, заболеванием глаз или патологическим состоянием или заболеванием, поражающим здоровье глаз.

Вводимое количество является достаточным для обеспечения улучшенной защиты клеток сетчатки и/или ганглионарных клеток сетчатки, включая, но без ограничения, фоторецепторы, пигментный эпителий сетчатки и ганглии сетчатки, от Fas-опосредованного апоптоза, или предотвращения смерти клеток сетчатки, приводя к улучшению и/или лечению патологического состояния, заболевания глаз или патологического состояния или заболевания, поражающего здоровье глаз.

Определение терапевтически эффективной дозы находится в пределах возможностей практикующих специалистов в данной области. В некоторых вариантах осуществления эффективная доза для человека будет находиться в диапазоне 5-10000 мкг/глаз, 50-5000 мкг/глаз или 100-2000 мкг/глаз. Для поддержания эффективного уровня предполагаются повторные дозы (например, еженедельно, один раз в две недели, один раз в месяц, один раз в квартал, один раз в полгода и т.д.).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтический состав является стерильной апиrogenной жидкостью и содержит по меньшей мере 0,1 мг/мл (например, >0,1, >0,2, >0,5, >0,6, >0,7, >0,8 и >0,9 мг/мл), по меньшей мере 1 мг/мл (например, >1, >2, >5, >10 мг/мл и т.д.) пептида/полипептида, описанного в данном документе (например, 1, 2, 5, 10 мг/мл или более) пептида/полипептида (например, соединения I).

В некоторых вариантах осуществления лечебная доза содержит по меньшей мере 0,01 мл (например, 0,01... 0,02... 0,05... 0,1... 0,2... 0,5... 1... 2... 3... 4 мл и объемы и диапазоны в пределах этих значений) жидкого фармацевтического состава, включающего защищающий фоторецепторы или RPE пептид/полипептид (например, соединение I). В некоторых вариантах осуществления в глаз человека путем инъекции вводят объем жидкости, составляющий от 10 до 500 мкл (например, 10, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 мкл и объемы и диапазоны в пределах этих значений). В некоторых вариантах осуществления в глаз человека путем инъекции вводят объем, составляющий от 50 до 600 мкл (например, 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500, 600 мкл и объемы и диапазоны в пределах этих значений). В некоторых вариантах осуществления при интраоперационном введении могут использоваться объемы миллилитровой шкалы (например, вплоть до общего объема полости стекловидного тела (например, приблизительно 4 мл). В некоторых вариантах осуществления соединение может быть включено в раствор перфузата, используемый для поддержания внутреннего глазного давления во время витрэктомии.

В некоторых вариантах осуществления предоставлена однократная доза (например, для лечения острого патологического состояния (например, отслойки сетчатки). В некоторых вариантах осуществления предоставлены многократные дозы (например, ежедневные, еженедельные, ежемесячные и т.д.) для лечения хронического патологического состояния. Состав может быть различным в зависимости от требуемой продолжительности воздействия на состояние, подлежащее лечению.

В некоторых вариантах осуществления чтобы оптимизировать безопасность и эффективность, лечебные дозы повышают от низкого уровня. В некоторых вариантах осуществления для интравитреальной инъекции доза содержит 0,01-5 мг пептида (например, 0,1 и 2,0 мг).

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические препараты (т.е. составы и/или композиции) содержат один или более эксципиентов. Эксципиенты, пригодные для глазного использования, включают, без ограничения, агенты, регулирующие тоничность, консерванты, хелатирующие агенты, буферные агенты, поверхностно-активные вещества, соразтворители и антиоксиданты. Пригодные регулирующие тоничность агенты включают маннитол, хлорид натрия, глицерин, сорбитол и т.п. Пригодные консерванты включают сложный эфир п-гидроксibenзойной кислоты, бензалкония хлорид, бензододециния бромид, поликватерний-1 и т.п. Пригодные хелатирующие агенты включают эдетат натрия и т.п. Пригодные буферные агенты включают фосфаты, бораты, цитраты, ацетаты, трометамин и т.п. Пригодные поверхностно-активные вещества включают ионные и неионные поверхностно-активные вещества, хотя предпочтительными являются неионные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты, полиэтиоксилированные производные касторового масла, полиэтиоксилированные жирные кислоты, поли-

этоксилированные спирты, блок-сополимеры полиоксиэтилена и полиоксипропилена (Полоксамер) и оксипропилированный третичный октилфенолформальдегидный полимер (Тилоксапол). Также могут содержаться другие пригодные поверхностно-активные вещества. Пригодные антиоксиданты включают сульфиты, тиосульфат, аскорбаты, ВНА, ВНТ, токоферолы и т.п.

Композиции настоящего изобретения необязательно содержат дополнительный активный агент. Такие дополнительные активные агенты могут включать анти-TNF антитела, такие как Адалимумаб (Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina 45, 332 (2014), Curr Eye Res 39, 1106 (2014)), или этанерцепт (PLoS One, 7, e40065), или ингибиторы киназ, которые, как показано, сохраняют структуру сетчатки, такие как ингибитор ROCK Y-27632 (Molecular Medicine Reports 12, 3655 (2015)), ингибитор аденозинкиназы ABT-702 (Life Sci 93, 78 (2013), или JKK-ингибирующий пептид D-JNK-1 (Diabetes 50, 77 (2001), Adv Exptl Med Biol 854, 677 (2016)), или докозагексановая кислота (J Lipid Res, 54, 2236 (2013)), или пананогинист RXR PA024 (там же), или некростатин, или ингибиторы RIP киназ, такие как Дабрафениб (Cell Death Dis 5, 1278 (2014)).

В некоторых иллюстративных вариантах осуществления в фармацевтический препарат может быть добавлен по меньшей мере один из эксципиентов, такой как полисорбат-20 (например, вплоть до 3%), полоксамер 407 (например, вплоть до 2%), тилоксапол (например, вплоть до 3%), кремофор (например, вплоть до 1%) и/или сорастворители (например, между 0,5 и 50%), такие как N,N-диметилацетамид, этанол, PEG-400, пропиленгликоль, диметилсульфоксид (DMSO); масла или циклодекстрины.

В дополнительных иллюстративных вариантах осуществления в фармацевтическую композицию может быть включено по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество (например, 0,1-20% мас./мас. композиции), такое как полисорбат 80, полисорбат-20, полоксамер или тилоксапол. В дополнение, в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид в количестве, составляющем приблизительно 1-50%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как N, N-диметилацетамид, этанол, PEG-400, пропиленгликоль, DMSO в количестве, составляющем приблизительно 1-20%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид в количестве, составляющем приблизительно 1-5%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен обеспечивающий изотоничность агент, такой как маннитол, сорбитол, глюкоза или трегалоза, или неорганическая соль, такая как хлорид натрия, в количествах, необходимых для приведения тоничности композиции в диапазон 250-400 мОсм/л.

pH композиции может находиться в диапазоне 2,5-6,0. pH может регулироваться посредством подходящего буфера и находиться в диапазоне 3,0-5,0 или в диапазоне 3,5-4,5.

В другом иллюстративном варианте осуществления в фармацевтическую композицию может быть включено по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество (например, 0,5-10% мас./мас. композиции), такое как полисорбат-80, полисорбат-20, полоксамер или тилоксапол. В дополнение, в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид в количестве, составляющем приблизительно 1-50%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид, в количестве, составляющем приблизительно 1-20%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как N, N-диметилацетамид, этанол, PEG-400, пропиленгликоль, DMSO, в количестве, составляющем приблизительно 1-5%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен обеспечивающий изотоничность агент, такой как маннитол, сорбитол, глюкоза или трегалоза, или неорганическая соль, такая как хлорид натрия, в количествах, необходимых для приведения тоничности композиции в диапазон 250-400 мОсм/л. pH композиции может находиться в диапазоне 2,5-6,0. pH можно может регулироваться посредством подходящего буфера и находиться в диапазоне 3,0-5,0 или в диапазоне 3,5-4,5.

В другом дополнительном иллюстративном варианте осуществления в фармацевтическую композицию может быть включено по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество (например, 1-3% мас./мас. композиции), такое как полисорбат 80, полисорбат-20, полоксамер или тилоксапол. В дополнение, в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид, в количестве, составляющем приблизительно 1-50%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как N, N-диметилацетамид, этанол, PEG-400, пропиленгликоль, DMSO, в количестве, составляющем приблизительно 1-20%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен органический сорастворитель, такой как пропиленгликоль или диметилсульфоксид, в количестве, составляющем приблизительно 1-5%. В качестве альтернативы в фармацевтическую композицию может быть включен обеспечивающий изотоничность агент, такой как маннитол, сорбитол, глюкоза или трегалоза, или неорганическая соль, такая как хлорид натрия, в количествах, необходимых для приведения тоничности композиции в диапазон 250-400 мОсм. pH композиции может находиться в диапазоне 2,5-6,0. pH можно может регулироваться посредством подходящего буфера и находиться в диапазоне

3,0-5,0 или в диапазоне 3,5-4,5.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, имеющей рН в диапазоне 3,0-6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной пропаноатом натрия/пропановой кислотой или ацетатом натрия/уксусной кислотой, имеющей рН в диапазоне 4,0-5,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной пропаноатом натрия/пропановой кислотой или ацетатом натрия/уксусной кислотой, имеющей рН в диапазоне 4,0-5,0 и сделанной изотоничной посредством 3-5% маннитола.

В некотором дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль, полисорбат-20 (например, 0,1-3% мас./мас. композиции) и пропиленгликоль (например, 3% мас./мас. композиции) в водной среде в диапазоне рН 3,0-6,0.

В определенных дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль, полисорбат-20 (например, 0,1-3% мас./мас. композиции) и пропиленгликоль (например, 3% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной ацетатом натрия/уксусной кислотой в диапазоне рН 4,0-5,0.

В некотором дополнительном варианте осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль, полисорбат-20 (например, 0,1-3% мас./мас. композиции) и маннитол (например, 3-5% мас./мас. композиции) в водной среде в диапазоне рН 3,0-6,0.

В определенных дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль, полисорбат-20 (например, 0,1-3% мас./мас. композиции) и маннитол (например, 3-5% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной ацетатом натрия/уксусной кислотой в диапазоне рН 4,0-5,0.

В некоторых дополнительных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) и полисорбат-20 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, имеющей рН в диапазоне 3,0-6,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) и полисорбат-20 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной пропаноатом натрия/пропановой кислотой или ацетатом натрия/уксусной кислотой, имеющей рН в диапазоне 4,0-5,0.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать соединение I или его фармацевтически приемлемую соль и полоксамер 407 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) и полисорбат-20 (например, 0,1-2% мас./мас. композиции) в водной среде, забуференной пропаноатом натрия/пропановой кислотой или ацетатом натрия/уксусной кислотой, имеющей рН в диапазоне 4,0-5,0 и сделанной изотоничной посредством 3-5% маннитола.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, как описано выше, могут включать соединение I, но не хлорид в качестве противоиона, причем предпочтительным вариантом является ацетат. Такие композиции могут демонстрировать превосходные свойства по сравнению с композициями, содержащими хлорид-ион.

В некоторых вариантах осуществления весовое соотношение пептид/полипептид (например, соединение I) составляет 1-25% по отношению к весу неводных эксципиентов в фармацевтическом составе, который, наоборот, составляет 0,1-20% эксципиентов, таких как полоксамер, полисорбат-20, пропиленгликоль и маннитол.

Это весовое соотношение пептид/полипептид (например, соединение I) по отношению к весу фармацевтического состава может составлять по меньшей мере приблизительно 0,1%, по меньшей мере 0,5%, по меньшей мере 1%, по меньшей мере приблизительно 2%, по меньшей мере приблизительно 3%.

Следующие две иллюстративные композиции, имеющие количество каждого ингредиента в указанном диапазоне, предоставят две из нескольких композиций, которые можно использовать для лечения или предотвращения ряда глазных заболеваний или патологических состояний (например, сетчатки) или предотвращения смерти клеток сетчатки в результате заболеваний или патологических состояний глаз и т.п. у больного:

## Иллюстративный состав I

Триацетатная соль Соединения I	0,1–2 мг/мл
Полоксамер 407	0,01–0,5%
Добавка (напр., Маннитол)	2,5–5%
Уксусная кислота	10 мМ
NaOH	до pH >3
Вода (WFI)	до 100%

## Иллюстративный состав II

Триацетатная соль Соединения I	0,1–2 мг/мл
Полисорбат-20	0,1–1,0%
Добавка (напр., Маннитол)	2,5–5%
Уксусная кислота	10 мМ
NaOH	до pH >3
Вода (WFI)	до 100%

В некоторых вариантах осуществления композиции настоящего изобретения вводят окулярно, например, с использованием методик, описанных в данном документе, и/или других методик (например, инъекции местного введения и т.д.), известным специалистам в данной области (см., например, Janoria et al., Expert Opin Drug Deliv., 4(4): 371-388 (July 2007); Ghate & Edelhauser, Expert Opin Drug Deliv., 3(2):275-87 (2006); Bourges et al., Adv Drug Deliv Rev., 58 (11): 1182-202 (2006), Epub 2006 Sep. 22; Gomes Dos Santos et al., Curr Pharm Biotechnol., 6(1):7-15 (2005); включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте). Композицию можно вводить с использованием любого способа, известного специалистам в данной области. Неограничивающие примеры включают местное, субконъюнктивальное, субтеноновое, интравитреальное, субретинальное введение или инъекцию в переднюю камеру глаза больного. Другие способы введения включают системное введение, включая внутривенное введение, а также пероральное введение. В некоторых вариантах осуществления композиции вводят интравитреально.

Некоторые варианты осуществления относятся к фармацевтической композиции, содержащей полипептид соединения I и фармацевтически приемлемый носитель. Пригодным носителем является любой носитель, который может доставлять полипептид без разрушения вектора внутри носителя, и такие носители хорошо известны в данной области.

