

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **035798**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.08.12

(51) Int. Cl. **A61K 31/56** (2006.01)

(21) Номер заявки
201790397

(22) Дата подачи заявки
2015.08.24

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ КАТАРАКТЫ

(31) 62/040,721; 62/194,120

(32) 2014.08.22; 2015.07.17

(33) US

(43) 2017.08.31

(86) PCT/US2015/046453

(87) WO 2016/029199 2016.02.25

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮХЕЛС БАЙОТЕК, ЛИМИТЕД
(КУ); ЗЕ РЕДЖЕНТС ОФ ЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ КАЛИФОРНИЯ
(US)

(72) Изобретатель:
Чжан Кан (US), Хоу Руэй, Цай
Хуэйминь (CN)

(74) Представитель:
Строкова О.В. (RU)

(56) WO-A1-2014035451

US-A1-20060121024

ZHAO et al. Lanosterol reverses protein aggregation in cataracts", Nature, 30 July 2015 (30.07.2015), Vol. 523, Pgs. 607-611, entire document

US-A1-20100068251

US-A1-20110136773

MEEHAN et al. "Amyloid Fibril Formation by Lens Crystallin Proteins and Its Implications for Cataract Formation*", The Journal of Biological Chemistry, 30 January 2004 (30.01.2004), Vol. 279, No. 5, Pgs. 3413-3419, entire document

(57) Изобретение относится к фармакологии, а именно к лечению глазных заболеваний. Предложен способ лечения или предупреждения катаракты у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение в глаз указанного субъекта композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола. Ланостерол ингибирует агрегацию белка кристаллина или растворяет агрегат белка кристаллина.

B1

035798

035798

B1

Перекрестные ссылки на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно предварительной заявке на патент США номер 62/040721, поданной 22 августа 2014 г., и предварительной заявке на патент США номер 62/194120, поданной 17 июля 2015 г., содержание которых включено в настоящую заявку посредством отсылки.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение в целом относится к стеролам и их применению для лечения нарушений зрения, которые поражают нормальную функцию хрусталика глаза пациента, имеющего нарушения зрения или имеющего риск развития таких нарушений.

Краткое описание изобретения

Данное изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения катаракты у субъекта, нуждающегося в этом, при этом способ включает введение в глаз указанного субъекта композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола, ингибирующего агрегацию белка кристаллина или растворяющего агрегат белка кристаллина.

В различных аспектах композицию вводят местно, субконъюнктивально, ретробульбарно, периокулярно, субретинально, супрахориоидально или интраокулярно. В одном варианте осуществления изобретения композицию вводят местно. Субъекты, которым вводят ланостерол согласно изобретению, могут включать, но без ограничения, млекопитающих, птиц, земноводных, рептилий и других позвоночных. В одном варианте осуществления субъекты представляют собой лошадей, свиней, собак, кошек, грызунов и/или других домашних животных. В другом варианте осуществления субъекты представляют собой людей.

В одном варианте осуществления изобретения указанная композиция составлена в виде офтальмологического раствора, офтальмологического геля, офтальмологической мази, офтальмологического промывочного раствора, внутриглазного раствора для инфузий, промывочного раствора для передней камеры глаза или раствора для инъекции. В одном варианте осуществления изобретения ланостерол вводят в количестве и в течение периода времени, достаточных для растворения амилоидоподобных фибрилл белков кристаллина.

В определенных вариантах осуществления изобретения фармацевтически приемлемый носитель представляет собой воду, буфер или раствор хлорида натрия. В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель является стерильным. В других вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мазь. В еще других вариантах осуществления фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гель. Гели могут быть получены с использованием гель-образующих материалов, которые хорошо известны в данной области, включая, но без ограничения, высоковязкую карбоксиметилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу, полиэтиленоксид и карбомер. В некоторых аспектах композиции фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель представляет собой циклодекстрин. В одном варианте осуществления циклодекстрин представляет собой (2-гидроксипропил)- β -циклодекстрин.

В одном варианте осуществления изобретения ланостерол ингибирует агрегацию белка кристаллина в глазу указанного субъекта. В одном варианте осуществления изобретения ланостерол растворяет агрегат белка кристаллина хрусталика в глазу указанного субъекта. В одном варианте осуществления изобретения белок кристаллин хрусталика выбран из α -кристаллина, β -кристаллина, γ -кристаллина или их комбинаций. В некоторых аспектах кристаллин выбран из группы, состоящей из α A-кристаллина, α B-кристаллина, β B2-кристаллина, β B1-кристаллина и γ D-кристаллина.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, которые показывают определенные варианты осуществления изобретения, приведены исключительно с целью иллюстрации, поскольку из подробного описания специалистам в данной области станут очевидными различные изменения и модификации в пределах сущности и объема изобретения. Весь документ должен рассматриваться как единое целое, и следует понимать, что рассматриваются все комбинации признаков, описанных здесь, даже если комбинация признаков не содержится вместе в одном предложении или параграфе, или разделе данного документа. В дополнение к вышесказанному изобретение включает в качестве дополнительного аспекта все варианты осуществления изобретения, более узкие по охвату, чем варианты, конкретно указанные выше. Например, если аспекты изобретения описываются как "содержащие" признак, варианты осуществления также рассматриваются как "состоящие из" или "состоящие в основном из" этого признака.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана идентификация мутаций LSS, вызывающих врожденную катаракту. На фиг. 1A показаны генеалогические схемы пораженных заболеванием семей и фенотип катаракты. Квадраты и круги обозначают мужчин и женщин соответственно. 1, аллель дикого типа; W581R и G588S представляют две мутации. На фиг. 1B на верхней панели показаны данные по секвенированию ДНК непораженного заболеванием индивидуума и пораженного заболеванием ребенка (II-1) с гомозиготной мутацией W581R; на нижней панели показаны данные по секвенированию ДНК непораженного заболеванием ин-

дивидуума и пораженного заболеванием ребенка (IV-1) с гомозиготной мутацией G588S. Подчеркнутая последовательность обозначает замену нуклеиновой кислоты. На фиг. 1С слева показана цветная фотография правого глаза пациента 1 в первом поколении (IV-1) с тотальной катарактой; справа показана цветная фотография правого глаза пациента 2 в том же поколении (IV-3) с катарактой.

На фиг. 2 показаны мутации LSS, нарушающие ферментативную функцию циклазы. На фиг. 2А показано сохранение W581R и G588 в LSS по нескольким видам: человек разумный (*Homo sapiens*), обыкновенный шимпанзе (лат. *Pan troglodytes*), дикий бык (лат. *Bos taurus*), домовая мышь (лат. *Mus musculus*), серая крыса (лат. *Rattus norvegicus*), банкивская джунглевая курица (лат. *Gallus gallus*) и да-нио-рерио (лат. *Danio rerio*). На фиг. 2В показано компьютерное моделирование структуры LSS и воздействие мутаций LSS W581R и G588S. Анализ с помощью компьютерного моделирования выявил петлю, возникающую из C584 и заканчивающуюся в E578 с важной боковой цепью W581 на конце петли, стабилизирующей стерол. Петля фиксирована мостиком S-S и солевым мостиком E578-R639. Амидный азот N G588 взаимодействует с C584 из предшествующего оборота спирали, и водород Ca G588 находится в непосредственной близости от важного E578, который затем образует прочный солевой мостик с R639 той же самой поддерживающей спирали. Мутация G588S вызывает столкновение боковой цепи серина с остатком петли E578 и является несовместимым со структурой. Стрелки указывают на локализацию мутантной боковой цепи. На фиг. 2С показан эффект сконструированной экспрессии белка дикого типа (WT LSS) и мутантов LSS на содержание стерола. LSS дикого типа значительно увеличивает выработку ланостерола, тогда как ни один из мутантов W581R или G588S не проявляет какой-либо активности циклазы. $n=3$ в каждой группе; $***P<0,001$.

На фиг. 3 показано, что ланостерол уменьшает внутриклеточную агрегацию различных мутантных белков кристаллинов. На фиг. 3А показаны конфокальные изображения агрегатов белков кристаллинов в клетках-предшественниках человеческого хрусталика. Вызывающий катаракту мутант Y118D α A-кристаллина формировал р62-положительные внутриклеточные тельца включения или агрегаты. Зеленый, белки eGFP-кристаллина; красный, р62; синий, ядро. В качестве контроля использовали клетки, трансфицированные реGFP-N1. На фиг. 3В показаны конфокальные изображения ингибирующего эффекта LSS на агрегаты кристаллинов. На фиг. 3С показано ингибирование агрегации мутантного кристаллина с помощью LSS (WT LSS) дикого типа и ланостерола, но не мутантного LSS или холестерина. На фиг. 3D показано увеличение растворимого мутантного белка α A-кристаллина (Y118D) путем коэкспрессии LSS дикого типа, но не мутантов LSS (в качестве контроля использовали Y118D, коэкспрессирующийся с реDNA3.1-N-Flag). Количественный анализ выполняли с использованием денситометрии белков кристаллинов с помощью вестерн-блот-анализа супернатанта или нерастворимой фракции клеточных лизатов. $n=3$ в каждой группе; репрезентативный вестерн-блот-анализ показан на фиг. 9С; $*P<0,05$, $**P<0,01$. На фиг. 3Е показаны конфокальные изображения повторного растворения предварительно образованных агрегатов кристаллинов под действием ланостерола. На фиг. 3F показано, что ланостерол значительно уменьшает внутриклеточную агрегацию различных вызывающих катаракту мутантных белков кристаллинов зависимым от концентрации образом ($n=3$, $P<1\times 10^{-4}$). Холестерол не уменьшал внутриклеточную агрегацию ($n=3$, $P>0,1$). На фиг. 3G показано, что ланостерол увеличивает растворимые фракции различных мутантов кристаллинов в клетках-предшественниках человеческого хрусталика. $n=3$; $P<0,001$. На фиг. 3Н показаны эффекты DMSO, холестерина или ланостерола на агрегаты Y118D α A-кристаллина в клетках-предшественниках человеческого хрусталика путем последовательной визуализации живых клеток. На фиг. 3И показан эффект ланостерола на растворение внутриклеточных агрегатов кристаллинов в течение времени ($n=22$ от 3 биологических образцов). Средние значения $\pm$ SD показаны в виде черных символов. Данные наилучшим образом подгоняли с помощью процесса экспоненциального спада "single exponential decay" (красная линия).

На фиг. 4 показаны повторно растворенные ланостеролом предварительно образованные амилоидоподобные фибриллы белков кристаллинов. На фиг. 4А показаны негативно окрашенные снимки ТЕМ агрегатов мутантных белков α A-кристаллинов, обработанных носителем липосом, холестерином или ланостеролом в липосомах. В правой колонке группы ланостерола показаны увеличенные в 5 раз изображения. На фиг. 4В показан эффект ланостерола на повторное растворение агрегатов кристаллина с помощью флуоресценции ThT ($n=3$). Фиг. 4В (i), мутанты β/γ -кристаллинов; фиг. 4В (ii), мутанты α -кристаллинов. Каждый столбец построен по данным, полученным от трех независимых образцов.

На фиг. 5 показано, что ланостерол уменьшает тяжесть катаракты и увеличивает прозрачность. На фиг. 5А на снимках катарактального кроличьего хрусталика, обработанного ланостеролом, показано, что ланостерол увеличивает прозрачность хрусталика. Фиг. 5А(i), слева, до лечения; фиг. 5А(ii), справа, после лечения. На фиг. 5В показана коробчатая диаграмма количественной оценки лечебного эффекта ланостерола ($n=13$). На фиг. 5С показаны снимки катарактального собачьего хрусталика, обработанного ланостеролом, которые показывают увеличенную прозрачность хрусталика. Фиг. 5С(i), слева, до лечения; фиг. 5С(ii), справа, после лечения. На фиг. 5D показана коробчатая диаграмма количественной оценки лечебного эффекта ланостерола ($n=7$). Показан диапазон, медиана (горизонтальная линия) и средние значения (круг). Пересечения обозначают максимальные и минимальные измеренные степени

катаракты. Усы обозначают стандартное отклонение, и ящик охватывает доверительный интервал 40%.

На фиг. 6А показаны графики картирования по гомозиготности по всему геному с помощью инструмента "Homozygosity Mapper" в виде столбчатых диаграмм. Для выделения представляющих интерес областей любой показатель выше, чем 80% от максимального показателя, полученного в этой работе, окрашен в красный цвет. На фиг. 6В показано, что показатели гомозиготности нанесены напротив физического положения на хромосоме 21, которая содержит ген LSS. Красный столбец обозначает области с наиболее высокими показателями. Правая сторона хромосомы содержит длинную непрерывную гомозиготную область, в которой локализован ген LSS.

На фиг. 7 показаны репрезентативные конфокальные изображения клеток, котрансфицированных с Flag-LSS и eGFP. Клетки-предшественники человеческого хрусталика совместно трансфицировали с геном LSS дикого типа или мутантным геном LSS и геном eGFP в течение 4 ч и культивировали в течение 16 ч в свежей культуральной среде. Клеточное распределение LSS затем визуализировали с использованием антитела против Flag (пурпурный). В качестве контроля использовали распределение eGFP (зеленый). Ядра окрашивали и визуализировали с помощью красителя Hoechst 33342 (синий).

На фиг. 8 показаны репрезентативные конфокальные изображения клеток, совместно трансфицированных LSS и различными вызывающими катаракту мутантами кристаллинов. Фиг. 8А, мутант R116C α A-кристаллина. Фиг. 8В, мутант R120G α B-кристаллина. Фиг. 8С, мутант V187E β B2-кристаллина. Фиг. 8D, мутант G129C γ C-кристаллина. Фиг. 8АЕ, мутант W43R γ D-кристаллина. Клетки-предшественники человеческого хрусталика совместно трансфицировали геном LSS дикого типа или мутантного Flag-LSS и геном мутантного GFP-кристаллина в течение 4 ч и культивировали в течение 16 ч в свежей культуральной среде. Все мутанты кристаллинов формировали p62-положительные агрегаты, о чем свидетельствует совместная локализация мутантных кристаллинов и p62. Клетки, совместно трансфицированные GFP-кристаллином и pcDNA3.1-N-Flag, использовали в качестве контролей. Образование внутриклеточных агрегатов различных белков кристаллинов визуализировали по флуоресценции GFP (зеленый). LSS дикого типа или мутантный LSS детектировали с помощью антитела против Flag (красный), p62 окрашивали с использованием антитела против p62, при этом ядра окрашивали и визуализировали с помощью красителя Hoechst 33342 (синий). Количественные анализы клеток с агрегатами представлены в обобщенном виде на фиг. 3С.

На фиг. 9 показано ингибирование агрегации мутантов кристаллинов с помощью LSS дикого типа и ланостерола в клетках HLEB-3 (фиг. 9А) или клетках HeLa (фиг. 9В). Клетки, совместно трансфицированные LSS и конструкциями мутантов кристаллинов, культивировали в течение 24 ч перед проведением анализа на образование агрегатов. Эксперименты RESCUE выполняли путем добавления 40 мкМ стеролов (ланостерола или холестерина) в клеточную культуральную среду в течение 2 ч, после чего стерольную среду заменяли свежей культуральной средой, и клетки культивировали дополнительно в течение 12 ч. Процентное содержание клеток с агрегатами кристаллинов рассчитывали по данным десяти произвольно выбранных полей зрения. Рассчитывали значения для группы LSS дикого типа, группы мутантов или группы мутантов и ланостерола. В группах LSS дикого типа и ланостерола наблюдалось значительно меньше агрегатов по сравнению с контрольной группой ($P < 1 \times 10^{-4}$), при этом различия в количестве агрегатов между группами мутантного LSS или холестерина и контрольной группой не наблюдалось ($P > 0,1$). На фиг. 9С клетки-предшественники человеческого хрусталика совместно трансфицировали с LSS дикого типа или мутантным LSS и α A-кристаллином (Y118D). В качестве контроля использовали α A-кристаллин (Y118D), совместно экспрессирующийся с pcDNA3.1-N-Flag. После трансфекции в течение 4 ч и инкубации в свежей культуральной среде дополнительно в течение 24 ч клетки лизировали и центрифугировали для разделения супернатанта и нерастворимых фракций. Гибридные белки LSS и кристаллинов детектировали с помощью антител против Flag и GFP соответственно. Красные стрелки указывают на более высокое содержание кристаллинов в растворимой фракции по сравнению с нерастворимой фракцией в клетках, содержащих WT-LSS. Данные количественно оценены по результатам трех независимых экспериментов и представлены в обобщенном виде на фиг. 3D.

