(19) **RU** (11) **2 177 801** (13) **C1**

(51) МПК[7] **A 61 K 38/05**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2001102098/14, 25.01.2001

(24) Дата начала действия патента: 25.01.2001

(46) Дата публикации: 10.01.2002

(56) Ссылки: RU 2080120 C1, 27.05.1997. US 5227372 A1, 13.07.1993. US 5837880 A1, 17.11.1998. FR 2667787 A, 17.04.1993. EP 0858803 A4, 19.08.1998.

(71) Заявитель:
Санкт-Петербургская общественная организация "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН"

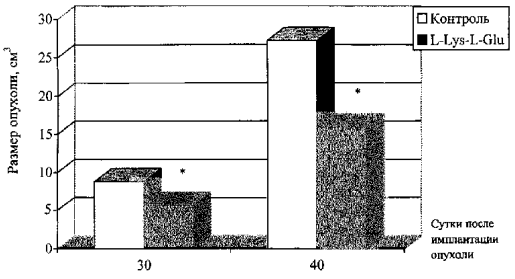
(72) Изобретатель: Хавинсон В.Х., Хокканен В.М., Трофимова С.В., Малинин В.В.

(73) Патентообладатель:
Санкт-Петербургская общественная организация "Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН"

(54) СРЕДСТВО, ИНГИБИРУЮЩЕЕ АНГИОГЕНЕЗ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ОРГАНА ЗРЕНИЯ

(57) Реферат:

Использование: в медицине в качестве средства, ингибирующего ангиогенез при заболеваниях органа зрения. Сущность изобретения: применение дипептида L-Lys-L-Glu в качестве препарата, обладающего способностью ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии. Предлагается фармакологическое средство, способное ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии, содержащее фармацевтически приемлемый носитель и эффективное количество дипептида в качестве активного начала, представляющего собой соединение формулы L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) или его химические модификации в виде солей. Средство предлагается для парентерального и местного применения. Согласно изобретению способ лечения заболеваний и патологических состояний органа зрения включает лечебное введение пациенту эффективного количества фармакологического средства в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта в зависимости от характера течения патологического процесса. Технический результат: стабилизация патологического процесса и улучшение зрительных функций. 3 с. и 3 з. п. ф-лы, 3 табл. , 1 ил.



* - P<0,05 по сравнению с показателем в контроле.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

(19) **RU** (11) **2 177 801** (13) **C1**

(51) Int. Cl.[7] **A 61 K 38/05**

RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: **2001102098/14, 25.01.2001**

(24) Effective date for property rights: **25.01.2001**

(46) Date of publication: **10.01.2002**

(71) Applicant:
Sankt-Peterburgskaja obshchestvennaja organizatsija "Sankt-Peterburgskij institut bioreguljatsii i gerontologii SZO RAMN"

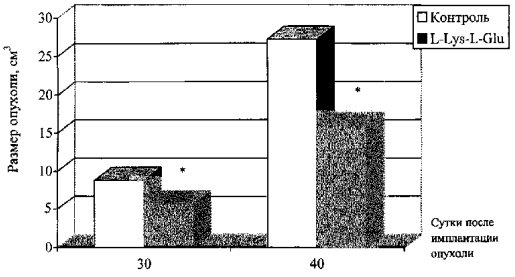
(72) Inventor: **Khavinson V.Kh., Khokkanen V.M., Trofimova S.V., Malinin V.V.**

(73) Proprietor:
Sankt-Peterburgskaja obshchestvennaja organizatsija "Sankt-Peterburgskij institut bioreguljatsii i gerontologii SZO RAMN"

(54) AGENT INHIBITING ANGIOGENESIS IN VISUAL ORGAN DISEASE

(57) Abstract:

FIELD: medicine, ophthalmology, peptides. SUBSTANCE: invention relates to the use dipeptide L-Lys-L-Glu as the preparation eliciting ability inhibiting angiogenesis in ophthalmopathology. Invention proposes the pharmacological agent that is able to inhibit angiogenesis in ophthalmopathology and containing pharmaceutically acceptable carrier and dipeptide as an active component taken in effective amount. Dipeptide is the compound of the formula L-lysyl-L-glutamic acid (L-Lys-L-Glu) or its chemical modification as salts. Method of treatment in diseases and pathological states of visual organ involves curative administration to patient the effective amount of the pharmacological agent for period that is necessary to attain the therapeutic effect depending on the course of pathological process. EFFECT: stabilization of pathological process, improved visual functions. 6 cl, 3 tbl, 1 dwg



* - P<0,05 по сравнению с показателем в контроле.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

Изобретение относится к медицине и касается использования в офтальмологии синтетического пептида L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) в качестве средства, ингибирующего неоваскуляризацию при различных заболеваниях органа зрения.

Известно, что процессы ангиогенеза лежат в основе регенерации тканей и опухолевого роста. В механизмах ангиогенеза основную роль играют факторы роста, стимулирующие пролиферацию эндотелиальных клеток, фибробластов и других клеток и способствующие контактам клеток друг с другом и с матриксом.

Среди наиболее близких аналогов по применению известны лекарственные препараты и цитокины, ингибирующее влияние которых на ангиогенез изучается в онкологии (1). Их действие направлено, в основном, на подавление синтеза фактора роста эндотелиоцитов (VEGF). Однако в офтальмологии известны единичные препараты, применяемые в качестве ингибитора ангиогенеза. Известны данные о положительном эффекте данапароида соды при лечении диабетической ретинопатии (далее ДР) (2, 3). Препарат вводили больным по 750 ЕД один раз в день в течение 6 недель. Эффект от лечения оценивали по картине глазного дна до и после лечения. При этом улучшение на глазном дне наблюдалось примерно в 80% случаев, в остальных 20% не отмечалось динамики (2). Положительный клинический эффект был получен вне зависимости от того, подвергался ли пациент до этого лазеркоагуляции сетчатки или нет. По данным авторов, препарат способствовал подавлению фактора роста эндотелиоцитов и, как следствие, торможению неоваскуляризации (2, 3, 4). Однако данапароид соды рекомендуется использовать только в качестве адъювантной терапии, и только при отечно-геморрагических формах ДР (2, 5).