Композиция может быть составлена и упакована пригодным образом для парентерального, перорального или местного введения. Например, парентеральный состав может быть стерильным, апирогенным продуктом и может состоять из жидкого препарата быстрого или замедленного высвобождения, сухого порошка, эмульсии, суспензии или любого другого стандартного состава. Пероральный состав фармацевтической композиции может представлять собой, например, жидкий раствор, такой как эффективное количество композиции, растворенное в разбавителях (например, воде, водном растворе хлорида натрия, соке и т.д.), суспензию в соответствующей жидкости или пригодные эмульсии. Пероральный состав также можно доставлять в форме таблетки, и она может включать эксципиенты, красящие вещества, разбавители, буферные агенты, увлажняющие агенты, консерванты, ароматические агенты и фармакологически совместимые эксципиенты. Местный состав может включать соединения для повышения абсорбции или проникновения активного ингредиента через кожу или другие пораженные области, такие как диметилсульфоксид и родственные аналоги. Фармацевтическая композиция также может быть доставлена локально с использованием трансдермального устройства, такого как пластырь, который может включать композицию в пригодной системе растворителей с адгезивной системой, такой как акриловая эмульсия, и сложно-полиэфирный пластырь. Стерильные композиции могут быть доставлены посредством глазных капель или другого способа местной доставки в глаз. Стерильные, апирогенные композиции могут быть доставлены интраокулярно в любую область глаза, включая, например, полость стекловидного тела, переднюю камеру и т.д. Стерильные, апирогенные композиции могут быть доставлены интравитреально, как это обычно делают интравитреальными инъекциями Луцентиса (ранибизумаб), Авастина (бевацизумаб), триамцинолона ацетонида, антибиотиков и т.д. Композиции могут быть доставлены перокулярно (например, в ткань вокруг глазного яблока (globe), но в пределах костной орбиты). Композиции могут быть доставлены посредством внутриглазного имплантата (например, ганцикловир имплантат, флуооцинолон имплантат и т.д.). При доставке внутриглазного имплантата устройства, содержащие композиции настоящего изобретения, имплантируют хирургически (например, в полость стекловидного тела), и лекарственный препарат высвобождается в глаз (например, с заданной скоростью). Композиции можно вводить с использованием технологии клеточной инкапсуляции (например, посредством Neurotech), при которой конструируют генетически модифицированные клетки для получения и секреции композиции, содержащей полипептид соединения I. Композиции могут быть доставлены посредством транссклеральной доставки лекарственного препарата с использованием устройства, пришитого или расположенного рядом с глазным яблоком, из которого может медленно элюировать лекарственный препарат.

рат, который может затем диффундировать в глаз.

Некоторые варианты осуществления относятся к композиции, наборам, системам и/или способам защиты, ингибирования, блонирования и/или уменьшения смерти фоторецепторных RPE-клеток или ганглионарных клеток сетчатки. Некоторые варианты осуществления относятся к ингибированию апоптоза фоторецепторов. Некоторые варианты осуществления относятся к ингибированию апоптоза в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза. Некоторые варианты осуществления относятся к ингибированию апоптоза в ганглионарных клетках сетчатки глаза. В некоторых вариантах осуществления смерть и/или апоптоз фоторецепторов, и/или апоптоз клеток пигментного эпителия сетчатки, и/или апоптоз и/или смерть ганглионарных клеток сетчатки вызваны отслойкой сетчатки, возрастной макулярной дегенерацией, глаукомой, травмой, раком, опухолью, воспалением, увеитом, диабетом, врожденной дегенерацией сетчатки и/или заболеванием, поражающим фоторецепторные клетки, аномальный пигментный эпителий сетчатки или ганглии сетчатки.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение улучшает жизнеспособность фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки и/или ингибирует смерть фоторецепторов (например, во время отслойки сетчатки и/или являющейся патологическим состоянием глаз, которое не действует отслойку сетчатки).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение находит применение в улучшении жизнеспособности фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки и/или ингибировании смерти фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки при ряде патологических состояний и/или заболеваний, включая, но без ограничения, макулярную дегенерацию (например, сухую, влажную, неэкссудативную или экссудативную/неоваскулярную), опухоли глаз, глаукому, врожденную дегенерацию сетчатки (например, пигментный ретинит, дегенерацию желтого пятна Штаргардта, синдром Ушера и т.д.), воспалительное заболевание (например, увеит), инфекцию глаз (например, бактериальную, грибковую, вирусную), аутоиммунный ретинит (например, запускаемый инфекцией), травму, диабетическую ретинопатию, хориоидальную неоваскуляризацию, ишемию сетчатки, окклюзионное заболевание сосудов сетчатки (например, окклюзия ветви вены сетчатки, окклюзия центральной вены сетчатки, окклюзия ветви артерии сетчатки, окклюзия центральной артерии сетчатки и т.д.), патологическую миопию, ангиоидные полосы сетчатки, макулярный отек (например, любой этиологии), центральную серозную хориоретинопатию.

Некоторые варианты осуществления относятся к введению композиции для ингибирования смерти фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки (например, апоптоза). В некоторых вариантах осуществления композиция содержит фармацевтический препарат, небольшую молекулу, пептид, нуклеиновую кислоту, молекулярный комплекс и т.д. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предоставляет введение полипептида, защищающего фоторецепторные, RPE или ганглионарные клетки сетчатки, для ингибирования апоптоза фоторецепторных, или RPE, или ганглионарных клеток сетчатки.

Некоторые варианты осуществления относятся к способу использования полипептида для ослабления активизации одного или более членов суперсемейства TNFR, желательны Fas или TRAIL в фоторецепторах и/или сетчатке. В некоторых вариантах осуществления такой способ используют, например, для ингибирования смерти клеток (например, апоптоза) в клетках и тканей, и его можно использовать *in vivo*, *ex vivo* или *in vitro*. Таким образом, соединение I можно применять для ослабления смерти клеток (например, смерти клеток сетчатки) в соответствии с такими способами. Для использования *in vitro* соединение I может быть предоставлено клеткам, обычно популяции клеток (например, в подходящем препарате, таком как буферный раствор) в количестве и в течение периода времени, достаточного для ингибирования апоптоза в клетках или для ингибирования воспаления. При необходимости можно наблюдать контролируемую популяцию, необработанную полипептидом изобретения, чтобы подтвердить влияние полипептида изобретения на уменьшение ингибирования гибели клеток или воспаления в подобной популяции клеток.

В некоторых вариантах осуществления в данном документе предоставлены способы лечения ряда заболеваний или патологических состояний глаз (например, сетчатки) или предотвращения смерти клеток сетчатки в результате заболеваний или патологических состояний глаз, включая следующие: глаукому, макулопатии/дегенерацию сетчатки, такую как макулярная дегенерация, включая возрастную макулярную дегенерацию (AMD), такую как неэкссудативная возрастная макулярная дегенерация и экссудативная возрастная макулярная дегенерация; хориоидальную неоваскуляризацию; ретинопатию, включая диабетическую ретинопатию, острую и хроническую макулярную нейроретинопатию, центральную серозную хориоретинопатию; и макулярный отек, включая кистозный макулярный отек, и диабетический макулярный отек; увеит/ретинит/хориоидит, такой как острая мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, болезнь Бехчета, ретинохориоидопатию "выстрел дробью", инфекционные (сифилис, болезнь Лайма, туберкулез, токсоплазмоз), увеит, включая срединный увеит (парспланит) и передний увеит, мультифокальный хориоидит, синдром множественных переходящих белых точек (MEWDS), саркоидоз глаз, задний склерит, ползучий хориоидит, субретиальный фиброз, увеит-синдром и синдром Фогта-Коянаги-Харада; сосудистые заболевания/экссудативные заболевания, такие как окклюзионное

поражение артерии сетчатки, окклюзия центральной вены сетчатки, диссеминированная внутрисосудистая коагулопатия, окклюзия ветви вены сетчатки, гипертензивные изменения дна глаза, глазной ишемический синдром, артериальные микроаневризмы сетчатки, болезнь Коутса, парафовеальные телеангиэктазии, окклюзия вены полусферы сетчатки, папиллофлебит, окклюзия центральной артерии сетчатки, окклюзия ветви артерии сетчатки, поражение сонной артерии (CAD), ангиит по типу "замерзшей ветви", серповидно-клеточная ретинопатия и другие гемоглобинопатии, ангиоидные полосы сетчатки, семейная экссудативная витреоретинопатия, болезнь Илза, травматические/хирургические заболевания: симпатическая офтальмия, увеитическая болезнь сетчатки, отслойка сетчатки, травма, лазер, PDT, фотокоагуляция, гипоперфузия во время операции, лучевая ретинопатия, ретинопатия после трансплантации костного мозга; пролиферативные расстройства, такие как пролиферативная витреоретинопатия и эпиретинальная мембрана, пролиферативная диабетическая ретинопатия; инфекционные расстройства: гистоплазмоз глаз, токсокароз глаз, гистоплазмоз глаз синдром (OHS), эндофтальмит, токсоплазмоз, заболевания сетчатки, ассоциированные с ВИЧ-инфекцией, заболевание сосудистой оболочки глаза, ассоциированное с ВИЧ-инфекцией, увеитическая болезнь, ассоциированная с ВИЧ-инфекцией, вирусный ретинит, острый некроз сетчатки, прогрессирующий некроз наружных слоев сетчатки, грибковые заболевания сетчатки, сифилис глаз, туберкулез глаз, диффузный односторонний подострый нейроретинит и миаз; генетические расстройства, такие как пигментный ретинит, системные расстройства с ассоциированными дистрофиями сетчатки, врожденная стационарная ночная слепота, колбочковые дистрофии, дегенерация желтого пятна Штаргардта и желтопятнистая абитрофия сетчатки, болезнь Веста, узорчатая дистрофия пигментного эпителия сетчатки, X-сцепленный ретиношизис, дистрофия глазного дна Сорсби, доброкачественная концентрическая макулопатия, кристаллическая дистрофия Биетти, эластическая псевдоксантома. Разрывы/перфорации сетчатки: отслойка сетчатки, макулярная перфорация, гигантский разрыв сетчатки; опухоли, такие как заболевание сетчатки, ассоциированное с опухолями, врожденная гипертрофия RPE, задняя увеальная меланома, хориоидальная гемангиома, хориоидальная остеома, хориоидальный метастаз, комбинированная гамартома сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, ретинобластома, вазопротрофирующие опухоли глазного дна, астроциты сетчатки, внутриглазные лимфоидные опухоли, и другие заболевания и патологические состояния, такие как точечная внутренняя хориопатия, острая задняя мультифокальная плакоидная пигментная эпителиопатия, миопическая дегенерация сетчатки, острый ретинальный пигментный эпителиит, дистрофии или дисплазии роговицы и т.п.

Некоторые варианты осуществления предоставляют способы увеличения выживаемости фоторецепторных, RPE или ганглионарных клеток сетчатки, включающие введение фармацевтической композиции, содержащей соединение I или его фармацевтически приемлемую соль. Фармацевтическое соединение можно вводить в форме композиции, которая составлена с фармацевтически приемлемым носителем и необязательными эксципиентами, адъювантами и т.д. в соответствии с обширной фармацевтической практикой. Композиция может находиться в виде твердой, полутвердой или жидкой лекарственной формы: такой как порошок, раствор, эликсир, сироп, суспензия, крем, капли, паста и спрей. Как известно специалистам в данной области, в зависимости от выбранного пути введения (например, глазные капли, инъекция и т.д.), определяется форма композиции. В целом, предпочтительно использовать стерильную стандартную лекарственную форму ингибитора изобретения для достижения легкого и точного введения активного фармацевтического соединения. В целом, терапевтически эффективное фармацевтическое соединение присутствует в такой лекарственной форме на уровне концентрации, варьирующем от приблизительно 0,01 мас.% до приблизительно 1,0 мас.% от общей композиции: т.е. в количестве, достаточном для предоставления желаемой разовой дозы.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию можно вводить в однократной или многократных дозах. Конкретный путь введения, требования к продукту и схема приема будут определяться одним из навыков в соответствии с состоянием индивида, подлежащего лечению, и ответом указанного индивида на лечение. В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой стандартную лекарственную форму для введения больному, включающую фармацевтическое соединение и одно или более нетоксичных фармацевтически приемлемых носителей, адъювантов или несущих сред. Количество активного ингредиента, который можно сочетать с такими материалами для получения однократной лекарственной формы, будет варьировать в зависимости от ряда факторов, как указано выше. В качестве носителей, адъювантов и несущих сред в композиции изобретения можно использовать ряд материалов, которые доступны в фармацевтической области. Инъекционные препараты, такие как масляные растворы, суспензии или эмульсии, могут быть составлены, как известно в данной области, при необходимости с использованием пригодных диспергирующих или увлажняющих агентов и суспендирующих агентов. В стерильном инъекционном препарате можно использовать нетоксичный парентерально приемлемый разбавитель или растворитель, такой как стерильная апиrogenная вода или 1,3-бутандиол. Среди других приемлемых носителей и растворителей, которые можно использовать, имеются 5% декстроза для инъекций, раствор Рингера для инъекций и изотонический хлорид натрия для инъекций (как описано в USP/NF). В дополнение, в качестве растворителей или суспендирующих сред могут традиционно использоваться стерильные, фиксированные масла. С этой целью можно использовать любую смесь фиксированных масел, включая синтетические моно-, ди- или триглицериды. В приготовле-



нии инъекционных композиций также можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Имеется несколько возможных путей доставки лекарственного препарата в ткани глаза. Путь введения зависит от намеченной ткани. В некоторых вариантах осуществления пути введения могут представлять собой традиционные пути введения, такие как местные или системные. Местное введение, в основном в форме глазных капель, можно использовать для лечения расстройств, поражающих передний сегмент глаза. Введение также может происходить посредством прямой инъекции, например интравитреальной инъекции, которая заключается в инъекции лекарственного препарата раствора, непосредственно в стекловидное тело (VH) с использованием, например, иглы 30G. Также могут быть пригодны другие пути введения, например, с использованием носителей лекарственного препарата.

В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить окулярно (т.е. в глаз), например, с использованием методик, описанных в данном документе, и/или других методик (например, инъекции, местного введения и т.д.), известных специалистам в данной области (см., например, Janoria et al., Expert Opinion на Drug Delivery. July 2007, Vol. 4, No. 4, Pages 371-388; Ghate & Edelhauser. Expert Opin Drug Deliv. 2006 March; 3(2):275-87; Bourges et al., Adv Drug Deliv Rev. 2006 Nov. 15; 58 (11): 1182-202. Epub 2006 Sep. 22; Gomes Dos Santos et al., Curr Pharm Biotechnol. 2005 February; 6(1):7-15; включенные в данный документ посредством ссылки во всей их полноте).

В некоторых вариантах осуществления композицию можно вводить совместно с одним или более другими агентами для эффективной защиты фоторецепторов и/или ингибирования апоптоза.

В некоторых вариантах осуществления предоставлены наборы, включающие соединение I или его фармацевтические препараты. В некоторых вариантах осуществления наборы дополнительно предоставляют устройства, материалы, буферы, контроли, инструкции, контейнеры (например, флаконы, шприцы) и т.д. (например, для введения). Например, любая из вышеуказанных композиций и/или составов может быть упакована. Любая из вышеуказанных композиций и составов может быть распределена в предварительно заполненные шприцы. Композиция и обработка приводят к стерильному апирогенному продукту. Упаковка функционирует для сохранения стерильности продукта.

### Примеры

При разработке описанных вариантов осуществления проводились эксперименты для разработки биологически активной фармацевтического состава соединения I (например, для интравитреального введения). Защитные для фоторецепторов свойства соединения I исследовали *in vitro* и *in vivo* после введения доз растворов пептида в DMSO. Соединение I имеет плохую растворимость в воде при pH выше ~3 и высокую тенденцию к образованию гелей или осадков в водной среде. Из пропорционального регулирования эффективной дозы от крыс до людей в соответствии с объемом стекловидного тела внутри вида в качестве первоначальной цели определили целевую концентрацию, равную 10-20 мг/мл, при этом более желательной становится более низкая концентрация (0,5-2,0 мг/мл), поскольку тестирование продемонстрировало неожиданно превосходную мощность и действие описанных вариантов осуществления. (примеры 1-6).

