

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202391613** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.07.20

(51) Int. Cl. *A61K 31/4365* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.12.03

(54) **КЛОПИДОГРЕЛ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ФОКАЛЬНОГО
СЕГМЕНТАРНОГО ГЛОМЕРУЛОСКЛЕРОЗА (ФСГС)**

(31) **20211546.5**

(72) Изобретатель:

(32) **2020.12.03**

Перко Пауль (AT)

(33) **EP**

(74) Представитель:

(86) **PCT/EP2021/084250**

Фелицына С.Б. (RU)

(87) **WO 2022/117862 2022.06.09**

(71) Заявитель:

ДЕЛЬТА 4 ГМБХ (AT)

(57) Настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему клопидогрел, или его соль, или сольват, для применения при лечении фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС).

A1

202391613

202391613

A1

КЛОПИДОГРЕЛ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ФОКАЛЬНОГО СЕГМЕНТАРНОГО ГЛОМЕРУЛОСКЛЕРОЗА (ФСГС)

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к фармацевтическому препарату, содержащему клопидогрел, или его соль, или сольват, для применения при лечении фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС).

Предшествующий уровень техники

Фокальный сегментарный гломерулосклероз (ФСГС) представляет собой тяжелую гломерулопатию, часто приводящую к терминальной стадии заболевания почек. ФСГС используют для описания гистопатологического поражения, определяемого наличием склероза в некоторых частях (сегментарного) некоторых гломерул (фокального). Это патологическое изменение относится как к заболеванию, характеризующемуся первичным повреждением подоцитов, так и ко вторичному эффекту по отношению к другим воздействиям, включая гипертонию, ожирение или вирусную инфекцию. Встречается ФСГС и без установленной причины (идиопатический).

Наиболее распространенным проявлением ФСГС является протеинурия от субнефротического до нефротического уровня (выраженная протеинурия, гипоальбуминемия и гиперлипидемия). Выраженная протеинурия связана с прогрессирующей потерей функции почек и почечной недостаточностью. На нее приходится около 15% случаев терминальной хронической почечной недостаточности (ТХПН (ESR)). Массивная протеинурия (>10-15 г/день) приводит к быстрому ухудшению функции почек и прогрессированию ТХПН в течение 2-3 лет.

Для лечения ФСГС не существует препарата, утвержденного для применения. Современные стандарты лечения пациентов с ФСГС включают стероиды, ингибиторы АПФ (АСЕ) или БРА (АРВ), иммунодепрессивные препараты, такие как глюкокортикоиды или ингибиторы кальциневрина, при необходимости, в случае непереносимости или неадекватной реакции на глюкокортикоиды; диуретики, плазмаферез, изменение питания и статины.

В WO2006029349A1 описано применение агонистов PPAR отдельно или в комбинации с ингибиторами агрегации тромбоцитов для задержки прогрессирования или лечения диабетического заболевания или расстройства, гиперлипидемического заболевания или расстройства, метаболического заболевания или расстройства и/или сердечно-сосудистого заболевания или расстройства, или заболевания, связанного с привыканием.

В 2008 г. Tu X. et al. описывают применение клопидогрела на начальной стадии повреждении почек, вызванного хирургической абляцией почек в размере 5/6 объема почек, вследствие ингибирования воспаления почек.

Peters H. et al. (2004) обращаются к анализу влияния клопидогрела на раннее повреждение и последующую фазу репарации экспериментального острого анти-тимоцит I гломерулонефрита на модели заживления острой гломерулярной раны на крысах.

Su X. et al. (2019) рассматривают влияние антитромбоцитарной терапии на исход сердечно-сосудистых и почечных заболеваний у пациентов с хронической болезнью почек и сообщают, что применение антитромбоцитарных средств может обеспечить общую чистую клиническую пользу.

В KR20180121722A раскрыта композиция для предупреждения или лечения заболеваний почек, содержащая правастатин и антитромбоцитарный препарат, такой клопидогрел.

Однако процент положительного клинического ответа невелик. Блокаторы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) также используются для контроля протеинурии, важного признака ФСГС. Однако использование существующих способов лечения привело лишь к ограниченному успеху.

Ежегодно в США диагноз ФСГС ставится примерно 5400 пациентам, но число случаев этого заболевания больше, чем в случае любой другой причины нефротического синдрома. Примерно 1000 пациентов с ФСГС ежегодно подвергаются трансплантации почки. Однако в течение нескольких часов или недель после пересадки почки ФСГС возвращается примерно у 30-40% пациентов. При этом только 20% пациентов достигают полной ремиссии после 5 лет лечения, а у 40% пациентов ремиссия отсутствует (Trojanov S. et al., 2005).

Несмотря на все усилия, лечение часто оказывается безуспешным, а ФСГС является причиной значительной части почечных заболеваний в конечной стадии. Таким образом, существует неудовлетворенная потребность в новых способах лечения ФСГС, изменяющих течение болезни.

Краткое описание изобретения

Указанная задача решается при помощи объекта настоящей формулы изобретения и как далее описано в настоящем документе. Неожиданно было найдено, что соединение настоящего изобретения значительно снижает соотношение белок/креатинин в моче (UPCR) и соотношение альбумин/креатинин в моче (UACR) в исследованиях на животных, тем самым показывая значительное функциональное улучшение и снижение протеинурии.

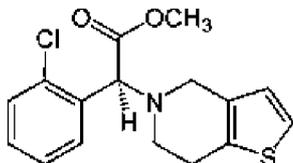
В соответствии с изобретением предлагается фармацевтический препарат, включающий клопидогрел, или его соль, или сольват для применения в лечении фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС).

В частности, фармацевтический препарат, описанный в настоящем документе, используется для лечения первичного ФСГС. В частности, ФСГС не связан с диабетом и не вызван им.

Согласно одному из вариантов осуществления изобретения, фармацевтический препарат представляет собой лекарственное средство или лекарственный препарат, включающий клопидогрел и фармацевтически приемлемый носитель.

В частности, фармацевтический препарат, описанный в настоящем документе, вводят системно.

Согласно одному из вариантов осуществления, клопидогрел, используемый в описанном здесь препарате, имеет структуру



В частности, описанный в данном документе препарат содержит примерно от 10 до 400 мг клопидогрела.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения, фармацевтический препарат, описанный в настоящем документе, предназначен для системного введения, предпочтительно для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, чрескожного или перорального введения.

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения, фармацевтический препарат, описанный в настоящем документе, вводят субъекту в виде спрея, порошка, геля, мази, крема, пены или жидкого раствора, лосьона, раствора для полоскания горла, аэрозольного порошка, аэрозольного жидкого состава, гранул, капсул, капель, таблеток, сиропа, пастилок или препарата для инфузий или инъекций.

Согласно изобретению, фармацевтический препарат предназначен для применения при лечении субъекта, страдающего ФСГС или подверженного риску развития ФСГС.

В следующем варианте осуществления изобретения фармацевтический препарат, описанный в настоящем документе, вводят в эффективном количестве субъекту, страдающему ФСГС или подверженному риску развития ФСГС.

В частности, препарат вводят в качестве единственного вещества, или, в случае сочетания лечения или препарата с другим лечением или препаратом, – с одним или несколькими действующими веществами.

Более конкретно, препарат вводят в комбинации с действующим веществом, которое выбрано из группы, состоящей из противовирусных препаратов, антикоагулянтов, иммуномодуляторов, препаратов человеческих антител, моноклональных антител, препаратов для интенсивной терапии, антигипертензивных средств, статинов, вазодилататоров, стероидов, цитотоксических препаратов, диуретиков, нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), средств для снижения уровня холестерина или триглицеридов.

Чертежи

Фиг. 1: ФСГС индуцировали адриамицином (ADR) и оценивали протеинурию в указанные сроки (в сутках) после индуцирования. UPCR = отношение белка и креатинина в моче - маркер протеинурии и повреждения почек; ячейки, отмеченные «ктрл» – контрольные мыши с ФСГС; ячейки, отмеченные «Клопидогрел» – мыши с ФСГС, получавшие лечение клопидогрелем; на вставках указаны медиана (средняя линия), интерквартильный интервал (ящик) и 95%-ные доверительные интервалы (усы) в дополнение к отдельным экспериментальным точкам (разброс). Р-значения t-тестов указаны над данными для каждого момента времени.