Известен лекарственный препарат лизиноприл, тормозящий неоваскуляризацию за счет подавления продукции VEGF (7, 8, 9). VEGF особенно в большом количестве накапливается в стекловидном теле у пациентов с пролиферативной стадией ДР за счет активации ренин-ангиотензиновой системы (6, 10, 11). Однако, как и данапароид соды, лизиноприл применяется только на определенных стадиях ДР. Кроме того, недостатком этих препаратов является большая длительность лечения и ограничение применения в офтальмологии.

Известен дипептид L-Lys-L-Glu, используемый в качестве компонента для пептидного синтеза (12).

Известно, что дипептид L-Lys-L-Glu обладает иммуномодулирующей активностью (13).

Известно, что дипептид L-Lys-L-Glu обладает способностью стимулировать репаративные процессы (14).

Однако, известные свойства дипептида L-Lys-L-Glu не имеют очевидной взаимосвязи с вновь выявленным свойством - способностью дипептида ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии, что объективно подтверждают приведенные ниже примеры.

Заявляемое изобретение направлено на решение задачи получения средства пептидной природы, обладающего способностью ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии.

Задача решена путем применения дипептида со следующей аминокислотной последовательностью: L-Lys-L-Glu в качестве средства, обладающего способностью ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии, с целью стабилизации патологического процесса и улучшения зрительных функций.

Дипептид получают классическим методом пептидного синтеза в растворе (15).

Ранее неизвестное свойство дипептида L-Lys-L-Glu, а именно способность ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии выявлено при его экспериментальном и клиническом изучении.

Согласно изобретению дипептид L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) проявляет новую биологическую активность, заключающуюся в способности ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии.

Согласно изобретению, фармакологическое средство, обладающее способностью ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии, содержит в качестве активного начала эффективное количество дипептида, представляющего собой соединение формулы L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) или его соли фармацевтически приемлемый носитель.

Согласно изобретению, фармакологическое средство предназначено для парентерального введения, а также в виде глазных инстилляций и при физиотерапевтических воздействиях методом электрофореза в составе любой лекарственной формы или композиции, в качестве средства лечения для лечения офтальмопатологии.

Понятие "фармакологическое средство", используемое в заявке, подразумевает использование лекарственной формы, приемлемой для способа введения и содержащей дипептид, или его соли, которые обладают терапевтическим эффектом для лечения заболеваний органа зрения, при которых необходимо подавлять ангиогенез.

Понятие "эффективное количество", используемое в данной заявке, подразумевает использование того количества активного начала, которое в соответствии с его количественными показателями активности и токсичности, а также на основании знаний специалиста должно быть эффективным в данной препаративной форме.

Согласно изобретению, способ лечения офтальмопатологии, направленный на подавление ангиогенеза, включает профилактическое и/или лечебное введение пациенту заявляемого фармакологического средства в дозах 0,1-100 мкг/кг массы тела не менее одного раза в день в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта в зависимости от характера течения патологического процесса.

Для получения фармацевтических композиций, отвечающих изобретению, предлагаемый дипептид или его соли, как активный ингредиент смешиваются с фармацевтическим носителем согласно принятым в фармацевтике способам компаундирования.

Изобретение иллюстрируется примером

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

синтеза дипептида формулы L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) (пример 1), примерами испытания токсичности и биологической активности дипептида (примеры 2, 3, 4) и примерами результатов клинического применения фармакологического средства у ограниченного контингента больных, демонстрирующими его фармакологические свойства и подтверждающими возможность достижения профилактического и/или лечебного эффекта (примеры 6, 7).

Пример 1. Синтез дипептида L-Lys-L-Glu и его солей

1. N α,Nε-дибензилоксикарбониллизил-γ-бензилглутаминовая кислота [I] .

0,154 г (0,65 ммоль) γ-бензилглутаминовой кислоты суспензируют в 3 мл диметилформамида, при перемешивании добавляют 0,091 мл (0,65 ммоль) триэтиламина, затем 0,300 г (0,59 ммоль) N-оксисукцинимидного эфира N α,Nε-дибензилоксикарбониллизина. Реакционную смесь перемешивают 12 часов при комнатной температуре. После этого растворитель упаривают в вакууме при 40°С, к остатку добавляют 10 мл 1н. H_2SO_4 и дважды экстрагируют продукт этилацетатом (30•2). Органический слой промывают 1 н. H_2SO_4, водой до нейтральной реакции, сушат над Na_2SO_4. Отгонку растворителя проводят в вакууме при 40°С, остаток растворяют в 1-2 мл этилацетата и высаживают продукт гексаном. Затем перекристаллизируют в системе этилацетат/гексан. Продукт отфильтровывают и сушат в вакууме над P_2O_5. Выход 0,330 г (88%). Коэффициент удерживания Rf= 0,81 (бензол: ацетон 1: 1, силуфол).

2. L-Лизил-L-Глутаминовая кислота.

Защищенный дипептид [I] 0,330 г растворяют в 10 мг метанола, добавляют 3 мл воды и гидрируют над палладием на угле. Контроль по тонкослойной хроматографии. По окончании гидрирования катализатор отфильтровывают, остаток растворяют в минимальном количестве воды и высаживают метанолом. Продукт отфильтровывают, промывают этанолом, сушат в вакууме над P_2O_5. Выход 0,110 г (85%). Т пл. 194-196°С. $[\alpha]_{\gamma}^{20}$= +20,0° (с= 3,0; H_2O). Rf= 0,54 (ацетонитрил: вода 1: 3, "Merk"). Электрофорез: EGly= 1,96; EHis= 0,98 (1400 вольт, 45 мин, 2% уксусная кислота, "Watmann 3 MM").