Пример 1. Получение и тестирование соединения I.

Пептид соединения I (Пептид His-His-Ile-Tyr-Leu-Gly-Ala-Val-Asn-Tyr-Ile-Tyr-NH<sub>2</sub>; SEQ ID NO: 1) был синтезирован на Fmoc-Амид-AMS смоле посредством Fmoc-химии многочисленными поставщиками. Fmoc-защищенные аминокислоты были приобретены у GL Biochem. Реагенты для соединения и расщепления были приобретены у Aldrich. Растворители были приобретены у Fisher Scientific.

Пептидную цепь собирали на смоле путем повторного удаления защитной группы Fmoc и связывания защищенной аминокислоты. В качестве связывающего реагента использовали DIC и HOBT, а в качестве основания использовали NMM; в качестве реагента, снимающего Fmoc-группу, использовали 20% пиперидин в DMF. Для проверки эффективности связывания после каждого связывания проводили нингидриновый тест.

После последнего связывания смолу промывали и сушили, а пептид отщепляли от смолы посредством обработки смесью для расщепления (TFA/Tis/H<sub>2</sub>O/DOTA: 95/3/2/2). Пептид осаждали из холодного эфира и собирали путем фильтрования, получали 13 г сырого продукта с чистотой 46% (выход: 127%).

Для каждого из двух подготовительных циклов очистки приблизительно 4,4 г неочищенного пептида очищали с помощью 2-дюймовой полимерной колонки с буфером TFA (буфер А, 0,1% TFA в воде; буфер В, 100% ацетонитрил), полученные в результате фракции с чистотой >85% дополнительно очищали с помощью 2-дюймовой полимерной колонки с буфером TFA. Собранные фракции с чистотой >95% лиофилизировали для высушивания, и из 8,8 г неочищенного было получено 3,68 г материала в виде соли TFA с чистотой >95%. К 1,5 г пептида (TFA в качестве противоиона) добавляли достаточно водного раствора HCl для растворения пептида. Пептид в водном растворе HCl лиофилизировали для высушивания. Было получено 1,4 г итогового пептида в виде соли HCl с чистотой 97,0%. HPLC 15% ACN в воде 0,1% TFA, Venusil XBP-C18 4,6×250 мм 1,0 мл/мин; RT 17,79 мин. Массовый спектр APCI MH<sup>+</sup> 1461,5.

Микроанализ.

Обнаружено: C, 52,21; H, 6,49; N, 15,42; Cl, 6,73. KF, 3,75%. Рассчитано для C<sub>71</sub>H<sub>100</sub>N<sub>18</sub>O<sub>16</sub>·3HCl·3,4

H<sub>2</sub>O: C, 52,24; H, 6,59; N, 15,45; Cl, 6,52. KF, 3,75%. % Активного вещества=89,55%.

Позднее образцы пептида синтезировали все еще в виде трифторацетатной соли, но анионный обмен проводили с ацетатом, чтобы получить соединение I в виде его триацетатной соли.

Пример 2: Профиль pH-растворимости соединения I.

Соединение I получали в виде тригидрохлоридной соли, как описано в примере 1, и подвергали скринингу на растворимость в воде при различных pH путем проведения титрования pH в соответствии со следующим протоколом. В некоторых случаях Met-12 подвергали идентичной экспериментальной процедуре для определения его профиля pH-растворимости при тех же условиях. Многочисленные предварительные эксперименты не смогли найти каких-либо условий, при которых можно было бы удовлетворительным образом получить состав Met-12 преимущественно в водной среде при любом pH выше 2,7.

Соединение I (10 мг) растворяли в воде (270-900 мкл) в 2 мл прозрачной пластиковой центрифужной пробирке с интенсивным перемешиванием, чтобы получить раствор с pH~2,4. Во всех случаях пептид образует прозрачный раствор, предполагая растворимость при низком pH по меньшей мере 40 мг/мл. Этот раствор затем разбавляли подходящим количеством соразтворителя или другого эксципиента (сахара, поверхностно-активного вещества и т.д.) для получения чистого кислого раствора 10 мг соединения I в 900 мкл тестируемого раствора при комнатной температуре (22-23°C). Используя микрошприц, добавляли небольшие аликваты основного раствора (обычно гидроксид натрия 1,0 М или 0,1 М, но иногда другие основания при исследовании буферов). Между добавлениями раствор смешивали путем встряхивания, и раствор исследовали визуально на предмет различного типа осадков, мутности как наиболее вероятного признака микроосадков, и вязкости для выявления гелеобразования. Во всех этих точках наблюдения проводили измерения pH. В некоторых экспериментах титрование происходило от эндогенного низкого pH до pH 10, но более поздние титрования проходили с pH ненамного выше 7 или иногда даже ниже.

При титровании водного раствора соединения I гидроксидом натрия предположили немного лучшую растворимость, ограниченную pH, чем Met-12, с прозрачным подвижным раствором до pH 3,3, в отличие от pH 3,0 для Met-12. Однако, когда титрование проводили с использованием пяти буферных оснований, трис, гистидина, цитрата натрия, борагата натрия и фосфата натрия, вместо гидроксида натрия, вязкость и признаки агрегации обычно наблюдались в диапазоне pH 2,6-2,9. Образование фибрилл также наблюдалось при pH ниже 3 в одном или двух случаях. Исходя из этих экспериментов, создается впечатление, что соединение I не имеет профиль pH-растворимости в воде лучше, чем Met-12.

Пример 3. pH-зависимая растворимость соединения I в смеси соразтворителей.

pH-зависимую растворимость соединения I исследовали с использованием соразтворителей и добавок и сравнивали с растворимостью Met-12 при таких же условиях.

Эксперимент с 70% DMSO был схож с титрованием Met-12 с гелеобразованием при pH приблизительно 5,5, но в этом случае, возможно, из-за неспособности C-конца к ионизации, при более высоких pH гель повторно не растворялся.

70%-ный пропиленгликоль (PG) улучшал растворимость соединения I по сравнению с Met-12 без гелеобразования, возникающего до pH примерно 4,7 по сравнению с pH 3,2 для Met-12, и затем оставаясь гелем до pH 10. Это титрование повторяли с меньшими количествами PG (35, 10%), но ни один из них не улучшил профиль растворимости по сравнению с водой.

Растворы 70% PEG400 и 70% глицерина не выглядели полезными, также как ни одна из двух добавок сахара, 10% маннитол или 10% трегалоза.

Исходя из этих экспериментов, пришли к заключению, что пропиленгликоль может быть полезным соразтворителем при некоторых ограничивающих обстоятельствах для соединения I, но не для Met-12.

Пример 4. pH-зависимая растворимость соединения I в смеси неионных поверхностно-активных веществ.

Неожиданно некоторые исследуемые поверхностно-активные вещества обеспечивали значительное улучшение профиля pH-растворимости соединения I, тогда как ни одно из протестированных поверхностно-активных веществ не улучшило профиль pH-растворимости Met-12. Соединение I в присутствии 10% тилоксапола оставалось прозрачным и приемлемой вязкости, пока pH был выше 5,87. С 10%-ным полисорбатом 80 прозрачный раствор не становился существенно вязким, пока pH был выше 6,36. С 10%-ным полисорбатом 20 фибриллы наблюдались при pH 3,2, но с отсутствием признаков помутнения или гелеобразования, пока pH был 7,14. 10%-ный полоксамер 407 был несколько неоднозначным в отношении того, где может возникнуть нерастворимость, поскольку вторая фаза явно присутствовала в диапазоне pH 5-9, хотя раствор казался подвижным. Казалось, он состоял из очень крупных прозрачных глобул, образованных в растворе. Считается, что это искажение вследствие высокой концентрации полоксамера, поскольку 15%-ные растворы полоксамера полностью желируются при 27°C, тогда как 10%-ный полоксамер существенно не желируется при 25°C, но ряд добавок может либо повысить, либо понизить критическую температуру золь-геля, и при обычном измерении вязкости для гелеобразования не будет эффективно получаться первоначальный вид отдельной гель-фазы. Поэтому можно полагать, что в смеси не было утраты растворимости пептида, но большое количество полоксамера образовало две фазы

полоксамера, золь-фазу и гель-фазу. Повидон К30 образует вязкий раствор при pH 3,60, который образует гель при pH выше 4,0.

Затем дозу некоторых поверхностно-активных веществ уменьшали по отношению к количеству добавляемого поверхностно-активного вещества. Когда дозу полисорбата-20 уменьшали до 3 и 1% концентрации, образование фибрилл наблюдали при pH ниже 2,5, но в обоих случаях других признаков преципитации не наблюдалось, пока pH был 4,14 и 3,76 соответственно. Полоксамер 407 при 4% вызывал небольшое и неочевидное увеличение количества фибрилл при иницировании титрования, но пока pH был выше 6,2, других признаков преципитации не наблюдалось, а пока pH был выше 5,6 при 2% приводил к образованию прозрачного раствора. При 0,5% фибриллы выявляли в растворе, как только начинали титрование, но пока pH был выше 4,5, дополнительных признаков преципитации не наблюдалось.

Соединение I явно превосходило Met-12 в большинстве исследуемых поверхностно-активных веществ, в частности полисорбате 80, полоксамере 407 и тилоксаполе, при этом данные о полисорбате-20 несколько неоднозначны из-за наблюдаемого первоначального образования фибрилл, хотя было ясно, что большая часть соединения находилась в растворе при pH 3-6, в отличие от Met-12 в той же самой несущей среде. Вот почему растворимость соединения I наблюдали в смесях сорастворитель-поверхностно-активное вещество, начиная с высоких концентраций добавок, а затем при более низких концентрациях одной или обеих добавок, при дизайне эксперимента с малозаполненной матрицей.

Пример 5. Исследования растворимости соединения I в смеси неионное поверхностно-активное вещество/сорастворитель.

Комбинация 70% PG и 10% полисорбата 80 привела к прозрачному раствору, который стал вязким при pH 3,4 и желировался при pH 5,25, что не делало его лучше, чем 70% PG, и хуже, чем 10% PS-80.

С 70% PG, 3% PS вязкость появлялась при pH 4,6, но при pH 5,25 материал все еще представлял собой гель.

С 35% PG и 3% PS-80 фибриллы возникали в растворе при pH всего лишь 2,66, а агрегаты в растворе были видны при pH 3,48.

35% PG, 10% PS-80 не показали признаков фибрилл или агрегатов, и заметная вязкость наблюдалась при pH 4,05, а гелеобразование - при pH 5,71 (ниже самого 10% PS-80).

10% PG и 10% PS-80 привели к прозрачному раствору с низкой вязкостью к pH 4,94, а выше pH 5,13 материал начинал выпадать в осадок.

10% PG и 3% PS-80 привели к прозрачному раствору к pH 3,16, но некоторое осаждение возникало при pH 3,4.

Как утверждалось ранее, раствор в 10% полисорбате-20, похоже, давал прозрачные подвижные растворы все время до pH 7, но даже при низком pH были видны некоторые фибриллы, и с увеличением pH они имели тенденцию к увеличению количества.

Неожиданно комбинация 10% PG и 10% полисорбата-20 привела к хорошей растворимости с появлением заметной вязкости, воспроизводимо возникающей только выше pH 7, без всяких видимых указаний на осаждение. Однако оставленный на ночь раствор желировался, и pH падал приблизительно на 0,2 единицы. Легкое взбалтывание преобразовывало гель в жидкость, которую можно было инъецировать.

3% полисорбат-20 с 10% PG давали прозрачный подвижный раствор до pH 5,3, но уменьшение PS-20 до 1% давало фибриллы при pH ниже 3.

В составы 4, 2 и 0,5% полоксамера добавляли 10% PG. С составом 4% полоксамера, казалось, возникает небольшое улучшение, без фибрилл, видимых при низком pH, и прозрачном растворе по меньшей мере до pH 5,36. При 2% полоксамере с 10% PG также все было хорошо с прозрачным подвижным раствором до pH 5,74. Состав 0,5% полоксамера показал фибриллы в начале титрования и показал некоторую мутность при pH 3,45, но оставался с низкой вязкостью, пока pH был 6.

В составы 2, 1 и 0,5% полоксамера добавляли или не добавляли 3, 1% PG, и измеряли стабильность при pH 4,0, pH 5,5 и pH 7,0 после отстаивания в течение 3 дней при RT с использованием как визуальных, так и фильтрационных (см. следующий пример) анализов. Визуально, фибриллы наблюдались менее часто во вновь полученных образцах, причем их более вероятно наблюдать при наличии меньшего количества эксципиентов и при более высоком pH, тогда как все образцы с pH 7,0 изначально были мутными, и некоторые имели очевидное осаждение. Все образцы с pH 4,0 изначально не были мутными, показывая небольшую мутность только с 0,5% PX, 0% PG после выдерживания. В образцах с pH 5,5 наблюдали первоначальную небольшую мутность во всех образцах 0% PG и образцах 1% PG 0,5% PX, но после выдерживания только образец с самым низким эксципиентом (0,5% PX 0% PG) показал небольшую мутность. Пара этих образцов стала немного мутной при взбалтывании. Фильтрационный анализ продемонстрировал несколько иную ситуацию. В составах 2% полоксамера все три состава с pH 4 имели извлечение после фильтрации >98%, а при pH 5,5 извлечение составило >96%, а при pH 7,0 извлечение все также было 86-93%. В составах 1% PX при pH 4 извлечение после фильтрации составило 97-98%, а при pH 5,5 - 87-93%, но при pH 7 составило только 1-13%. В составах 0,5% PX извлечение после фильтрации при pH 4 составило 73-88%, при pH 5,5 - 12-43%, и при pH 7 после фильтрации восстановления не было ни в одном из трех образцов.

Из этих экспериментов было сделано заключение, что относительно низкие количества PG в каче-

стве соразворителя могут быть умеренно полезными с некоторыми поверхностно-активными веществами, но высокие концентрации были вредными, и прогнозируемость результатов этих составов является невысокой. В составах PX как количества имеющегося PX, так и pH составов являются более важными, чем уровни PG. Кроме того, визуальные показатели не обязательно согласуются с более надежным фильтрационным анализом, и наблюдение за фибриллами выглядело особенно некоррелируемым с количеством имеющегося фильтруемого лекарственного препарата.

Пример 6. Исследования растворимости неионного поверхностно-активного вещества с более низкой концентрацией соединения I.