На фиг. 10 показано, что ланостерол значительно уменьшает внутриклеточную агрегацию, вызванную различными вызывающими катаракту мутантными белками кристаллинами зависимым от концентрации образом при анализе в клетках HLEB-3 или HeLa. На фиг. 10А показаны репрезентативные конфокальные изображения клеток HLEB-3, трансфицированных различными вызывающими катаракту мутантами кристаллинов. На фиг. 10В показаны репрезентативные конфокальные изображения клеток HeLa, трансфицированных различными вызывающими катаракту мутантами кристаллинов. Клетки трансфицировали различными конструкциями кристаллинов в течение 4 ч и культивировали дополнительно в течение 24 ч в свежей культуральной среде. Затем клетки обрабатывали 10, 20 и 40 мкМ ланостерола в 1% (клетки HLEB-3) или 2% DMSO (клетки HeLa) в течение 2 ч и культивировали дополнительно в течение 12 ч. В качестве контролей использовали клетки, обработанные 1% (клетки HLEB-3) или 2% DMSO (клетки HeLa). Образование внутриклеточных агрегатов различных белков кристаллинов визуализировали по флуоресценции GFP (зеленый) и ядра окрашивали Hoechst 33342 (синий). Стрелками указаны типичные внутриклеточные агрегаты. На фиг. 10С показана зависимость от концентрации эф-

фектов ланостерола в отношении растворения агрегатов при анализе в клетках HLEB-3. На фиг. 10D показана зависимость от концентрации эффектов ланостерола в отношении растворения агрегатов при анализе в клетках HeLa.

На фиг. 11 показано, что обработка ланостеролом, но не холестеролом, повышает уровень вызывающих катаракту мутантных кристаллинов в растворимых фракциях по сравнению с контрольной группой или группой мутантного LSS. На фиг. 11A клетки-предшественники человеческого хрусталика трансфицировали генами мутантных кристаллинов в течение 4 ч, а затем инкубировали в свежей культуральной среде дополнительно в течение 24 ч. Клетки собирали и лизировали. Супернатант и нерастворимые фракции разделяли путем центрифугирования и анализировали с помощью вестерн-блот-анализа. Гибридные белки LSS и кристаллинов идентифицировали с помощью антител против Flag и GFP соответственно. Группа, обработанная ланостеролом, выделена красными рамками. В качестве контроля использовали клетки, обработанные 1% DMSO. β -Актин использовали в качестве внутреннего контроля нагрузки белка тотальных клеточных лизатов (TCL). S, супернатант; P, нерастворимая фракция. На фиг. 11B показан эффект DMSO (n=4) и холестерина (n=7) на изменения размеров агрегатов α A-кристаллина (Y118D) в клетках-предшественниках человеческого хрусталика, оцененный путем наблюдения за перемещением одиночной частицы на отображении живой клетки. На фиг. 11C показана оценка эффекта ланостерола на растворение агрегатов кристаллинов по мутности. Агрегаты кристаллинов формировали путем инкубации 5 мг/мл раствора белков при 60°C в течение 2 ч (α -кристаллины) или при 37°C в течение 48 ч (β - и γ -кристаллины) в присутствии 1 М гуанидинхлорида. Предварительно образованные агрегаты ресуспендировали в PBS при конечной концентрации 0,2 мг/мл и обрабатывали 500 мкМ стеролов в 500 мкМ DPPC липосоме и инкубировали при 37°C в течение 24 ч. Агрегаты, обработанные только 500 мкМ DPPC липосомой, использовали в качестве контролей. На фиг. 11D показан зависимый от концентрации эффект ланостерола на повторное растворение амилоидоподобных фибрилл, образованных мутантами α A-кристаллина, оцененный по флуоресценции ThT. В качестве контролей использовали агрегаты, обработанные только 500 мкМ DPPC липосомой.

На фиг. 12 показана система классификации катарактальных хрусталиков. На фиг. 12A хрусталики помещали выше решетки и фотографировали. Степень прозрачности оценивали как 0, прозрачные хрусталики и отсутствие помутнения (линии решетки ясно наблюдаются, a'); 1, мутные хрусталики и легкая степень помутнения (минимальная мутность линий решетки, со все еще видимыми линиями решетки, b'); 2, мутные хрусталики и присутствие диффузного помутнения, затрагивающего почти весь хрусталик (умеренное помутнение линий решетки, с видимыми основными линиями решетки, c'); или 3, непрозрачный хрусталик и присутствие обширного густого помутнения, затрагивающего весь хрусталик (полное помутнение линий решетки, с невидимыми линиями решетки, d'). На фиг. 12B показано, что ланостерол уменьшает тяжесть катаракты и увеличивает прозрачность в изолированных катарактальных кроличьих хрусталиках. Кроличьи хрусталики (n=13) вырезали и инкубировали с ланостеролом в течение 6 дней, а затем оценивали на ясность и прозрачность хрусталика. Показаны пары снимков каждого катарактального кроличьего хрусталика до и после лечения с указанными под ними баллами. На фиг. 12C показано, что ланостерол уменьшает тяжесть катаракты и увеличивает прозрачность хрусталика глаза у собак. Глаза собак с катарактой (n=7) обрабатывали ланостеролом в течение 6 недель и оценивали на четкость и прозрачность. Показана пара снимков каждого исследуемого глаза до и после лечения с указанными под ними баллами. Также, показаны три контрольных глаза, обработанные только носителями.

Подробное описание изобретения

Теперь будут подробно рассмотрены конкретные варианты осуществления изобретения, включая оптимальные способы, предусмотренные изобретателями для осуществления изобретения. Примеры этих конкретных вариантов осуществления проиллюстрированы в прилагаемых чертежах. Несмотря на то что изобретение описано с точки зрения этих конкретных вариантов осуществления, будет понятно, что не предполагается ограничивать изобретение описанными вариантами. Напротив, предполагается, что изобретение охватывает все альтернативы, модификации и эквиваленты, которые могут быть соответствовать сущности и объему изобретения, определяемому прилагаемой формулой изобретения. В следующем далее описании конкретные детали изложены для обеспечения полного понимания настоящего изобретения. Настоящее изобретение может быть применено на практике без некоторых или всех этих конкретных деталей. Кроме того, хорошо известные признаки могут быть не описаны подробно во избежание излишнего усложнения описания изобретения.

Настоящее изобретение относится к способу и композициям, предназначенным для лечения или предупреждения нарушений зрения, которые поражают нормальную структуру глаза у субъекта, имеющего такие нарушения зрения или имеющего риск развития таких нарушений, при этом способ включает введение такому субъекту композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и фармацевтически эффективное количество стерола формулы I. Например, в качестве иллюстративного соединения изобретение предусматривает введение пациенту офтальмологически эффективного количества ланостерола (3 β -гидрокси-8,24-ланостадиен; 8,24-ланостадиен-3 β -ол).

В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает набор для лечения и/или преду-

предупреждения нарушений зрения, которые поражают нормальную структуру глаза у субъекта, включающий состав, содержащий эффективное количество ланостерола, фармацевтически приемлемый носитель и инструкции по введению указанного состава, при этом указанное введение обеспечивает лечение и/или предупреждение указанного нарушения зрения. В еще другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает офтальмологическую фармацевтическую композицию для лечения и/или предупреждения нарушений зрения у субъекта, при этом указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола; при этом указанная композиция может быть составлена в виде офтальмологического раствора, офтальмологической мази, офтальмологического промывочного раствора, внутриглазного раствора для инфузий, промывочного раствора для передней камеры глаза, принимаемых внутрь лекарственных средств, инъекции или консерванта для извлеченной роговой оболочки.

В других аспектах изобретение обеспечивает способ ингибирования или предупреждения агрегации белка. В различных аспектах способа белок представляет собой амилоид-образующий белок или белок, являющийся основной причиной заболевания с потерей функции (loss-of-function). В некоторых аспектах амилоид-образующий белок выбран из группы, состоящей из Hsp27, α A-кристаллина, α B-кристаллина, β B2-кристаллина, β V1-кристаллина, γ D-кристаллина, Hsp22, Hsp20, Тау-белка, альфа-синуклеина, амилина (островковый амилоидный полипептид, IAPP), бета-амилоида, прионного белка PrP, хантингтина, кальцитонина, атриального натрийуретического фактора, аполипротеина AI, сывороточного амилоида A, медины, пролактина, транстиретина, лизозима, бета-2-микроглобулина, гельсолина, кератоэпителина, цистатина, легких цепей иммуноглобулинов, вызывающих амилоидоз (AL) и S-IBM. В других аспектах белок, лежащий в основе заболевания с потерей функции (loss-of-function), выбран из группы, состоящей из мутантной β -глюкозидазы, трансмембранного рецептора муковисцидоза, гексозаминидазы A, гексозаминидазы B, β -галактозидазы и альфа-глюкозидазы.

В одном варианте осуществления данное изобретение раскрывает применение композиции для изготовления лекарственного средства для лечения и/или предупреждения нарушений зрения у субъекта, при этом указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола. Указанный субъект имеет нарушение зрения или имеет риск развития нарушения зрения, которое поражает нормальную структуру хрусталика глаза. Указанный субъект может быть выбран из группы, состоящей из земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих; при этом указанное млекопитающее может быть выбрано из группы, состоящей из грызунов, кошек, собак, свиней, лошадей и человека. В другом варианте осуществления указанное нарушение зрения выбрано из группы, состоящей из катаракты, врожденной катаракты, корковой катаракты, задней субкапсулярной катаракты, пресбиопии, ядерного склероза, дегенеративного заболевания сетчатки, болезни Рефсума, синдрома Смита-Лемли-Опитца (SLOS), кристаллической дистрофии роговицы Шнайдера (SCCD), друз, возрастной макулярной дегенерации и диабетической ретинопатии, и ланостерол ингибирует агрегацию белка кристаллина.

В еще другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает применение композиции для изготовления лекарственного средства для лечения катаракты или слепоты/нарушенного зрения у субъекта, при этом указанная композиция содержит фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола, при этом указанный ланостерол растворяет агрегат(ы) белка кристаллина хрусталика в глазу указанного субъекта, при этом белок кристаллин хрусталика представляет собой любой из α -кристаллина, β -кристаллина или γ -кристаллина. Указанная выше композиция может быть составлена в виде офтальмологического раствора, офтальмологической мази, офтальмологического промывочного раствора, внутриглазного раствора для инфузий, промывочного раствора для передней камеры глаза, принимаемых внутрь лекарственных средств, инъекции или консерванта для извлеченной роговой оболочки.

В еще другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способ растворения амилоидоподобных фибрилл белков кристаллинов, включающий стадию приведения в контакт амилоидоподобных фибрилл с ланостеролом в количестве и в течение времени, достаточных для растворения амилоидоподобных фибрилл белков кристаллинов, при этом способ может быть осуществлен *in situ*, *in vitro* или *in vivo*. Способ может быть осуществлен на субъекте, выбранном из группы, состоящей из земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих, при этом указанное млекопитающее может быть выбрано из группы, состоящей из грызунов, кошек, собак, свиней, лошадей и человека.

В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способ идентификации и/или лечения субъекта, имеющего риск развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу, включающий: а) анализ величины активности ланостеролсинтазы у субъекта; б) определение того, является ли величина активности ланостеролсинтазы меньше, чем величина активности у контрольной популяции без катаракты или слепоты/нарушенного зрения, при этом, если величина активности ланостеролсинтазы меньше величины активности у контрольной популяции, это свидетельствует о повышенном риске развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика; и с)

лечение субъекта с помощью ланостерола в количестве и в течение времени, эффективных для предупреждения или изменения образования агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента, осуществляя тем самым идентификацию и лечение субъекта, имеющего риск развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента.

В другом варианте осуществления данное изобретение раскрывает способ идентификации и/или лечения субъекта, имеющего риск развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента, включающий: а) определение того, являются ли оба аллеля гена ланостеролсинтазы пораженными мутацией, которая понижает экспрессию или активность ланостеролсинтазы, при этом присутствие мутации в обоих аллелях ланостеролсинтазы повышает риск развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента; и б) лечение субъекта ланостеролом в количестве и в течение времени, эффективных для предупреждения или изменения образования агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента, осуществляя тем самым идентификацию и лечение субъекта, имеющего риск развития катаракты или слепоты/нарушенного зрения, связанных с образованием агрегата(ов) белка кристаллина хрусталика в глазу у пациента. В одном варианте осуществления мутация в гене ланостеролсинтазы присутствует в кодоне 581, заменяющая триптофан (W) на аргинин (R), или в кодоне 588, заменяющая глицин (G) на серию (S).

В других вариантах осуществления в настоящем изобретении описаны стеролы и способы применения стеролов. Например, стеролы формулы I составлены в виде офтальмологических фармацевтических композиций, содержащих фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель, для ингибирования агрегации белка кристаллина. В определенных других вариантах осуществления в настоящем изобретении описаны способы применения стеролов формулы I для ингибирования агрегации белка кристаллина. В еще других вариантах осуществления соединения согласно изобретению способны изменять агрегацию белка кристаллина и ингибировать дальнейшую агрегацию белка кристаллина.

Способы лечения или предупреждения нарушений зрения

Настоящее изобретение обеспечивает офтальмологические фармацевтические композиции и способы применения настоящего изобретения для предупреждения и/или лечения нарушений зрения, которые поражают нормальную структуру хрусталика в глазу у субъекта, имеющего нарушения зрения или имеющего риск развития таких нарушений. Как описано в настоящем документе, нарушение зрения, которое поражает нормальную структуру хрусталика в глазу (называемое здесь выражением "нарушение зрения"), относится к состояниям, которые поражают структуру хрусталика таким образом, что вызывают зрительную дисфункцию, такую как изменения прозрачности или жесткости хрусталика глаза. Такие состояния включают катаракты, пресбиопию и склероз ядра. Кроме того, нарушения зрения относятся к дегенеративным изменениям сетчатки, таким как болезнь Рефсума, синдром Смита-Лемли-Опитца (SLOS) и кристаллическая дистрофия роговицы Шнайдера (SCCD), абетополипρωτεинемия и наследственная гипобеталипопротеинемия. В определенных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композиции и способы их применения для уменьшения или изменения агрегации белка кристаллина. В альтернативных вариантах осуществления предлагаются композиции и способы ингибирования, предупреждения и/или лечения нарушения внутри- или межбелковых взаимодействий, которые образуют макроструктуру, важную для прозрачности и индекса рефракции хрусталика.

Термин "катаракта", упоминаемый в настоящем изобретении, означает заболевание или состояние, при котором наблюдаются симптомы помутнения на поверхности и/или внутри хрусталика или набухания хрусталика, и включает врожденную и приобретенную катаракту (cf. PDR Staff, "PDR of Ophthalmic Medicines 2013", PDR Network, 2012). В некоторых вариантах осуществления катаракта представляет собой возрастную катаракту, диабетическую катаракту, катаракту, связанную с хирургической операцией, катаракту, возникшую после облучения, катаракту, возникшую в результате генетического заболевания, катаракту, возникшую в результате инфекции, или катаракту, возникшую в результате приема лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления индивидуум имеет наследственную форму катаракты с ранним началом. Конкретные примеры таких форм включают врожденную катаракту, такую как врожденная псевдокатаракта, врожденная мембранная катаракта, врожденная коронарная катаракта, врожденная слоистая катаракта, врожденная точечная катаракта и врожденная нитчатая катаракта; и приобретенную катаракту, такую как старческая катаракта, вторичная катаракта, бурая катаракта, осложненная катаракта, диабетическая катаракта, травматическая катаракта и другие формы, вызванные электрическим шоком, облучением, ультразвуковым воздействием, лекарственными средствами, системными заболеваниями и нарушениями питания. Кроме того, приобретенная катаракта включает послеоперационную катаракту с симптомами вызывания помутнения задней капсулы после замены хрусталика для лечения катаракты.

Ядерный склероз относится к состоянию, как правило, у взрослых животных, который также приводит к помутнению хрусталика. Это возрастное изменение плотности ядра хрусталика, вызванное уплотнением более старых волокон хрусталика в ядре в результате наслоения на них вновь образованных волокон.

Пресбиопия относится к состоянию зрения, при котором хрусталик глаза утрачивает гибкость, что затрудняет фокусирование глаза на объектах, расположенных на близком расстоянии.

В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает способ лечения или предупреждения нарушения зрения, при этом способ включает введение индивидууму, нуждающемуся в этом, эффективного количества композиции, содержащей соединение, имеющее структурную формулу I. В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой стерол, имеющий структурную формулу I.

Индивидуум, "нуждающийся в" лечении в соответствии с изобретением, представляет собой индивидуума, который страдает нарушением зрения, которое поражает нормальную функцию хрусталика в глазу. Например, индивидуум может иметь возрастную катаракту или катаракту, или иметь риск развития возрастной катаракты или катаракты. Индивидуумы, имеющие риск развития катаракты, включают, но без ограничения, индивидуумов с семейным анамнезом развития катаракты; индивидуумов с мутацией, связанной с катарактой; индивидуумов, подвергнутых облучению; имеющих диабет и т.п. Например, в одном аспекте у индивидуума диагностирована катаракта в одном глазу, и соединение вводят для предупреждения или замедления образования катаракты в контралатеральном глазу. Аналогичным образом, индивидуум, "нуждающийся в" лечении в соответствии с изобретением, представляет собой индивидуума, который может иметь пресбиопию или может иметь риск ее развития. Аналогичным образом, индивидуум, "нуждающийся в" лечении в соответствии с изобретением, представляет собой индивидуума, который имеет ядерный склероз или имеет риск его развития. Предпочтительно индивидуум представляет собой человека, однако животные, которые страдают заболеванием глаз или имеют риск их развития (животные, нуждающиеся в лечении), также могут быть идентифицированы специалистом в данной области. Могут быть идентифицированы млекопитающие, нуждающиеся в лечении, такие как кошки, собаки, свиньи, лошади, коровы и грызуны. Кроме того, животные, такие как птицы, рептилии, земноводные и рыба, которые нуждаются в лечении, могут быть идентифицированы.