Для получения соответствующих солей по карбоксильным группам к свободному тетрапептиду добавляют рассчитанное количество водного раствора гидроокиси соответствующего металла (NaOH, KOH, $Zn(OH)_2$, LiOH, $Ca(OH)_2$, $Mg(OH)_2$, NH_4OH).

Для получения триэтиламмониевой соли обработку проводят аналогичным образом, используя в качестве основания триэтиламин.

Фармологическое средство в форме раствора получают следующим образом: дипептид (или его соли), полученные описанным выше способом, растворяют в 0,9% изотоническом растворе NaCl, с содержанием дипептида 10 мкг в 1мл раствора.

Пример 2. Изучение токсичности дипептида L-Lys-L-Glu

Изучение общетоксического действия дипептида L-Lys-L-Glu проводилось в соответствии с "Правилами доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP)".

Цель изучения состояла в определении переносимых токсических доз препарата, оценке степени и характера патологических изменений в различных органах и системах организма и выявлении зависимости токсических эффектов от дозы и длительности применения препарата.

Определение острой токсичности дипептида L-Lys-L-Glu проводили по методу Кербера. Исследование проведено на 66 белых беспородных мышах-самцах массой 20-23 г, содержавшихся на стандартном режиме и получавших стандартное питание в условиях вивария. Животные были разделены случайным распределением на 6 равных групп по 11 мышей в каждой. Препарат вводили животным однократно внутримышечно в объеме 0,25 мл в дозах 1 мг/кг, 2 мг/кг, 3 мг/кг, 4 мг/кг, 5 мг/кг (в несколько раз превышающих терапевтическую дозу, рекомендуемую для клинического изучения). Животным контрольной группы в том же объеме вводился физиологический раствор.

В течение 72 часов и далее через 14 суток ни в одной группе животных гибели мышей не обнаружено. Не отмечено каких-либо изменений общего состояния, поведения, двигательной активности, волосяного и кожного покрова, физиологических отправлений животных.

Таким образом, дипептид L-Lys-L-Glu в дозах, превышающих терапевтическую, рекомендуемую для клинических испытаний, в несколько тысяч раз, не вызывает острых токсических реакций, что указывает на большую терапевтическую широту препарата.

Исследование подострой токсичности дипептида L-Lys-L-Glu проведено на 60 белых беспородных крысах массой 150-250 г. Ежедневно однократно животным опытных групп вводили препарат внутримышечно в течение 90 дней в дозах 1 мкг/кг, 0,3 мг/кг, 3 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора. Животным контрольной группы вводили в том же объеме физиологический раствор.

На протяжении всего периода исследования животные находились под ежедневным наблюдением. Отмечали поведение животных, потребление корма и воды, состояние волосяного покрова и слизистых оболочек. Проводили еженедельное взвешивание животных. До введения препарата, на 30, 60 и 90 сутки после начала введения препарата у животных исследовали морфологический состав и свойства периферической крови. При завершении эксперимента исследовали биохимические и коагулологические показатели крови.

Хроническую токсичность дипептида L-Lys-L-Glu, полученного заявляемым способом, изучали при длительном введении его крысам массой 150-250 г. Животным ежедневно вводили внутримышечно препарат в дозах 1 мкг/кг, 0,1 мг/кг, 1 мг/кг в 0,5 мл физиологического раствора в течение 6 месяцев. Отмечали поведение животных, потребление корма и воды, состояние

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

волосяного покрова и слизистых оболочек. Взвешивание животных проводилось ежедневно в первые 3 месяца эксперимента, затем 1 раз в месяц. Через 3 месяца после начала введения и при завершении эксперимента проводили гематологические и биохимические исследования. Оценивали функции сердечно-сосудистой системы, печени, поджелудочной железы, почек и надпочечников. После окончания введения препарата часть животных подвергали патоморфологическому исследованию с целью оценки состояния различных отделов головного и спинного мозга, сердца, аорты, легких, печени, почек, органов эндокринной и иммунной систем.

При оценке общего состояния животных, морфологических и биохимических показателей периферической крови, морфологического состояния внутренних органов, состояния сердечно-сосудистой и дыхательной систем, функции печени и почек патологические изменения в организме не обнаружены.

Изучение подострой и хронической токсичности дипептида L-Lys-L-Glu свидетельствует об отсутствии побочных эффектов при длительном применении препарата в дозах, превышающих терапевтическую в несколько раз.

Пример 3. Влияние дипептида L-Lys-L-Glu на механизмы ангиогенеза при развитии спонтанных опухолей у мышей СВА

В опытах были использованы 100 самок мышей линии СВА массой тела 18-22 г. Мышам опытной группы ежемесячно курсами по 5 последовательных дней подкожно вводили дипептид L-Lys-L-Glu по 0,1 мкг на инъекцию. Животные контрольной группы по аналогичной схеме получали инъекции 0,9% раствора хлористого натрия. За животными наблюдали до их естественной гибели. После вскрытия животных выявленные новообразования классифицировали согласно рекомендациям Международного агентства по изучению рака (МАИР) как "фатальные" (то есть, послужившие непосредственной причиной гибели животных) или как "случайные" (в случаях, когда животное погибло от других причин). Все опухоли, а также ткани и органы, подозрительные на наличие опухолевого роста, вырезали и фиксировали в 10% нейтральном формалине. После гистологической обработки ткани заливали в парафин. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и изучали микроскопически.

Сведения о частоте, локализации и типе опухолей в контрольной и опытной группах представлены в таблице (см. в конце описания).

Установлено, что применение дипептида L-Lys-L-Glu оказывало угнетающее действие на спонтанный канцерогенез у самок мышей СВА, что выражалось в снижении в 1,5 раза частоты развития всех опухолей и в 1,9 раза множественности новообразований. Под влиянием препарата у мышей в 2,5 раза реже развивались аденомы легких и наблюдалась тенденция к снижению частоты развития аденокарцином молочной железы и опухолей сосудистой стенки - гемангиом.