Эксперименты эффективности *in vitro*, а позже *in vivo* продемонстрировали, что соединение I является более эффективным в диапазоне 3->10 раз в блокировании индуцированного FasL (или отсройкой сетчатки) апоптоза в фоторецепторных клетках. Эти неожиданные результаты позволяют понизить прогнозируемую дозу для человека до диапазона 25-200 мкг/глаз, что уменьшило максимальную требуемую концентрацию составленного лекарственного препарата до 2,0 мг/мл. Дополнительный набор экспериментов провели, чтобы найти оптимальные условия составления при этой концентрации, с некоторыми экспериментами, направленными даже на более низкие концентрации лекарственного препарата. В этой работе в качестве поверхностно-активного вещества рассматривали либо полоксамер 407, либо полисорбат-20. Как видимая мутность, так и визуальная оценка вязкости являются полезными скрининговыми наблюдениями, но как обсуждалось выше, обнаружено, что они не всегда показывают наличие агрегированного пептида, и в большей части последней работы оценивали растворимость посредством измерения количества лекарственного препарата, присутствующего в образце перед и после его пропускания через 0,2-микронную PVDF мембрану или PALL 25 мм 0,2 мкМ Ultipor Nylon 6,6 фильтр. Мутные или сильно вязкие растворы было в целом трудно или невозможно фильтровать, а когда их смогли отфильтровать, они часто давали очень низкое извлечение лекарственного препарата. Неожиданно некоторые подвижные прозрачные растворы также показали большие потери при фильтрации, поэтому удовлетворительные составы были определены как составы, которые давали >90% извлечение лекарственного препарата после фильтрации. Необходимо заметить, что все измерения растворимости соединений, наподобие соединения I, которые образуют фибриллы, могут измерять только кинетическую растворимость. Образование фибрилл при многих наборах условий может быть очень медленным, и можно измерять растворимость метастабильных растворов, когда истинная термодинамическая растворимость в отношении наиболее стабильной возможной формы фибрилл может занимать от дней до лет до полного достижения. Однако составы перед фильтрацией обычно выдерживают в течение 24-72 ч, для того чтобы избежать по меньшей мере быстрого осаждения после получения состава.

В начальном эксперименте рассматривались растворы соединения I 1 мг/мл в 3% PS-20/3% PG и 2% PX/2% PG при pH 4. Все они дали прозрачные растворы без потери API при фильтрации. В следующем эксперименте рассматривали 2 мг/мл в 2% PG и 0,1%, 0,25% и 0,5% PX, а также 0,5% PG и PX при pH ~3, pH 4, pH 5,5 и pH 7. Все растворы получились прозрачными и подвижными, кроме образца 0,1% PX с pH 7, который был немного мутным и несомненно подвижным, но который не обеспечивал извлечения при фильтровании. Извлечение при pH 5,5 составило только 78%, а при pH 4,0 - 92%. Более высокие количества PX привели к полному извлечению при pH 3 и 4,0, 93-97% при pH 5,3, и 88-92% при pH 7,0. 0,5% PX с высоким и низким PG были, по существу, идентичными, что указывает на то, что PG не очень важен в этой области многообразия составов.

Поскольку во время этих экспериментов иногда наблюдались довольно большие изменения pH при длительном отстаивании, аналогичный эксперимент с 2,0 мг/мл соединения I и 0,25% PX, 2% PG проводили при pH 3,4, 5,5 и 7, сравнивая в то же время самобуферизирующийся материал (соль HCl, разбавленная NaOH) с 10 mM гистидина, ацетатного и цитратного буферов с анализом посредством фильтрационного анализа. Ацетатный буфер оказался, по меньшей мере, хорошим самобуферизирующимся материалом при всех pH, гистидиновый буфер оказался немного хуже, а цитратный буфер оказался значительно хуже при всех трех из более высоких pH, с извлечением только 75% при pH 4 по сравнению с 91% для гистидинового буфера, 92% незабуференного и 97% для ацетатного буфера. Ацетатный буфер затем стандартизировали.

Для изучения действия обеспечивающих изотоничность агентов 10 mM забуференных ацетатом растворов с pH 4 и pH 5,5 при 2 мг/мл соединения I с 0,25% PX исследовали с 0,5% и 2% PG, 4,5% маннитолом, 2% глицерином и 0,8% водным хлоридом натрия. Все растворы дали извлечение 98-99% при pH 4,0 и извлечение 90-94% при pH 5,5, за исключением образцов хлорида натрия, которые при двух pH имели извлечение 89 и 79%. Все растворы были в диапазоне 230-310 мОсм/л кроме 0,5% PG, который был довольно гипотоничным. С использованием в качестве обеспечивающего изотоничность агента 10 mM ацетатного буфера и 4,5% маннитола, 2 мг/мл соединения I и pH 4,0 и 5,5 были рассмотрены состояния пяти поверхностно-активных веществ. Они представляли собой отсутствие поверхностно-активного вещества, 0,1% PS-20, 0,1% PS-20 плюс 0,25% PX, 0,25% PX и 0,4% PX. В отсутствии поверхностно-активного вещества было отфильтровано 0% при высоком pH и 23% при pH 4,0, а 0,4% PX и смесь 0,25% PX/0,1% PS-20 давали полное извлечение при pH 4,0 и 95 и 91% при pH 5,5 соответственно. 0,25% PX несколько уступал с извлечением 96 и 91% соответственно, а 0,1% PS, в свою очередь, несколько усту-

пал с 90 и 65% при pH 4 и 5,5 соответственно.

Как показал эксперимент по изотоничности, гидрохлорид может быть плохим для растворимости, эксперимент был проведен с использованием 2 мг/мл триацетатной соли соединения I. Из-за слабой кислотности уксусной кислоты pH, присущий этой соли при 2 мг/мл в воде, составил 3,4-3,6, но, несмотря на это, образцы растворяли в 10 mM уксусной кислоты, 4,5% маннитоле и 0,4, 0,5, 0,6, 0,8 и 1,0% PX или 0,4, 0,5, 0,75, 1,0 и 1,5% PS-20, и pH доводили до 4,0 или 5,5. Все образцы с неотрегулированным pH (3,4-3,6) показали извлечение >97% после фильтрации и >98% при pH 4. При pH 5,5 0,4 и 0,5% PX извлечение составляло 96%, а более высокие концентрации PX давали извлечение 98-99%, тогда как все составы PS-20 при этом pH давали извлечение 92-94%. Из этих экспериментов оптимизированный состав мог содержать меньше PX, чем аналогичный состав на основе PS-20, но PS-20 все-таки является приемлемым, и можно избежать некоторых потенциальных проблем PX, даже если брать при более высоких концентрациях.

Пример 7. Эффективность соединения I *in vitro*.

Клеточная культура.

Клеточная линия фоторецепторов 661W была великодушно предоставлена Muayyad Al-Ubaidi (Department of Cell Biology, University of Oklahoma Health Sciences Center, Oklahoma City, OK). Клеточная линия 661W представляет собой фоторецепторную линию, которая была immortalized за счет экспрессии антигена SV40-T при регулировании промотора человеческого интерфоторецепторного ретинолсвязывающего белка (IRBP) (Al-Ubaidi et al., J Cell Biol., 119(6): 1681-1687 (1992), включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). Клетки 661W экспрессируют маркеры фоторецепторов колбочек, включая синие и зеленые колбочковые пигменты, трансдуцин и колбочковый аррестин (Tan et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., (3):764-768 (2004), включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте), и могут подвергаться каспазоопосредованной смерти клеток (Kanan et al., Invest Ophthalmol Vis Sci., 48(1):40-51 (2007), включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

Клеточную линию 661W содержали в модифицированной Дульбекко среде Игла, содержащей 10% фетальную бычью сыворотку, 300 мг/л глутамина, 32 мг/л путресцина, 40 мкл/л β-меркаптоэтанола, 40 мкг/л гидрокортизон-21-гемисукцината и 40 мкг/л прогестерона. Среда также содержала пенициллин (90 ед./мл) и стрептомицин (0,09 мг/мл). Клетки выращивали при 37°C в увлажненной атмосфере из 5% CO<sub>2</sub> и 95% воздуха.

Анализ активности.

Активность каспазы-3, каспазы-8 и каспазы-9 измеряли с помощью наборов для колориметрического анализа расщепления тетрапептидов по инструкции производителя (BioVision, Mountain View, Calif). Общий (661W/сетчаточный) белок экстрагировали согласно ранее опубликованному протоколу (Zacks et al., IOVS, 44(3):1262-1267 (2003), включенный в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). 100 мкг общего (661W/сетчаточного) белка инкубировали с субстратами (LEHD-pNA) каспазы-3 (DEVD-pNA), каспазы-8 (IETD-pNA) или каспазы-9 при итоговой концентрации 200 мкМ в течение 60 мин. Поглощение измеряли при 405 нм в микропланшетном ридере (Spectra-MAX 190, Molecular Devices, Sunnyvale, Calif). В качестве отрицательного контроля, (661W/сетчаточный) белок инкубировали с аналитическим буфером без тетрапептида. Использовали второй отрицательный контроль, в котором с тетрапептидом инкубировали один аналитический буфер. В качестве положительного контроля очищенную каспазу-3, каспазу-8 или каспазу-9 инкубировали с одним тетрапептидом.

Предыдущие эксперименты, проводимые в процессе разработки настоящего изобретения, продемонстрировали, что передача Fas сигналов играет важную роль в активизации каспазы-8 и фоторецепторном апоптозе *in vivo*.

Клетки 661W обрабатывали FasL. Добавление FasL приводило к смерти клеток. Активность каспазы-8, измеренная в лизатах клеток 661W, увеличивалась с увеличением концентрации FasL, с пиком при дозе 500 нг/мл. Клетки 661W обрабатывали 500 нг/мл FasL, и уровни активности измеряли в разные моменты времени. Активность каспазы-8 значительно повышалась через 48 ч в клетках 661W, подвергнутых воздействию FasL. Активность каспазы-8 достоверно повышалась дозозависимым образом на 20-30% в разных циклах.

Систему анализов, описанную выше, использовали в качестве скрининговой системы *in vitro*, чтобы найти потенциальные ингибиторы пути Fas-индуцированной активизации каспазы-8. Когда в этом анализе клеток 661W тестировали (тригидрохлоридную соль) Met-12, было показано дозозависимое уменьшение FasL-индуцированной активизации каспазы-8 с максимумом при 10 мкМ, когда в зависимости от анализа активизация каспазы-8 уменьшается до 0-25% базового уровня. Эта активность очень зависит от состава, в котором доставляется пептид Met-12. Для этого анализа итоговый состав для Met-12 разводили в 1000 раз, а чтобы попасть в верхнюю часть кривой дозы, которая обычно составляет 100 мкМ, используются меньшие разведения. В этих обстоятельствах максимальную эффективность дозы наблюдали с неразбавленным раствором DMSO, который доставлял пептид Met-12 в виде прозрачной подвижной жидкости, когда явный pH значительно ниже 3,0. Когда испытывали составы на основе воды, даже когда не было визуального подтверждения осаждения или агрегирования перед добавлением материала в тес-

тируемые лунки, составы показали значительно меньшую эффективность дозы, причем максимальное ингибирование не достигалось до доз 50-100 мкМ.

Это дает веские основания предполагать, что независимо от итоговой физической формы в тестируемых лунках агрегирование в дозируемом растворе даже в этих клеточных анализах приводит к разновидностям со значительно менее доступным лекарственным препаратом, чем в истинных растворах, разводимых в точно таких же условиях, когда они предположительно обладают такой же присущей потенциальной растворимостью. Безусловно, наиболее вероятное объяснение этого состоит в том, что предварительно образованные не в растворах агрегаты являются кинетически и термодинамически достаточно стабильными, чтобы не распадаться в растворе с оптимальной скоростью на протяжении теста, тогда как растворы при разведении в тестируемых лунках либо не образуют агрегаты, либо, более вероятно, образуют другие агрегаты, которые растворяются более легко. Принципиальная причина различия агрегатов должна заключаться в том, что пептид имеет как минимум несколько менее концентрированный вид, когда он переходит из своего усиленного pH или соразтворителем растворимого вида в 99%-ную водную среду с pH 7,4. Однако, поскольку в тестируемых лунках эффективное перемешивание маловероятно, а в глазу невозможно и, как обсуждалось ниже, сольватирующиеся протоны (низкий pH) и низкомолекулярные растворители переходят к диффузии в воде значительно быстрее, чем гидрофобные и объемные пептиды, весьма вероятно, что эти пептиды быстро создают агрегаты либо в тестируемых лунках, либо жидкой части стекловидного тела немедленно после введения дозы. Таким образом, хотя введение дозы раствора явно превосходит введение дозы суспензии/геля, нет никакой гарантии, что при введении он не будет изолировать много пептидов в виде нерастворимых агрегатов и стохастическим образом снижать эффективную концентрацию лекарственного препарата.

Неожиданно, как показано на фиг. 1, когда в этом анализе тригидрохлорид соединения I тестировали в виде незабуференного раствора в DMSO в сравнении с Met-12 (также тригидрохлорида в DMSO), было доказано, что он в 10 раз является более сильным, чем Met-12 при определении  $IC_{50}$ , и приблизительно в 3 раза более сильным при измерении концентрации, которая давала максимальное ингибирование FasL-индуцированной активизации каспазы-8.  $EC_{50}$  составила 0,4 мкМ, тогда как  $EC_{50}$  для самого Met-12 составила 4 мкМ, и максимальное ингибирование наблюдали при 3 мкМ. Однако выше 3 мкМ соединение I показало U-образную кривую, а выше 30 мкМ, похоже, было почти неактивным. В отличие от этого Met-12, дозируемый таким же образом, достигает своей (немного большей) максимальной эффективности при 10 мкМ, а затем к 100 мкМ имеет только небольшую обратную потерю эффективности (см. фиг. 1; активность каспазы-8 спустя 48 ч после обработки человеческим рекомбинантным FasL после предварительной обработки Met-12 и соединением I). Уровень активности каспазы-8 необработанного контроля составляет 0%. Активность каспазы-8 контроля с обработкой только FasL устанавливают как 100%.

Так как в механизм действия FasL вовлечена тримеризация трехвалентного лиганда Fas-рецептора, очень трудно увидеть, как одновалентные производные Met-12 могли бы иметь кривые доз смешанного агониста-антагониста, и можно полагать, что потеря эффективности объясняется искажением растворимости анализа. Однако неожиданное увеличение эффективности дозы соединения I должно позволить давать более низкое количество лекарственного препарата, чем требуется для самого Met-12, что, в свою очередь, уменьшает требования растворимости для состава пептида для интравитреальной инъекции.

Данные, показанные на фиг. 2, согласуются с объяснением выше. Она снова демонстрирует, что тригидрохлорид соединения I в DMSO (20 мг/мл) является немного более сильной дозой, чем Met-12, но что он снова становится неактивным при более высокой концентрации. В отличие от этого, если приготовить в концентрации 10 мг/мл в прозрачном фильтруемом предположительно мицеллярном растворе 2% полисорбата-20 и 2% PG при pH 4, тригидрохлорид соединения I представляет собой значительно более сильную дозу, но также более эффективную, чем Met-12 или соединение I в DMSO. Кроме того, имеется очень небольшая потеря максимальной эффективности на пике дозы 30 мкМ, протестированной в этом анализе. Этот неожиданный результат демонстрирует, что возможность получения состава соединения I в поверхностно-активных веществах может приводить к большому повышению эффективности лекарственного препарата.