"Лечение" нарушения зрения не требует 100% устранения или изменения нарушения зрения. В некоторых вариантах осуществления "лечение" нарушений зрения в соответствии со способом согласно изобретению ослабляет, ингибирует, предупреждает и/или изменяет дисфункцию хрусталика, например помутнение или негибкость хрусталика, например по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10% или по меньшей мере на около 20% по сравнению с уровнями, наблюдаемыми без применения композиции или способа согласно изобретению (например, у биологически сопоставимого контрольного субъекта или в образце, не подвергнутом воздействию композиции согласно изобретению или соединению согласно способу изобретения). В некоторых вариантах осуществления дисфункция (такая как образование катаракты, помутнение или агрегация кристаллина на поверхности или внутри хрусталика) уменьшается по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50% или по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или более (около 100%) по сравнению с дисфункцией хрусталика в отсутствие соединения согласно способу изобретения. Как правило, дисфункции хрусталика, такие как помутнение или катаракты, выявляют с использованием любого числа оптических тестов, включая, но без ограничения, тестирование остроты зрения, офтальмоскопию, осмотр глаза с помощью щелевой лампы, кератометрию, тонометрию, тестирование контрастности, тестирование чувствительности к яркому свету, получение карт волнового фронта.

Аналогичным образом, "предупреждение" не требует 100% ингибирования или сдерживания развития нарушения зрения. Например, любое снижение помутнения или мутности, или замедление прогрессирования катаракты представляет благоприятный биологический эффект у субъекта. Кроме того, например, любое уменьшение агрегации кристаллина в хрусталике глаза представляет благоприятный биологический эффект. В этом отношении изобретение обеспечивает уменьшение нарушения зрения, например, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10% или по меньшей мере на около 20% по сравнению с уровнями, наблюдаемыми без применения способа изобретения (например, у биологически сопоставимого контрольного субъекта или в образце, не подвергнутого воздействию соединения согласно способу изобретения). В некоторых вариантах осуществления нарушение зрения снижается по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50% или по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или более (около 100%).

Ингибирование, предупреждение или изменение дисфункции не требует 100% ингибирования, предупреждения, устранения или изменения. Например, любое ингибирование агрегации представляет благоприятный биологический эффект у субъекта. В этом отношении изобретение обеспечивает ингибирование нарушения зрения, которое поражает нормальную функцию хрусталика глаза у пациента, например, по меньшей мере на около 5%, по меньшей мере на около 10% или по меньшей мере на около 20% по сравнению с уровнями, наблюдаемыми без применения способа согласно изобретению (например, у биологически сопоставимого субъекта или в образце, не подвергнутого лечению соединением согласно способу изобретения). В некоторых вариантах осуществления обеспечено ингибирование, предупреждение и/или изменение нарушения зрения по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%,

по меньшей мере на около 50% или по меньшей мере на около 60%. В некоторых вариантах осуществления способ согласно изобретению обеспечивает ингибирование образования амилоида по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90% или более (около 100%) по сравнению с образованием амилоида при отсутствии соединения согласно способу изобретения.

"Эффективное количество" офтальмологической фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы I, представляет собой такое количество, которое ингибирует, предупреждает или изменяет дисфункцию хрусталика у индивидуума. Офтальмологическую фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению вводят субъекту, нуждающемуся в этом, в количестве, эффективном для лечения нарушения зрения. Используемое здесь "фармацевтически эффективное количество" означает дозу, которая ослабляет по меньшей мере один из признаков, симптомов или причин нарушения зрения, или обеспечивает любое другое желательное изменение биологической системы. В случае превентивных применений термин "профилактически эффективное количество" означает дозу, вводимую пациенту, подверженному или иным образом имеющему риск развития конкретного заболевания, которая может представлять собой дозу, такую же или отличающуюся от терапевтически эффективного количества. Эффективное количество композиции для конкретного индивидуума может зависеть от индивидуума, тяжести состояния индивидуума, типа применяемого препарата, частоты введения и продолжительности лечения. В соответствии с настоящим изобретением введение офтальмологического фармацевтического препарата согласно настоящему изобретению, такого как, например, ланостерол, даже при относительно низких концентрациях в жидких каплях, например, по меньшей мере 10^{-9} М, по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-8}$ М, по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-7}$ М, по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-6}$ М, по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-5}$ М, по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-4}$ М или по меньшей мере $0,5 \cdot 10^{-3}$ М, или любая концентрация, подпадающая в диапазон этих значений (например, от 10^{-9} до 10^{-3} М) может изменить такие нарушения зрения с помощью только одного, двух, трех или многократных ежедневных применений и делает это быстро.

Путь введения.

Специалистам в данной области будет понятно, что наиболее подходящий способ введения соединения субъекту зависит от ряда факторов. В различных вариантах осуществления соединение согласно изобретению локально местно в глаз, например местно, субконъюнктивально, ретробульбарно, периокулярно, субретинально, супрахориоидально или интраокулярно.

Фармацевтические композиции, которые являются особенно полезными для введения напрямую в глаз, включают водные растворы и/или суспензии, составленные в виде глазных капель и загущенных растворов и/или суспензий, составленных в виде офтальмологических гелей (включая гелеобразующие растворы) или мазей, которые представляют собой офтальмологический раствор, офтальмологическую мазь, офтальмологический промывочный раствор, внутриглазной раствор для инфузий, промывочный раствор для передней камеры глаза, принимаемые внутрь лекарственные средства, инъекцию или консервант для извлеченной роговой оболочки. Другие лекарственные формы для доставки офтальмологического лекарственного средства включают глазные вставки, интравитреальные инъекции и имплантаты. Инъекционные растворы можно напрямую вводить путем инъекции в роговую оболочку глаза, хрусталик и стекловидное тело или соседние с ним ткани с использованием тонкой иглы. Композиции можно также вводить в виде внутриглазного перфузата.

Дополнительные рассматриваемые способы введения включают, но без ограничения, один или несколько из следующих способов: пероральное (например, в виде таблетки, капсулы или в виде проглатываемого раствора), мукозальное (например, в виде назального спрея или аэрозоля для ингаляции), назальное, парентеральное (например, с помощью инъекционной формы, гастроинтестинальное, интраспинальное, интраперитонеальное, внутримышечное, внутривенное, внутриматочное, интрадермальное, интракраниальное, внутритрахеальное, внутривагинальное, интрацеребровентрикулярное, внутрицеребральное, подкожное, трансдермальное, ректальное, буккальное, эпидуральное и сублингвальное) введение.

В некоторых вариантах осуществления доставку композиции согласно изобретению в глаз осуществляют посредством контактных линз. Линзы могут быть предварительно обработаны желательным соединением. Альтернативно, линзы обеспечены в наборе, содержащем компоненты для приготовления покрытых линз, которые представлены в виде лиофилизированных порошков для восстановления или в виде концентрированных или готовых к применению растворов. Композиции могут быть обеспечены в виде наборов для однократного или многократного применения.

В некоторых вариантах осуществления доставку композиции согласно изобретению в глаз осуществляют посредством глазной палочки (Gwon et al., *Ophthalmology*. 1986 September; 93(9 Suppl):82-5). В некоторых вариантах осуществления доставку композиции согласно изобретению в глаз осуществляют посредством гидрогелевых интраокулярных линз (Garty et al., *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2011 Aug. 3; 52(9):6109-16).

Доза.

Композиция, содержащая соединение, обеспечена в терапевтически эффективном количестве, кото-

рое обеспечивает достижение желательного биологического эффекта с приемлемым с медицинской точки зрения уровнем токсичности. Доза композиций может различаться в зависимости от способа введения и тяжести заболевания. Доза может быть также отрегулирована в зависимости от массы тела, возраста, пола и/или степени симптомов каждого пациента, подлежащего лечению. Точная доза и способ введения будет возложена, в конечном счете, на усмотрение назначенного терапевта или ветеринара. Следует учесть, что может возникнуть необходимость в проведении стандартных корректировок дозы в зависимости от возраста и массы пациента, а также тяжести состояния, подлежащего лечению. Частота введения зависит от лекарственной формы и указанных выше параметров. Например, может быть желательно применять глазные капли по меньшей мере один раз в день, включая 2, 3, 4 или 5 раз в день.

Специалисты в данной области смогут легко определить оптимальные дозы, методологии дозирования и частоту повторений. Оптимальные дозы могут различаться в зависимости от относительной активности конкретной фармацевтической композиции и способа введения. Подходящие дозы, как правило, определяют исходя из величины ЕС₅₀ (эффективной концентрации для 50% тестируемой группы), которая, как было обнаружено, является эффективной в животных моделях *in vitro* и *in vivo*. Как правило, доза составляет от 0,01 мкг до 100 г на 1 кг массы тела и может вводиться один или более раз каждый день, каждую неделю, каждый месяц или каждый год, или даже один раз каждые 2-20 лет. Специалисты в данной области смогут легко определить частоту повторений дозирования исходя из измеренных величин времени удержания и концентрации лекарственного средства в физиологических жидкостях или тканях. После успешного лечения может оказаться желательным подвергнуть пациента поддерживающей терапии для предотвращения повторного возникновения болезненного состояния, при этом терапевтические композиции, описанные здесь, вводят в поддерживающих дозах, варьирующих от 0,01 мкг до 100 г на 1 кг массы тела, от одного или нескольких раз в день до одного раза каждый 20 лет. Иллюстративные дозы соединений для системного введения человеку (имеющему массу тела приблизительно 70 кг) составляют от 0,1 мг до 5 г, например от 1 мг до 2,5 г соединения на одну дозу.

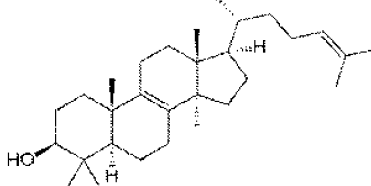
Предпочтительные концентрации соединения формулы I изменяются в диапазоне примерно от 1 до 500 мкг/мл, например около 1 мкг/мл, около 2 мкг/мл, около 3 мкг/мл, около 4 мкг/мл, около 5 мкг/мл, около 10 мкг/мл, около 20 мкг/мл, около 30 мкг/мл, около 40 мкг/мл, около 50 мкг/мл, около 60 мкг/мл, около 70 мкг/мл, около 80 мкг/мл, около 90 мкг/мл, около 100 мкг/мл, около 120 мкг/мл, около 140 мкг/мл, около 160 мкг/мл, около 180 мкг/мл, около 200 мкг/мл, около 250 мкг/мл, около 300 мкг/мл, около 350 мкг/мл, около 400 мкг/мл, около 450 мкг/мл или около 500 мкг/мл. Ингибитор может быть обеспечен в комбинации с другими фармацевтически активными агентами.

Фармацевтические композиции, описанные здесь, можно вводить в виде однократной дозы или в виде многократных доз; вводимых в виде отдельных терапевтических агентов или в комбинации с другими терапевтическими агентами; и в сочетании с общепринятыми терапиями, которые можно применять последовательно или одновременно. В одном варианте осуществления изобретения суточные дозы офтальмологических составов для терапии человека и/или животного составляют примерно 1 каплю на глаз, примерно 2 капли на глаз, примерно 3 капли на глаз, примерно 4 капли на глаз, примерно 5 капель на глаз, примерно 6 капель на глаз, примерно 7 капель на глаз, примерно 8 капель на глаз, примерно 9 капель на глаз, примерно 10 капель на глаз, примерно 11 капель на глаз, примерно 12 капель на глаз или более чем примерно 12 капель на глаз. В другом варианте осуществления изобретения режим ежедневного введения офтальмологических составов для лечения человека и/или животного составляет примерно 1 раз в день, примерно 2 раза в день, примерно 3 раза в день, примерно 4 раза в день, примерно 5 раз в день, примерно 6 раз в день, примерно 7 раз в день, примерно 8 раз в день, примерно 9 раз в день, примерно 10 раз в день, примерно 11 раз в день, примерно 12 раз в день или более 12 раз в день. Дозировки могут быть стандартизированы, например, с помощью стандартной фармакопейной медицинской капельницы с наружным диаметром 3 мм, которая при удерживании в вертикальном положении доставляет 20 капель воды общей массы 0,9-1,1 г при 25°C.

При введении согласно режиму дозирования, описанному выше, режим лечения у человека и/или животных может продолжаться в течение неопределенного времени или до тех пор, пока не будет наблюдаться дополнительное улучшение. Альтернативно, режим лечения может продолжаться в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 7 дней, 8 дней, 9 дней, 10 дней, 11 дней, 12 дней, 13 дней, 14 дней, 15 дней, 16 дней, 17 дней, 18 дней, 19 дней, 20 дней, 21 дня, 22 дней, 23 дней, 24 дней, 25 дней, 26 дней, 27 дней, 28 дней, 29 дней, 30 дней, 31 дня, 32 дней, 33 дней, 34 дней, 35 дней, 36 дней, 37 дней, 38 дней, 39 дней, 40 дней, 41 дня, 42 дней, 43 дней, 44 дней, 45 дней, 46 дней, 47 дней, 48 дней, 49 дней, 50 дней, 60 дней, 70 дней, 80 дней, 90 дней, 100 дней, 150 дней, 200 дней, 250 дней, 300 дней, 400 дней, 500 дней, 750 дней, 1000 дней или более 1000 дней.

Соединения, эффективные для лечения или предупреждения катаракты

В различных вариантах осуществления соединение предлагаемого способа или композиции представляет собой ланостерол, содержащий соединение формулы I



или пролекарство или фармацевтически приемлемую соль.

Например, соединение предлагаемого способа или композиции представляет собой ланостерол; его пролекарство или фармацевтически приемлемую соль. В одном варианте осуществления соединение представляет собой ланостерол. В другом варианте осуществления предполагается, что любое пролекарство или фармацевтически приемлемая соль указанного выше соединения находится в объеме изобретения.

Фармацевтические композиции

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции, содержащие одно или нескольких терапевтических соединений, могут быть изготовлены путем составления одного или нескольких из этих терапевтических соединений в фармацевтически приемлемом носителе. Используемый здесь "фармацевтически или терапевтически приемлемый носитель" относится к несущей среде, которая не влияет на эффективность биологической активности действующих ингредиентов и которая является нетоксичной для хозяина или пациента. Тип носителя, используемого в фармацевтическом препарате, будет зависеть от способа введения терапевтических соединений. Множество способов изготовления фармацевтических композиций для различных путей введения известно в данной области.

Используемый здесь "фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель" относится к фармацевтически приемлемому вспомогательному веществу, носителю, связывающему веществу и/или разбавителю для доставки соединения структурной формулы I напрямую или опосредованно в глаз, на поверхность глаза или вблизи глаза. Соответственно в изобретении, кроме того, предлагается композиция, содержащая соединение структурной формулы I и фармацевтически приемлемый офтальмологический носитель.

Необязательно композиция содержит свободную кислоту, свободное основание, соль (например, соль присоединения кислоты или основания), гидрат или пролекарство соединения структурной формулы I. Используемое здесь выражение "фармацевтически приемлемая соль" или "фармацевтически приемлемая кислота" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям или кислотам соответственно соединения формулы I. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую молекулу, которая стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль (или кислота) может иметь в своей структуре более одного заряженного атома. В случае если множество заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли (или кислоты), то такая соль (или кислота) может иметь множество противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль (кислота) может иметь один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

Иллюстративные соли включают, но без ограничения, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентисинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формат, безоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (то есть 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как ацетатный ион, сукцинатный ион или другой противоион.

Пролекарство представляет собой вещество, которое включает соединение структурной формулы I, ковалентно связанное с молекулой носителя. Молекула носителя может высвободиться из соединения структурной формулы I *in vitro* или *in vivo* с получением соединения структурной формулы I. Пролекарственные формы хорошо известны в данной области, как описано Sloan, K.B., Prodrugs, M. Dekker, New York, 1992 и Testa, B. and Mayer, J.M., Hydrolysis in drug and prodrug metabolism: chemistry, biochemistry, and enzymology, Wiley-VCH, Zurich, 2003.

В некоторых вариантах осуществления изобретения фармацевтические композиции получены путем растворения композиции согласно изобретению в подходящем растворителе. Подходящие растворители включают, но без ограничения, воду, солевой раствор (например, NaCl), буферные растворы, мази, гели или другие растворители. В определенных вариантах осуществления растворители являются стерильными.

Водные растворы и разбавители для суспензий, которые используют для приготовления глазных капель, могут включать дистиллированную воду, физиологический раствор и т.п. Эти фармацевтические

композиции могут быть составлены путем смешивания, разбавления или растворения соединения, необязательно с подходящими фармацевтическими добавками, такими как вспомогательные вещества, дезинтегрирующие вещества, связывающие вещества, смазывающие вещества, разбавители, буферы, антисептические вещества, увлажняющие вещества, эмульгаторы, дезинтегрирующие агенты, стабилизирующие агенты и растворяющие агенты в соответствии с общепринятыми способами, и составления общепринятым способом в зависимости от лекарственной формы. Неводные растворы и разбавители для суспензий могут включать пищевое (например, растительное) масло, жидкий парафин, минеральное масло, пропиленгликоль, п-октилдодеканол, полисорбат, макроголы, моностеарат алюминия, а также аналогичные растворители.