Пример 4. Влияние дипептида L-Lys-L-Glu на механизмы ангиогенеза при росте перевиваемой саркомы М-1 у крыс

Исследование выполнено на 45 самцах белых беспородных крыс, массой тела 180-200 г, которым под кожу правого бедра перевивали ткань соединительнотканной опухоли - саркомы М-1. Материал для имплантации был получен от опухоли животного-донора. Штамм опухоли получен в результате перевивки саркомы, возникшей у крысы после введения 3,4-бензпирена.

Крысам первой опытной группы вводили дипептид L-Lys-L-Glu внутрибрюшинно через 24 ч после имплантации опухоли в дозе 0,5 мкг на животное-опухоленоситель в течение 10 дней (в латентный период роста опухоли). Во второй опытной группе животные получали инъекции препарата внутрибрюшинно с 12 по 21 день после имплантации опухоли в дозе 0,5 мкг на животное-опухоленоситель (в период начала экспоненциальной фазы роста опухолей). Животным контрольной группы вводили физиологический раствор.

В контрольном интервале времени (с 5 по 31 сутки) измерение 3-х взаимно перпендикулярных диаметров опухолей производили 2-3 раза в неделю. Объем опухоли рассчитывали по формуле:

$V = 4/3\pi \cdot (L/2) \cdot (D/2)^2$ см^3, где L - длина опухоли; $D = (D_1+D_2)/2$, а D_1 и D_2 - 2 других взаимно перпендикулярных диаметра.

Забой животных и выделение опухолей был проведен под нембуталовым наркозом (50 мг/кг). Затем проводили микроскопическое исследование опухолевой ткани и оценивали функциональную активность опухолевых клеток.

У животных контрольной группы опухолевые узелки начинали пальпироваться под кожей бедра на 5-7 сутки после введения трансплантата.

Опухоли привились у всех животных контрольной группы и к 10 суткам достигали размеров, позволяющих проводить достаточно точные измерения. Наиболее интенсивный рост опухолей наблюдался до 24 суток.

Применение дипептида L-Lys-L-Glu оказывало неоднозначное действие на рост имплантированной соединительнотканной опухоли. Проявление эффекта препарата зависело от стадии развития опухоли. Введение дипептида L-Lys-L-Glu на протяжении латентного периода приводило к замедлению скорости роста саркомы М-1. Ингибирующий эффект начинал проявляться через 2 недели после окончания курса введения препарата и сохранялся в течение всего срока наблюдения. На чертеже показано влияние дипептида L-Lys-L-Glu на рост саркомы М-1 у крыс. Инъекции препарата в аналогичных дозах в период активной фазы роста опухоли практически не влияли на ее кинетические параметры.

При изучении препаратов, окрашенных гематоксилином и эозином, и полутонких срезов существенных изменений в гистологическом строении опухолей после введения дипептида L-Lys-L-Glu не выявлено. Результаты гистохимических и иммуногистохимический исследований также практически полностью совпадают с данными в контрольной группе.

Вместе с тем, по данным компьютерного анализа, у животных первой опытной группы увеличилась апоптозная гибель опухолевых клеток на 12,5%, а во второй группе - на 29%.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

Результаты проведенного комплексного морфо-кинетического исследования показали, что дипептид L-Lys-L-Glu обладает неоднозначным действием на рост солидной соединительнотканной опухоли - саркомы М-1. Объективно регистрируемый эффект ингибирования прогрессии опухоли проявился лишь после введения препарата в достаточно малых дозах в латентном периоде формирования новообразования. При этом по показателям пролиферативной и функциональной активности замедление экспансии не связано с прямым цитостатическим действием дипептида L-Lys-L-Glu на опухолевые клетки.

Результаты количественного анализа свидетельствуют о том, что уровень апоптозной гибели опухолевых клеток после применения дипептида L-Lys-L-Glu в опытных группах выше, чем в контрольной группе животных. При этом отмечалась активизация стромальных клеток микроокружения - тучных клеток, гранулоцитов и моноцитов. Известно, что эти клетки продуцируют целый спектр мультифункциональных цитокинов, которые принимают непосредственное участие в регуляции ряда физиологических, иммунологических и патологических функций. Кроме того, показано, что противоопухолевая активность тучных клеток и моноцитов проявляется в их непосредственном киллерном действии.

По данным статмокинетических исследований, выполненных на мышиной саркоме, уровень апоптозной гибели меняется по мере роста опухолей. На ранних стадиях роста новообразований гибель опухолевых клеток в форме апоптоза сначала увеличивается, после достижения опухолями веса ~ 50 мг снижается и затем сохраняется на одном уровне. Можно предположить, что изменение апоптозной активности отражает первоначальную попытку организма контролировать рост новообразования.

По современным представлениям, апоптозу отводится ведущее место в поддержании клеточного баланса, как в физиологических условиях, так и при действии разных токсических стимулов. Установлено, что при противоопухолевой терапии апоптоз выступает как один из ведущих патогенетических факторов, определяющих либо рост, либо регрессию злокачественных новообразований.

Таким образом, результаты морфо-кинетических исследований свидетельствуют о том, что применение дипептида L-Lys-L-Glu в дозе 0,5 мкг на животное замедляет рост солидной соединительнотканной опухоли - саркомы М-1. Морфологическим эквивалентом ингибирующего действия препарата является усиление индуцированной гибели опухолевых клеток в форме апоптоза. Достоверный эффект регистрируется при введении препарата в латентном периоде формирования опухолей. Прямое цитостатическое действие вилона на опухолевые клетки не выявлено. Вероятно, эффект дипептида L-Lys-L-Glu реализуется опосредованно через стромальные клетки сосудистого русла опухолей.