Фиг. 3 сравнивает раствор DMSO 20 мг/мл с двумя полисорбатными составами тригидрохлорида соединения I, содержащими 1% и 3% PS-20 и 3% PG при pH 4 со всеми в концентрации 10 мг/мл. Все 3 демонстрируют в этом случае одинаковую эффективность при более низких концентрациях, но 1% PS-20 демонстрирует только слабую потерю активности от своей наиболее сильной концентрации 3 мкМ, все время до 30 мкМ, тогда как 3% PS демонстрирует продолжающееся увеличение активности все время до 30 мкМ, верхней протестированной дозы.

На фиг. 4 оптимизированные составы тригидрохлорида соединения I при 2 мг/мл в 10 мМ ацетатном буфере с pH 4, 4,5% маннитоле и 0,4% PS-20 (темные треугольники) сравниваются с 20 мг/мл тригидрохлорида соединения I в DMSO (светлые кружки) в клетках 661W. Тригидрохлорид в DMSO демонстрирует обычную U-образную кривую с максимальным результатом при 3 мкМ и существенным отступлением при более высоких концентрациях. Состав можно было протестировать только до 10 мкМ вследствие ее низких концентраций, но он демонстрирует эффективность, аналогичную раствору DMSO.

Вероятное объяснение большей эффективности, наблюдаемой для мицеллярных составов, состоит в том, что растворимость пептида сохраняется в течение более долгого периода времени за счет предрасположенности поверхностно-активного вещества к самосборке, на которую разведение и диспергирование влияет очень медленно, в резком противоречии с градиентами pH или низкомолекулярными сорастворителями. Таким образом, мицеллы и пептид более широко диспергируют в водную среду перед высвобождением пептида в водную среду, потому что мицеллы очень медленно распадаются, тогда как в сорастворителе или сильно кислом растворе фактором солюбилизации (ионы водорода, низкомолекулярные) является очень быстрое вымывание в водную среду перед тем, как пептид получает какую-либо реальную возможность дисперсии за пределы зон, в которые его непосредственно помещает инъекция. Это будет вызывать менее эффективную дисперсию пептида из составов раствора и образование более неактивных агрегатов, чем из мицеллярного состава.

Пример 8: Интравитреальное глазное фармакокинетическое исследование на кролике с соединением I.

Это исследование провели для определения концентраций соединения I в стекловидном теле (VH) и ткани сетчатки после интравитреальных инъекций самцам кроликов Dutch Belted. Концентрации определяли в тканях на 24, 72, 168 и 240 ч после введения 50 мкл билатеральной интравитреальной (IVT) дозы.

Дизайн исследования изложен в табл. 1.

Таблица 1

Дизайн исследования

Группа	Состав	Доза и Путь введения	Конечные моменты времени (кровь и ткани глаза)	Собран ные образцы	Проанализи рованы образцы
1 (n=8)	2 мг/мл триацетата Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	50 мкл/ггл аз 0,1 мг/гла з IVT	24, 72, 168, и 240 часов после введения дозы (n=2/момент времени)	Стекло видное тело и сетчат ка	Стекл овидн ое тело и сетча тка
2 (n=8)	0,5 мг/мл триацетата Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	50 мкл/ггл аз 0,025 мг/гла з IVT	24, 72, 168 и 240 часов после введения дозы (n=2/момент времени)	Стекло видное тело и сетчат ка	Стекл овидн ое тело и сетча тка
3 (n=8)	0,5 мг/мл триацетата Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,1% полоксамере 407, pH 4,5	50 мкл/ггл аз 0,025 мг/гла з IVT	24, 72, 168 и 240 часов после введения дозы (n=2/момент времени)	Стекло видное тело и сетчат ка	Стекл овидн ое тело и сетча тка
4 (n=8)	1 мг/мл триацетата Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полисорбате-20, pH	50 мкл/ггл аз 0,05 мг/гла з IVT	24, 72, 168 и 240 часов после введения дозы (n=2/момент времени)	Стекло видное тело и сетчат ка	Стекл овидн ое тело и сетча тка
	4,5		времени)		тка

Тестовая система содержала следующее:

Вид/Порода/Пол:	Самцы кроликов Dutch Belted
Поставщик:	Covance Research Products, Inc.
Возрастной диапазон:	4-5 месяцев
Вес при получении	
(Диапазон весов):	1,51-1,85 кг
Путь введения:	Интравитреальная (IVT) инъекция
Продолжительность	
Лечения:	Разовая доза в глаз
Концентрации	2,0, 1,0 и 0,5 мг/мл триацетата
состава:	Соединения I
Объем дозы:	50 мкл в глаз

Дозу интравитреальной (IVT) инъекции в глаз 50 мкл вводили в глазное яблоко каждого из глаз кролика Dutch Belted.

В соответствующие моменты времени кроликов усыпляли с помощью внутривенной избыточной дозы барбитурата, глаза подвергали энуклеации и быстро замораживали. У всех животных собирали стекловидное тело и сетчатку и анализировали на соединение I посредством LC-MS/MS.

Расчеты.

Процентный коэффициент вариации: использовали в качестве оценки точности.

Процентный коэффициент вариации (%CV)=(Стандартное отклонение/среднее значение)×100

Квадратический анализ методом наименьших квадратов: построение стандартной кривой осуществляли с использованием квадратного уравнения со взвешиванием  $1/x^2$

$$y=ax^2+bx+c$$

где y - отношение площади пиков калибровочных стандартов к внутреннему стандарту;

x - концентрация калибровочных стандартов;

a - квадратичный коэффициент  $x^2$ ;

b - квадратичный коэффициент x;

c - константа в виде отрезка, отсекаемого на оси y калибровочной кривой.

Квадратичная концентрация аналита: концентрация аналита рассчитывается с использованием параметров калибровочных кривых, рассчитанных выше и затем решения для значения x.

Результаты.

Концентрации в сетчатке и VH находятся в табл. 2 и 3 ниже и графически представлены на фиг. 1 и 2. Фармакокинетические параметры рассчитывали при необходимости и кратко изложены в табл. 4 и 5 ниже.

Таблица 2

Концентрации соединения I в сетчатке Dutch Belted

Группа	Образец ID	Момент времени	Глаз	Масса сетчатки (г)	Количество добавленного разбавителя (мкл)	Общий Объем (мкл)	Рассчитанная концентрация (нг/мл)	Рассчитанная концентрация (нг/г)	среднее	SD	%CV
1	A	24 ч	OD	0,04327	173	216	62,0	309	596	872	146
			OS	0,04312	172	215	<LLOQ	<LLOQ			
			OD	0,06310	252	315	378	1890			
			OS	0,05021	201	251	36,7	183			
	B	72 ч	OD	0,04984	199	249	25300	126000	1630	1500	92,0
			OS	0,04052	162	203	224	1120			
			OD	0,04274	171	214	664	3320			
			OS	0,04199	168	210	89,3	447			
	A	168 ч	OD	0,04319	173	216	103	515	354	332	93,8
			OS	0,04484	179	224	<LLOQ	<LLOQ			
			OD	0,04184	167	209	147	734			
			OS	0,03689	148	185	33,5	168			
	B	240 ч	OD	0,03929	157	196	112	559	490	114	23,3
			OS	0,04716	189	236	82,2	411			
			OD	0,04788	192	240	122	612			
			OS	0,05603	224	280	75,2	376			
2	A	24 ч	OD	0,03837	153	191	56,8	283	169	121	71,6



			OS	0,03881	155	194	35,4	177			
			OD	0,03939	158	197	43,2	216			
			OS	0,04028	161	201	<LLOQ	<LLOQ			
		A	72 ч	OD	0,04784	191	239	63,6	318	223	173
				OS	0,04461	178	223	<LLOQ	<LLOQ		77,6
		B		OD	0,03850	154	193	36,0	180		
				OS	0,03466	139	174	78,6	395		
		A	168 ч	OD	0,04639	186	232	503	2520	912	1070
				OS	0,04044	162	202	56,7	283		117
		B		OD	0,05231	209	261	82,2	410		
				OS	0,04112	164	205	87,4	436		
		A	240 ч	OD	0,04847	194	242	66,8	334	631	329
				OS	0,04503	180	225	212	1060		52,1
		B		OD	0,04467	179	224	142	712		
				OS	0,04772	191	239	83,4	418		
3		A	24 ч	OD	0,04893	196	245	24,8	124	929	1450
				OS	0,04561	182	228	621	3100		156
		B		OD	0,05029	201	251	28,0	140		
				OS	0,04463	179	224	69,8	350		
		A	72 ч	OD	0,04474	179	224	33,0	165	68,0	82,0
				OS	0,04508	180	225	<LLOQ	<LLOQ		121
		B		OD	0,04974	199	249	21,3	107		
				OS	0,04698	188	235	<LLOQ	<LLOQ		
		A	168 ч	OD	0,04188	168	210	832	4170	1440	1890
				OS	0,03783	151	189	<LLOQ	<LLOQ		131
		B		OD	0,03577	143	179	74,3	372		
				OS	0,04405	176	220	247	1230		
		A	240 ч	OD	0,03215	129	161	104	521	192	248
				OS	0,04526	181	226	<LLOQ	<LLOQ		129
		B		OD	0,03895	156	195	49,6	248		
				OS	0,05110	204	255	<LLOQ	<LLOQ		
4		A	24 ч	OD	0,04033	161	201	32,1	160	206	237
				OS	0,04551	182	228	109	546		115
		B		OD	0,03931	157	196	23,6	118		
				OS	0,04407	176	220	<LLOQ	<LLOQ		
		A	72 ч	OD	0,04616	185	231	<LLOQ	<LLOQ	95,0	111
				OS	0,04115	165	206	34,4	172		117
		B		OD	0,04900	196	245	41,5	208		
				OS	0,04991	200	250	<LLOQ	<LLOQ		
		A	168 ч	OD	0,03554	142	178	<LLOQ	<LLOQ	51,0	ISD
				OS	0,03511	140	175	41,0	204		ISD
		B		OD	0,05409	216	270	<LLOQ	<LLOQ		
				OS	0,04863	195	244	<LLOQ	<LLOQ		
		A	240 ч	OD	0,04413	177	221	<LLOQ	<LLOQ	27,3	ISD
				OS	0,04205	168	210	<LLOQ	<LLOQ		ISD
		B		OD	0,04442	178	222	<LLOQ	<LLOQ		
				OS	0,05194	208	260	21,7	109		

LLOQ=20,0 нг/мл или 100 нг/г;

значения <LLOQ использовать 0 для статистического определения;

ISD - неполные данные для определения;

подчеркнуто: превышения верхней границы количественного значения и статистического выброса, данные исключены.

Таблица 3

## Концентрации соединения I в стекловидном теле Dutch Belted

Группа	Образец ID	Момент времени	Глаз	Рассчитанная концентрация (нг/мл)	Масса стекловидного тела (г) *	Рассчитанная концентрация (мкг/глаз)	Среднее (мкг/глаз)	SD	%CV
1	A	24 ч	OD	104000	1,05875	110	106	8,05	7,59
			OS	105000	1,09135	115			
			OD	78800	1,27841	101			
			OS	75900	1,28441	97,5			
	A	72 ч	OD	125000	0,71978	90,0	90,4	8,07	8,93
			OS	104000	0,76824	79,9			
			OD	97700	0,94602	92,4			
			OS	106000	0,93764	99,4			
	A	168 ч	OD	84800	1,16490	98,8	103	5,82	5,65
			OS	81500	1,18636	96,7			
			OD	92600	1,17384	109			
			OS	88500	1,20263	106			

	A	240 ч	OD	79400	1,17233	93,1	84,2	14,9	17,7		
	B		OS	87500	1,12218	98,2					
			OD	52900	1,22366	64,7					
			OS	65300	1,23536	80,7					
2	A	24 ч	OD	22000	0,84743	18,6	22,9	2,86	12,5		
	B		OS	20400	1,19418	24,4					
			OD	21200	1,15341	24,5					
			OS	21700	1,10663	24,0					
	A	72 ч	OD	21300	1,09577	23,3	23,6	0,379	1,61		
	B		OS	1900	1,12046	<u>2,13</u>					
			OD	20000	1,16980	23,4					
			OS	20600	1,16716	24,0					
	A	168 ч	OD	22300	1,12460	25,1	23,0	1,50	6,52		
	B		OS	20500	1,05482	21,6					
			OD	21600	1,05841	22,9					
			OS	18400	1,21646	22,4					
	A	240 ч	OD	18000	1,17848	21,2	19,5	1,28	6,56		
	B		OS	15100	1,28698	19,4					
			OD	14800	1,22182	18,1					
			OS	16000	1,20828	19,3					
	3	A	24 ч	OD	24500	1,21473	29,8	26,0	2,73	10,5	
		B		OS	20300	1,18169	24,0				
				OD	21100	1,23315	26,0				
		A	72 ч	OS	19300	1,24396	24,0	22,8	0,814	3,57	
B				OD	214	1,19559	<u>0,256</u>				
				OS	18900	1,22604	23,2				
				OD	21000	1,11298	23,4				
A		168 ч	OS	18900	1,15681	21,9	25,5	1,98	7,76		
			B	OD	21900	1,09436				24,0	
				OS	26100	1,08970				28,4	
				OD	20700	1,18375				24,5	
A		240 ч	OS	21300	1,18491	25,2	20,4	1,13	5,54		
			B	OD	16700	1,18857				19,8	
				OS	18200	1,19607				21,8	
				OD	16200	1,18248				19,2	
4		A	24 ч	OS	16700	1,23788	20,7	46,8	2,55	5,45	
				B	OD	44000	1,08887				47,9
					OS	40000	1,08052				43,2
					OD	38500	1,21775				46,9
	A	72 ч	OS	41600	1,17967	49,1	32,5	10,2	31,4		
			B	OD	39600	1,10963				43,9	
				OS	33500	1,14187				38,3	
				OD	23100	1,02867				23,8	
	A	168 ч	OS	21700	1,09956	23,9	25,6	1,12	4,38		
			B	OD	25900	1,04704				27,1	
				OS	21000	1,22612				25,7	
				OD	19900	1,22735				24,4	
	B	240 ч	OS	20000	1,26320	25,3	19,4	ISD	ISD		
			OD	19800	1,10090	21,8					
	A		OS	158	1,12301	<u>0,177</u>					
			OD	12500	1,35282	16,9					
	B		OS	177	1,38049	<u>0,244</u>					
			OD	19900	1,22735	24,4					
			OS	20000	1,26320	25,3					
			OD	19800	1,10090	21,8					

LLOQ=50,0 нг/мл;

\* - принятая плотность 1,00 г/мл;

подчеркнуто: предполагаемый статистический выброс, данные не включены в статистику;

ISD - неполные данные для определения;

курсив: результат превышения верхней границы количественного значения, оценочные данные.