Различные добавки могут содержаться в глазных каплях, офтальмологических гелях и/или офтальмологических мазях по необходимости. Они могут включать дополнительные ингредиенты, добавки или носитель, подходящие для применения при контакте с поверхностью глаза или вокруг глаза без вызывания токсичности, несовместимости, нестабильности, раздражения, аллергической реакции и т.п. По необходимости, в состав могут быть добавлены добавки, такие как растворители, основания, адъюванты, суспендирующие агенты, загущающие агенты, эмульгирующие агенты, стабилизирующие агенты, буферные агенты, регулирующие изотоничность агенты, регулирующие pH агенты, хелатирующие агенты, успокаивающие средства, консерванты, корригирующие вещества, вкусовые агенты, окрашивающие вещества, вспомогательные вещества, связывающие вещества, смазывающие вещества, поверхностно-активные вещества, способствующие абсорбции вещества, диспергирующие вещества, консерванты, солюбилизующие вещества и т.п.

Например, глазные капли могут быть изготовлены путем растворения соединения в стерильной воде, в которой растворен поверхностно-активный агент, и необязательного добавления подходящих фармацевтических добавок, таких как консервант, стабилизирующий агент, буфер, антиоксидант и повышающий вязкость агент.

Например, буферные агенты добавляют для поддержания на постоянном уровне значения pH и могут включать фармацевтически приемлемые буферные агенты, такие как боратный буфер, цитратный буфер, тартратный буфер, фосфатный буфер, ацетатный буфер или Tris-HCl буфер (содержащий трис-(гидроксиметил)аминометан и HCl. Например, Tris-HCl буфер, имеющий pH 7,4, содержит 3 г/л трис-(гидроксиметил)аминометана и 0,76 г/л HCl. В еще другом аспекте буфер представляет собой 10× фосфатно-солевой буферный раствор ("PBS") или 5× раствор PBS. Буферные агенты включены в количестве, которое обеспечивает достаточную буферную емкость для предполагаемых физиологических условий.

Другие буферы включают, но без ограничения, буферы на основе HEPES (N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-{2-этансульфоновая кислота}), имеющие pK_a 7,5 при 25°C и pH в диапазоне примерно 6,8-8,2; BES (N,N-бис-(2-гидроксиэтил)-2-аминоэтансульфоновая кислота), имеющие pK_a 7,1 при 25°C и pH в диапазоне примерно 6,4-7,8; MOPS (3-(N-морфолино)пропансульфоновая кислота), имеющие pK_a 7,2 при 25°C и pH в диапазоне примерно 6,5-7,9; TES (N-трис-(гидроксиметил)метил-2-аминоэтансульфоновая кислота), имеющие pK_a 7,4 при 25°C и pH в диапазоне примерно 6,8-8,2; MOBS (4-(N-морфолино)бутансульфоновая кислота), имеющие pK_a 7,6 при 25°C и pH в диапазоне примерно 6,9-8,3; DIPSO (3-(N,N-бис-(2-гидроксиэтил)амино)-2-гидроксипропан), имеющие pK_a 7,52 при 25°C и pH в диапазоне примерно 7-8,2; TAPS ((2-гидрокси-3-(трис-(гидроксиметил)метиламино)-1-пропансульфоновая кислота)), имеющие pK_a 7,61 при 25°C и pH в диапазоне примерно 7-8,2; TABS (N-трис-(гидроксиметил)метил-4-аминобутансульфоновая кислота), имеющие pK_a 8,9 при 25°C и pH в диапазоне примерно 8,2-9,6; AMPSO (N-(1,1-диметил-2-гидроксиэтил)-3-амино-2-гидроксипропансульфоновая кислота), имеющие pK_a 9,0 при 25°C и pH в диапазоне примерно 8,3-9,7; CHES (2-циклогексиламино)этансульфоновая кислота), имеющие pK_a 9,5 при 25°C и pH в диапазоне примерно 8,6-10,0; CAPSO (3-(циклогексиламино)-2-гидрокси-1-пропансульфоновая кислота), имеющие pK_a 9,6 при 25°C и pH в диапазоне примерно 8,9-10,3; и CAPS (3-(циклогексиламино)-1-пропансульфоновая кислота), имеющие pK_a 10,4 при 25°C и pH в диапазоне примерно 9,7-11,1.

В дополнение к буферу в глазные капли могут быть добавлены изотонизирующие средства для того, чтобы сделать их изотоничными слезной жидкости. Изотонизирующие средства включают, но без ограничения, сахара, такие как декстроза, глюкоза, сахароза и фруктоза; сахарные спирты, такие как маннитол и сорбитол; многоатомные спирты, такие как глицерол, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль; и соли, такие как хлорид натрия, цитрат натрия, бензалкония хлорид, фединхлорид, хлорид калия, прокаинхлорид, хлорамфеникол и сукцинат натрия. Изотонизирующие агенты добавляют в количестве, которое делает осмотическое давление глазных капель равным осмотическому давлению слезы.

Консерванты могут быть добавлены для поддержания целостности глазной капли и/или офтальмологической мази. Примеры консервантов включают, но без ограничения, сорбиновую кислоту, бензалкония хлорид, бензододециния бромид, парабены, хлорбутанол, бензиловый спирт, фенилэтиловый спирт, динатрия эдентат, сорбиновую кислоту, поликватерниум-1 или другие агенты, известные специалистам в

данной области.

В некоторых вариантах осуществления загустители используют для повышения вязкости офтальмологических препаратов, таких как глазные капли, офтальмологические гели и/или офтальмологические мази. Загустители, которые могут быть использованы, включают, но без ограничения, глицерол, полиэтиленгликоль, карбоксиметилцеллюлозу и карбоксивинил-полимеры.

В дополнение к вышеуказанному, в некоторых вариантах осуществления желательно использовать дополнительные агенты, которые включают, но без ограничения, стабилизаторы, такие как сульфит натрия, карбонат натрия и пропиленгликоль; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, аскорбат натрия, бутилированный гидрокситолуол (БНТ), бутилированный гидроксианизол (БНА), токоферол, тиосульфат натрия; и/или хелатирующие агенты, такие как этилен-диамин-тетрауксусная кислота (EDTA), этиленгликоль-бис-(2-аминоэтил)-N,N,N,N-тетрауксусная кислота (EGTA) и цитрат натрия.

Глазные капли, офтальмологические гели и/или офтальмологические мази могут быть изготовлены путем асептической манипуляции или в альтернативном случае выполняют стерилизацию на соответствующей стадии изготовления. Например, стерильная фармацевтическая композиция может быть изготовлена путем смешивания стерильных ингредиентов асептически. Альтернативно, стерильная фармацевтическая композиция может быть изготовлена сначала путем смешивания ингредиентов, а затем стерилизации конечного препарата. Методы стерилизации могут включать, но без ограничения, тепловую стерилизацию, радиационную стерилизацию и стерилизующую фильтрацию.

Офтальмологические мази (глазные мази) могут быть асептически изготовлены путем примешивания активного ингредиента в основу, которую используют для изготовления глазных мазей, с последующим составлением в фармацевтические препараты с помощью любого способа, известного в данной области. Примерами типичных основ для глазных мазей являются вазелин, Jelene 50, Plastibase и макрогол. Кроме того, могут быть добавлены поверхностно-активные вещества для повышения гидрофильности.

Существует ряд эффективных способов для контролируемого высвобождения активного агента; смотри, например, работу Wagh V.D., Inamdar B., Samanta M.K., *Polymers used in ocular dosage form and drug delivery systems*. Asian J Pharm 2, 2008, 12-17 и ссылки на литературу, цитированные в ней, содержание которой включено здесь посредством ссылки. В частности, предусматривается применение полимеров (например, производные целлюлозы, такие как гидроксипропилметилцеллюлоза (HPMC) и гидроксипропилцеллюлоза (HPC), полиакриловая кислота (РАА), полиакрилаты, циклодекстрины и природные камеди, сложные полиортоэфиры (РОЕ) и мукоадгезивные полимеры); полутвердых веществ, таких как гели, пленки и другие вставки; смол, таких как ионообменные смолы; ионтофоретической доставки; и коллоидных частиц, таких как микросферы и наночастицы.

Соединения согласно настоящему изобретению могут быть также обеспечены в комбинации с другими терапевтическими агентами. В некоторых вариантах осуществления соединения согласно изобретению могут быть совместно составлены с другими активными агентами, включающими, но без ограничения, противомикробные агенты, антибиотики, противовирусные агенты, противогрибковые, антипротозойные агенты, противовоспалительные лекарственные средства, противоаллергические агенты, включая антигистамины, сосудосуживающие искусственные слезы, вазодилаторы, местные анестезирующие средства, анальгетики, понижающие внутриглазное давление агенты, иммунорегуляторы, антиоксиданты, витамины и минералы, ингибитор фермента или, в качестве альтернативы, протеазы и пептидазы, ингибитор цитокина и т.п.

В различных вариантах осуществления соединения согласно изобретению могут быть также обеспечены в комбинации с офтальмологическими терапевтическими средствами, выбранными из группы, состоящей из 0,5% Acular (офтальмологический раствор кеторолака трометамин), Acuvail (кеторолака трометамин), AK-Con-A (офтальмологический нафазолин), Akten (лидокаина гидрохлорид), Alamast, Alphagan (бримонидин), Alrex, Astepro (назальный спрей азеластина гидрохлорида), AzaSite (азитромицин), Bergeve (офтальмологический раствор бепотастина безилата), Besivance (офтальмологическая суспензия безифлоксацина), Betaxon, BSS стерильный ирригационный раствор, Cosopt, Durezol (дифлупреднат), Eylea (афлиберцепт), Lotemax, Lucentis (ранибизумаб), Lumigan (офтальмологический раствор биматопроста), Mascugen (пегапганиб), 0,3% Ocuflax (офтальмологический раствор офлоксацина), OcuHist, Ozurdex (дексаметазон), Quixin (левофлоксацин), 0,15% Rescula (офтальмологический раствор унопростона изопропила), Restasis (офтальмологическая эмульсия циклоспорины), таблетки Salagen, Travatan (офтальмологический раствор травопроста), Valcyte (валганцикловир HCl), Viroptic, Vistide (цидофовир), Visudyne (вертепорфин для инъекций), Vitrasert имплантат, Vitravene для инъекций, ZADITOR, Zioptan (офтальмологический раствор тафлупроста), Zirgan (офтальмологический гель ганцикловир), Zymaxid (офтальмологический раствор гатифлоксацина), атропин, флурбипрофен, физостигмин, азопт, гентамицин, пилокарпин, бацитрацин, гониозол, полимиксин В, бетадин, грамицидин, преднизолон, бетаксолол, гуморсол, пропаракан, бетоптик, хилартин, пропин, бринзоламид, гипертонический раствор NaCl, Pugalube, BSS, индоцианин зеленый, Rose Bengal, карбахол, итраконазол, гиалуронат натрия, цефазолин, латанопрост, супрофен, целлювикс, маннитол, террамицин, хлорамфеникол, метазоламид, тимолол, циклоксан, миконазол, тобрамицин, ципрофлоксацин, миостат, триамцинолон, косопт, муро-128, трифлуридин, декеариум, неомицин, тропикамид, дексаметазон, нептазан, тусопт, дипивефрин, оцуфлукс, вида-

рабин, дорзоламид, офлоксацин, Вира-А, эпинефрин, окситетрациклин, виброптиц, флуоресцеин, фенилэфрин и ксалатан.

Наборы.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к наборам для предупреждения и/или облегчения одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием глаз. Наборы могут включать один или несколько контейнеров, которые содержат одно или несколько описанных здесь терапевтических соединений. Соединения могут содержаться в контейнере в виде готовой к применению фармацевтической композиции или, в альтернативном случае, соединения могут содержаться в чистом виде без вспомогательных веществ. В таких вариантах осуществления набор может включать соединения в чистом виде, содержащиеся в контейнере отдельно от фармацевтически приемлемого носителя. Перед применением соединения разбавляют или иным образом смешивают с фармацевтически приемлемым носителем.

Некоторые варианты описанных здесь наборов также включают инструкции, в которых описан способ введения фармацевтической композиции, который обеспечивает ослабление одного или нескольких симптомов, связанных с заболеванием глаз, включающим, но без ограничения, дегенерацию сетчатки, пресбиопию, катаракту и/или ядерный склероз хрусталика глаза. В некоторых вариантах осуществления инструкции также содержат описание процедуры смешивания терапевтических соединений, содержащихся в наборе, с офтальмологическими фармацевтически приемлемыми носителями.

В некоторых вариантах осуществления изобретения контейнер, который содержит описанные здесь терапевтические соединения, представляет собой контейнер, используемый для офтальмологического введения. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой капельницу для введения глазных капель. В других вариантах осуществления контейнер представляет собой тубик для введения офтальмологического геля или офтальмологической мази.

Некоторые варианты осуществления настоящего изобретения дополнительно проиллюстрированы следующими примерами, которые не следует рассматривать как ограничивающие. Специалистам в данной области должно быть понятно, что методики, раскрытые в приведенных ниже примерах, представляют собой методики, разработанные авторами изобретения для успешного функционирования при практическом осуществлении изобретения и поэтому их можно рассматривать как предпочтительные способы для его практического осуществления. Однако из описания настоящего изобретения специалистам в данной области должно быть понятно, что в раскрытых конкретных вариантах осуществления могут быть произведены многие изменения и при этом получены сходные или аналогичные результаты без отступления от сущности и объема изобретения.

Устройства.

Некоторые варианты осуществления изобретения относятся к устройствам для введения субъекту стерола согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления устройства включают внутреннюю часть, полость или резервуар, в котором содержится стерол согласно изобретению, составленный в фармацевтически приемлемом носителе. В таких вариантах осуществления фармацевтические носители включают, но без ограничения, растворы, гели и мази. В некоторых вариантах осуществления внутренняя часть, полость или резервуар содержит один или несколько описанных здесь фармацевтических препаратов, содержащих стерол согласно изобретению.

В некоторых вариантах осуществления устройства, рассматриваемые здесь, также содержат аппликатор, который соединен с внутренней частью, полостью или резервуаром устройства. Аппликатор может иметь цилиндрическую, коническую или любую другую форму, которая обеспечивает возможность доставки фармацевтического препарата, содержащего стерол согласно изобретению, из внутренней части, полости или резервуара в глаз. В предпочтительном варианте осуществления аппликатор представляет собой конический цилиндр, в котором широкий конец соединен с внутренней частью, полостью или резервуаром, и конический конец образует выходное отверстие для прохождения фармацевтического препарата, содержащего стерол согласно изобретению, в глаз.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые здесь, имеют такое же значение, как и обычно понимаемое специалистом в данной области, к которой принадлежит настоящее изобретение. Хотя при практической реализации или испытании настоящего изобретения могут использоваться любые способы, устройства и материалы, подобные или эквивалентные тем, которые описаны здесь, ниже представлено описание предпочтительных способов, устройств и материалов.

Все указанные публикации включены здесь посредством ссылки для целей описания и раскрытия методик, которые описываются в этих публикациях и которые могли быть использованы в связи с описываемым здесь изобретением. Публикации, указанные выше и по всему тексту, приведены исключительно ввиду их раскрытия до даты подачи настоящей заявки. Ничто здесь не может рассматриваться как признание того, что авторы настоящего изобретения не полномочны относить к более ранней дате такое раскрытие в силу более раннего изобретения.

Следующие далее примеры предназначены для иллюстрации, но не ограничивают изобретение каким-либо образом по виду или форме, прямо или косвенно. В то время как указанные примеры являются типичными среди тех, которые можно использовать, альтернативно можно использовать другие проце-

дуры, методики или технологии, известные специалистам в данной области.

Пример 1.

Хрусталик глаза человека состоит преимущественно из белков кристаллинов, организованных в виде высокоупорядоченной взаимосвязанной макроструктуры, важной для прозрачности хрусталика и показателя преломления. Любое нарушение внутри- или межбелковых взаимодействий будет изменять эту чувствительную структуру, воздействуя на гидрофобные поверхности с последующей агрегацией белков и образованием катаракты. Катаракта является самой распространенной причиной слепоты во всем мире, поражая десятки миллионов людей, и в настоящее время единственным методом лечения является хирургическое удаление катарактальных хрусталиков. Конкретные механизмы, посредством которых белки хрусталика предотвращают агрегацию и поддерживают прозрачность хрусталика, остаются большей частью малоизученными. Хрусталик богат ланостеролом, который представляет собой амфипатическую молекулу. Ланостерол синтезируется ферментом ланостерол-синтазой (LSS) в ключевой реакции циклизации на пути синтеза холестерина. В настоящем документе идентифицировано две различные гомозиготные миссенс-мутации LSS (W581R и G588S) в двух семьях с обширной врожденной катарактой. Обе эти мутации поражают высококонсервативные аминокислотные остатки и ухудшают ключевые каталитические функции LSS. Сконструированная экспрессия LSS дикого типа, но не мутантного, предотвращает внутриклеточную агрегацию различных вызывающих катаракту мутантных белков кристаллинов. Лечение с помощью ланостерола, но не холестерина, значительно уменьшает предварительно образованные агрегаты белков *in vitro* и в экспериментах по трансфекции клеток. Кроме того, было показано, что лечение ланостеролом может уменьшить тяжесть катаракты и повысить прозрачность удаленных кроличьих катарактальных хрусталиков *in vitro* и тяжесть катаракты *in vivo* у собак. Исследование показало, что ланостерол является важной молекулой в отношении предотвращения агрегации белков хрусталика и указывает на новую стратегию предупреждения и лечения катаракты.