Пример 5. Влияние дипептида L-Lys-L-Glu на механизмы ангиогенеза при токсической дистрофии сетчатки у кроликов

Исследование действия дипептида L-Lys-L-Glu при экспериментальной дистрофии сетчатки проводили на глазах 17 половозрелых кроликов породы "Шиншилла", массой 2-3 кг. Экспериментальную токсическую дистрофию сетчатки создавали путем внутривенного введения 3%-ного раствора йодистого калия в дозе 30 мг/кг. Животные опытной группы (9 кроликов) в течение 7 суток получали ежедневные однократные внутримышечные инъекции дипептида в дозе 1 мкг/кг, начиная с 10-х суток после введения токсического агента. Животные контрольной группы получали инъекции стерильного физиологического раствора. Животным проводили ежедневное офтальмоскопическое исследование, а также гистологическое исследование тканей глаз в различные сроки после введения йодистого калия.

Через 1 час после введения токсического агента наблюдался отек диска зрительного нерва и сетчатки, более выраженный по периферии.

Гистологически на 2-е сутки после введения йодистого калия выявлено, что сетчатка резко отечна, слои разрыхлены, в области I и III нейронов значительное накопление жидкости, кровеносные сосуды радужной оболочки переполнены. На 7-е сутки при офтальмоскопии отмечалось появление аморфных очагов серовато-черного цвета по периферии глазного дна. В дальнейшем сохраняются отек сетчатой оболочки глаза, а по периферии сетчатки наблюдалось скопление пигментных клеток, расположенных ближе к углу глаза. В цилиарном теле обнаруживали сращение между собой отростков с образованием "пещеристых лакун".

Гистологически через 5 суток у контрольных животных сохранялся умеренный отек сетчатки и наблюдались аморфные очаги по периферии сетчатки. При офтальмоскопии у кроликов, получавших дипептид, выявлено снижение отека сетчатки, уменьшение размеров аморфных очагов. Это подтверждали результаты гистологического исследования, проведенного через 5 суток после окончания введения дипептида. У животных опытной группы отека сетчатки не обнаруживалось, сохранившиеся очаги отличались меньшими по сравнению с контролем размерами.

Таким образом, результаты исследования свидетельствуют о том, что применение дипептида L-Lys-L-Glu на фоне развивающихся дистрофических изменений сетчатки, вызванных воздействием токсического агента, уменьшает степень выраженности деструктивных изменений, предотвращает дальнейшее развитие патологического процесса и способствует нормализации структур сетчатки. Дипептид L-Lys-L-Glu оказывает противовоспалительное действие за счет нормализации показателей местного иммунитета, микроциркуляции и реологических свойств крови.

Пример 6. Эффективность применения дипептида L-Lys-L-Glu (или его солей) при поражениях переднего отдела глаза

Заболевания роговицы по сравнению с заболеваниями других оболочек глаза встречаются сравнительно часто (они составляют более 1/3 всех глазных

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

заболевания). По окончанию воспалительного процесса роговицы нередко остаются помутнения различной интенсивности, пронизанные новообразованными сосудами. Новообразование сосудов происходит из сосудов конъюнктивы или из более глубоких эписклеральных и склеральных сосудов. Характер неоваскуляризации роговицы неоднотипен. Различают три типа новообразованных сосудов: магистральный, рассыпной и ветвистый. Форма сосудов зависит от места расположения и площади очага в роговице. Если патологический процесс при этом расположен в центре, то зрительные функции могут быть снижены значительно, вплоть до нарушения светоощущения. Известно, что даже после полного рассасывания роговичных инфильтратов в роговой оболочке длительно сохраняются новообразованные сосуды, снижая остроту зрения.

Фармакологическое средство (содержащее дипептид или его соли) применяли у пациентов с поражением роговицы, сопровождающимся неоваскуляризацией. Основную группу составили 39 больных (71 глаз) с поражением роговицы различного генеза, сопровождающихся неоваскуляризацией.

Средство вводили парабульбарно по 10,0 мкг однократно ежедневно в течение 10 дней на фоне противовоспалительной терапии.

Контрольную группу составили 16 больных (30 глаз) со сходной клинической картиной, получавшие общепринятую терапию.

Клиническая картина у всех больных характеризовалась явлениями светобоязни, слезотечения, блефароспазма, перикорнеальной инъекции глазного яблока, инфильтратов в роговице с нарушением прозрачности, сферичности последней и появлением во всех случаях сети новообразованных сосудов с током крови. У части пациентов кератит сопровождался явлениями увеита.

С диагностической целью пациентам основной и контрольной групп была выполнена флюоресцентная кератография. Критерием оценки микроциркуляции служили временные параметры (время "рука-конъюнктива", время полного контрастирования лимба), состояние ангиоархитектоники лимба и роговичной ткани, характер проницаемости сосудов лимба и роговицы.

У всех пациентов было выявлено нарушение ангиоархитектоники лимбальных сосудов за счет изменения радиального расположения, а также из-за врастания новообразованных сосудов как в поверхностные, так и в глубокие слои роговицы. На концевых ветвях новообразованных сосудов обнаруживались ампулообразные расширения, из которых наблюдался повышенный выход флюоресцеина в позднюю фазу исследования.

Время "рука-конъюнктива" было укорочено в 2 раза, а время полного контрастирования лимба - в 1,5 раза по сравнению с нормой.

У всех пациентов, получивших средство, значительно быстрее, чем в контрольной группе уменьшилась или исчезла светобоязнь, слезотечение, явления воспаления. Инфильтраты значительно уменьшились по площади и увеличилась прозрачность роговицы в зонах помутнений. Кроме того, во всех случаях было зарегистрировано отсутствие тока крови по новообразованным сосудам, остались единичные полупрозрачные полностью запустевшие сосуды без тока крови. Улучшение клинической картины привело к значительному повышению остроты зрения, по сравнению с пациентами контрольной группы (табл. 2).