Результаты этого исследования как в сетчатке, так и в стекловидном теле показаны на фиг. 5 (А+В) и фиг. 6 (А+В) соответственно. Концентрации соединения I в сетчатке были переменными с коэффициентом изменчивости (%CV), варьирующим от 52 до 156% на протяжении времени исследования для всех групп.  $T_{max}$  сетчатки отмечали через 72 (3 дня) или 168 (7 дней) часов после введения для трех составов с полноксимером, но оно не было дозозависимым, в то время как  $T_{max}$  сетчатки для состава с полисорбатом составило 24 ч после введения.  $AUC_{0-last}$  сетчатки следовало за аналогичным шаблоном переменных в виде  $C_{max}$ .  $T_{1/2}$  сетчатки для соединения I могло быть рассчитано только для данных сетчатки с 2 мг/мл полноксимера (168 ч) и 1 мг/мл полисорбата (199 ч).

Анализ стекловидного тела для соединения I показал, что концентрация была относительно последовательной в каждый момент времени для составов с полноксимером. При нормировании по весу собранного VH рассчитывали теоретический итог соединения I. Общее количество соединения I, инъекциро-

ванного в каждый глаз кролика, составило 100 мкг (2 мг/мл×50 мкл) или 25 мкг (0,5 мг/мл×50 мкл) для группы полксамеров и 50 мкг (1 мг/мл×50 мкл) для полисорбата. Наименьшая средняя концентрация для всех групп была на 10 день. Среднее соединение I, оставшееся в VH для группы 1 (100 мкг), колебалось от 84,2 до 106 мкг от 24 ч до 10 дней после IVT введения. Среднее соединение I, оставшееся в VH для группы 2 (25 мкг), колебалось от 19,5 до 23,0 мкг от 24 ч до 10 дней после IVT введения. Среднее соединение I, оставшееся в VH для группы 3 (25 мкг), колебалось от 26,0 до 20,4 мкг от 24 ч до 10 дней после IVT введения. Среднее соединение I, оставшееся в VH для группы 4 полисорбата (50 мкг), колебалось от максимума 46,8 мкг на 24 ч до 19,4 мкг на 10 день после IVT введения. Группой полисорбата был единственный состав с заметным уменьшением концентрации соединения I со временем. Также во всех группах существенные количества лекарственного препарата в неизменном виде были обнаружены через 10 дней после введения.

Расчет фармакокинетических параметров для соединения I в VH показал  $T_{max}$  24 или 72 ч после IVT введения с  $C_{max}$ , близко совпадающим с общим количеством лекарственного препарата, вводимого для каждой группы (табл. 4).  $AUC_{0-last}$  была почти пропорциональна дозе между группами полксамера, причем группа 1 (2 мг/мл) имеет приблизительно в четыре раза большую AUC, чем AUC групп 2 и 3 (обе по 0,5 мг/мл). Группа полисорбата (1 мг/мл) была менее дозозависима относительно групп полксамера, но это может быть легко объяснено, так как это была единственная группа, которая имела заметное уменьшение концентрации соединения I в VH в ходе исследования.  $T_{1/2}$  для группы полисорбата составило 183 ч с хорошим линейным приближением, тогда как  $t_{1/2}$  для групп полксамера составило >900 ч с менее оптимальным линейным приближением.

Таблица 4  
Фармакокинетические параметры для соединения I в стекловидном теле

Параметр	2 мг/мл полксамер а	0,5 мг/мл полксамер а	0,5 мг/мл извлеченно го полксамер а	1 мг/мл полисорбата
$T_{max}$ (ч)	24	72	24	24
$C_{max}$ (мкг/глаз)	106	23,6	26,0	46,8
Конечное $t_{1/2}$ (ч)	1028*	994*	911*	183
$AUC_{0-last}$ (мкг*ч/глаз)	22000	5150	5460	6870

\* $R^2 < 0,7$

Таблица 5  
Фармакокинетические параметры для соединения I в сетчатке

Параметр	2 мг/мл полксамера	0,5 мг/мл полксамера	0,5 мг/мл извлеченного полксамера	1 мг/мл полисорбата
$T_{max}$ (ч)	72	168	168	24
$C_{max}$ (нг/г)	1630	912	1924	275
Конечное $t_{1/2}$ (ч)	168	NC	NC	199
$AUC_{0-last}$ (нг*ч/г)	203000	129000	219000	44600

NC - не рассчитывали.

В заключение, соединение I при введении IVT в составах либо с полксамером, либо с полисорбатом не показало признаков раздражения или проблем с переносимостью в ходе 10-дневного исследования. Концентрация соединения I при введении IVT в виде состава с полксамером медленно уменьшается в течение периода вплоть до 10 дней, а вероятно дольше либо в сетчатке, либо в VH. Соединение I при введении в виде состава с полисорбатом продемонстрировало явное, хотя и медленное уменьшение концентрации за время проведения 10-дневного исследования, предполагая, что интравитреальная фармакокинетика может быть регулируемой в пределах определенных параметров за счет тщательного выбора используемых неионных поверхностно-активных веществ.

Пример 9. Глазное фармакокинетическое исследование на крысах с соединением I.

Это исследование провели для определения концентрации тригидрохлорида соединения I в тканях стекловидного тела и сетчатки после интравитреальных инъекций серым крысам. Концентрации определяли в тканях через 24 (группа 1) и 72 ч (группы 1 и 2) после введения 5 мкл билатеральной интравитреальной (IVT) дозы.

Дизайн исследования изложен в табл. 6.

Таблица 6

## Дизайн исследования

Группа	Состав	Доза и Путь введения	Конечная момент времени (кровь и ткани глаза)	Собранные образцы	Проанализированные образцы
1 (n=8)	0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	0,3 мкг/глаз IVT	24 и 72 часа после введения	Стекловидное	Стекловидное
2 (n=8)	0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	0,3 мкг/глаз IVT	72 часа после введения дозы. Сетчатки от 4 животных будут объединены в 2 образца через 72 часа.	Стекловидное тело и сетчатка	Стекловидное тело и сетчатка

Тестовая система содержала следующее:

Вид/Порода/Пол:	Крысы Norway Brown
Поставщик:	Charles River, Inc.
Возрастной диапазон:	1-2 месяца
Вес при получении	
(Диапазон весов):	165,9-181,2 г
Путь введения:	Интравитреальная (IVT) инъекция
Продолжительность	
Лечения:	Разовая доза в глаз
Концентрации состав:	0,06 мг/мл триацетата ONL-1204
Объем дозы:	5 мкл в глаз

Получение глазных тканей.

Крыс усыпляли с помощью внутривенной избыточной дозы барбитурата, глаза подвергали энуклеации и быстро замораживали. Стекловидное тело (VH) и сетчатку собирали у всех животных и анализировали на соединение I посредством LC-MS/MS.

Результаты.

Концентрации глазных тканей.

Концентрации тригидрохлорида соединения I в неизвестных образцах сетчатки и стекловидного тела крыс Brown Norway.

Таблица 7

## Концентрации соединения I в сетчатке крыс Brown Norway

Группа	Образец ID	Момент времени	Глаз	Масса сетчатки (г)	Количество добавленного разбавителя (мкл)	Общий Объем (мкл) <sup>1</sup>	Рассчитанная концентрация (нг/мл)	Рассчитанная концентрация (нг/г)	среднее (нг/г)	SD	%CV
1 0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамер 407, pH 4,5	A	24 ч	OD и OS	0,01584	63	79	34,6	173	1210	1670	138
	B		OD и OS	0,02249	90	112	736	3670			
	C		OD и OS	0,01744	70	87	29,2	146			
	D		OD и OS	0,01899	76	95	172	860			
	A	72 ч	OD и OS	0,01395	56	70	81,5	409	570	172	30,2
	B		OD и OS	0,01943	78	97	117	584			
	C		OD и OS	0,01514	61	76	96,0	482			
	D		OD и OS	0,01742	70	87	161	804			
2 0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 мМ уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	A-D	72 ч	Все объединены	0,06088	244	305	92,2	462	NA	NA	NA
	E-H	72 ч	Все объединены	0,04906	196	245	262	1310	NA	NA	NA

LLOQ=20,0 нг/мл или 100 нг/г;

значения <LLOQ использовать 0 для статистического определения;

примечание 1: 1,00 г/мл принято для сетчатки ткани крыс.

Таблица 8

## Концентрации соединения I в стекловидном теле крыс Brown Norway

Группа	Образец ID	Момент времени	Глаз	Рассчитанная концентрация (нг/мл)	Масса стекловидного тела (г) *	Рассчитанная концентрация (мкг/VH образец)	Среднее (мкг/VH образец)	SD	%CV
1 0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 mM уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	A	24 ч	OD и OS	1780	0,05314	0,0946	0,157	0,0568	36,2
	B		OD и OS	5210	0,03262	0,170			
	C		OD и OS	4360	0,05262	0,229			
	D		OD и OS	3620	0,03768	0,136			
	A	72 ч	OD и OS	1480	0,04818	0,0713	0,0994	0,0738	74,2
	B		OD и OS	3740	0,05013	0,187			
	C		OD и OS	306	0,04681	0,0143			
	D		OD и OS	2350	0,05314	0,125			
2 0,06 мг/мл Соединения I в 4,5% маннитоле, 10 mM уксусной кислоты, 0,4% полоксамере 407, pH 4,5	A	72 ч	OD и OS	3030	0,04931	0,149	0,127	0,0836	65,8
	B		OD и OS	453	0,05496	0,0249			
	C		OD и OS	3590	0,05423	0,195			
	D		OD и OS	3610	0,05280	0,191			
	E		OD и OS	2910	0,04381	0,127			
	F		OD и OS	4070	0,05832	0,237			
	G		OD и OS	69,0	0,02919	0,00201			
	H		OD и OS	4800	0,01807	0,0867			

LLOQ=50,0 нг/мл;

\* - принятая плотность 1,00 г/мл.

Гомогенизация ткани.

Инструкции по гомогенизации неизвестных образцов стекловидных тел (VH).

Для каждого неизвестного образца или контрольного образца VH: в гомогенизационную пробирку отвешивают VH. В гомогенизационную пробирку добавляют ACN:воду:1 М соляную кислоту (70:20:10, об./об./об.) (мкл) в 4 раза больше веса (мг) VH. Добавляют шарики из окиси циркония с размером 2,8 и 1,4 мм. Все образцы гомогенизируют на Precellys®: 5500 об/мин, циклы 3×30 с, и 20 с между циклами, при температуре между -10 и 0°C.

Инструкции по гомогенизации стандартных образцов глазной ткани сетчатки.

Для каждого стандартного образца сетчатки: в гомогенизационную пробирку отвешивают контрольную ткань сетчатки.

В гомогенизационную пробирку добавляют в 0,5 раза больше веса ткани (мг) рабочего калибровочного стандартного образца сетчатки (мкл).

В гомогенизационную пробирку добавляют ACN:воду:1 М соляную кислоту (70:20:10, об./об./об.) (мкл) в 3,5 раза больше веса ткани (мг).

Добавляют шарики из окиси циркония с размером 1,4 мм.

Все образцы гомогенизируют на Precellys®: 5500 об/мин, циклы 3×30 с и 20 с между циклами, при температуре между -10 и 0°C.

Инструкции по гомогенизации пустых контрольных образцов тканей сетчатки и неизвестных образцов.

Для каждого неизвестного или контрольного образца сетчатки: в гомогенизационную пробирку отвешивают ткань сетчатки.

В гомогенизационную пробирку добавляют ACN:воду:1 М соляную кислоту (70:20:10, об./об./об.) (мкл) в 4 раза больше веса ткани (мг).

Добавляют шарики из окиси циркония с размером 1,4 мм.

Все образцы гомогенизируют на Precellys®: 5500 об/мин, циклы 3×30 с, и 20 с между циклами, при температуре между -10 и 0°C.

Получение стандартных образцов, образцов и контрольных образцов.

Получение калибровочных маточных и рабочих стандартных образцов.

Маточный калибровочный стандартный образец получали в диметилсульфоксиде (DMSO) в концентрации 500 мкг/мл для ONL-1204.

Рабочие калибровочные стандартные образцы получали для стекловидного тела путем серийного разведения рабочего маточного раствора ACN:водой:1М соляной кислотой (70:20:10, об./об./об.) в диа-

пазоне от 500 до 200000 нг/мл ONL-1204.

Рабочие калибровочные стандартные образцы получали для сетчатки путем серийного разведения рабочего маточного раствора ацетонитрилом:водой:1М соляной кислотой (70:20:10) в диапазоне от 100 до 200000 нг/мл ONL-1204.

Получение стандартных образцов, неизвестных образцов и контрольных образцов и контрольных образцов с внутренним стандартным образцом для анализа стекловидного тела.

В полипропиленовой пробирке 10 мкл (20 мкл STD 11) рабочего калибровочного стандартного образца или маточного образца добавляли к 90 мкл (80 мкл STD 11) стекловидного тела контрольного образца. Для контрольных образцов и контрольных образцов с внутренним стандартным образцом добавляли 100 мкл контрольного образца бычьего стекловидного тела. К каждому стандартному или контрольному образцу добавляли 400 мкл ACN:воды:1М соляной кислоты (70:20:10, об./об./об.).

Затем аликвотами распределили 100 мкл каждого образца стекловидного тела с ACN:муравьиной кислотой (1000:1, об./об.). В каждый образец стекловидного тела добавляли 100 мкл DMSO:воды:муравьиной кислоты (50:40:10). Образцы подвергали вихревому перемешиванию, затем центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин (4°C). К 500 мкл супернатанта добавляли 100 мкл рабочего внутреннего стандартного раствора (50000 нг/мл API1887 в воде) (вода для контроля без внутреннего стандартного раствора) и 150 мкл воды. Затем образцы подвергали вихревому перемешиванию и переносили на планшет автодозатора для анализа.

Получение стандартных образцов, неизвестных образцов и контрольных образцов и контрольных образцов с внутренним стандартным образцом для анализа сетчатки.

В полипропиленовую пробирку добавляли 50 мкл неизвестного гомогената крыс Brown Norway, бычьего контрольного образца или калибровочного стандартного бычьего гомогената. В каждый образец добавляли 50 мкл DMSO:воды:муравьиной кислоты (50:40:10). Затем образцы подвергали вихревому перемешиванию и центрифугировали в течение 10 мин при 14000 об/мин (4°C). Затем 80 мкл супернатанта каждого образца распределили аликвотами в 96-луночный планшет автодозатора. Добавляли 40 мкл рабочего внутреннего стандартного раствора (5000 нг/мл API1887 в воде) (вода для контрольного раствора без внутреннего стандартного раствора) и 120 мкл воды. Затем образцы перемешивали многоканальной пипеткой и анализировали.

Расчеты.

Процентный коэффициент вариации: использовали в качестве оценки точности.