Фиг. 2: В независимом эксперименте ФСГС индуцировали адриамицином (ADR) и оценивали протеинурию в указанные сроки (в сутках) после индуцирования. UPCR = отношение белка и креатинина в моче - маркер протеинурии и повреждения почек; ячейки, отмеченные «ктрл» – контрольные мыши с ФСГС; ячейки, отмеченные «Клопидогрел» – мыши с ФСГС, получавшие лечение клопидогрелем; на вставках указаны медиана (средняя линия), интерквартильный интервал (ящик) и 95%-ные доверительные интервалы (усы) в дополнение к отдельным экспериментальным точкам (разброс). Р-значения t-тестов указаны над данными для каждого момента времени.

Фиг. 3: Показано среднее снижение UPCR (панель А) и UACR (панель В) в результате лечения клопидогрелем с течением времени. Цифры наверху обозначают моменты времени, использованные в первом и втором экспериментах соответственно.

Фиг. 4: Эксперимент 1. Значения UPCR (левая панель) и UACR (правая панель) всех индивидуальных показателей мочи контрольных и получавших лечение клопидогрелем животных после введения в хвостовую вену. Р-значения рассчитывали по критерию Стьюдента.

Фиг. 5: Эксперимент 2. Значения UPCR (левая панель) и UACR (правая панель) всех индивидуальных показателей мочи контрольных и получавших лечение клопидогрелем животных после введения в хвостовую вену. Р-значения рассчитывали по критерию Стьюдента.

Фиг. 6: Изменение массы тела мышей измеряли еженедельно и представляли в виде кратности изменения веса по сравнению с исходной массой. (А) Эксперимент 1. (В) Эксперимент 2.

Фиг. 7: гистологическая оценка при большом увеличении (63-кратное, 40-кратное). Показаны репрезентативные окрашивания Шифф-йодной кислотой (PAS) контрольных животных с адриамициновой нефропатией (верхние панели) и животных, получавших клопидогрель (нижние панели). Черными стрелками показаны отдельные склеротические участки. Черными звездочками отмечены белковые образования, представляющие собой тубулярную эктазию.

Фиг. 8: Гистопатологические эффекты терапии клопидогрелем. (А) Средние значения процента склеротических клубочков в двух независимых экспериментах, представленные в виде коробчатых диаграмм, представляющих все индивидуальные значения. (В и С) Столбчатая диаграмма со 100%-ным накоплением, отражающая численность указанных групп в зависимости от относительного количества склеротических клубочков (В) или выраженности тубулярной эктазии (В и С). Столбчатая диаграмма с 100%-ным накоплением, представляющая численность указанных групп в зависимости от относительного количества склеротических клубочков (В) или выраженности тубулярной эктазии (С). Числа в столбиковых диаграммах представляют собой количество наблюдений (n). Показатели выраженности сегментарного склероза: 0: нет, 1: 1-4%, 2: 5-9%, 3: 10-19%, 4: $\geq 20\%$. Показатели выраженности тубулярной эктазии: 0: нет, 1: слабая, 2: умеренная, 3: сильная, 4: очень сильная.

Фиг. 9: гистологическая оценка терапии клопидогрелем. Показаны обзорные окрашивания реактивом Шиффа (А) дикого типа, (В-Д) трех контрольных животных с адриамициновой нефропатией, (Е-Г) трех животных с адриамициновой нефропатией, получавших лечение клопидогрелем. Черными стрелками показаны избранные склеротические клубочки. Черными звездочками показаны отдельные белковые образования, вызванные тубулярной эктазией и нарушением процесса фильтрации.

Подробное описание изобретения

Используемые в настоящем описании термины «заключать в себе», «содержать», «иметь» и «включать» могут использоваться в качестве синонимов и понимаются как открытое определение, допускающее наличие дополнительных членов, частей или элементов. «Состоящий» считается наиболее ограничивающим определением, исключающим наличие дополнительных элементов у признака, охарактеризованного с помощью определения «состоящего». Таким образом, «заключающий» является более широким и содержит определение «состоящий».

Используемый в настоящем описании термин «примерно» относится к одному и тому же значению или значению, отличающемуся от данного значения на +/-10% или +/-5%.

Клопидогрел, описанный в настоящем документе, может использоваться в виде «физиологически приемлемой соли». Выбор соли определяется главным образом тем, насколько кислотным или основным является химическое вещество (рН), безопасностью ионизированной формы, предполагаемым применением препарата, способом введения препарата (например, через рот, в виде инъекции или на кожу) и типом лекарственной формы (например, таблетка, капсула или жидкость).

Примером физиологически приемлемых солей являются натриевые соли. Однако вместо натриевых солей можно также использовать другие физиологически приемлемые соли, например, соли других щелочных металлов, соли щелочноземельных металлов, соли аммония и соли замещенного аммония. Конкретными примерами являются соли калия, лития, кальция, алюминия и железа. Предпочтительными солями замещенного аммония являются соли, полученные, например, из низших моно-, ди- или триалкиламинов, или моно-, ди- и триалканоламинов. Можно также использовать свободные аминокислоты как таковые. Конкретными примерами являются соли этиламина, этилендиамина, диэтиламина или триэтиламина.

Используемый в настоящем документе термин «субъект» или «пациент» относится к человеку или млекопитающему, отличному от человека, такому как собака, кошка, лошадь, верблюд, крупный рогатый скот или свинья, страдающему ФСГС или подверженному риску развития ФСГС. В частности, речь идет о человеке.

Субъект, «подверженный риску» развития ФСГС, может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания, и может иметь или не иметь выявляемое заболевание или симптомы заболевания до применения способов лечения, описанных в настоящем документе. «Подверженный риску» означает, что субъект имеет один или несколько факторов риска, которые представляют собой измеряемые параметры, коррелирующие с развитием ФСГС, которые описаны в настоящем документе и известны в данной области. Субъект, имеющий один или несколько таких факторов риска, имеет более высокую вероятность развития ФСГС, чем субъект, не имеющий одного или нескольких таких фактора(факторов) риска.

«Субъект» может быть «пациентом». «Пациент» относится к «субъекту», который находится под наблюдением лечащего врача. В другом варианте осуществления пациентом является субъект, которому не был поставлен диагноз ФСГС. В других вариантах осуществления пациент - это субъект, которому был поставлен диагноз ФСГС,

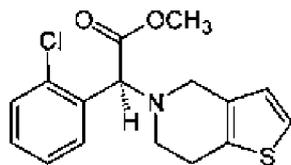
но он не получал никакой терапии для лечения ФСГС.

Термин «недиабетический субъект» относится к субъекту, не страдающему сахарным диабетом.

Термин «фармацевтически приемлемый», также называемый «фармакологически приемлемый», означает совместимость с лечением животных, в частности, человека. Термин «фармацевтически приемлемая соль» также включает в себя как фармацевтически приемлемые соли присоединения кислоты, так и фармацевтически приемлемые соли присоединения основания.