На долю катаракты приходится более половины всех случаев слепоты во всем мире, при этом единственным общепризнанным лечением является хирургическое удаление непрозрачного хрусталика. В развитых странах хирургические операции по удалению катаракты составляют значительную часть расходов на здравоохранение в силу высокой распространенности этого заболевания среди стареющего населения. Кроме того, существует значительная заболеваемость катарактой в развивающихся странах, в которых доступ к хирургической помощи является ограниченным.

Высокие концентрации белков кристаллинов в волокнах хрусталика способствуют прозрачности хрусталика и свойствам преломления². Суперсемейство кристаллина состоит из α -, β - и γ -кристаллинов, которые являются одними из наиболее высококонцентрированных внутриклеточных белков в организме человека. Агрегация белков является единственным наиболее важным фактором в формировании катаракты³. Факторы, которые приводят к агрегации белков, включают мутации в белках кристаллинов, которые, как известно, вызывают врожденные катаракты, или окислительный стресс, который, в свою очередь, способствует развитию возрастной катаракты. Однако полностью не изучены точные механизмы, посредством которых белки хрусталика поддерживают прозрачность или вызывают помутнение.

Ланостерол-синтаза (2,3-оксидосквален-ланостерол-циклаза, LSS; EC 5.4.99.7) кодируется геном LSS. Белок LSS катализирует превращение (S)-2,3-оксидосквалена в ланостерол, что представляет важную раннюю скорость-ограничивающую стадию в биосинтезе холестерина, стероидных гормонов и витамина D (ref. 4). Было обнаружено, что LSS экспрессируется в хрусталике⁵. Ранее сообщалось, что определенная комбинация гипоморфных мутаций на LSS и FDFT1 (фарнезилдифосфатфарнезилтрансфераза 1) может снижать уровни холестерина в хрусталике и вызывать катаракту у крыс линии Shumiyu cataract rats (SCR)⁶. В настоящем документе идентифицированы новые гомозиготные мутации в гене LSS в двух близкородственных семьях и исследована способность ланостерола уменьшать агрегацию белков и образование катаракты.

Идентифицировали троих детей с тяжелой врожденной катарактой из кровнородственной семьи европейского происхождения (фиг. 1a). Проводили полноэкзомное секвенирование при средней не менее чем 55-кратной глубине покрытия на целевой области (табл. 1a) для выявления каузальной мутации. В среднем 60,800-80,800 SNP было обнаружено в каждом экземе (табл. 1b). Использование кровнородственной рецессивной модели и фильтрации против распространенных вариантов (частота минорного аллеля 0,5%) в общедоступных базах данных, включая dbSNP и 1000 Genomes Project, а также прогнозирование функции мутации (прогнозирование с помощью SIFT⁷, Polyphen2⁸, PhyloP⁹ и Mutationtaster¹⁰) сузили потенциальные варианты кандидатных генов и идентифицировали вариант (G588S) в LSS на хромосоме 21 в качестве наиболее вероятного кандидата (табл. 1c). Три пораженных заболеванием ребенка были гомозиготными в отношении перехода GRA (GRch37/hg19: chr21:47615645; NM_001001438.2:c.1762GA, NM_001001438.1: p.G588S), тогда как непораженный заболеванием отец, мать и оставшийся ребенок были гетерозиготными в отношении этого изменения (фиг. 1a, b). Полногеномное генотипирование SNP выявило три длинные непрерывные гомозиготные области в этом семействе по HomozygosityMapper¹¹ (chr2:q22.1-q24.1, chr2:q31.1-q32.1 и chr21:q22.3; - фиг. 6a и табл. 1d). Ген LSS локализован в одной из гомозиготных областей на хромосоме 21 (фиг. 6B). Кроме того, проводили скрининг на наличие мутаций в гене LSS у 154 семей с врожденной катарактой и идентифицировали

другую гомозиготную мутацию, W581R (GRCh37/hg19: chr211:47615666; NM_001001438.2:c.1741T.C, NM_001001438.1: p.W581R) во второй кровнородственной семье (фиг. 1A-C). Эти две мутации отсутствовали у 11000 контрольных хромосом.

Аминокислотные остатки W581 и G588 в LSS являются высококонсервативными (фиг. 2A). Проводили анализ с использованием компьютерного моделирования для изучения эффектов мутаций W581R и G588S на 3D-структуру и функцию LSS. Согласно сообщениям, аминокислота триптофан в положении 581 положительно влияет на каталитический сайт активности циклазы¹². Мутант G588S моделировали путем замены с последующим уточнением боковой цепи. Уточнение боковой цепи S588 не решило вандерваальсово столкновение между боковой цепью серина и карбонилем основной цепи E578, который образует ключевой солевой мостик с R639. Необходимо, чтобы ориентация петли E579:C584 была изменена для размещения мутации. Боковая цепь мутанта S588 сталкивается с соседней петлей, что указывает на несовместимость мутации с нормальной ферментативной структурой и функцией LSS (фиг. 2B). Подтверждая результаты *in silico*, экспрессия LSS дикого типа в эксперименте по трансфекции клеток показала активность циклазы и значительно увеличила объем выработки ланостерола в липидной фракции в клетках HeLa, в то время как ни мутантный белок W581R, ни G588S не продемонстрировал какой-либо активности циклазы (фиг. 2C). Напротив, экспрессия LSS дикого типа или мутантного LSS не повлияла на уровень холестерина, что дает основание предположить вероятность существования альтернативного пути для гомеостаза холестерина. Мутации W581R и G588S не вызвали изменение внутриклеточной локализации или образование агрегатов белка LSS по сравнению с LSS дикого типа, на основании чего можно предположить, что фенотип катаракты не был обусловлен образованием светорассеивающих частиц самими мутантными белками LSS (фиг. 7). Агрегация кристаллинов, основных структурных белков в хрусталике, является доминирующей причиной различных типов катаракты³. Для имитации агрегации белков в катарактальном хрусталике шесть известных вызывающих катаракту мутантных белков кристаллинов экспрессировали в человеческих клетках-предшественниках хрусталика, эпителиальной линии хрусталика глаза человека B-3 (HLEB-3) или клетках HeLa. Эти мутантные кристаллины формировали р62-положительные тельца включения/агресомы во всех трех трансфицированных клеточных линиях, что дает основание предположить, что агрегация является внутренним свойством мутантных кристаллинов (фиг. 3A и 8 и 9)¹³. Совместная экспрессия LSS дикого типа и вызывающего катаракту мутантного белка кристаллина значительно снизила количество и размер агрегатов внутриклеточного кристаллина, в отличие от взятых в отдельности мутантов LSS (фиг. 3B, C и 8 и 9). Вестерн-блот-анализ показал, что мутант Y118D α A-кристаллина высвобождался из внутриклеточных агрегатов и становился более растворимым при использовании LSS дикого типа (фиг. 3D и фиг. 9C). Кроме того, добавление ланостерола, но не холестерина в культуральную среду клеток, совместно экспрессирующих мутант LSS и мутантный кристаллин, успешно снижало агрегацию кристаллина (фиг. 3C и 8 и 9). Этот результат указывает на то, что ланостерол, но не холестерол, может являться эффективным агентом для предотвращения агрегации мутантных белков кристаллинов.

В подтверждение этой гипотезы ланостерол значительно ингибировал образование агресом белков кристаллинов обоих типов, как дикого, так и мутантного, зависимым от концентрации образом, тогда как холестерол не имел такого эффекта (фиг. 3E, F и 10). Ланостерол, но не холестерол, увеличивал количество мутантных кристаллинов в растворимых фракциях клеточных лизатов (фиг. 3G и 11A). С использованием последовательной визуализации живых клеток, экспрессирующих GFP-слитый мутант Y118D α A-кристаллина, было показано, что добавление ланостерола может эффективно уменьшать агрегаты кристаллина с периодом полужизни 22268 мин (фиг. 3H), в то время как добавление DMSO или холестерола не снизило образование агресом (фиг. 11B). Наблюдение за перемещением одиночной частицы в живых клетках ясно показало, что ланостерол играет важную роль в диссоциации предварительно сформированных внутриклеточных агрегатов белков.

Для изучения того, имеет ли ланостерол прямой эффект на растворение агрегированных белков, агрегаты пяти кристаллинов дикого типа и девяти мутантных кристаллинов получали путем нагревания кристаллинов дикого типа и мутантных кристаллинов в присутствии 1 М гуанидинхлорида. В этих условиях все белки кристаллины формировали амилоидоподобные фибриллы, выявляемые по усилению флуоресценции тирофлавина Т (ThT), фибриллярным структурам по данным просвечивающей электронной микроскопии (ТЕМ) методом негативного окрашивания и низкому значению мутности (фиг. 4 и 11C). Морфология амилоидоподобных фибрилл, полученных здесь, была схожей с описанными ранее белками кристаллитами¹⁴. PBS-содержащие липосомы, образованные дипальмитоил фосфатидилхолином (DPPC), использовали для повышения растворимости соединений стеролов и имитации состояния стеролов в клеточных мембранах. Ланостерол, но не холестерол, успешно повторно растворял агрегированные белки кристаллины из амилоидоподобных фибрилл зависимым от концентрации образом, о чем свидетельствует исчезновение фибриллярных структур на негативно окрашенных снимках ТЕМ и снижение интенсивности флуоресценции ThT (фиг. 4 и 11D). Например, повторно растворенные α A-кристаллины могут быть идентифицированы на негативно окрашенных снимках ТЕМ, и их размер составил около 15 нм (фиг. 4A)¹⁵.

Для оценки эффекта ланостерола на уменьшение катаракты в тканях хрусталика природные катарактальные хрусталики кроликов изолировали и инкубировали в 25 мМ растворе ланостерола в течение 6 дней и сравнивали прозрачность хрусталиков до и после лечения ланостеролом. Наблюдалась сильная тенденция в сторону уменьшения тяжести катаракты, о чем свидетельствовало увеличение прозрачности хрусталиков ($P < 0,003$, Wilcoxon Test, фиг. 5A, B, табл. 2A и фиг. 12A, B). Дополнительно исследовали эффект ланостерола в отношении регресса катаракты у собак *in vivo*. Лечение ланостеролом значительно уменьшило тяжесть катаракты и повысило прозрачность хрусталика ($P < 0,009$, Wilcoxon Test, фиг. 5C, D; табл. 2B и фиг. 12C).

Гомозиготные мутации, поражающие каталитическую функцию LSS, вызывают обширную врожденную катаракту с тяжелой потерей зрения. Важная роль ланостерола в отношении предупреждения катаракты подтверждается наблюдением того, что линия крыс, несущая мутации соединения LSS, повторяет фенотип человека, больного катарактой⁶. В подтверждение этой точки зрения было обнаружено, что ингибирование LSS с помощью U18666A, ингибитора LSS (также известного как ингибитор оксидосквален-циклазы), вызывает катаракту¹⁶. Кроме того, лечение ланостеролом заметно снизило агрегацию белков в клеточной культуре, вызванную мутантными белками кристаллинами, при одновременном уменьшении тяжести предварительно образованной катаракты, увеличивая прозрачность хрусталика в животных моделях. Вполне возможно, что амфипатическая природа ланостерола позволяет ему интеркалировать внутрь и покрывать гидрофобные области ядра крупных белковых агрегатов, обеспечивая их эффективное постепенное растворение в воде.

Таким образом, ланостерол играет важную роль в ингибировании агрегации белков хрусталика и снижении образования катаракты, представляя новую стратегию для предупреждения и лечения катаракты. Катаракта является ведущей причиной слепоты и миллионы пациентов каждый год подвергаются хирургической операции по удалению катаракты для удаления помутневшего хрусталика. Хирургическая операция, несмотря на свою успешность, связана с осложнениями и патологическими нарушениями. Поэтому фармакологическое лечение, вызывающее регресс катаракты, может иметь большое влияние на здоровье и экономику. Кроме того, результаты, полученные авторами настоящего изобретения, могут иметь более широкое применение для лечения заболеваний, связанных с агрегацией белков, в том числе нейродегенеративных заболеваний и диабета, которые вместе являются основной причиной заболеваемости и смертности среди пожилых людей, путем проведения исследования с использованием малых молекул, таких как продемонстрированный здесь подход.

Способы.

Участники исследования.

Все участники прошли стандартные полные офтальмологические осмотры и визуализирующие исследования. Демографические данные, факторы риска, а также образцы крови собирали во время первого визита. Для участия в исследовании была принята кровнородственная семья, состоящая из двух взрослых и четырех детей. Родители были двоюродными братьями, и у троих из четырех детей была диагностирована дегенерация сетчатки и катаракта (фиг. 1A). Проводили скрининг на мутации LSS у дополнительных 154 членов родословной с врожденной катарактой и идентифицировали еще одну семью с гомозиготной мутацией W581R.

Захват и секвенирование экзона.

Захват экзона осуществляли с использованием набора Agilent SureSelect Human All Exon Kit (в растворе) в соответствии с протоколами производителя. Вкратце, образцы геномной ДНК фрагментировали случайным образом с использованием Covaris с максимальным размером конечных фрагментов 150-200 пар оснований, и к обоим концам фрагментов лигировали адаптеры. Темплаты с лигированными адаптерами очищали на парамагнитных частицах (SPRI) Agencourt AMPure и вырезали фрагменты с размером вставки ~ 250 пар оснований. Извлеченную ДНК амплифицировали с помощью PCR, опосредованной лигированием, очищали и гибридизовали с SureSelect Biotinylated RNA Library (BAITS) для обогащения. Гибридизованные фрагменты были захвачены стрептавидиновыми шариками, тогда как негибридизованные фрагменты вымывались через 24 ч. Захваченные продукты PCR, опосредованной лигированием, анализировали при помощи биоанализатора Agilent 2100 Bioanalyzer для оценки величины обогащения. Каждую захваченную библиотеку затем загружали на Genome Analyzer II на платформе Illumina и секвенирование спаренных концов выполняли с длиной чтения 90 пар оснований, что обеспечило среднюю глубину покрытия по меньшей мере 50× для каждого образца. Исходные файлы изображений обрабатывали с помощью программного обеспечения на базе Illumina с параметрами по умолчанию.

Картирование прочтений и детекция вариантов.

Чтения последовательностей у каждого индивида выравнивали на референсный геном человека (NCBI сборка 37, hg19) с помощью программы BWA¹⁷ (версия 0.5.9 - r16). BAM-файлы, созданные с помощью BWA, затем обрабатывали с использованием GATK¹⁸ GATK¹⁸ Best Practice Pipeline с помощью Genome Analysis ToolKit (версия 2.8 GATK) для повторного выравнивания и детекции вариаций (SNV и Indel). Вариации, которые прошли критерии фильтрации VQSR, были извлечены для последующих анализов.

Консенсусные генотипы в целевых областях были названы с помощью SOApsnp (v1.03) и BWA

(версия 0.5.9-r16) с рекомендуемыми параметрами. Консенсусный генотип с подобным Phred качеством, равным по меньшей мере 20, и глубиной покрытия по меньшей мере 4× рассматривался как генотип с высокой степенью достоверности. Генотипы, которые отличались от референсного, извлекали в качестве кандидатных SNP, и результаты SNP фильтровали следующим образом: Phred-подобное качество SNP >20, общая глубина от 4× до 200×, предполагаемое число копий <2 и расстояние между двумя соседними SNP не менее 5 пар оснований.

Функциональная аннотация генетических вариантов.

Варианты функционально аннотировали с использованием ANNOVAR и подразделяли на миссенс-мутации, нонсенс-мутации, мутации "read-through" и мутации сайта сплайсинга, которые, вероятно, будут пагубными по сравнению с синонимичными и некодирующими мутациями. На основании этих аннотаций варианты фильтровали сначала на несинонимичный акцепторный сайт и донорный сайт сплайсинга, а затем фильтровали против доступных публичных баз данных (базы данных dbSNP129 и 1000 Genome variants). Варианты, которые были определены как гомозиготные мутации у трех пораженных заболеванием субъектов и гетерозиготные мутации у носителей (родители), но отсутствовали в общедоступных базах данных, рассматривались как кандидатные казуальные варианты.

Скрининг мутаций LSS и гена.