Процентный коэффициент вариации (%CV)=(Стандартное отклонение/среднее значение)×100

Квадратический анализ методом наименьших квадратов: построение стандартной кривой осуществляли с использованием квадратного уравнения с взвешиванием  $1/x^2$

$$y=ax^2+bx+c$$

где y - отношение площади пиков калибровочных стандартов к внутреннему стандарту;

x - концентрация калибровочных стандартов;

a - квадратичный коэффициент  $x^2$ ;

b - квадратичный коэффициент x;

c - константа в виде отрезка, отсекаемого на оси y калибровочной кривой.

Квадратичная концентрация аналита: концентрация аналита рассчитывается с использованием параметров калибровочных кривых, рассчитанных выше, а затем решения для значения x.

Анализ.

На фиг. 7 показаны глобально усредненные результаты. Для группы 1 оба глаза каждого животного объединили для единого анализа. В группе 2 для получения образцов объединили оба глаза от 4 животных. Концентрации для объединенной сетчатки в группе 2 составляли 462 и 1310 нг/г для образцов A-D и E-H соответственно. Анализ стекловидного тела на соединение I провели с использованием объединенных образцов из каждого глаза для каждого животного в группах 1 и 2. При нормировании собранных VH по весу рассчитывали теоретический итог соединения I. Общее количество соединения I, инъецированного в каждый глаз крысы, составило 0,3 мкг (0,06 мг/мл·5 мкл)). По причине различных путей, которыми собирали данные через 72 ч, стандартную ошибку не рассчитывали. Темные полосы представляют количество триацетата соединения I в стекловидном теле каждого глаза, при этом полоса t=0 представляет предназначенную дозу 300 нг, а светлые полосы представляют концентрацию соединения I в сетчатке, выраженную в нг/г. В первые 24 ч приблизительно половина лекарственного препарата выходила из VH, но конечный период полувыведения явно составлял порядка нескольких дней. Между тем концентрации в сетчатке через 24 ч были выше 1 мкг/г, и только приблизительно 40% через 72 ч. Это подтверждает то, что сетчатка крыс будет подвергаться воздействию лекарственного препарата с легко обнаруживаемыми количествами по меньшей мере в течение недели.

Концентрации соединения I в сетчатке колебались от 146 до 3670 нг/г для образцов группы 1 через 24 ч, и от 409 до 804 нг/г в образцах группы 1 через 72 ч. Среднее соединение I, оставшееся в VH для группы 1, составило 0,157 и 0,0994 мкг/образец в моменты времени 24 ч и 72 ч соответственно. Среднее соединение I, оставшееся в VH для образцов группы 2 через 72 ч, составило 0,127 мкг/образец. Данные

показывают, что существенные количества лекарственного препарата в неизменном виде остаются 72 ч после введения.

Пример 10 Эффективность соединения I *in vivo*.

Кратко, грызунам давали наркоз смеси 50:50 кетамина (100 мг/мл) и ксилазина (20 мг/мл), и зрачки расширяли фенилэфрином (2,5%) и тропикамидом (1%) местно. Для создания 2 мм склеротомии кзади от лимба использовали микровитреоретинальный нож 20 калибра (Walcott Scientific, Marmora, NJ), осторожно избегая повреждения хрусталика.

При прямой визуализации через операционный микроскоп субретинальный инъектор (Glaser, 32-gauge tip; BD Ophthalmic Systems, Sarasota, FL) вводили через склеротомический разрез в полость стекловидного тела, а затем через периферический ретиномический разрез - в субретинальное пространство. Для отслаивания нейросенсорной сетчатки от расположенного ниже пигментного эпителия сетчатки медленно инъецировали гиалуронат натрия (10 мг/мл).

Во всех экспериментах приблизительно отслаивалось от трети до половины надсосовой нейросенсорной сетчатки. У всех животных отслоения создавали в одном и том же месте, чтобы обеспечить прямое сравнение подсчета клеток сетчатки. Отслоения создавались в левом глазу, правый глаз оставляли в качестве контроля.

В некоторые глаза в качестве положительного контроля давали Met-12 дикого типа (HHYLGAV-NYIY, 5 мкг в DMSO) в виде его тригидрохлоридной соли, а в другие глаза тотчас после создания отслойки с использованием шприца Hamilton (Hamilton Company, Reno, NV) в субретинальное пространство в области отслойки в 5-мкл объеме инъецировали соединение I (0,5, 1,0, 5,0 или 10 мкг в DMSO) в виде его тригидрохлоридной соли или носитель (диметилсульфоксид [DMSO]).

Через три дня крыс умерщвляли, сетчатку иссекали, фиксировали, делали срезы и окрашивали для анализа TUNEL. В областях отслоенной сетчатки подсчитывали число апоптозных клеток. Каждый эксперимент включал 4 области из каждой из 4 секций, полученных из 5 или 6 сетчаток для каждой группы дозирования. Результаты показаны на фиг. 8.

Как показано на фиг. 8, контрольные отслоенные сетчатки не показали апоптозных клеток, тогда как контрольные сетчатки DMSO имеют приблизительно 4% клеток, окрашенных по TUNEL, и положительный контроль Met-12 (5 мкг) с немного выше 1% положительного количества по TUNEL. Обработка солью тригидрохлорида соединения I привела к 0,58% при 0,5 мкг, 1,14% при 1 мкг, 0,82% при 5 мкг и 0,9% при 10 мкг. На основе значительного опыта с моделью результаты для соединения I считаются приблизительно эквивалентными друг другу и 5 мкг положительного контроля Met-12. Таким образом, неожиданно в этой модели *in vivo* соль тригидрохлорида соединения I является значительно более эффективной, чем соль тригидрохлорида Met-12.

Пример 11. Исследование эффективности.

Используя ту же модель отслойки сетчатки грызунов, как в примере 10, высокоэффективную дозу 5 мкг соединения I в DMSO сравнивали с такой же дозой и 1 мкг дозой соединения I в двух разных составах.

Первым составом был 1,0 или 0,2 мг/мл раствор тригидрохлорида соединения I в 3% пропиленгликоле и 3% PS-20 при pH 4,0, а второй состав имел такие же концентрации соединения I в растворе 2% пропиленгликоля 2% полоксамера 407, также при pH 4. Результаты показаны на фиг. 9.

Приложенные контрольные сетчатки не показали апоптозных клеток, тогда как необработанные отслоения показали приблизительно 6,5% апоптозных клеток при измерении в этот момент времени.

С соединением I в DMSO они уменьшились до 2,5%, а 5 мкг PG/PS-20 имели уменьшение апоптозных клеток аналогичной степени до 2,9%. Однако состав PG/PX при этой концентрации был значительно лучше, уменьшая апоптозные клетки до 0,3% при 5 мкг. При 1 мкг состав PG/PX уменьшал апоптозные клетки до 0,4%, но доза PG/PS-20 1 мкг давала даже большее снижение до 0,01%. Данные демонстрируют, что работать могут не только мицеллярные образования, но что соль тригидрохлорида соединения I в них может быть даже более сильной, чем когда она составлена в DMSO.

Пример 12. Исследование эффективности.

Используя ту же модель отслойки сетчатки грызунов, как в примере 10, в качестве положительного контроля использовали соль тригидрохлорида соединения I в DMSO (1 мкг). Отрицательным контролем была апробированная тестовая несущая среда (0,4% полоксамер, 4,5% маннитол, 10 мм уксусной кислоты при pH 4,5). Триацетатную соль соединения I в DMSO (1 мкг) сравнивали с тригидрохлоридной солью в такой же дозе.

Прикрепленные сетчатки (полоса 4) не имели апоптозных клеток, тогда как обработанные несущей средой отслоенные сетчатки (полоса 1) показали 4,2% апоптозных клеток, что подтверждает отсутствие активности, так как она находится в пределах исторического диапазона для отслойки необработанной сетчатки (см. пример 10). Соль тригидрохлорида соединения I (DMSO) давала 2,4% апоптозных клеток, тогда как триацетатная соль (DMSO) давала только 1,2%, демонстрируя, что переключение с гидрохлоридных на ацетатные соли не имеет негативных результатов и вполне положительно влияет на эффективность.

Все публикации и патенты, упомянутые в настоящей заявке и/или перечисленные ниже, включены

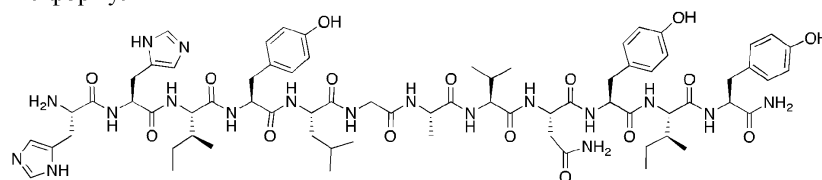
в данный документ посредством ссылки. Различные модификации и варианты описанных способов и композиций изобретения будут очевидны специалистам в данной области без выхода за пределы объема правовых притязаний и сущности изобретения. Хотя изобретение было описано в связи с конкретными предпочтительными вариантами осуществления, должно быть понятно, что заявленное изобретение не должно быть неправильно ограничено этими конкретными вариантами осуществления. На самом деле различные модификации описанных вариантов осуществления изобретения, которые очевидны специалистам в соответствующих областях, предназначены находиться в пределах объема правовых притязаний следующей формулы изобретения.

Хотя настоящее изобретение было описано в значительной степени со ссылкой на некоторые варианты его осуществления, другие варианты осуществления возможны без выхода из настоящего изобретения. Вследствие этого сущность и объем правовых притязаний приложенной формулы изобретения не должны быть ограничены описанием предпочтительных вариантов осуществления, содержащихся в данном документе. Все варианты осуществления, которые попадают в рамки смысла формулы изобретения либо буквально, либо эквивалентно, предназначены для охвата формулой изобретения.

Кроме того, описанные выше преимущества необязательно являются единственными преимуществами изобретения, и не следует ожидать, чтобы все описанные преимущества были достигнуты в каждом варианте осуществления изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

##### 1. Соединение формулы 1



(Формула 1)

или его фармацевтически приемлемая соль.

2. Полиацетатная соль или триацетатная соль соединения по п.1.

3. Фармацевтическая композиция для лечения патологического состояния глаз или заболевания глаз у субъекта, содержащая терапевтически эффективное количество соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 и фармацевтический носитель.

4. Фармацевтическая композиция по п.3, где патологическое состояние глаз или заболевание глаз выбрано из отслойки сетчатки, макулярной дегенерации, возрастной макулярной дегенерации, неэкссудативной возрастной макулярной дегенерации, экссудативной возрастной макулярной дегенерации, хориоидальной неоваскуляризации, ретинопатии, диабетической ретинопатии, острой и хронической макулярной нейроретинопатии, центральной серозной хориоретинопатии, макулярного отека, кистозного макулярного отека, диабетического макулярного отека, увеита/ретинита/хориоидита, мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии, болезни Бехчета, ретинохориоидопатии "выстрел дробью", патологического состояния глаза вследствие инфекционного заболевания (сифилис, болезнь Лайма, туберкулез, токсоплазмоз), увеита, срединного увеита (парспланит), переднего увеита, мультифокального хориоидита, синдрома множественных переходящих белых точек (MEWDS), саркоидоза глаз, заднего склерита, ползучего хориоидита, субретинального фиброза, увеит-синдрома, синдрома Фогта-Коянаги-Харада; окклюзионного поражения артерии сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, диссеминированной внутрисосудистой коагулопатии, окклюзии ветви вены сетчатки, гипертензивных изменений дна глаза, глазного ишемического синдрома, артериальных микроаневризм сетчатки, болезни Коатса, парафовеальных телеангиэктазий, окклюзии вены полусферы сетчатки, папиллофлебита, окклюзии центральной артерии сетчатки, окклюзии ветви артерии сетчатки, поражения сонной артерии (CAD), ангиита по типу "замерзшей ветви", гемоглобинопатии, включая серповидно-клеточную ретинопатию, ангиоидных полос сетчатки, семейной экссудативной витреоретинопатии, болезни Илза, симпатической офтальмии, заболевания сетчатки увеит, отслойки сетчатки, травмы глаза, травмы глаза, вызванной лазером, побочных эффектов или травмы глаза, вызванных фотодинамической терапией (PDT), фотокоагуляции, патологического состояния глаза вследствие гипоперфузии во время операции, лучевой ретинопатии, ретинопатии после трансплантации костного мозга, пролиферативной витреоретинопатии и эпиретинальной мембраны, пролиферативной диабетической ретинопатии, гистоплазмоза глаз, токсикароза глаз, синдрома гистоплазмоза глаз (OHS), эндофтальмита, патологического состояния глаза, вызванного токсоплазмозом, заболеваний сетчатки, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, заболеваний сосудистой оболочки глаза, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, заболевания увеита, ассоциированного с ВИЧ-инфекцией, вирусного ретинита, острого некроза сетчатки, прогрессирующего некроза наружных слоев сетчатки, грибковых заболеваний сетчатки, сифилиса глаз, туберкулеза глаз, диффузного одностороннего подострого нейроретинита, патологического состояния глаза, вызванного миазом, пигментного рети-



нита, дистрофии сетчатки вследствие системного нарушения, врожденной стационарной ночной слепоты, колбочковых дистрофий, дегенерации желтого пятна Штаргардта, желтопятнистой абнотрофии сетчатки, болезни Веста, узорчатой дистрофии пигментного эпителия сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, дистрофии глазного дна сорсби, доброкачественной концентрической макулопатии, кристаллической дистрофии Биетти, эластической псевдоксантомы, отслойки сетчатки, макулярной перфорации, гигантского разрыва сетчатки, заболевания сетчатки, ассоциированного с опухолями, врожденной гипертрофии пигментного эпителия сетчатки (RPE), задней увеальной меланомы, хориоидальной гемангиомы, хориоидальной остеомы, хориоидального метастаза, комбинированной гамартомы сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, ретинобластомы, вазопротрофических опухолей глазного дна, астроцитомы сетчатки, внутриглазных лимфоидных опухолей, точечной внутренней хориопатии, острой задней мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии, миопической дегенерации сетчатки, аномального гомеостаза пигментного эпителия сетчатки, острого ретинального пигментного эпителиита, глаукомы, дистрофии или дисплазии роговицы.

5. Фармацевтическая композиция по п.3 или 4, где композиция составлена для внутриглазного, интравитреального или периокулярного введения.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.3-5, где лечение патологического состояния глаз или заболевания глаз у субъекта осуществляется путем защиты фоторецепторных клеток от отслоения сетчатки, предотвращения апоптоза или некроптоза в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза или предотвращения апоптоза или некроптоза в ганглионарных клетках сетчатки глаза.

7. Фармацевтическая композиция по любому из пп.3-6, дополнительно содержащая по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество, выбранное из группы, состоящей из полисорбата 80, полисорбата 20, полоксамера 407 и тилоксапола.