Используемый в настоящем описании термин «фармацевтически приемлемая соль присоединения кислоты» означает любую нетоксичную органическую или неорганическую соль любого основного соединения, предлагаемого в настоящем изобретении, или любого из его промежуточных продуктов. Основные соединения, предлагаемые в настоящем изобретении, которые могут образовывать соль присоединения кислоты, включают, например, соединения, содержащие основной атом азота. Примеры неорганических кислот, образующих подходящие соли, включают хлористоводородную, бромистоводородную, серную и фосфорную кислоты, а также соли металлов, такие как гидрофосфат натрия и гидросульфат калия. Примеры органических кислот, образующих подходящие соли, включают моно-, ди- и трикарбоновые кислоты, такие как гликолевая, молочная, пировиноградная, малоновая, янтарная, глутаровая, фумаровая, яблочная, винная, лимонная, аскорбиновая, малеиновая, бензойная, фенилуксусная, коричная и салициловая кислоты, а также сульфоновые кислоты, такие как п-толуолсульфоновая и метансульфоновая кислоты. Могут быть образованы моно-, ди- или трикислотные соли, и такие соли могут существовать либо в гидратированной, сольватированной, либо в практически безводной форме. В целом, соли присоединения кислоты соединений изобретения более растворимы в воде и различных гидрофильных органических растворителях, и обычно имеют более высокие температуры плавления по сравнению с соответствующими формами свободного основания. Выбор подходящей соли известен специалисту в данной области. Другие нефармакологически приемлемые соли присоединения кислоты, например, оксалаты, могут быть использованы, например, для выделения соединений изобретения, для лабораторного использования или для последующего преобразования в фармацевтически приемлемую соль присоединения кислоты. В частности, клопидогрел может присутствовать в виде гидросульфатной соли клопидогрела (гидросульфата клопидогрела), сульфоната или безилатной соли. Клопидогрел также может присутствовать в виде комплекса включения с циклодекстрином, таким как β -циклодекстрин, или его производным.

Клопидогрел, ((S)-метил-(2-хлорфенил)-2-(6,7-дигидро-4*H*-тиено[3,2-*c*]пиридин-5-ил)ацетат, (+)-метил-(2-хлорфенил)-2-(6,7-дигидро-4*H*-тиено[3,2-*c*]пиридин-5-ил)ацетат), используемый в настоящем изобретении, имеет следующую структуру



и является пролекарством ингибитора тромбоцитов, используемого для снижения риска инфаркта миокарда и инсульта. Клопидогрел метаболизируется в активную форму под действием карбоксилэстеразы-1. Активная форма является ингибитором тромбоцитов, который необратимо связывается с рецепторами АДФ P2Y₁₂ на поверхности тромбоцитах. Это связывание предотвращает связывание АДФ с рецепторами P2Y₁₂, активацию гликопротеинового комплекса GPIIb/IIIa и агрегацию тромбоцитов.

Помимо функции ингибитора агрегации тромбоцитов, клопидогрел способен оказывать противовоспалительное действие, которое может благоприятно влиять на развитие и/или прогрессирование заболевания ФСГС в дополнение к удивительному эффекту снижения UPCR и UACR, как описано в настоящем документе. Клопидогрел может противодействовать TNF путем активации оси AMPK/Nrf2 (Yang H. et al., 2016). Также описано влияние TNF-а на ФСГС и повреждение подоцитов (Chen A. et al., 2020, Chung CF. et al., 2019, Pedigo C.E. et al., 2016), а также значение Nrf2 и AMPK для деятельности подоцитов (Yang S.M. et al., 2013, Tsai P.Y. et al., 2011, Rogacka D. et al., 2020). Показано, что клопидогрел снижает уровень TNF (Solheim S. et al., 2006), а также SERPINE1 (Sakata T. et al., 2011), двух белков, связанных с развитием ФСГС. Кроме того, сообщалось, что клопидогрел индуцирует NFE2L2 (NRF2), фактор с ренопротективным потенциалом, который способен облегчить прогрессирование заболевания ФСГС (Yang H. et al., 2016). С другой стороны, высокий уровень IL10 связан с низкой чувствительностью к клопидогрелю (Osmancik P. et al., 2012). Для измерения ответа клопидогрела используют анализ фосфорилирования VASP (Siller-Matula J.M. et al., 2010; Cayla G. et al., 2008). Показано, что фосфопротеин, стимулированный вазодилататорами (VASP), фосфорилируется в ответ на рецидив в плазме крови десяти последовательно обследованных пациентов, но не в плазме при ответе на сопряженную ремиссию или контрольных образцов без ФСГС. Сигнал фосфорилирования отсутствует в подоцитах человека с патологической мутацией подоцина (Harris J.J. et al., 2013).

Клопидогрел продают под торговыми названиями Clopilet, Plavix и Zyllt.

Клопидогрел содержит от 10 до 400 мг клопидогрела на дозу. В частности, он может содержать 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170,

180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400 мг клопидогрела. Его можно вводить непрерывно в виде одной и той же дозы или в виде приема по правилу Болар в высокой дозе, составляющей, например, примерно 300 мг, и далее в поддерживающей низкой дозе, составляющей, примерно 70 мг.

В частности, суточная доза клопидогрела или его фармацевтически приемлемых солей в фармацевтическом препарате настоящего изобретения составляет от 10 до 400 мг, в частности, от 50 до 300 мг из расчета на взрослого человека. Однако рамки настоящего изобретения не ограничиваются данной дозировкой.

ФСГС представляет собой выраженное клинико-патологическое заболевание, характеризующееся очаговым и сегментарным склерозом в почечных гломерулах и процессом сглаживания ножки подоцитов (D'Agati V., 2003; Rosenberg A.Z. and Kopp J.B., 2017, Bose B. and Cattran D., 2014). Патофизиология ФСГС может возникать внутри гломерул («первичный ФСГС») или быть вторичной по отношению к прочим причинам (например, гипертензии; D'Agati V., 2003, Rosenberg A.Z. and Kopp J.B., 2017, Bose B. and Cattran D., 2014). ФСГС часто приводит к нефротическому синдрому, характеризующемуся протеинурией, гипоальбуминурией, гиперлипидемией и отеками (D'Agati V., 2003; Rosenberg A.Z. and Kopp J.B., 2017, Bose B. and Cattran D., 2014). В большом числе случаев точная причина ФСГС остается неустановленной (идиопатический; D'Agati V., 2003; Rosenberg A.Z. and Kopp J.B., 2017, Bose B. and Cattran D., 2014). Известные этиологии ФСГС неоднородны и включают генные мутации, прием лекарственных препаратов, вирусное заражение, гипертонию, циркулирующие факторы, но не диабет (D'Agati V., 2003; Rosenberg A.Z. and Kopp J.B., 2017, Bose B. and Cattran D., 2014). Диабетическая нефропатия – включая диабетический гломерулосклероз – представляет собой хроническую потерю функции почек в результате патофизиологии сахарного диабета (Qi et al., 2017).

Подоциты представляют собой атипичные эпителиальные клетки в капсуле Боумена в почках, которые оборачиваются вокруг капилляров клубочков.

В настоящем документе ФСГС представляет собой рубцевание клубочков (склероз) и повреждение подоцитов, вызванное эндогенным фактором, который распознает подоцит в качестве мишени (подоцитопатия, идиопатический ФСГС), или вызванное идентифицируемой причиной, которая прямо или косвенно повреждает подоциты (первичный или вторичный ФСГС), например, генетическим нарушением, гипертензией, воспалением, нарушением пролиферации или механическим воздействием.

Отличительной морфологической картиной первичного ФСГС является диффузная подоцитопатия (плюс по меньшей мере одно поражение ФСГС), в которой клинически

преобладает нефротический синдром. Диффузная подоцитарная токсичность охватывает почти все подоциты, при этом более 50% отростков ножек сглажены, что следует из данных электронной микроскопии. Обычно наблюдаются обширная потеря альбумина с мочой, а также гипоальбуминемия, но они нетипичны при вторичных формах, даже если присутствует протеинурия нефротического диапазона. Общими признаками являются микроворсинчатая трансформация, отслоение цитоплазмы, повышенная плотность актинового цитоскелета на сглаженных отростках ножек, увеличение количества лизосом и аутофагоцитарных телец. Вследствие структурной реорганизации повышается риск отслоения подоцитов от базальной мембраны клубочка (БМК, GBM), в результате чего остаются обширные участки оголенной БМК. Эти «липкие» участки могут привести к образованию спаек, после чего отложение гиалина и разрастание мезангиального матрикса постепенно сужают просвет капилляров, пока пораженный сегмент не станет непроходимым и склерозированным. Иногда наблюдаются обратимые клубочковые пролапсы в проксимальный каналец, которые являются проявлением острого увеличения клубочка и являются предвестником «поражение верхушки» (Angioi A., and Pani, A., 2016).