Секвенирование ДНК по Сэнгеру проводили для проверки мутации G588S в LSS. 22 экзона гена LSS амплифицировали с помощью PCR и секвенировали на генетическом анализаторе Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems). Праймеры, используемые для амплификации экзонов в LSS, представлены в табл. 3А. Проводили скрининг на мутации в гене LSS в 154 семьях с врожденной катарактой и идентифицировали другую гомозиготную мутацию, W581R, во второй кровнородственной семье. Эти две мутации отсутствовали в 11000 контрольных хромосомах, включая 2000 хромосом от непораженной заболеванием контрольной популяции в Сан-Диего и 1000 Genomes Project, и 8000 хромосом из базы данных по секвенированию экзонов University of Washington. В связи с предыдущим сообщением о том, что мутация FDFT1 модифицирует фенотипы катаракты, подвергали скринингу варианты в гене FDFT1, выявив только один общий несинонимичный вариант rs4731 (GRCh37/hg19: chr8:11666337; NM_001287742.1:c.134A.G,NM_001274671.1:p.K45R). Вариант был исключен в качестве казуальной мутации, так как не пораженная заболеванием дочь несла такое же гомозиготное изменение, и относительно высокая частота общей популяции имеет этот вариант (частота минорных аллелей 0,4% в базе данных 1000 Genome Project) (табл. 1Е).

3D-моделирование мутации G588S.

Модель мутанта G588S конструировали из двух структур, как описано Ruf et al.²⁰, и вносили в базу данных Protein Data Bank в виде записей 1W6K и 1W6J¹². Координаты, полученные методом рентгеноструктурного анализа, использовали для построения полноатомной модели фермента и уточняли с помощью программы Internal Coordinate Mechanics program (ICM) и протокола преобразования в PDB.²¹ Для анализа индуцированного мутацией G588S эффекта на связывание ланостерола анализировали все боковые цепи, вовлеченные в карман фермента, взаимодействующего с ланостеролом, с использованием структуры 1W6K. Области контакта рассчитывали как разность между доступной для растворителя областью остатка с ланостеролом и без него, и сортировали по размеру с помощью программы ICM.²²

Конструкции плазмид и сайт-направленный мутагенез.

Клон, содержащий кДНК LSS, получали от фирмы Thermo Scientific Inc. Кодировующую последовательность LSS дикого типа клонировали и встраивали в плазмиду pcDNA3.1-N-Flag (Invitrogen). Эти мутанты конструировали посредством сайт-направленного мутагенеза методом PCR с перекрывающимися расширениями. Обычные праймеры PCR представляли собой следующие: прямой праймер NdeI, 59-CATATGACGG AGGGCACGTGTCT-39, и обратный праймер XhoI, 59-CTCGAGTCAGGGGTGGCCA GCAAG-39. Праймеры для конструирования мутантов W581R и G588S представляли собой следующие: прямой праймер W581R, 59-TGGGAAGGCTCCCGGGGAGTTTGCT-39; обратный праймер 59-GTGAAGCAAACCTCCCCGGGAGCCTTC-39; прямой праймер G588S, 59-GCTTCACCTACAGCACCTGGTTTG-39; обратный праймер G588S, 59-CCAAACCAGGTGCTGTAGGTGAAG-39. Рекombинантные плазмиды pcDNA3.1-N-Flag, содержащие гены LSS дикого типа или мутировавшие гены LSS, трансформировали в клетки E. coli DH5a. кДНК aA-, aB-, bB2-, cC- и cD-кристаллина клонировали из тотальной кДНК человеческого хрусталика, как описано ранее.²³⁻²⁶ Мутанты конструировали путем сайт-направленного мутагенеза с использованием праймеров, указанных в табл. 3В. Амплифицированные фрагменты расщепляли с помощью XhoI и BamHI, а затем вставляли в эукариотический экспрессионный вектор pEGFP-N1 или прокариотический экспрессионный вектор pET28a. Плазмиды получали с использованием набора Plasmid Maxiprep kit (Vigorous) и подтверждали с помощью секвенирования ДНК. Конструкции генов кристаллинов получали в виде C-концевого гибридного белка EGFP, тогда как LSS получали в виде N-концевого Flag-меченого белка.

Клеточная культура и трансфекция.

Клетки HeLa и эпителиальные клетки В-3 хрусталика глаза человека (HLEB-3) получали из Американской коллекции типовых культур (ATCC). Клетки-предшественники человеческого хрусталика выде-

ляли из фетального человеческого глаза.²⁷ Клетки HeLa культивировали в среде DMEM, содержащей 10% FBS (Gibco). Клетки HLEB-3 культивировали в среде F12 с 20% FBS, тогда как клетки-предшественники человеческого хрусталика культивировали в среде MEM, содержащей 20% FBS и 10 мг/мл FGF (Gibco). Все клетки культивировали в инкубаторе при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. Тестирование клеток стандартным способом на заражение микоплазмами показал отрицательный результат.

Для оценки эффекта экспрессии LSS на содержание стерола клетки HeLa трансфицировали LSS дикого типа или мутантами LSS, слитыми с Flag-меткой на N-конце кодирующей области. Клетки собирали через 24 ч после трансфекции и липидную фракцию экстрагировали для анализа методом LC-MS. Клетки, трансфицированные плазмидным вектором pcDNA3.1-N-Flag, использовали в качестве контроля. Уровни экспрессии LSS дикого типа и мутантного LSS нормализовали с помощью Вестерн-блот-анализа с использованием мышиных антител против Flag (F1804; Sigma-Aldrich) и мышиных антител против актина (BS6007M; Bioworld Technology).

Для оценки эффекта ланостерола на агрегацию кристаллинов клетки-предшественники человеческого хрусталика совместно трансфицировали LSS и различными конструкциями кристаллинов в течение 4 ч. В качестве контроля использовали клетки, совместно трансфицированные мутантами кристаллинов и pcDNA3.1-N-Flag. Клетки-предшественники человеческого хрусталика, совместно трансфицированные LSS и конструкциями мутантов кристаллинов, культивировали в течение 12 ч перед проведением анализа на образование агрегатов. Эксперименты проводили через 16 ч путем добавления 40 мМ стеролов (ланостерола или холестерина, Sigma-Aldrich) в клеточную культуральную среду в течение 2 ч, которую затем заменяли свежей культуральной средой, и клетки культивировали в течение 24 ч. Процентное содержание клеток с агрегатами кристаллинов рассчитывали из десяти произвольно выбранных полей обзора. Рассчитывали значения для группы LSS дикого типа, группы мутанта и группы мутанта плюс ланостерол. В качестве контрольной группы использовали клетки, обработанные 1% DMSO.

Влияние LSS и ланостерола на агрегацию внутриклеточного кристаллина оценивали в исследованиях, в которых группа лечения была неизвестна наблюдателю. Эксперименты повторяли по меньшей мере три раза. Р-величины рассчитывали с использованием критерия Стьюдента. Флуоресцентная микроскопия. Равные количества клеток-предшественников человеческого хрусталика, клеток HLEB-3 или HeLa высевали на покровные стекла, предварительно обработанные TC (Solarbio). После культивирования в течение 24 ч до достижения 90% конфлюэнтности клетки трансфицировали плазмидами, содержащими различные гены LSS или кристаллинов, или совместно трансфицировали плазмидами, содержащими определенный ген кристаллина, и генами, содержащими ген LSS дикого типа или мутантного LSS. В качестве контрольной группы использовали клетки, трансфицированные плазмидами, содержащими реGFP-N1 и/или pcDNA3.1-N-Flag. Трансфекцию и совместную трансфекцию выполняли с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen) в соответствии с инструкциями производителя.

Эффект LSS дикого типа или мутантного LSS на внутриклеточную агрегацию различных вызывающих катаракту мутантов кристаллинов оценивали по совместной экспрессии Flag-LSS и кристаллин-GFP в клетках-предшественниках человеческого хрусталика, клетках HLEB-3 или клетках HeLa. Внутриклеточные распределения белков визуализировали с использованием белка GFP или антитела против Flag. После совместной трансфекции в течение 4 ч клетки культивировали в свежей среде в течение 24 ч, а затем анализировали с помощью микроскопии.

Эффект ланостерола или холестерина на формирование агресом различных кристаллинов изучали путем трансфекции клеток плазмидами, содержащими различные гены кристаллинов. Клетки инкубировали в течение 24 ч для обеспечения эффективной экспрессии белка и формирования агресом. Затем клетки обрабатывали 0-40 мМ стеролами в 1% (для клеток-предшественников человеческого хрусталика) или 2% DMSO (для клеток HeLa). В качестве контроля использовали клетки, обработанные 1 или 2% DMSO. После обработки в течение 2 ч среду заменяли свежей средой. Через 12 ч клетки использовали для микроскопического анализа.

Образцы для проведения микроскопического анализа готовили путем промывки покровных стекол три раза фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Клетки фиксировали 4% параформальдегидом в течение 40 мин, а затем снова три раза промывали PBS. Клетки пермеабилizировали в 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 10 мин и блокировали 5% нормальной козьей сывороткой в PBS в течение 1 ч при 37°C. Иммуноокрашивание осуществляли путем добавления мышиного антитела против Flag (1:500) или мышиного антитела против p62 (1:200, ab56416; Abcam) в буфере PBS, содержащем 5% нормальную козью сыворотку, и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем покровные стекла промывали три раза PBS, а затем инкубировали с Alexa 649-конъюгированным козьим антителом против мышиного IgG (1:250) в течение 1 ч при комнатной температуре. Ядра подкрашивали красителем Hoechst 33342 (Invitrogen). Приготовленные клетки анализировали с использованием конфокального микроскопа Carl Zeiss LSM 710.

Визуализация живых клеток.

Клетки-предшественники человеческого хрусталика трансфицировали плазмидами, содержащими мутант α A-кристаллина (Y118D). После трансфекции в течение 24 ч клетки со стабильной экспрессией

мутанта α A-кристаллина (Y118D) подвергали скринингу путем инкубации в культуральной среде, содержащей 0,8 мг/мл G418 в течение 7 дней. Затем полученные клетки высевали на чашки для клеточных культур со стеклянным дном (In Vitro Scientific) и в течение 4 ч обрабатывали 1% DMSO, 40 мМ холестерином в 1% DMSO или 40 мМ ланостеролом в 1% DMSO. Добавляли свежую культуральную среду и клетки анализировали путем последовательной визуализации живых клеток. Изображения живых клеток изучали с помощью микроскопа Olympus IX81 и фиксировали с помощью программного обеспечения CellSens Dimension software (Olympus). Количественный анализ размера агрегатов проводили путем измерения интенсивности флуоресценции р62-положительных агрегатов путем наблюдения за перемещением одиночной частицы при визуализации живых клеток. Визуализацию живых клеток проводили с использованием трех биологических повторов с 1-8 повторениями каждого.

Экстракция липидов из клеток.

Экстракцию липидов выполняли по методу Блайя и Дайера.²⁸ Вкратце, $\sim 1 \times 10^6$ - 10^7 клеток HeLa промывали 3-5 раз PBS, а затем соскребали в 400 мл ледяного метанола и переносили в пробирку типа Эппендорф 1,5 мл с добавлением 200 мл хлороформа. Образцы перемешивали на вортексе в течение 1 мин, а затем смешивали с 300 мл 1 М KCl. Органическую и водную фазы разделяли микроцентрифугированием при $20817 \times g$ в течение 5 мин при 4°C. После разделения нижнюю органическую фазу собирали. Затем оставшуюся водную фазу повторно дважды экстрагировали с использованием 300 мл хлороформа. Собранные органические фазы сушили с использованием концентратора образцов SpeedVac под вакуумом. Высушенные образцы хранили при 280°C для последующего анализа методом LC-MS.

Анализ LC-MS.

Высушенные экстракты липидов повторно суспендировали в 100 мл метанола. Образцы перемешивали на вортексе в течение 10 мин, подвергали воздействию ультразвука мощностью 80 Вт в течение 30 мин, микроцентрифугировали при 20817g в течение 10 мин, а затем супернатант переносили в новую пробирку типа Эппендорф. Обработку путем микроцентрифугирования повторяли три раза. Полученные образцы анализировали при помощи жидкостного хромато-масс-спектрометра с тройным квадруполом Agilent 1290/6460 LC/MS с использованием альтернативного источника Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI). Липиды разделяли с использованием колонки Agilent SB-C18. Выборочный ионный мониторинг выполняли с использованием режима ионизации электронами. В качестве контролей использовали ланостерол и холестерол высокой чистоты. Определение методом MS проводили в следующих условиях: температура газа 350°C, скорость потока газа 4 л/мин, давлении на распылителе 60 фунт/кв.дюйм, температура испарителя 350°C, напряжение на капилляре 3500 В и ток короны 4 мА. Для оптимизации чувствительности и специфичности выбирали два характеристических иона для анализа методом MS каждого соединения (369,3/161,1 и 369,3/147 для холестерина и 409,2/191,3 и 409,2/109 для ланостерола). Вестерн-блоттинг. Клеточные лизаты готовили в буфере RIPA, содержащем 50 мМ Tris (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1 мМ EDTA, 0,5% деоксихолата натрия и 0,1% SDS. Супернатант и осажденные фракции разделяли путем центрифугирования. Белки разделяли в 12,5% SDS-PAGE и переносили на PVDF мембрану (GE Healthcare). Мышиные антитела против Flag (F1804; Sigma-Aldrich) или GFP (MB2005; Bioworld Technology) использовали для идентификации сверхэкспрессированных белков LSS и кристаллинов соответственно. Количественную оценку полос на вестерн-блотах осуществляли с использованием программного обеспечения GELPRO (Media Cybernetics). Представленные количественные показатели рассчитывали из трех независимых экспериментов.

Экспрессия и очистка белков.

Рекомбинантные His-меченые белки дикого типа и мутантные белки b- и c-кристаллинов сверхэкспрессировали в клетках *Escherichia coli* и очищали с помощью аффинной хроматографии с использованием колонки Ni-NTA с последующей гель-фильтрационной хроматографией с использованием такого же протокола, который описан в литературе^{23,24,26, 29}. Сверхэкспрессию и очистку немеченых α A- и α B-кристаллинов выполняли, как описано ранее³⁰. Чистота белков предположительно составила выше 95%, оцененная по одной однородной полосе на 12,5% SDS-PAGE, 10% Native-PAGE и одиночному пику в профиле эксклюзионной хроматографии. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорда с использованием в качестве стандарта бычьего сывороточного альбумина (BSA)³¹. Все образцы белков готовили в 20 мМ буфере PBS, содержащем 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA и 1 мМ DTT.

Агрегация белков и диссоциация агрегатов.

Агрегаты белков α A- и α B-кристаллинов дикого типа и мутантных белков α A- и α B-кристаллинов получали путем нагревания в течение 2 ч при 60°C растворов белков при концентрации 5 мг/мл, содержащих 1 М гуанидинхлорид (сверхчистый, Sigma-Aldrich). Агрегаты b- и c-кристаллинов дикого типа и мутантных b- и c-кристаллинов готовили путем нагревания растворов белков, содержащих 1 М гуанидинхлорид, при 37°C в течение 48 ч. Образование агрегатов подтверждали по флуоресценции ThT, мутности (поглощение при 400 нм) и по данным наблюдений с помощью просвечивающего электронного микроскопа (TEM). Предварительно образованные агрегаты ресуспендировали в 20 мМ PBS при конечной концентрации 0,2 мг/мл (приблизительно 10 мМ). Ресуспендированные агрегаты обрабатывали 500 мМ ланостеролом или холестерином в липосомах, образованных 500 мМ DPPC (Sigma-Aldrich), при

37°C. Агрегаты, обработанные 500 мМ DPPC-липосомами, использовали в качестве отрицательного контроля. Через 24 ч после обработки растворы белков использовали для наблюдения ThT-флуоресценции, мутности и негативного окрашивания, наблюдаемого с помощью просвечивающего электронного микроскопа (ТЕМ). Образцы для ТЕМ готовили путем осаждения растворов белков на свежее обработанную тлеющим разрядом медную сетку с углеродным покрытием. Негативно окрашенные образцы получали путем окрашивания сетки 1,25% уранилацетатом в течение 30 с. Негативно окрашенные изображения ТЕМ получали на электронном трансмиссионном микроскопе Hitachi H-7650В при напряжении 120 кВ и увеличении 48000.

Лечение кроличьих катарактальных хрусталиков.

Кроликов умерщвляли путем ингаляции CO₂ и хрусталики немедленно вырезали и обрабатывали носителем или ланостеролом, растворенным в носителе для получения 25 мМ растворов. Ткани хрусталиков инкубировали в этих растворах в течение 6 дней в темноте при комнатной температуре. Катаракту исследовали под микроскопом и фотографировали. Оценку степени катаракты проводил исследователь, не посвященный в детали исследования, с использованием ранее описанной оценочной шкалы помутнения, показанной ниже^{32,33}. Улучшение прозрачности и транспарентности хрусталиков количественно оценивали путем визуального осмотра и с помощью оценочной шкалы. Прозрачность хрусталиков оценивали по пропусканию света, четкости изображения сетки под хрусталиком (рис. 12), а также улучшению общей прозрачности хрусталика или улучшению прозрачности локальных областей кортикальной катаракты. Для оценки эффекта лечения использовали критерий Уилкоксона.