8. Фармацевтическая композиция по п.7, где по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество составляет 0,01-20% мас./мас. композиции, или где по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество составляет 0,05-10% мас./мас. композиции, или где по меньшей мере одно неионное поверхностно-активное вещество составляет 0,25-3% мас./мас. композиции.

9. Фармацевтическая композиция по п.7 или 8, где, если используют два или более неионных поверхностно-активных вещества, общее количество добавленных неионных поверхностно-активных веществ составляет 0,01-20% мас./мас. композиции.

10. Фармацевтическая композиция по любому из пп.3-9, дополнительно содержащая по меньшей мере одно из пропиленгликоля и диметилсульфоксида.

11. Фармацевтическая композиция по любому из пп.3-9, дополнительно содержащая органический сорастворитель, при этом органический сорастворитель составляет 1-50% мас./мас. композиции, например 1-20% мас./мас. композиции или 1-5% мас./мас. композиции.

12. Фармацевтическая композиция по любому из пп.3-11, где композиция имеет pH в диапазоне 2,5-6,0.

13. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 в фармацевтическом составе для предотвращения Fas или лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с фактором некроза опухолей (TRAIL)-опосредованного апоптоза в фоторецепторах глаза, или для предотвращения апоптоза или некроптоза в клетках пигментного эпителия сетчатки глаза, или для предотвращения апоптоза или некроптоза в ганглионарных клетках сетчатки.

14. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 в фармацевтическом составе для лечения отслойки сетчатки, смерти клеток пигментного эпителия сетчатки или смерти ганглионарных клеток сетчатки или для предотвращения заболеваний или патологических состояний ганглионарных клеток сетчатки.

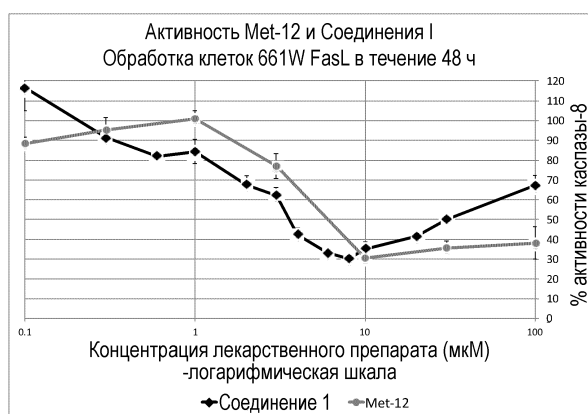
15. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 в фармацевтическом составе для лечения патологического состояния глаз или заболевания глаз, выбранного из отслойки сетчатки, макулярной дегенерации, возрастной макулярной дегенерации, неэкссудативной возрастной макулярной дегенерации, экссудативной возрастной макулярной дегенерации, хориоидальной неоваскуляризации, ретинопатии, диабетической ретинопатии, острой и хронической макулярной нейро-ретинопатии, центральной серозной хориоретинопатии, макулярного отека, кистозного макулярного отека, диабетического макулярного отека, увеита/ретинита/хориоидита, мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии, болезни Бехчета, ретинохориоидопатии "выстрел дробью", патологического состояния глаза вследствие инфекционного заболевания (сифилис, болезнь Лайма, туберкулез, токсоплазмоз), увеита, срединного увеита (парспланит), переднего увеита, мультифокального хориоидита, синдрома множественных преходящих белых точек (MEWDS), саркоидоза глаз, заднего склерита, ползучего хориоидита, субретинального фиброза, увеит-синдрома, синдрома Фогта-Коянаги-Харада; окклюзионного поражения артерии сетчатки, окклюзии центральной вены сетчатки, диссеминированной внутрисосудистой коагулопатии, окклюзии ветви вены сетчатки, гипертензивных изменений дна глаза, глазного ишемического синдрома, артериальных микроаневризм сетчатки, болезни Коатса, парафовеальных телеангиэктазий, окклюзии вены полусферы сетчатки, папиллофлебита, окклюзии центральной артерии сетчатки, окклюзии ветви артерии сетчатки, поражения сонной артерии (CAD), ангиита по типу "за-

мерзшей ветви", гемоглобинопатии, включая серповидно-клеточную ретинопатию, ангиоидных полос сетчатки, семейной эксудативной витреоретинопатии, болезни Илза, симпатической офтальмии, заболевания сетчатки увеит, отслойки сетчатки, травмы глаза, травмы глаза, вызванной лазером, побочных эффектов или травмы глаза, вызванных фотодинамической терапией (PDT), фотокоагуляции, патологического состояния глаза вследствие гипоперфузии во время операции, лучевой ретинопатии, ретинопатии после трансплантации костного мозга, пролиферативной витреоретинопатии и эпиретинальной мембраны, пролиферативной диабетической ретинопатии, гистоплазмоза глаз, токсокароза глаз, синдрома гистоплазмоза глаз (OHS), эндофтальмита, патологического состояния глаза, вызванного токсоплазмозом, заболеваний сетчатки, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, заболеваний сосудистой оболочки глаза, ассоциированных с ВИЧ-инфекцией, заболевания увеита, ассоциированного с ВИЧ-инфекцией, вирусного ретинита, острого некроза сетчатки, прогрессирующего некроза наружных слоев сетчатки, грибковых заболеваний сетчатки, сифилиса глаз, туберкулеза глаз, диффузного одностороннего подострого нейроретинита, патологического состояния глаза, вызванного миазом, пигментного ретинита, дистрофии сетчатки вследствие системного нарушения, врожденной стационарной ночной слепоты, колбочковых дистрофий, дегенерации желтого пятна Штаргардта, желтопятнистой абiotрофии сетчатки, болезни Беста, узорчатой дистрофии пигментного эпителия сетчатки, X-сцепленного ретиношизиса, дистрофии глазного дна сорсби, доброкачественной концентрической макулопатии, кристаллической дистрофии Биетти, эластической псевдоксантомы, отслойки сетчатки, макулярной перфорации, гигантского разрыва сетчатки, заболевания сетчатки, ассоциированного с опухолями, врожденной гипертрофии пигментного эпителия сетчатки (RPE), задней увеальной меланомы, хориоидальной гемангиомы, хориоидальной остеомы, хориоидального метастаза, комбинированной гамартомы сетчатки и пигментного эпителия сетчатки, ретинобластомы, вазопрлиферативных опухолей глазного дна, астроцитомы сетчатки, внутриглазных лимфоидных опухолей, точечной внутренней хориопатии, острой задней мультифокальной плакоидной пигментной эпителиопатии, миопической дегенерации сетчатки, аномального гомеостаза пигментного эпителия сетчатки, острого ретинального пигментного эпителиита, глаукомы, дистрофии или дисплазии роговицы.

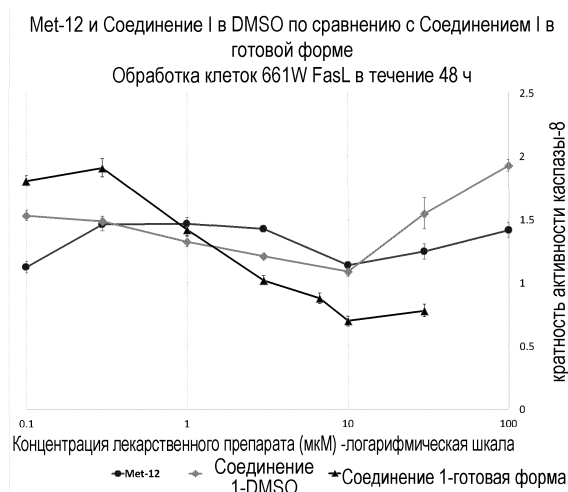
16. Применение соединения или его фармацевтически приемлемой соли по п.1 или 2 в фармацевтическом составе для лечения патологического состояния глаз или заболевания глаз у субъекта, где фармацевтический состав вводят в количестве, достаточном для ослабления смерти фоторецепторных клеток у субъекта, или в количестве, достаточном для повышения выживаемости фоторецепторных клеток у указанного субъекта, где количество, достаточное для ослабления смерти фоторецепторных клеток у субъекта или для повышения выживаемости фоторецепторных клеток у указанного субъекта, составляет от 0,01 до 1,0 мас.% от общей массы фармацевтического состава.

17. Применение по п.16, где смерть фоторецепторных клеток представляет собой Fas- или TRAIL-опосредованный апоптоз фоторецепторов.

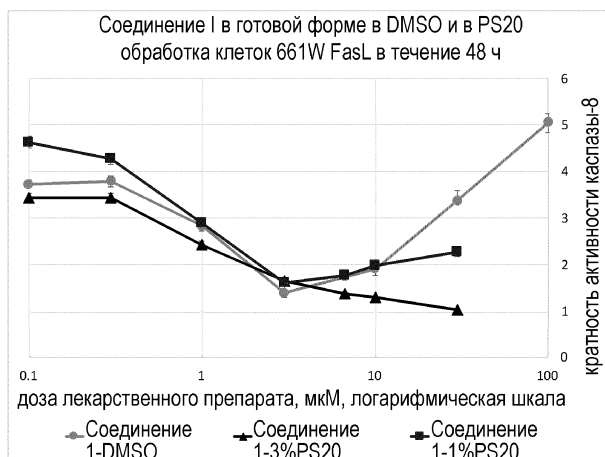
18. Применение по любому из пп.14-17, где фармацевтический состав вводят субъекту интраокулярно, интравитреально или периокулярно.



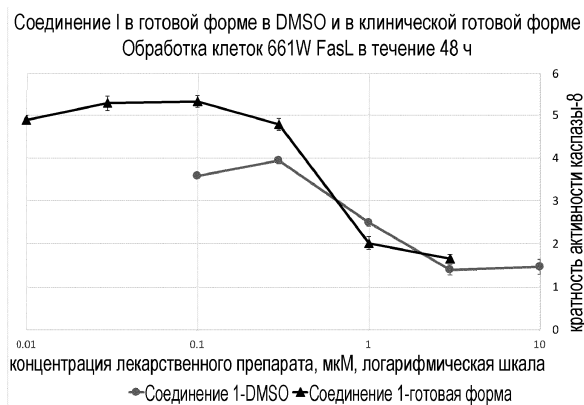
Фиг. 1



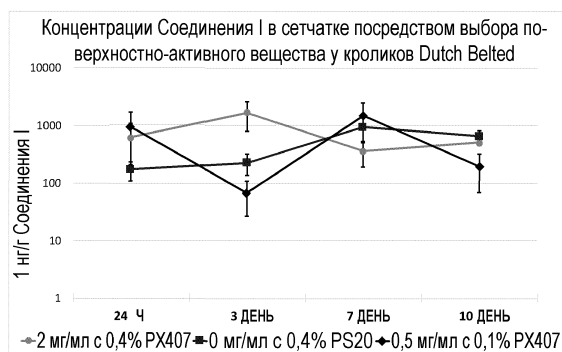
Фиг. 2



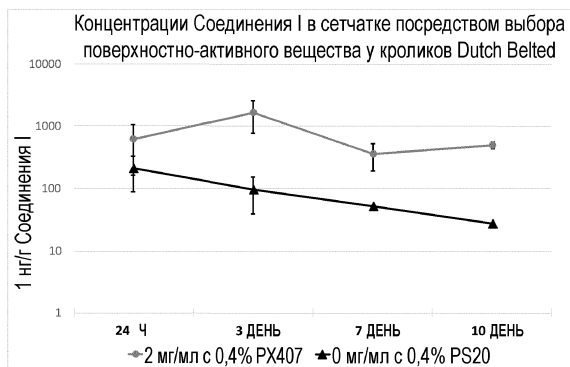
Фиг. 3



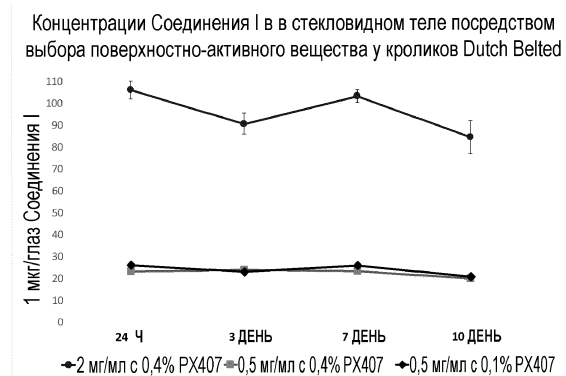
Фиг. 4



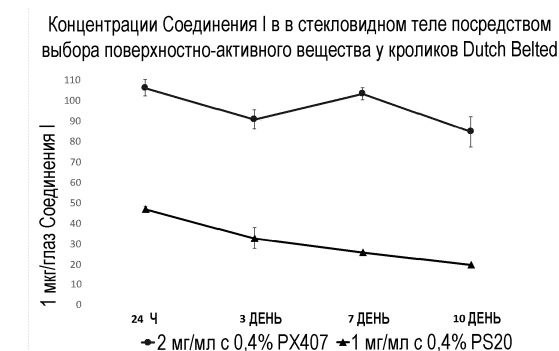
Фиг. 5a



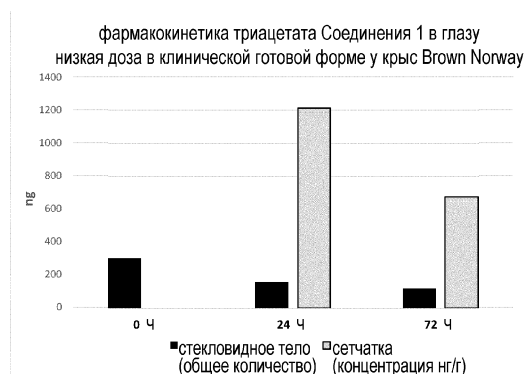
Фиг. 5b



Фиг. 6a



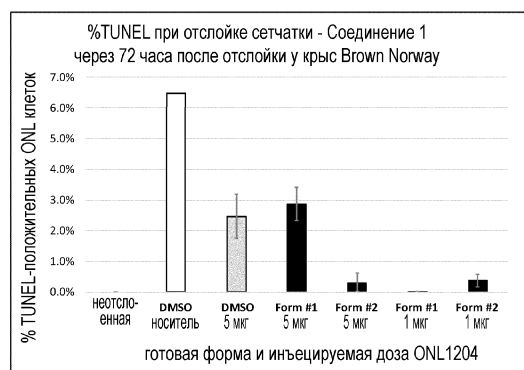
Фиг. 6b



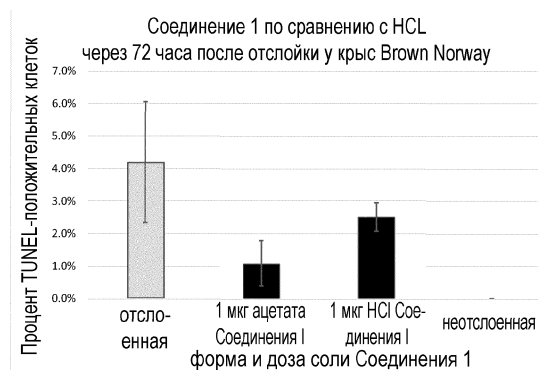
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