Наиболее агрессивной формой ФСГС является коллапсирующая гломерулопатия, гистологически проявляющаяся сглаживанием отростков ножек, сегментарным или глобальным коллапсом капиллярного пучка, окруженного короной гиперпластических подоцитов (Angioi A., and Pani, A., 2016).

Симптомами ФСГС также являются тяжелая протеинурия с необязательным биопсийным подтверждением ФСГС с гломерулосклерозом, гломерулонефритом (например, мембранопролиферативный гломерулонефрит (МППН, MPGN), IgA-гломерулонефрит), нефротический синдром (гипоальбуминурия, гиперлипидемия, отеки), прогрессирующая почечная недостаточность, поражения клубочков при гистопатологии, в частности, в соответствии с классификацией Haas M. Et al., 2013, а также слияние и повреждение подоцитов.

ФСГС можно диагностировать способами, которые хорошо известны в данной области, такими как, но без ограничения, определение соотношения белок/креатинин в моче (UPCR), соотношения альбумин/креатинин в моче (UACR), световая микроскопия биопсии почки, например, размер клубочков, гистологический вариант ФСГС, микрокистозные тубулярные изменения и тубулярная гипертрофия; иммунофлюоресценция, например, для исключения других первичных гломерулопатий; и электронная микроскопия, например, степень сглаживания отростков ножек подоцитов, микроворсинчатая трансформация подоцитов и тубулоретикулярные включения.

В частности, ФСГС, в контексте настоящего документа, относится к недиабетическому заболеванию почек. В частности, диабетическая нефропатия, вызванная сахарным диабетом, исключена из случаев применения клопидогрела для лечения ФСГС. Недиабетическое заболевание почек и диабетическое заболевание почек можно подтвердить и отличить способами, которые известны в данной области, такими как биопсия.

У пациентов с диабетом часто наблюдаются узловые и диффузные поражения. Способы классификации диабетических нефропатий хорошо известны специалистам и описаны Qi C. et al., 2017, Tervaert T.W.C. et al., 2010, и Fioretto P. et al., 1996. Классификация Fioretto включает тубулярные, интерстициальные и сосудистые поражения и разделяет диабетические нефропатии на три категории в соответствии с патологическими изменениями, видимые при помощи светового микроскопа: С1 – нормальный/близкий к норме; С2 – типичная диабетическая нефропатия с преимущественно гломерулярными изменениями; и С3 – атипичные формы поражения, связанные с непропорционально большим количеством повреждений, включая тубулоинтерстициальный или артериолярный гиалиноз, и с отсутствием или лишь незначительными диабетическими гломерулярными изменениями. Патологическая классификация Tervaert разделяет диабетические нефропатии на четыре класса в соответствии с гломерулярными поражениями, наряду с отдельной системой баллов для тубулярных, интерстициальных и сосудистых поражений.

В частности, пациенты, страдающие диабетом, в частности, пациенты, страдающие диабетом более 2 лет, исключаются из лечения клопидогрелем, которое описано в настоящем документе.

Нефропатии, связанные с диабетом, включают диабетическую ретинопатию, диабетическую нефропатию и гломерулосклероз, связанный с диабетом. Использование термина «ФСГС» охватывает врожденный ФСГС, первичный ФСГС, а также рецидивирующий ФСГС, но специально исключает диабетический ФСГС.

Гломерулонефрит характеризуется воспалением мембранной ткани в почке, которая служит фильтром, отделяющим отходы и лишнюю жидкость из крови.

MPGN представляет собой форму гломерулонефрита, вызванную аномальным иммунным ответом. Отложения антител накапливаются в части почек, называемой базовой мембраной клубочка.

Гломерулосклероз характеризуется рубцеванием или затвердением крошечных кровеносных сосудов внутри почки. Хотя гломерулонефрит и гломерулосклероз вызываются различными причинами, они оба могут привести к почечной

недостаточности.

Нефротический синдром представляет собой заболевание почек, при котором из организма выделяется слишком много белка с мочой. Нефротический синдром обычно вызывается повреждением скоплений мелких кровеносных сосудов в почках.

Используемый в настоящем документе термин рецидивирующий ФСГС (рФСГС, rFSGS), или рецидив ФСГС, определяется тяжелой протеинурией с необязательным подтверждением биопсией ФСГС с гломерулярным склерозом и слиянием и повреждением подоцитов без признаков острого отторжения, гломерулита или аллотрансплантационной гломерулопатии. В контексте настоящего документа субъект или пациент, страдающий рецидивирующим ФСГС (рФСГС), определяется как человек, у которого был диагностирован ФСГС до трансплантации почки, а затем развился рецидив ФСГС (рФСГС) после трансплантации почки.

В настоящем документе субъекта или пациента с нерцидивирующим ФСГС (nrFSGS) определяют как человека, у которого был диагностирован ФСГС до трансплантации почки, но у которого не развивается ФСГС после трансплантации почки.

В настоящем документе субъект или пациент с врожденным ФСГС (нФСГС) определяется как человек, у которого диагностирован ФСГС (тяжелая протеинурия с необязательным подтверждением биопсией ФСГС с гломерулярным склерозом и слиянием и повреждением подоцитов), в его почке до трансплантации.

Фармацевтический препарат может представлять собой лекарственное средство или препарат, включающий клопидогрел и фармацевтически приемлемый носитель. Описанный в настоящем документе препарат также может быть использован в качестве пищевой добавки.

В настоящем изобретении также представлен способ лечения ФСГС, в котором фармацевтический препарат включает клопидогрел в эффективном количестве.

В частности, клопидогрел или его фармацевтически приемлемая соль или сольват значительно уменьшает повреждение подоцитов и подоцитопатию при ФСГС.

Термин «эффективное количество» или «фармацевтически эффективное количество» относится к такому количеству соединения, которое вызывает желаемый эффект, для которого его вводят (например, улучшение симптомов ФСГС, уменьшение тяжести ФСГС или симптома ФСГС и/или уменьшение прогрессирования ФСГС или симптома ФСГС). Точное количество эффективной дозы зависит от цели лечения и может быть определено известными способами специалистом в данной области (см., например, Lloyd V.A., 2016).

Используемый в настоящем документе термин «лечение» и его аналоги относятся к

замедлению или остановке прогрессирования заболевания. «Лечение» и его аналоги, используемые в настоящем документе, включают, но не ограничиваются полной или частичной ремиссией, снижением риска почечной недостаточности (например, ESRD) и осложнений, связанных с заболеванием (например, отек, восприимчивость к инфекциям или тромбозамболические события). Улучшение или уменьшение выраженности любого из этих симптомов можно легко оценить в соответствии с способами и способами, которые известны в данной области техники или разработаны позже. Желательные эффекты лечения включают предупреждение возникновения или рецидива ФСГС, в частности недиабетического ФСГС, или его состояния или симптома, облегчение состояния или симптома ФСГС, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий ФСГС, снижение скорости прогрессирования или тяжести ФСГС, и/или облегчение или паллиативное облегчение ФСГС. В некоторых вариантах осуществления изобретения способы и композиции изобретения используются на субпопуляциях пациентов, у которых выявлен риск развития ФСГС. В некоторых случаях способы и композиции изобретения полезны для отсрочки развития ФСГС.

В некоторых вариантах осуществления соединения фармацевтического препарата, описанного в настоящем документе (т.е. клопидогрел), или фармацевтически приемлемая соль или сольват этого соединения не назначают с каким-либо другим терапевтическим соединением. В некоторых вариантах осуществления изобретения соединения не назначают с каким-либо другим терапевтическим соединением одновременно или последовательно. В некоторых вариантах осуществления соединения вводят отдельно.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение пациенту одного или нескольких дополнительных терапевтических соединений. В некоторых вариантах осуществления изобретения одно или более дополнительных терапевтических соединений выбирают из одного или более компонентов из числа противовирусного препарата, антикоагулянта, иммуномодулятора, препарата человеческих антител, моноклонального антитела, препарата для интенсивной терапии, антигипертензивного средства, статина, вазодилатора, стероида, цитотоксического средства, диуретика, нестероидного противовоспалительного препарата (НПВП, NSAID), средства для снижения уровня холестерина или триглицеридов, агонистов PPAR или фитофармакологических веществ, таких как миристиновая кислота.

По меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, в контексте настоящего документа, включает всевозможные растворители, разбавители, другие жидкие носители, диспергирующие средства, суспендирующие средства, поверхностно-активные вещества, изотонические вещества, загустители, эмульгаторы, консерванты,

твердые связующие вещества и смазывающие вещества, подходящие для конкретной желательной лекарственной формы. В Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd edition, 2013, Pharmaceutical Press, and Encyclopedia of Pharmaceutical Technology, 2004, Taylor & Francis, описаны различные носители, применяемые при составлении фармацевтических композиций и известные способы их получения. За исключением случаев, когда любой стандартный носитель несовместим с соединениями настоящего раскрытия, например, вызывает нежелательный биологический эффект или иным образом взаимодействует с любым другим компонентом (компонентами) фармацевтического препарата, предполагается, что его использование входит в объем настоящего раскрытия. Неограничивающие примеры подходящих фармацевтически приемлемых носителей включают, но без ограничения, ионообменные вещества, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки (например, сывороточный альбумин человека), буферные вещества (например, фосфаты, глицин, сорбиновая кислота и сорбат калия), частичные смеси глицеридов насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли и электролиты (например, сульфат протамина, гидрофосфат натрия, гидрофосфат калия, хлорид натрия и соли цинка), коллоидный оксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, полиакрилаты, воски, блоксополимеры полиэтилена-полиоксипропилена, ланолин, сахара (такие как лактоза, глюкоза и сахароза), крахмалы (такие как кукурузный крахмал и картофельный крахмал), целлюлозу и ее производные (такие как карбоксиметилцеллюлоза, этилцеллюлоза и ацетат целлюлозы, микрокристаллическая целлюлоза, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия), лактозу, декстрин, маннит, белый сахар, кукурузный крахмал, прежелатинизированный крахмал, осажденный карбонат кальция и гидрофосфат кальция, порошкообразный трагакант, солод, желатин, тальк, вспомогательные вещества (такие как масло какао и суппозиторные воски), масла (такие как арахисовое масло, хлопковое масло, сафлоровое масло, кунжутное масло, оливковое масло, кукурузное масло и соевое масло), гликоли (такие как пропиленгликоль и полиэтиленгликоль), сложные эфиры (такие как этилолеат и этиллаурат), агар-агор, буферные вещества (такие как гидроксид магния и гидроксид алюминия), альгиновую кислоту, апирогенную воду, изотонический физиологический раствор, раствор Рингера, этиловый спирт, фосфатные буферные растворы, нетоксичные совместимые смазывающие материалы (такие как лаурилсульфат натрия и стеарат магния), красители, высвобождающие агенты, покрывающие агенты, подслащивающие агенты, ароматизирующие агенты, парфюмерные агенты, консерванты и антиоксиданты или любые их смеси и комбинации.

Растворимость клопидогрела или его солей можно повысить способами,

известными в данной области, такими как, но без ограничения, сочетание с неводными веществами, такими как полиол или глицерин, или полярными растворителями, такими как пропиленгликоль.

Примеры

Приведенное выше описание будет более понятно со ссылкой на следующие примеры. Однако такие примеры представляют собой лишь способы осуществления одного или нескольких вариантов реализации настоящего изобретения и не должны рассматриваться как ограничивающие объем изобретения.

Пример 1

Тестирование *in vivo*

Для биологического тестирования клопидогрела была выбрана общепринятая модель ФСГС на мышах, т.е. адриамицин-индуцированная нефропатия. Адриамициновая нефропатия является современной моделью первичного фокального сегментарного гломерулосклероза человека (ФСГС) на грызунах и характеризуется повреждением подоцитов с последующим гломерулосклерозом, тубулоинтерстициальным воспалением и фиброзом (Da Sacco S. et al., 2014, Lee V.W. и Harris D.C., 2011)) и поэтому была использована для демонстрации терапевтического эффекта клопидогрела при ФСГС.

Все эксперименты на животных и манипуляции с ними проводились в соответствии с австрийским законом о защите животных и были одобрены Комитетом по контролю этических норм обращения с животными австрийского министерства образования, науки и исследований.

Адриамицин-зависимую нефропатию (активное соединение: доксорубицин) вызывали введением 10-недельным мышам линии BALB/c в хвостовую вену дозы около 9 мг/кг мыши. Контрольным мышам вводили 0,9%-ный физиологический раствор. В каждой группе анализировали не менее 6 мышей. Ежедневно проводили мониторинг мышей на предмет появления признаков боли, изменения движений или снижения приема пищи и умерщвляли путем цервикальной дислокации. Тестируемые препараты вводили перорально, предварительно смешав их с кормом в дозах, основанных на литературных исследованиях.

В качестве дополнительной модели можно использовать сверхэкспрессирующих miR-193a мышей, которые страдают ФСГС из-за подавления гена опухоли Вильмса 1 (WT1) (Gebeshuber et al., 2013).

Результаты

Уровень альбумина в моче оценивали способом ИФА (ELISA), уровень общего белка и креатинина в моче измеряли с помощью аналитической системы Roche Cobas с

использованием обычных лабораторных наборов. Соотношение белок/креатинин в моче (UPCR) и соотношение альбумин/креатинин в моче (UACR) оценивали в разные моменты времени. Массу и показатели физического развития отслеживали ежедневно. В конце эксперимента собирали срезы тканей, образцы плазмы и мочи, которые сохраняли до последующего анализа. Для перспективных препаратов-кандидатов были обнаружены значительно сниженные значения UPCR и UACR, что свидетельствует о функциональном улучшении и снижении протеинурии.

Повторные измерения ANOVA в различные моменты времени были рассчитаны с помощью статистического программного обеспечения R. Эффекты для приема препарата (клопидогрел) и момента времени (в сутках) были значимыми с р-значениями 0,009 (препарат) и 0,023 (момент времени), соответственно. р-Значение для взаимодействия (препарат: момент времени) составило 0,788 (см. фиг. 2).

На фиг. 1 показано, что ФСГС вызывали адриамицином (ADR), и оценивали протеинурию в указанные сроки (в сутках) после индукции. UPCR – соотношение белка к креатинину в моче; UACR – соотношение альбумина к креатинину в моче – оба вещества являются маркерами протеинурии и повреждения почек; серые ячейки (ктрл) – мыши контрольной группы с ФСГС; ячейки, помеченные «клопидогрель» – мыши с ФСГС, получавшие лечение клопидогрелем; на вставках указаны медиана (средняя линия), интерквартильный размах (коробка) и 95%-ные доверительные интервалы (усы) в дополнение к отдельным точкам данных (разброс). Р-значения t-тестов указаны над данными для каждой временной точки. UPCR у мышей, получавших клопидогрель и ктрл, и у мышей, получавших клопидогрель, через 37 дней после начала эксперимента снижается до похожего уровня, поскольку в данном эксперименте мыши смогли восстановиться после индуцированного адриамицином ФСГС.

На фиг. 2 показано следующее: в независимом эксперименте ФСГС индуцировали адриамицином (ADR) и оценивали протеинурию в указанные сроки (в сутках) после индукции. UPCR – соотношение белка к креатинину в моче; серые ячейки (ктрл) – мыши контрольной группы с ФСГС; ячейки, помеченные «клопидогрель» – мыши с ФСГС, получавшие лечение клопидогрелем; на коробчатых диаграммах указаны медиана (средняя линия), интерквартильный размах (коробка) и 95% доверительные интервалы (усы) в дополнение к отдельным точкам данных (разброс). Р-значения t-тестов указаны над данными для каждой временной точки. Результаты повторного ANOVA для проверки клопидогреля по временным точкам показаны выше.

Пример 2

Тестирование *in vivo*

Для биологического тестирования клопидогрела была выбрана общепринятая модель ФСГС на мышах, т.е. адриамицин-индуцированная нефропатия. Адриамициновая нефропатия представляет собой современную модель первичного фокального сегментарного гломерулосклероза (ФСГС) человека, которая характеризуется повреждением подоцитов с последующим гломерулосклерозом, тубулоинтерстициальным воспалением и фиброзом (Da Sacco S. et al., 2014, Lee V.W. и Harris D.C., 2011), и поэтому ее использовали для демонстрации терапевтического эффекта клопидогрела при ФСГС.