Система классификации катаракты.

Степень 0: отсутствие помутнения (хорошо видимые линии решетки); N степень 1: легкая степень помутнения (минимальное помутнение линий решетки, все еще видимыми линиями решетки); N степень 2: присутствие диффузного помутнения, затрагивающего почти весь хрусталик (умеренное помутнение линий решетки, с видимыми основными линиями решетки); N степень 3: присутствие обширного толстого помутнения, затрагивающего весь хрусталик (тотальное помутнение линий решетки, с отсутствием видимых линий решетки).

Получение наночастиц, нагруженных лекарственным средством.

Ланостерол нагружали в липид-полимерную гибридную наночастицу с использованием адаптированного метода наноосаждения³⁴. Вкратце, требуемую концентрацию ланостерола смешивали с полимером поликапролактоном (PCL), растворенным в ацетонитриле. Лецитин и 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфозтаноламин-N-карбокси (полиэтиленгликоль) 2000 (DSPE-PEG-COOH) растворяли в 4%-ном водном растворе этанола при 20% от массы полимера PCL и нагревали выше 60°C. Затем раствор ланостерола в PCL добавляли в предварительно нагретый раствор липидов при осторожном перемешивании с последующим интенсивным перемешиванием в течение 3 мин. Затем полученный раствор перемешивали в течение 2 ч для обеспечения формирования наночастиц и испарения ацетонитрила. Затем раствор наночастиц промывали три раза с использованием устройства для ультрафильтрации Amicon Ultra-4 (Millipore) с порогом отсеивания по молекулярной массе 10 кДа для удаления остатков органического растворителя и свободных молекул. Полученные наночастицы затем ресуспендировали в PBS буфере для последующего использования. Размер, распределение по размерам и поверхностный зета-потенциал нагруженных лекарственным средством наночастиц характеризовали с помощью динамического рассеяния света. Предельную нагрузку ланостерола количественно определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Лечение катарактальных хрусталиков у собак.

Для оценки эффекта лечения ланостеролом на катаракту у живых животных собак предварительно лечили путем внутримышечных инъекций ацепромаксина и буторфанолола. Через 20 мин проводили анестезию путем внутривенного введения пропофола. Затем собак немедленно интубировали и поддерживали на кислороде и 2% изофлуране при 2 л/мин. Нагруженные ланостеролом (100 мг) наночастицы сначала вводили в полость стекловидного тела испытуемого глаза с использованием иглы 28 калибра, а затем каждые 3 дня в течение всего периода эксперимента. Подлежащие лечению глаза и имитационные глаза рандомизировали. В контрольный глаз инъецировали пустые наночастицы носители в качестве отрицательного контроля. Подлежащие лечению глаза обрабатывали ланостеролом в форме глазных капель (смотри ниже состав глазных капель). Одну каплю ланостерола объемом 50 мкл вводили ежедневно три раза в день в испытуемый глаз в течение 6 недель. Степень тяжести катаракты исследовали с помощью щелевой лампы и фотографировали в начале и в конце 6-недельного периода лечения. Перед проведением обследования зрачки расширяли с помощью 1% тропикамида и 10% фенилэфрина. Степень тяжести катаракты оценивал исследователь, не владеющий полной информацией о проводимом исследовании, на основании стадии катаракты у собак, как показано ниже³⁵. Количественно оценивали улучшения прозрачности и транспарентности хрусталиков. Критерий Уилкоксона использовали для оценки эффекта лечения.

Система классификации катаракты у собак.

Степень 0: отсутствие помутнения (катаракта отсутствует); N степень 1: легкая степень помутнения

(начальная стадия); N степень 2: присутствие диффузного помутнения, затрагивающего почти весь хрусталик (незрелая стадия); N степень 3: присутствие обширного густого помутнения, затрагивающего весь хрусталик (зрелая стадия). Раствор носителя для наружного применения. Бидистиллированную H₂O добавляли к 1,1 г (EDTA)₂Na, объединяли с 0,055 г алкилдиметилбензиламмония хлорида до достижения конечного объема 1,1 л (pH 5,66). Раствор носителя для наружного применения, содержащий 25 мМ ланостерола. Бидистиллированную H₂O добавляли к смеси, содержащей 12,5 г ланостерола, 1,1 г (EDTA)₂Na, 0,055 г алкилдиметилбензиламмония хлорида и 200 мл этанола, до конечного объема 1,1 л.

В одном варианте осуществления раствор глазных капель, содержащий ланостерол, имеет следующий состав.

Рецептура.

Только раствор носителя:

Гидроксипропил-β-циклодекстрин	165 г
Полисорбат 80	1 г
EDTA2Na	1,1 г
Алкилдиметилбензиламмоний хлорид	0,055 г
EtOH	200 мл

Затем добавление бидистиллированной H₂O до конечного объема 1,1 л (pH 5,66)

5 мМ ланостерола в растворе носителя:

Ланостерол	2,5 г
Гидроксипропил-β-циклодекстрин	165 г
Полисорбат 80	1 г
EDTA2Na	1,1 г
Алкилдиметилбензиламмоний хлорид	0,055 г
EtOH	200 мл

Затем добавление бидистиллированной H₂O до конечного объема 1,1 л (pH 5,66).

Таблица 1

Секвенирование экзома и варианты

Таблица 1a

Сводные данные по секвенированию экзома

Образец	Общий эффектив. выход (Mb)	Средняя глубина секвенир.	Уровень несовпадений	Покрываемость целевой области	Доля мишени, покрытой >= 4x	Доля мишени, покрытой >= 10x
IV-1	3409,20	60,16	0,20%	99,60%	99,10%	97,60%
IV-2	3314,58	58,62	0,20%	99,60%	99,20%	97,80%
IV-3	3327,63	57,24	0,20%	99,80%	99,20%	97,40%
III-2	3029,40	51,89	0,21%	99,80%	99,30%	97,70%
III-1	6877,08	54,24	0,29%	96,30%	89,40%	81,80%
IV-4	6331,78	44,12	0,29%	96,50%	88,80%	79,80%

Таблица 1b

Краткая информация о детектированных вариантах

Образец	Всего	Гетерозиг.	Гомозиг.	Миссенс	Нонсенс	считывание	синонимич	сплайсинг	межгенные	интронные
IV-1	61189	35571	25618	6105	69	39	7296	32	5371	36598
IV-2	60829	34698	26131	6074	62	41	7211	38	5178	36572
IV-3	61078	35238	25840	6221	78	43	7265	38	5099	36544
III-2	62753	39001	23752	6393	64	38	7588	34	5764	36924
III-1	80067	49694	30373	7247	93	49	8166	47	15063	41391
IV-4	80893	48211	32682	7252	85	50	8184	50	14547	42414

Таблица 1c

Линия приоритизации вариантов после секвенирования экзома

Фильтры	III-1 (носитель отец)	III-2 (носитель мать)	IV-1 (пораженный дочь)	IV-2 (пораженный сын)	IV-3 (пораженный сын)	IV-4 (непораженная дочь)	Объединенные
Всего вариантов	80067	62753	61189	60829	61078	80893	-
Миссенс, нонсенс, сплайсинг	7389	6495	6213	6177	6342	7387	-
Пораженные: 1/1; носитель: 0/1; непораженные: 0/1 или 0/0*	5792	4661	3127	3123	3085	5638	9
Нет в dbSNP	3724	2969	1954	1929	1928	3589	5
Нет в 1000 Genomes Project	1032	767	227	264	245	1059	1
Прогнозируемое поражение	267	269	31	45	41	264	1

*Гомозиготные у пораженного ребенка, гетерозиготные у носителя, отсутствие гомозиготных мутантов у непораженного ребенка.

Таблица 1d

Сводные данные по полногеномному генотипированию

Образец	Всего локусов	Захвачено	SNP
IV-1	4,641,218	4,440,318	559,832
IV-2	4,641,218	4,446,992	605,499
IV-3	4,641,218	4,445,267	526,794
III-2	4,641,218	4,448,054	537,925
III-1	4,641,218	4,446,581	574,880
IV-4	4,641,218	4,450,657	584,347

Таблица 1e

Кодируемые варианты, обнаруженные на гене FDFT1

Положение (GRCh37/hg19)	refSNP	REF	ALT	Функция	III-1 (носитель отец)	III-2 (носитель мать)	IV-1 (пораженная дочь)	IV-2 (пораженный сын)	IV-3 (пораженный сын)	IV-4 (непораженная дочь)
chr8:11666337	rs4731	A	G	несинонимичные	A/G	A/G	G/G	A/G	G/G	G/G
chr8:11683653	rs904011	T	C	синонимичные	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C	C/C

Таблица 2

Эффект лечения ланостеролом катарактальных хрусталиков глаз кроликов и катаракты у собак

Таблица 2a

Эффект лечения ланостеролом катарактальных хрусталиков глаз кроликов

Номер образца	До лечения	После лечения
1	3	1
2	2	0
3	2	1
4	2	0
5	3	1
6	2	1
7	2	1
8	2	0
9	1	1
10	1	0
11	2	1
12	1	1
13	2	1

Таблица 2b

Эффект лечения ланостеролом катаракты у собак

Исследуемый глаз	Лечебная группа		Контрольная группа	
	До	После	До	После
1	2	1	1	1
2	1	0	2	2
3	2	1	1	1
4	3	1		
5	1	0		
6	2	0		
7	2	1		

Таблица 3

Праймеры, используемые для секвенирования каждого экзона
в человеческом гене LSS и конструирование мутантов кристаллинов

Таблица 3а

Праймеры, используемые для PCR-амплификации каждого экзона в человеческом гене LSS

Ампликон	Последовательность (5'-3')
LSS-Exon 1-F	GCCTGAGCGCTGCCGAGGCT
LSS-Exon1-R	GACACCTGAGGACACCGGCCAT
LSS-Exon2-F	GTGGTCTAGGTGCTGAGGAGA
LSS-Exon2-R	CGTGTCTTACGGCTCAGCCCT
LSS-Exon3-F	CTTGGCTGTATGTGAAGAGGCT
LSS-Exon3-R	CCTAGACCAGGCTGGCCAGGAT
LSS-Exon4-F	GTTGAGTGAGGTGCTCAGAGGA
LSS-Exon4-R	GCAGCTGCCTGGAACCCAGCAT
LSS-Exon5-F	GCACTTCTAGTTTCTGAGGAACCTC
LSS-Exon5-R	CCACTGTCTTCTGAGGTGCACT
LSS-Exon6-F	CAGAGGCTGAAGCTTCCAGCT
LSS-Exon6-R	GCTGTACAGCTGCACCTGAC
LSS-Exon7-F	GAAAGGGCCCAAGGTATGGATGCT
LSS-Exon7-R	GTGAGTGGACAGGTGTGGTATGAT
LSS-Exon8-F	GAGCCAGGCTTACAGGTGCT
LSS-Exon8-R	GCAGGGGATGAGTGGCTGAAT
LSS-Exon9-F	GCAGTGCATGGAGCTCCAGGT
LSS-Exon9-R	CCAGGAACCCCACTCCAGCT
LSS-Exon10-F	GTGATCTGACGAGACCTTGT
LSS-Exon 10-R	CACCTGGATGACAGTGGGGCT
LSS-Exon11-F	GTGCAGGCTTGGGTAGCAGCT
LSS-Exon 11-R	GACATGATTGCAAGGAAGCAT
LSS-Exon12-F	CTGGAGCAGTGGCTGGGAGT
LSS-Exon 12-R	GCAAGTGTGTGGCCAGCAGTGT
LSS-Exon13-F	GGCAGGATGTGGCCAGGACCAT
LSS-Exon 13-R	GCACCTTCTGCTCAGGAGCT
LSS-Exon14-F	CCAGTCTGTCTCAGCGATGT
LSS-Exon 14-R	CCAAAAACGCCAAGGGAGGAGT
LSS-Exon15-F	CTGGCTGCACCCACACCTTTGT
LSS-Exon 15-R	GCTCATCTGCAGGACACGAGGT
LSS-Exon16-F	GTGTTCAGCCCTAGTGTGCT
LSS-Exon 16-R	CAGGTTTGTGTACCAAGTGT
LSS-Exon17-F	GAGCTGCAGGCTGGGGACCA
LSS-Exon 17-R	CCGTGTGCAGAAATGATGCT
LSS-Exon18-F	GAATTGGGATAGTAACTGCT
LSS-Exon 18-R	CCGAGTGTGTGAGAGCAGAACT
LSS-Exon19-F	CTTAATGCTTGAAGCACTGGAGT
LSS-Exon 19-R	CACCTATGACAGGCACTGGGTT
LSS-Exon20-F	CAAGGCAGCTGCTGGGGTGA
LSS-Exon 20-R	CACCGGCTCAGCAGTGTGAT
LSS-Exon21-F	CTCACTGCAGCATTCAGGGTT
LSS-Exon21-R	GTGGAAACAGCCATGCAGCT
LSS-Exon22-F	GCCACAGCCAGGGCTCCAGTT
LSS-Exon 22-R	GGTTGAGGCCAAGCAGGGT

Таблица 3б

Праймеры, используемые для конструирования мутантов кристаллинов

Ген	Праймер (5'-3')
<i>αA-R116C-For</i>	TTCCCGTGAGTTCCACTGCCGTACCGCTGCCGTGCTGC
<i>αA-R116C-Rev</i>	CGGCAGCGGTAGCGGAGTGGAACCTACGGG
<i>αA-R116H-For</i>	TTCCCGTGAGTTCCACTGCCGTACCGCTGCCGTGCCAC
<i>αA-R116H-Rev</i>	CGGCAGCGGTAGCGGAGTGGAACCTACGGG
<i>αA-Y118D-For</i>	GAGTTCCACCGCCGACCGCTGCCGTCCAACTACGAC
<i>αA-Y118D-Rev</i>	CGTTGGACGGCAGCGGTCGCGCGGTGGAACT
<i>αB-R120G-For</i>	CAGGGAGTGTCAAGGAAATACGGATAGGGGG
<i>αB-R120G-Rev</i>	GGATCCGGTATTTCCCGTGGAACTCCCT
<i>βB2-V187E-For</i>	AGGTGCAGTCCGAGCGCGTATGTGGAG
<i>βB2-V187E-Rev</i>	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
<i>βB2-V187M-For</i>	AGGTGCAGTCCATGCGCGTATGTGATG
<i>βB2-V187M-Rev</i>	ATACGGCGCTCGGACTGCACCT
<i>βB2-R188H-For</i>	TGCAGTCCGTGCACCGTATCCCGCCAC
<i>βB2-R188H-Rev</i>	GGATACGGTGCACGGACTGCA
<i>γC-G129C-For</i>	CACGTGCTGGAGTGTGCTGGGGTGC
<i>γC-G129C-Rev</i>	CAGCAGCACTCCAGCAGTGT
<i>γD-W43R-For</i>	GTGGACAGCGCTGCCGATGCTATAGCTGGCGG
<i>γD-W43R-Rev</i>	GCTCATAGAGCATCCGGCAGCCGCTGTCCAC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения или предупреждения катаракты у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение в глаз указанного субъекта композиции, содержащей фармацевтически приемлемый носитель и фармацевтически эффективное количество ланостерола, ингибирующего агрегацию белка кристаллина или растворяющего агрегат белка кристаллина.

2. Способ по п.1, в котором указанный ланостерол ингибирует агрегацию белка кристаллина в глазу указанного субъекта.

3. Способ по п.1, в котором указанный ланостерол растворяет агрегат белка кристаллина хрусталика в глазу указанного субъекта.

4. Способ по п.3, в котором белок кристаллин хрусталика выбран из α -кристаллина, β -кристаллина, γ -кристаллина или их комбинаций.

5. Способ по п.1, в котором указанная композиция составлена в виде офтальмологического раствора, офтальмологического геля, офтальмологической мази, офтальмологического промывочного раствора, внутриглазного раствора для инфузий, промывочного раствора для передней камеры глаза или раствора для инъекции.

6. Способ по п.1, в котором указанный субъект выбран из группы, состоящей из земноводных, рептилий, птиц и млекопитающих.

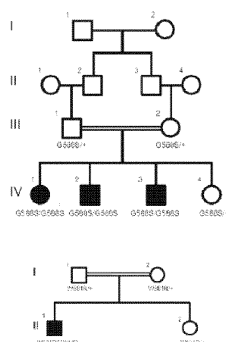
7. Способ по п.6, в котором указанное млекопитающее выбрано из группы, состоящей из грызунов, кошек, собак, свиней, лошадей и людей.

8. Способ по п.1, в котором ланостерол вводят в количестве и в течение периода времени, достаточных для растворения амилоидоподобных фибрилл белков кристаллина.

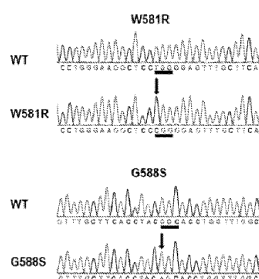
9. Способ по п.8, в котором белки кристаллина выбраны из α -кристаллина, β -кристаллина, γ -кристаллина или их комбинаций.

10. Способ по п.1, в котором субъектом является человек.