Данные флюоресцентной кератографии свидетельствовали о значительном улучшении клинической картины в основной группе. По мере купирования воспалительных явлений временные параметры микроциркуляции удлинялись. К концу курса лечения в 81,6% случаев временные показатели восстановились до нормы. Во всех случаях произошло уменьшение пропотевания красителя из новообразованных сосудов, а в 70,4% случаев наступило запустевание центральных отделов сосудов с прекращением в них микроциркуляции и пропотевание флюоресцеина.

В контрольной группе только в 36,6% случаев произошла нормализация временных параметров микроциркуляции и ни в одном случае не произошло запустевание новообразованных сосудов роговицы.

Больная К. , 1978 г. р. , находилась на стационарном лечении с 24.08. по 22.11.2000 г.

Диагноз: Туберкулезно-аллергический кератит правого глаза. Туберкулез внутригрудных лимфатических узлов (малая форма).

Из анамнеза известно, что больная заболела в мае 2000 г. , неспецифическая терапия с применением кортикостероидов, антибиотиков широкого спектра действия и других препаратов была малоэффективной.

Офтальмологический статус при поступлении:

Острота зрения правого глаза = 1,0; в поверхностном слое и строме определяются два округлых инфильтрата размером в диаметре 2,0 и 2,7 мм, к которым от лимба подходит несколько новообразованных сосудов. При офтальмоскопии регистрируется ток крови по новообразованным сосудам; вокруг помутнений - признаки отека эпителия и явления десцемиита. Остальные структуры глаза не изменены.

При флюоресцентной кератографии время "рука-конъюнктива" составило 9,1±0,4 с, время полного контрастирования лимбальных сосудов было также ниже нормы и составило 10,8±1,1 с. Зона лимба состояла из сплошных сосудистых петель с выраженной гиперфлюоресценцией. В позднюю фазу наблюдался обильный выход флюоресцеина из концевых ампулообразно расширенных ветвей новообразованных сосудов.

Проведен курс парабульбарных инъекций средства в оба глаза по 10,0 мкг ежедневно однократно в течение 10 дней.

На фоне лечения одновременно с рассасыванием инфильтратов отмечалось "запустевание" новообразованных сосудов, на их месте сохранились лишь полупрозрачные линейные едва различимые помутнения в поверхностных слоях роговицы без тока крови. К концу курса одно из помутнений полностью рассосалось, второе стало прозрачным в центре.

Результаты флюоресцентной кератотомии

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

свидетельствовали о купировании патологического процесса: время "рука-конъюнктива" и контрастирования лимба приблизились к норме - 10,9±1,1 с и 14,8±0,9 с соответственно. Не наблюдалось выпота флюоресцеина из новообразованных сосудов.

Больная З. , 1946 г. р. , находилась на стационарном лечении с 18.09.00. по 04.11.00.

Диагноз: туберкулезно-аллергический кератит обоих глаз.

Из анамнеза известно, что заболевание носило волнообразный рецидивирующий характер, плохо поддавалось лечению на протяжении трех лет. Последнее обострение кератита возникло в марте 2000 года. Специфическая терапия с применением туберкулостатиков, десенсибилизирующих средств, физиотерапия позволяли добиться лишь кратковременного эффекта.

Офтальмологический статус при поступлении:

Жалобы на резко выраженную светобоязнь, слезотечение, блефароспазм. Острота зрения правого глаза = 0,2 со сферой + 1,5 = 0,6 не корригируется; острота зрения левого глаза = 0,01 не корригируется. При офтальмоскопии правого глаза в средних слоях роговицы параоптической зоны имелись два небольших серых инфильтрата; на 3-х часах определялась сеть глубоких и поверхностных роговичных новообразованных сосудов в направлении от лимба к инфильтратам. При офтальмоскопии левого глаза в средних слоях оптической зоны роговицы - три небольших округлых серых инфильтрата; на 3-х часах определялся пучок роговичных новообразованных сосудов, тянущийся от лимба к инфильтратам.

Проведен курс парабульбарных инъекций средства в оба глаза по 10,0 мкг ежедневно однократно в течение 10 дней.

На фоне комплексного лечения с применением средства исчезла светобоязнь, слезотечение. Значительно возросла острота зрения (особенно на левый глаз).

Острота зрения правого глаза = 0,5 со сферой + 1,5 = 0,7 не корригируется; острота зрения левого глаза = 0,5 не корригируется.

При офтальмоскопии на обоих глазах значительно увеличилась прозрачность роговицы в зоне старых помутнений.

На правом глазу один инфильтрат полностью рассосался, второй значительно уменьшился по площади, уплотнился. На левом глазу инфильтраты практически рассосались.

Произошло "запустевание" всех новообразованных сосудов. Остались единичные полупрозрачные полностью запустевшие сосуды без тока крови.

Таким образом, заявляемый дипептид является эффективным ингибитором ангиогенеза при поражении переднего отрезка глаза.

Пример 7. Эффективность применения дипептида L-Lys-L-Glu (или его солей) при поражениях заднего отдела глаза

Пролиферативные хориоретиниты чаще всего возникают в исходе других форм (геморрагических, экссудативных) патологического процесса. Они сопровождаются серьезными циркуляторными нарушениями и ишемизацией ткани с ухудшением трофики. Интенсивный венозный застой вызывает стаз в капиллярном отрезке сосудистого русла, провоцируя выработку фактора роста эндотелия (VEGF), за счет чего и происходит рост новообразованных сосудов. Несостоятельность стенки новообразованных сосудов ведет как к преретинальным геморрагическим и экссудативным изменениям, так и к кровоизлияниям в стекловидное тело. Кроме того, новообразованные сосуды могут разрастаться по задней гиалоидной мембране стекловидного тела, затем, преодолев эту преграду, врастать в него, используя в качестве основы витреальные волокна. Появление фиброваскулярной ткани, пенетрирующей заднюю гиалоидную мембрану, и ее сокращение ведет к образованию витреоретинальных тракций, которые могут вызвать отслойку сетчатки. Поэтому поиск препаратов, обладающих ингибирующим эффектом в отношении неоангиогенеза, является одной из важнейших задач офтальмологии.