Все эксперименты на животных и манипуляции с ними проводились в соответствии с австрийским законом о защите животных и были одобрены Комитетом по контролю этических норм обращения с животными австрийского министерства образования, науки и исследований.

Материалы и способы

Адриамицин (доксорубицин; Sigma, D1515-10 мг) разбавляли H₂O двойной дистилляции. Чтобы вызвать ФСГС, внутривенно вводили в хвостовую вену дозу 10,5 мг/кг мыши с использованием игл 27G, т.е. в общем объеме 200 мкл на 25-граммовую мышь.

Для введения инъекции в хвостовую вену мышей анестезировали введением кетанета (Pfizer, флаконы 25 мг/мл) и ромпуна (Bayer, раствор для инъекций 20 мг/мл). Получали конечную смесь, содержащую 12,5 мг/мл кетанета и 0,25% компуна в 0,9% растворе NaCl, и вводили в дозе 200 мкл/25 г мыши. Для терапевтических экспериментов использовали гидросульфат клопидогрела (Sigma, PNR1431-1G).

Животные/Содержание животных

Мыши и модель ФСГС

Самки мышей линии Balb/c получали из питомника Медицинского университета (Abteilung für Labortierkunde, Himberg, Austria). Для экспериментов использовали животных в возрасте 12-16 недель с весом >20 г, скорректированных по весу и возрасту. Животным позволяли акклиматизироваться в течение не менее 7 дней. Для идентификации животных помечали ушными или пальцевыми клипсами. Адриамициновая нефропатия у мышей Balb/c является наиболее часто используемой моделью для доклинических исследований ФСГС на животных и имеет общие черты с ФСГС человека.

Питание

Стандартный коммерческий корм от ssniff (ssniff Spezialdiäten GmbH, Зест,

Германия) содержал сырой белок (19%), сырой жир (3,3%), сырую клетчатку (4,9%), сырую золу (6,4%), крахмал (36,5%), сахар (4,7%). Животных контрольной группы кормили стандартным кормом, животных подопытной группы - стандартным кормом + клопидогрел (200 мг/кг) производства ssniff. Всем животным разрешалось питаться *ad libitum*, исходя из среднесуточного потребления ~4 грамма на мышшь (согласно руководству по уходу за животными Университета Джона Хопкинса, Балтимор, Мериленд, США; <http://web.jhu.edu/animalcare/procedures/mouse.html>), то есть ~25-30 мг клопидогрела/кг мышши/день (Halim et al., 2019).

Содержание

Животных содержали в макролоновых клетках размера 375 мм x 215 мм x 150 мм в стандартных условиях ($23\pm 1^\circ\text{C}$, $55\pm 10\%$ влажности, 12-часовой цикл день-ночь) и ежедневно проверяли. Корм и вода предоставлялись *ad libitum*.

Сбор мочи и измерения

Каждую неделю отбирали разовые пробы мочи, и измеряли в них уровень креатинина и белка.

Альбумин в моче определяли способом ИФА. 96-луночные планшеты покрывали в течение ночи при 4°C 100 мкл раствора антител Anti Mouse Serum Albumin antibody (Abcam ab34807, Lot GR3242102-4; разведение 1:2000) в посадочном буфере (3,7г NaHCO_3 ; 0,64 г Na_2CO_3 ; 1 л дистиллированной воды). Остальные процедуры проводили при комнатной температуре. Лунки трижды промывали HBSS (Sigma H8264-500ML) + 0,05% Tween-20 (Bio-Rad, #1706531) и блокировали разбавителем ELISA/ELISPOT (eBioscience, 00-4202-56) и снова трижды промывали. И образцы, и препарат для построения стандартной кривой разводили разбавителем ELISA/ELISPOT, инкубировали в течение 2 часов, затем в 3 этапа промывали HBSS + 0,05% Tween-20, инкубировали с HRP антителом против мышинового сывороточного альбумина (Abcam ab19195, Lot GR3242102-4; разведение 1:100000) в течение 1 часа, после чего проводили 5 стадий промывки. Реакционную смесь проявляли при помощи реактива TMB One Solution (Promega, G7431) и останавливали реакцию при действии 2N H_2SO_4 . Стандартные кривые были построены с использованием мышинового альбумина (Merck/Sigma, 126674-25MG). Поглощение при 450 нм измеряли на микропланшетном ридере Epoch (BioTek) с использованием программного обеспечения Gen5 1.10.

Результаты гистологического исследования

В конце эксперимента почки извлекали, помещали в парафин и проводили окрашивание реактивом Шиффа (Шифф-йодная кислота). Были тщательно изучены результаты гистологического исследования, и количественно определено количество

склеротических гломерул и белковых слепков.

Статистические данные

Для статистического анализа данных использовали R версию 4.0.2. Для сравнения значений UPCR и UACR между образцами от обработанных и контрольных мышей для каждой отдельной временной точки и для оценки различий в гистологических параметрах использовали t-критерий Стьюдента. Для анализа влияния препарата на UPCR и UACR с течением времени проводили ANOVA с использованием соответствующих функций пакета rstatix (V0.6.0). Для создания графических визуализаций использовали пакеты ggplot2 (V3.3.2) и ggpubr (V0.4.0).

План эксперимента

В двух независимых экспериментах (Эксперимент 1 и 2) 34 самкам мышей линии Balb/c вводили 10,5 мг/кг адриамицина в хвостовую вену (см. таблицу 2). Через 48 часов после инъекции активная группа получала стандартный корм + 200 мг/кг клопидогрела, а мышей контрольной группы оставляли на стандартном корме. Разовые порции мочи собирали еженедельно, почки извлекали при умерщвлении. В хвостовую вену вводили 10,5 мг/кг адриамицина. Через 2 дня начинали лечение клопидогрелем. Еженедельно собирали разовые порции мочи и измеряли вес. Эксперименты продолжались около 5 недель.

В следующей таблице 1 приведен обзор мышей, использованных в экспериментах (* почки были собраны у 7 мышей из каждой группы; ** 1 животное было найдено мертвым в каждой группе).

Таблица 1

	Эксперимент 1		Эксперимент 2	
	В начале	В конце	В начале	В конце
Контроль	9	9*	9	8**
Клопидогрел	8	8*	8	7**

Результаты

Клопидогрел значительно снижает альбуминурию и протеинурию

Определение соотношения альбумина и креатинина в моче (UACR) и соотношения белка и креатинина в моче (UPCR) выявило заметное улучшение при терапии клопидогрелем. На фиг. 3 показано процентное снижение UACR и UPCR в двух независимых экспериментах. На фиг. 4 представлены коробчатые диаграммы и р-значения для всех отдельных проб мочи в эксперименте 1.

В результате повторного ANOVA выявлено значительное благоприятное влияние лечения клопидогрелем с течением времени на исход, определенный на основе уровня UPCR и UACR ($p=0,000475$ для UPCR и $p=0,004$ для UACR).

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) - **UPCR**

Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
Эксперимент.препарат	1	56	13,779	0,000475	*	0,197
Временная точка.суток	3	56	3,191	0,030000	*	0,146
Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	3	56	1,175	0,327000		0,059

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **UACR**

Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
Эксперимент.препарат	1	57	9.007	0.004	*	0.136
Временная точка.суток	3	57	2.041	0.118	*	0.097
Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	3	57	1.253	0.299		0.06

Повторные измерения ANOVA также показали благоприятное влияние лечения клопидогрелем с течением времени на результат, определенный на основании уровней UPCR и UACR во втором независимом эксперименте (фиг. 5) ($p=0,029$ для UPCR и $p=0,009$ для UACR).

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **UPCR**

	Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	Эксперимент.препарат	1	66	4,978	0,029	*	0,070
2	Временная точка.суток	4	66	3,949	0,006	*	0,193
3	Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	4	66	0,447	0,774		0,026

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **UACR**

	Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	Эксперимент.препарат	1	66	7,175	0,009	*	0,098
2	Временная точка.суток	4	66	4,418	0,003	*	0,211
3	Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	4	66	0,289	0,884		0,017

Таким образом, благоприятное воздействие клопидогреля было подтверждено в двух независимых экспериментах.