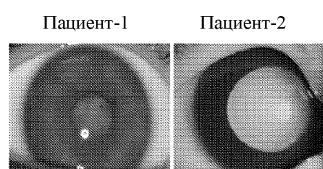
11. Способ по п.1, в котором композицию вводят местно, субконъюнктивно, ретробульбарно, периокулярно, субретинально, супрахориоидально или интраокулярно.
12. Способ по п.11, в котором композицию вводят местно.
13. Способ по п.1, в котором фармацевтически приемлемый носитель выбран из воды, буфера или раствора хлорида натрия.
14. Способ по п.1, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой гель.
15. Способ по п.1, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой мазь.
16. Способ по п.1, в котором фармацевтически приемлемый носитель представляет собой цикло-декстрин.



Фиг. 1А



Фиг. 1В

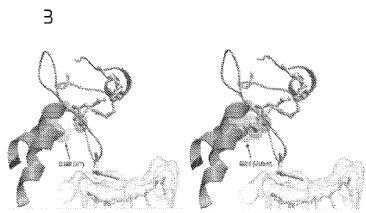


Фиг. 1С

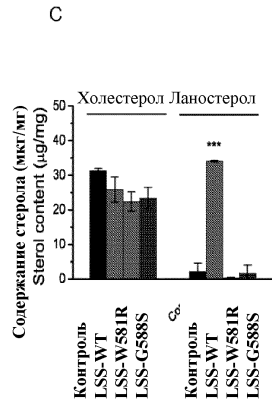
А

	W581R	G588S
LSS_человек	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_обыкн. шимпанзе	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_дикий бык	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_домовая мышь	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_серая крыса	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_джунглевая курица	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM
LSS_данио-рерио	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM	DGSWEGSWGVCFTYGTWFGLEAFACM

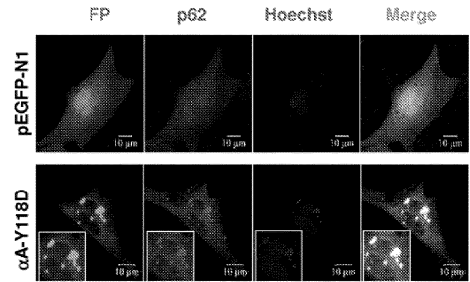
Фиг. 2А



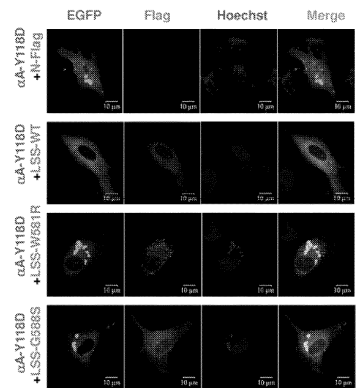
Фиг. 2В



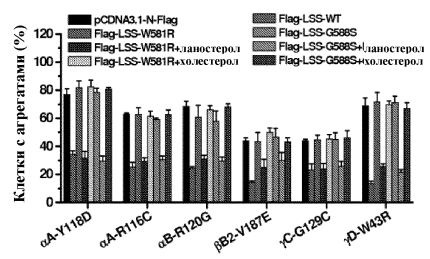
Фиг. 2С



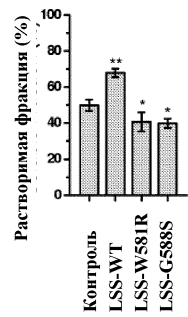
Фиг. 3А



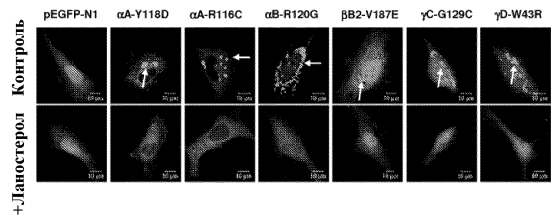
Фиг. 3В



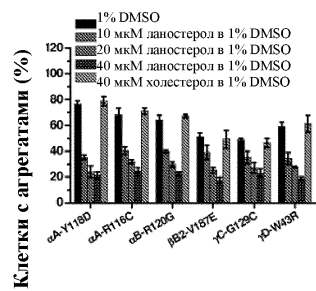
Фиг. 3С



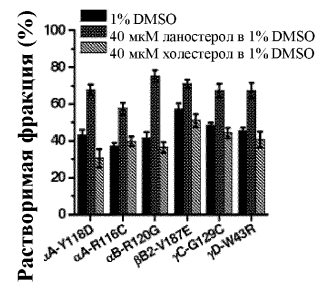
Фиг. 3D



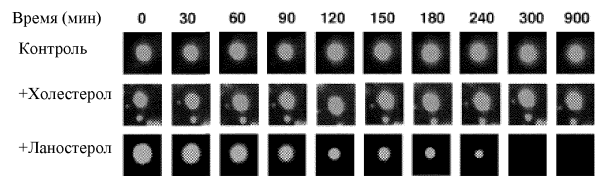
Фиг. 3E



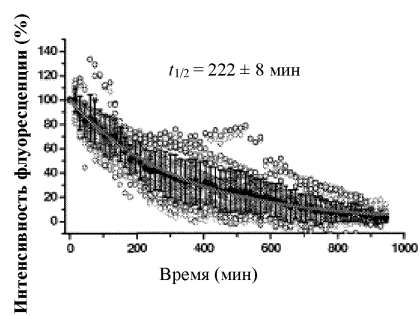
Фиг. 3F



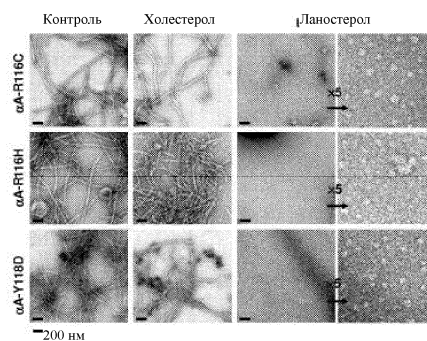
Фиг. 3G



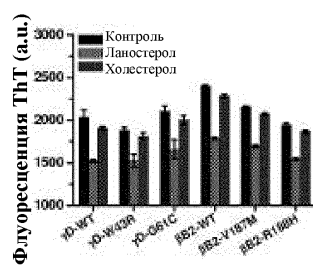
Фиг. 3H



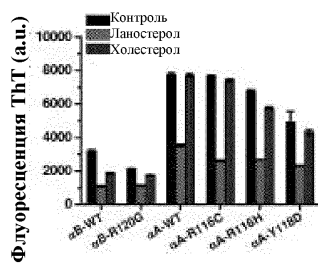
Фиг. 3I



Фиг. 4A



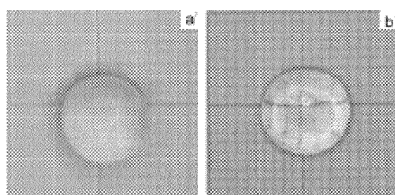
Фиг. 4B(i)



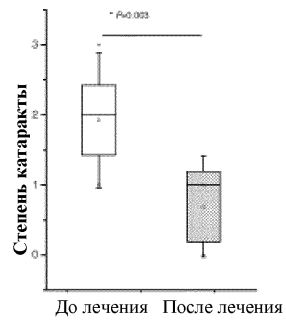
Фиг. 4B(ii)

Фиг. 5A(i)

Фиг. 5A(ii)



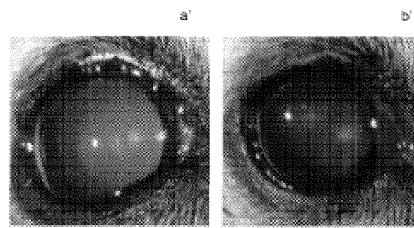
Фиг. 5A



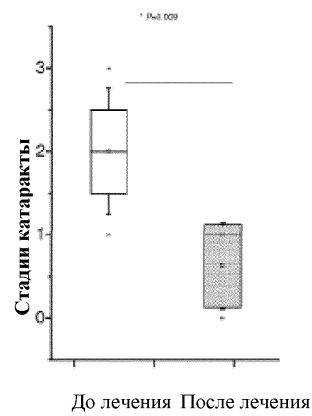
Фиг. 5В

Фиг. 5C(i)

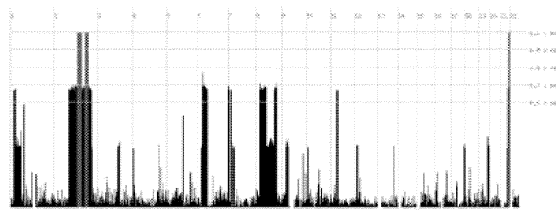
Фиг. 5C(ii)



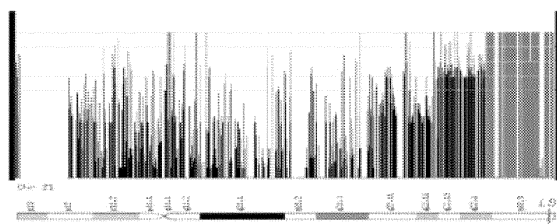
Фиг. 5С



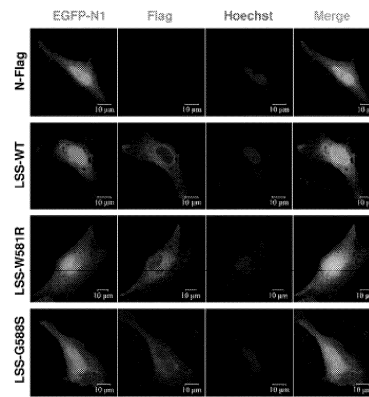
Фиг. 5D



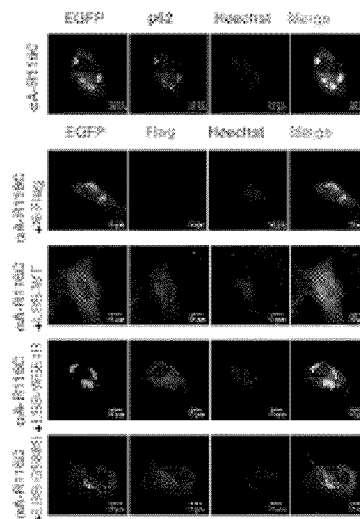
Фиг. 6А



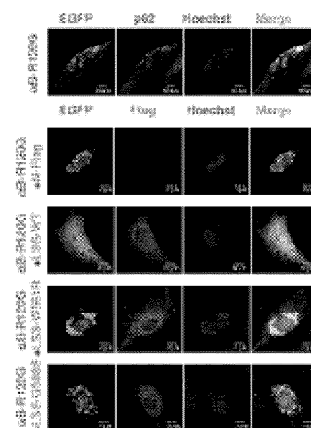
Фиг. 6В



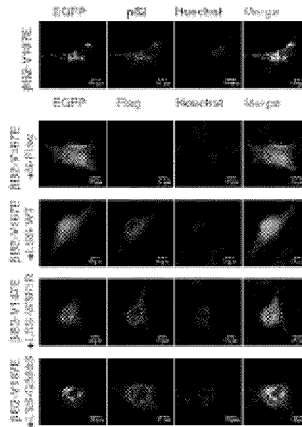
Фиг. 7



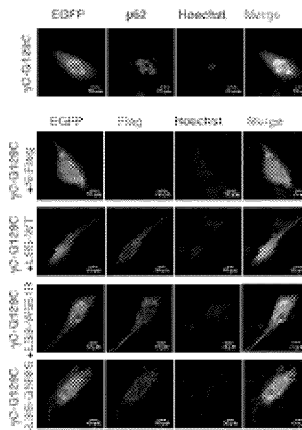
Фиг. 8A



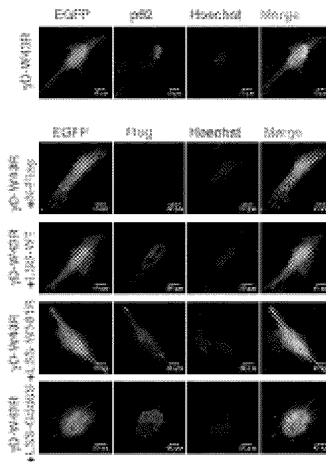
Фиг. 8B



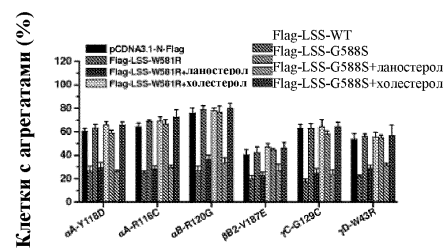
ФИГ. 8С



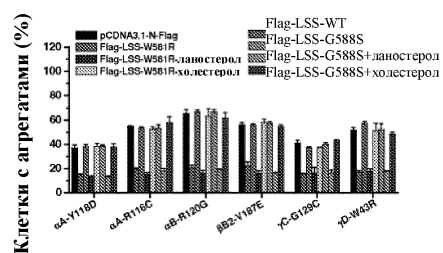
ФИГ. 8D



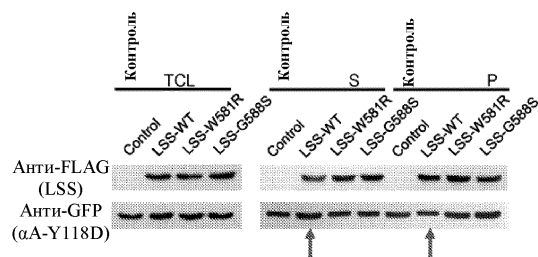
ФИГ. 8Е



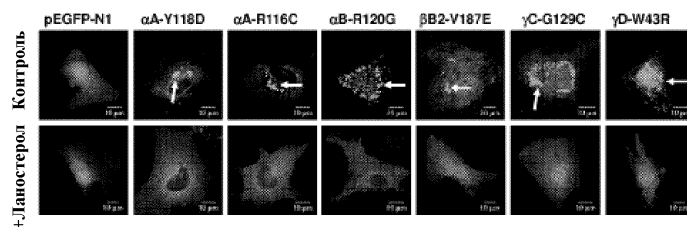
Фиг. 9А



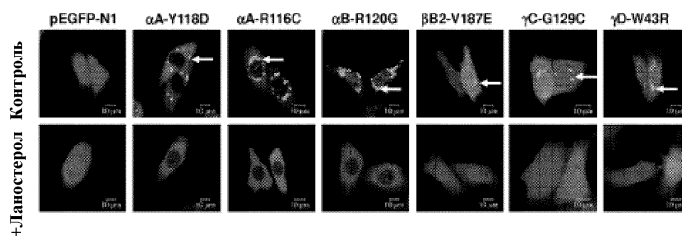
Фиг. 9В



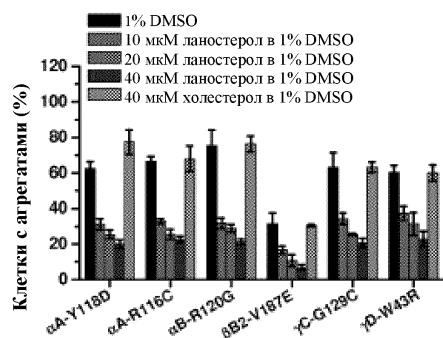
Фиг. 9С



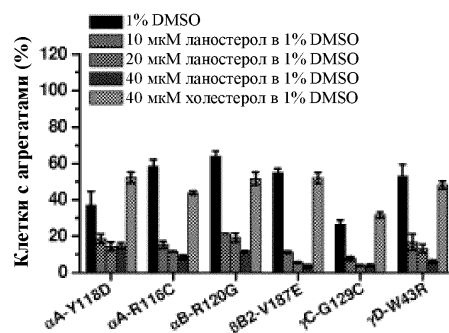
Фиг. 10А



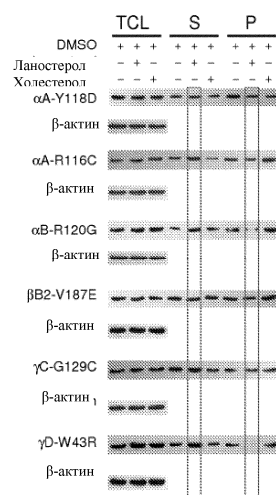
Фиг. 10В



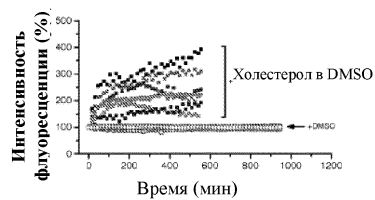
Фиг. 10С



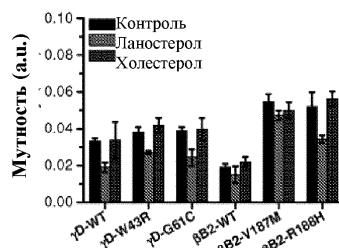
Фиг. 10D



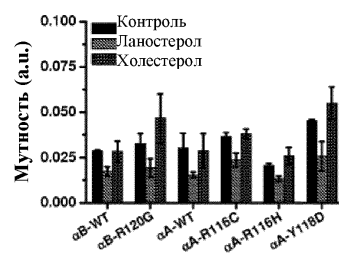
Фиг. 11A



Фиг. 11B



Фиг. 11C(i)



Фиг. 11C(ii)