Фармакологическое средство применяли у 34 пациентов (67 глаз) с очаговой патологией различного генеза (хориоретиниты, центральная серозная хориоретинопатия, макулодистрофия и др.), сопровождающейся неоваскуляризацией. На фоне общепринятой терапии вводили дипептид парабульбарно по 10,0 мкг однократно ежедневно в течение 10 дней.

Контрольную группу составили 12 больных (24 глаза) с аналогичной патологией. Пациенты контрольной группы получали традиционную в таких случаях терапию по отработанной схеме.

Субъективные симптомы очагового поражения глаз у больных характеризовались: снижением остроты зрения (особенно значительным при локализации фокуса в центральной зоне глазного дна) в 89,5% случаев, наличием скотом в поле зрения в 43,2% случаев, появлением фотопсий, метаморфопсий, макропсий или микропсий в 44,7% случаев.

Клиническая картина характеризовалась клеточной инфильтрацией стекловидного тела, причем при средней и высокой интенсивности воспаления при биомикроскопическом исследовании наблюдалось диффузное клеточно-экссудативное помутнение стекловидного тела, затрудняющее офтальмоскопию.

У всех пациентов на глазном дне при офтальмоскопии наблюдались единичные или множественные фокусы в центральной или периферической областях сетчатки. Воспалительные очаги в хориоидеи обнаруживались в виде ограниченных желтовато-серых округлых, с нечеткими краями образований. Старые воспалительные очаги выглядели, как белые пятна фиброзной ткани с пигментом и четкими границами.

У всех пациентов при выполнении флюоресцентной ангиографии глазного дна (ФАГД) были выявлены признаки неоваскуляризации.

В ранних фазах на ангиограмме регистрировалось веерообразное распределение контрастированных капилляров. Сосудистые ветви могли быть изолированными, но в большинстве случаев группировались в обширные сосудистые поля, к которым подходили приводящие сосуды.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

Область неоваскуляризации имела прогрессирующий край, состоящий из плотно прилежащих друг к другу капилляров. Край зоны хориоидальной неоваскуляризации характеризовался резко выраженной гиперфлюоресценцией, за счет обильного пропотевания красителя из измененных сосудов.

В поздних фазах на ангиограмме вся зона хориоидальной неоваскуляризации диффузно контрастировалась флюоресцеином.

Все пациенты, получившие фармакологическое средство, отмечали субъективное повышение зрительных функций - изображение становилось более четким, ярким, пропали (в 44,3% случаев) или стали менее выраженными (в 43,6% случаев) фотопсии, метаморфопсии, макропсии и микропсии. В 87,3% случаев уменьшились в количестве и размерах скотомы в поле зрения больных.

Динамика остроты зрения представлена в таблице 3.

При биоофтальмоскопии у всех пациентов уменьшились признаки активности хориоретинита. Значительно снизилась клеточная инфильтрация стекловидного тела, за счет чего повысилась его прозрачность. На глазном дне свежие хориоретинальные очаги приобрели четкие контуры, перифокальный отек в 52,4% случаев исчез, а в 43,2% случаев значительно уменьшился.

Под действием средства у всех пациентов улучшились результаты ФАГД за счет уменьшения активности хориоретинита. Сократилась площадь хориоидальной неоваскуляризации и значительно уменьшилась гиперфлюоресценция.

Кроме того, уменьшилась площадь отслойки пигментного эпителия, что косвенно свидетельствует об уменьшении вероятности выброса VEGF и, следовательно, прорастания новообразованных сосудов из хориоидеи в сетчатку.

Больная П. , 1953 года рождения. Диагноз периферический хориоретинит правого глаза туберкулезной этиологии был поставлен в 1998 г. В этом же году был проведен первичный курс противотуберкулезной терапии и выполнена лазеркоагуляция сетчатки на правый глаз. Пациентка в течение двух последних лет неоднократно получала консервативное лечение (туберкулостатики, кортикостероиды, гепатопротекторы, ангиопротекторы, витамины), однако специфический процесс продолжал прогрессировать, приобрел вялотекущий характер, зрительные функции значительно снизились.

При осмотре: острота зрения правого глаза 0,4 не корригируется, острота зрения левого глаза 1,0. При биомикроскопии правого глаза определяется фиброз стекловидного тела и клеточная инфильтрация, затрудняющие офтальмоскопию глазного дна. На левом глазу - без патологических изменений.

На глазном дне левого глаза: диск зрительного нерва без особенностей. На средней периферии в верхне-внутреннем квадранте рядом со старым хориоретинальным очагом свежий очаг размером 2/3 диаметра диска, серого цвета, с нечеткими контурами, проминирующий в стекловидное тело, с выраженным перифокальным воспалением. С внутренней стороны очага определяются новообразованные сосуды и множественные геморрагии.

Данные ФАГД: в доинъекционную фазу офтальмоскопически видимые очаги обладают аутофлюоресценцией. Старый очаг окрашивается во время циркуляторной фазы и больше не прокрашивается. На месте свежего очага во время хориоидальной фазы участок гипофлюоресценции сохраняется в течение 2-х минут, в это же время появляются светящие точки, которые в артериальную фазу сливаются в "сеточку" с обильной гиперфлюоресценцией. Ретинальные геморрагии определяются, как "пятна" абсолютной гипофлюоресценции. Свежий очаг постепенно накапливает краситель, достигая максимума к 10 минуте. Яркость свечения очага сохраняется до 30 минуты, затем ослабевает. Остаточное свечение сохраняется до 60 минуты.

Проведен курс парабульбарных инъекций средства в дозе 10,0 мкг ежедневно однократно в течение 10 дней.

После 8-й инъекции препарата пациентка стала отмечать субъективное улучшение - изображение стало более четким, ярким. К концу курса острота зрения повысилась на правый глаз на две десятых и достигла 0,6.