По результатам обоих экспериментов, клопидогрел снизил UPCR в среднем на 49% во всех временных точках (повторные измерения ANOVA $p=7,84e-05$) и UACR в среднем на 61% во всех временных точках (повторные измерения ANOVA $p=0,000162$).

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **UPCR**

	Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	Эксперимент.препарат	1	122	16,710	7,84e-05	*	0,120
2	Временная точка.суток	8	122	4,123	2,21e-04	*	0,213
3	Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	8	122	0,815	5,91e-01		0,051

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **UACR**

	Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	Эксперимент.препарат	1	123	15,147	0,000162	*	0,110
2	Временная точка.суток	8	123	2,427	0,018000	*	0,136
3	Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	8	123	1,076	0,384000		0,065

Таким образом, определение UPCR и UACR выявило выраженную и значительную защиту почечной функции при терапии клопидогрелем.

Общее состояние здоровья - изменение массы тела:

Снижение массы тела является распространенным симптомом заболевания почек, а также следствием токсичности адриамицина. Изменение массы тела оценивали еженедельно в ходе экспериментов. Мы заметили, что у мышей, получавших клопидогрел, потеря массы тела была меньше по сравнению с мышами контрольной группы.

Таблица измерений ANOVA (тесты III типа) – **Масса тела**

	Эффект	DFn	DFd	F	p	p<.05	ges
1	Эксперимент.препарат	1	129	7,607	7,00e-03	*	0,056
2	Временная точка.суток	8	129	6,752	2,25e-07	*	0,295
3	Эксперимент.препарат:Временная точка.суток	8	129	0,634	7,48e-01		0,038

В целом, клопидогрель снизил потерю массы тела, связанную с ADR, на 48% (повторный анализ ANOVA $p=0,007$).

Гистопатологическая оценка

Гистопатологическая оценка подтвердила, что у животных с адриамицин-индуцированной нефропатией наблюдаются характерные гломерулярные поражения, а также поразительные тубулярные изменения (см. фиг. 7 и фиг. 9). Гломерулы часто поражаются преимущественно сегментарно (затрагиваются только части гломерулярного клубочка), но иногда и глобально - склеротическим помутнением гломерулярных капилляров. Эти поражения как на животных моделях, так и у человека могут быть результатом повреждения подоцитов и являются диагностическими признаками прогрессирующего заболевания. У интактных животных наблюдается повреждение канальцев. Проксимальные канальцы сильно расширены, выстланы уплощенными эпителиальными клетками и содержат однородные белковые образования. Такие изменения канальцев указывают на дисфункцию канальцев, являются неспецифическими и могут наблюдаться при первичном тубулоинтерстициальном заболевании (хронический интерстициальный нефрит), но могут также возникать при тяжелом гломерулярном повреждении. Патогенетические механизмы могут представлять собой обструкцию мочевого потока как нисходящую причину канальцевой дилатации, а также гломерулярное повреждение, особенно если оно связано с протеинурией высокой степени, которая, вероятно, и вызывает наблюдаемые здесь изменения.

Несмотря на то, что ФСГС инициируется гломерулярным повреждением, конечной причиной ESRD является нарушение процесса канальцевой реабсорбции. На фиг. 7 и фиг. 9 показано, что описанные выше изменения отсутствуют или, по крайней мере, выражены гораздо слабее: лишь очень немногие гломерулы поражены сегментарными склерозами

(отмечены стрелками), а также очень незначительными и значительно сниженными повреждениями канальцев (отмечены звездочками на компактных проявляющихся белковых образованиях).

На фиг. 8 представлена количественная оценка гистопатологического повреждения в обеих группах. Показатель повреждения, определяемый как сумма баллов тяжести гломерулярного склероза и баллов тяжести тубулярной эктазии, отражает существенное облегчение течения заболевания после терапии клопидогрелем, составляющее примерно 67%. Следует отметить, что адриамициновая нефропатия характеризуется значительной гетерогенностью гломерулярного склероза (Zhou et al. 2019; Xiong et al. 2020), что также отражает состояние человека. Важно отметить, что клопидогрел полностью предотвращал тяжелое заболевание - основная терапевтическая цель - и ни в одном из образцов не был достигнут индекс гломерулярного склероза выше 4% от всех гломерул, в то время как в контрольной группе без лечения индекс склероза повышался до 35% (фиг. 8А, В). Тубулярная эктазия, определяемая по белковым цилиндрам при окрашивании реактивом Шиффа, является альтернативной мерой для выявления сбоя в процессе почечной фильтрации и также значительно уменьшалась под действием клопидогрела (фиг. 8С).

Морфологические детали анализируемых участков и широкоформатные изображения приведены на фиг. 9, где представлены три случая наиболее значительных поражений из каждой группы.

В целом, клопидогрел снижал гистопатологические повреждения на 67,9% (95% доверительный интервал -11,7% до -98,1%) со среднего балла 2,67 до 0,86 ($p=0,038$).

Таким образом, определение склеротических гломерул и эктазированных канальцев выявило выраженное и значительное улучшение гистопатологического повреждения при терапии клопидогрелем.

Подводя итог, лечение клопидогрелем значительно улучшало основные показатели ФСГС, а именно UACR, UPCR и выраженность гистопатологических изменений.

Пример 3

Для классификации поражений ФСГС у животных с адриамицин-индуцированной нефропатией проведено исследование способом электронной микроскопии и подтверждено, что у этих животных подоциты поражены диффузной подоцитарной токсичностью с высоким процентом сглаживания отростков ножек, микроворсинчатой трансформацией подоцитов и тубулоретикулярными включениями, в то время как у животных, получавших клопидогрель, как описано выше, значительно уменьшилось повреждение подоцитов (подоцитопатия).

Литература

- Angioi A., and Pani A., FSGS: from pathogenesis to histological lesion, *J. Nephrol.* (2016), *Nephrol.*, 29(4):517-23
- Bose B., Cattran D., *Glomerular Diseases: FSGS*, 2014, *Clin. J. Am.Soc.Nephrol.*, 9, 626-632
- Cayla G. et al., Flow cytometric assessment of vasodilator-stimulated phosphoprotein: prognostic value of recurrent cardiovascular events after acute coronary syndromes, 2008, 101(11-12), 743-51
- Chen A. et al., Soluble RARRES1 induces podocyte apoptosis to promote glomerular disease progression, 2020, *J.Clin.Invest*, 130(10), 5523-5535
- Chung CF. et al., Intrinsic tumor necrosis factor- α pathway is activated in a subset of patients with focal segmental glomerulosclerosis, 2019, *PLoS One*, 14(5):e0216426
- Da Sacco S. et al., *Renal Regeneration, Adriamycin Nephropathy, Dubois' Lupus Erythematosus and related Syndromes* (9th edition), 2019
- D'Agati V., Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis, 2003, *Semin Nephrol*, 23(2), 117-34
- Fioretto, P. et al., 1996, Patterns of renal injury in NIDDM patients with microalbuminuria, *Diabetologia*, vol. 39, no. 12, pp. 1569–1576
- Gebeshuber CA, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1, 2013, *Nat Med.*, 19(4),481-487
- Halim H., et al., Ticagrelor Induces Paraoxonase-1 (PON1) and Better Protects Hypercholesterolemic Mice against Atherosclerosis Compared to Clopidogrel, 2019, *PloS One*, 14 (6), e0218934. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218934>.
- Harris J.J. et al., Active proteases in nephrotic plasma lead to a podocin-dependent phosphorylation of VASP in podocytes via protease activated receptor-1, 2013, *J Pathol.*, 229(5), 660-71
- Lee V.W. and Harris D.C., Adriamycin nephropathy: A model of focal segmental glomerulosclerosis, *Nephrology*, 16, 2011, 30-38
- Lloyd V.A. Jr., 2016, *The Art, Science, and Technology of Pharmaceutical Compounding*, 5th Edition, eISBN: 1-58212-263-6
- Osmancik P. et al., High leukocyte count and interleukin-10 predict high on-treatment-platelet-reactivity in patients treated with clopidogrel, 2012, *J Thromb Thrombolysis*, 33(4), 349-54
- Pedigo C.E. et al., Local TNF causes NFATc1-dependent cholesterol-mediated podocyte injury, 2016, *J. Clin. Invest*, 126(9), 3336-50

Peters H, et al. Platelet inhibition limits TGF-beta overexpression and matrix expansion after induction of anti-thy1 glomerulonephritis. *Kidney Int.* 2004, 65(6), 2238-2248.