При биомикроскопии сохранились только единичные клеточные элементы на фибриллах стекловидного тела. На глазном дне свежий хориоретинальный очаг приобрел четкие контуры, исчез перифокальный отек, полностью рассосались геморрагии, запустели новообразованные сосуды.

Улучшение картины глазного дна подтвердили данные ФАГД. Старый очаг продолжал окрашиваться только во время циркуляторной фазы. Яркость свечения свежего очага сохранялась только до 15 минуты, затем ослабевала.

Практически отсутствует пропотевание красителя из новообразованных сосудов, исчезли ФАГ-признаки ретинальных геморрагий.

Таким образом, предлагаемое средство является эффективным ингибитором ангиогенеза при поражении заднего отрезка глаза.

Источники информации

1. Гершанович М. Л. , Филов В. А. , Акимов М. А. , Акимов А. А. , Введение в фармакотерапию злокачественных опухолей СПб. ; Сотис, 1999, 152 с.

2. Van der Pijl J. W. , Van der Woude F. J. , Geelhoed-Duijvestijn P. H. et al. Danaparoid sodium lowers proteinuria in nephropathy//J. Am. Soc. Nephrol. 1997. Vol. 8, 3. P. 456-462.

3. van der Pijl J. W. , Van der Woude F. J. , Swart W. et al. Effect of danaparoid sodium on hard exudates in diabetic retinopathy//Lancet. 1997. Vol. 350, 9093. P. 1743-1745.

4. Paques M. , Massin P. , Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy//Diabetes Metab. 1997. Vol. 23, 2. P. 125-130.

5. Van der Pijl J. W. , Van der Woude F. J. , Geelhoed-Duijvestijn P. H. et al. Danaparoid sodium in diabetic retinopathy//Lancet. 1998. Vol. 351, 9094. P. 1743-1744.

6. Aiello L. P. , Avery R. L. , Arrigg P.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

G. , et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders see comments//N. Engl. J. Med. 1994. Vol. 331, 22. P. 1480-1487.

7. Chaturvedi N. , Sjolie A. K. , Stephenson J. M. et al. Effects of lisinopril on progression of retinopathy in normotensive people with type I diabetes. The EUCLID Study Group. EURODIAB Controlled Trial of Lisinopril in Insulin-Dependent Diabetes Meilitus//Lancet. 1997. Vol. 351, 9095. P. 28-31.

8. Randomised placebo-controlled trial of lisinopril in normotensive patients with insulin-dependent diabetes and normoalbuminuria or microalbuminuria.

9. Sawicki P. T. Lisinopril and albumin excretion in diabetes//Lancet. 1997. Vol. 350. 9078. P. 662.

10. Kuroki M. , Kawakami M. Diabetic retinopathy - the mechanisms of the ocular neovascularization and the development of anti-angiogenic drugs//Nippo Risho. 1999. Vol. 57, 3. P. 584-589.

11. Williams B. , Baker A. Q. , Gallacher B. , Lodwick D. Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells//Hypertension. 1995. Vol. 25. 5. P. 913-917.

12. SERVA Catalog. Heidelberg, 1987/88. PE 1 - PE 40.

13. Патент РФ 2080120 "Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью". БИ 15. 27.05.97.

14. Патент РФ 2139085 "Средство, стимулирующее репаративные процессы, и способ его применения". БИ 28. 10.10.99.

15. Якубке Х. -Д. , Ешкайт Х. Аминокислоты, пептиды, белки: Пер. с нем. - М. : Мир, 1985. 456 с.

Формула изобретения:

1. Применение дипептида L-лизил-L-глутаминовая кислота (L-Lys-L-Glu) в качестве средства, способного ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии.

2. Фармакологическое средство для профилактики и/или лечения заболеваний, при которых необходимо ингибировать ангиогенез при офтальмопатологии, содержащее в качестве активного начала эффективное количество дипептида L-Lys-L-Glu или его солей и фармацевтически приемлемый носитель.

3. Средство по п. 1, где оно представлено в виде лекарственной формы для парентерального введения.

4. Средство по п. 1, где оно представлено в виде лекарственной формы для местного введения.

5. Способ лечения офтальмопатологии, включающий введение пациенту эффективного количества фармакологического средства по пп. 2-4 в течение периода, необходимого для достижения терапевтического эффекта в зависимости от характера течения патологического процесса.

6. Способ по п. 5, отличающийся тем, что фармакологическое средство по пп. 2-4 активно при введении его в дозах 0,1-100 мкг/кг массы тела.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

Таблица 1

Влияние дипептида L-Lys-L-Glu на частоту, локализацию и тип опухолей у самок мышей СВА

Показатели	Контроль	Дипептид L-Lys-L-Glu
Число мышей в группе	50	50
Число мышей с опухолями	15 (30%)	10 (20%)
Число мышей со злокачественными опухолями	3	5
Общее число опухолей	19	10
Число злокачественных опухолей	5	5
Локализация, тип и число опухолей Молочная железа: - аденома - аденокарцинома	 1 5	 0 1
Легкие: - аденома - аденокарцинома	 11 0	 4* 2
Печень: - гистиоцитарная саркома	 0	 1
Лейкоз	0	1
Сосудистая стенка: - гемангиома	 3	 1

* - P<0,01 по сравнению с показателем в контроле.

Таблица 2

Группа больных	Острота зрения	
	До лечения	После лечения
Контрольная	0,44±0,02	0,48±0,03
Основная	0,45±0,03	0,67±0,03*#

* - P<0,05 по сравнению с показателем до лечения;

- P<0,05 по сравнению с показателем в контрольной группе.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1

Таблица 3

Группа больных	Острота зрения	
	До Лечения	После лечения
Контрольная	0,23±0,01	0,24±0,01
Основная	0,21±0,03	0,39±0,03*#

* - P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем до лечения;

- P<0,05 по сравнению с аналогичным показателем в контрольной группе.

RU 2177801 C1

RU 2177801 C1