Qi C. et al., Classification and differential diagnosis of diabetic nephropathy, *Journal of Diabetes Research*, 2016, ID8637138, 1-7.

Rogacka D. et al., Regulation of podocytes function by AMP-activated protein kinase, 2020, *Arch Biochem Biophys*, 692, 108541

Rosenberg A.Z. and Kopp, J.B., Focal segmental glomerulosclerosis, *Clin J Am Soc Nephrol* 12: 502–517, 2017

Sakata T. et al., Antiplatelet therapy effectively reduces plasma plasminogen activator inhibitor-1 levels, 2011, *Artherosclerosis*, 214(2), 490-1

Siller-Matula J.M. et al., Multiple electrode aggregometry predicts stent thrombosis better than the vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation assay, 2010, 8(2), 351-9

Solheim S et al., No difference in the effects of clopidogrel and aspirin on inflammatory markers in patients with coronary heart disease, 2006, *Thromb. Haemost.*, 96(5), 660-4

Su X, et al., Effect of antiplatelet therapy on cardiovascular and kidney outcomes in patients with chronic kidney disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC Nephrol.* 2019, 20(1). doi:10.1186/s12882-019-1499-3

Tervaert, T.W.C., et al., Pathologic classification of diabetic nephropathy, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2010, vol.21, no.4, pp. 556–563

Tsai PY. et al., Antroquinonol reduces oxidative stress by enhancing the Nrf2 signaling pathway and inhibits inflammation and sclerosis in focal segmental glomerulosclerosis mice, 2011, *Free Radic Biol Med*, 50(11), 1503-16

Tu X. et al., Anti-inflammatory Renoprotective Effect of Clopidogrel and Irbesartan in Chronic Renal Injury, 2008, *J.Am.Soc.Nephrol.*, 19(1), 77-83

Troyanov S, et al.; Toronto Glomerulonephritis Registry Group. Focal and segmental glomerulosclerosis: definition and relevance of a partial remission, 2005, *J Am Soc Nephrol.*, 16(4),1061-1068

Xiong T., et al. Interleukin-9 Protects from Early Podocyte Injury and Progressive Glomerulosclerosis in Adriamycin-Induced Nephropathy. *Kidney International* 2020, 98 (3): 615–629.

Yang H. et al., Clopidogrel Protects Endothelium by Hinderling TNF α -InducedVCAM-1 Expression through CaMKK β /AMPK/Nrf2 Pathway, 2016, *J Diabetes Res.* 1-10

Yang SM., et al., Citral is renoprotective for focal segmental glomerulosclerosis by inhibiting oxidative stress and apoptosis and activating Nrf2 pathway in mice, 2013, *PLoS One*, 8(9), e74871

Zhou D., et al., Sonic Hedgehog Connects Podocyte Injury to Mesangial Activation and Glomerulosclerosis, 2019, JCI Insight, 4 (22). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.130515>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтический препарат, включающий клопидогрел, или его соль, или сольват, для применения при лечении недиабетического субъекта, страдающего фокальным сегментарным гломерулосклерозом (ФСГС).

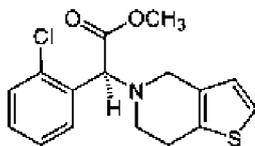
2. Фармацевтический препарат для применения по п. 1, в котором клопидогрел присутствует в качестве единственного действующего вещества.

3. Фармацевтический препарат для применения по п. 1 или 2, в котором ФСГС представляет собой первичный ФСГС.

4. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 3, в котором фармацевтический препарат представляет собой лекарственное средство или лекарственный препарат, включающий клопидогрел и фармацевтически приемлемый носитель.

5. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 4, в котором препарат вводят системно.

6. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 5, в котором клопидогрел имеет структуру



7. Фармацевтический препарат для применения по п. 6, в котором данный препарат содержит примерно от 10 до 400 мг клопидогрела.

8. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 7, в котором указанный фармацевтический препарат предназначен для системного введения, предпочтительно для внутривенного, внутримышечного, подкожного, внутрикожного, чрескожного или перорального введения.

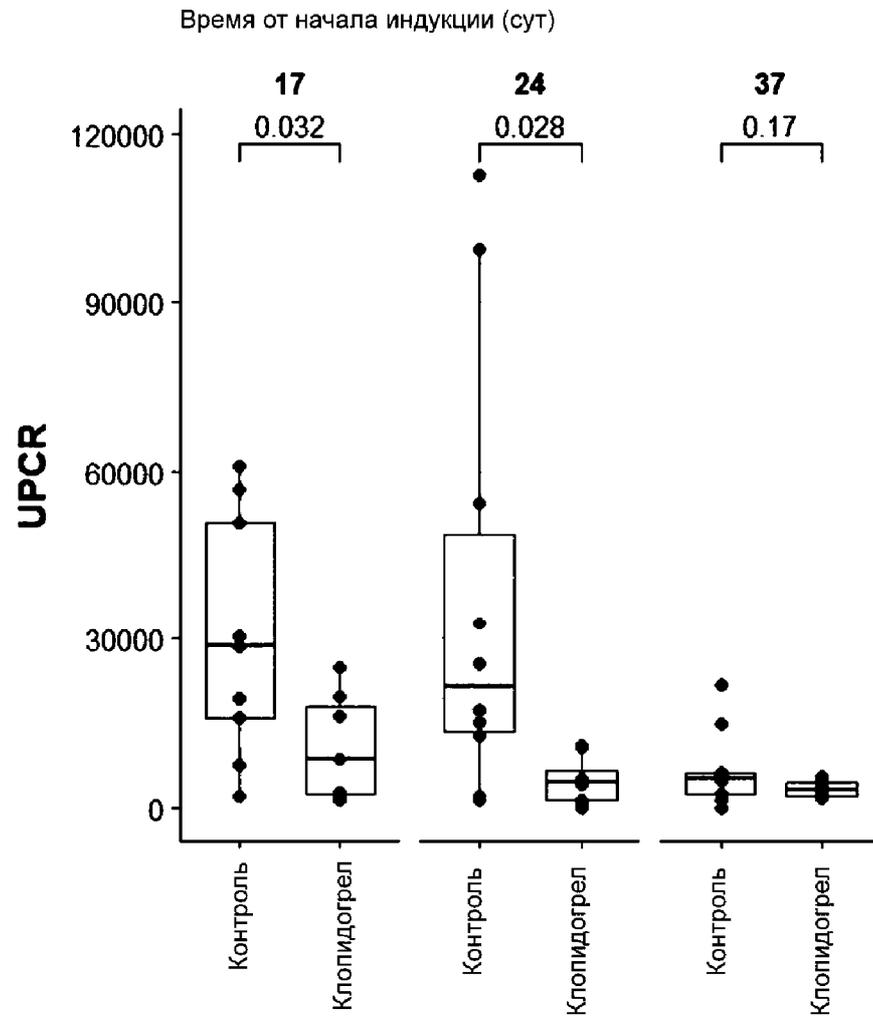
9. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 8, в котором указанный фармацевтический препарат вводят субъекту в виде спрея, порошка, геля, мази, крема, пены или жидкого раствора, лосьона, раствора для полоскания горла, аэрозольного порошка, аэрозольного жидкого состава, гранул, капсул, капель, таблеток, сиропа, пастилок или препарата для инфузии или инъекции.

10. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 9, в котором указанный фармацевтический препарат вводят в эффективном количестве субъекту, страдающему ФСГС или подверженному риску развития ФСГС.

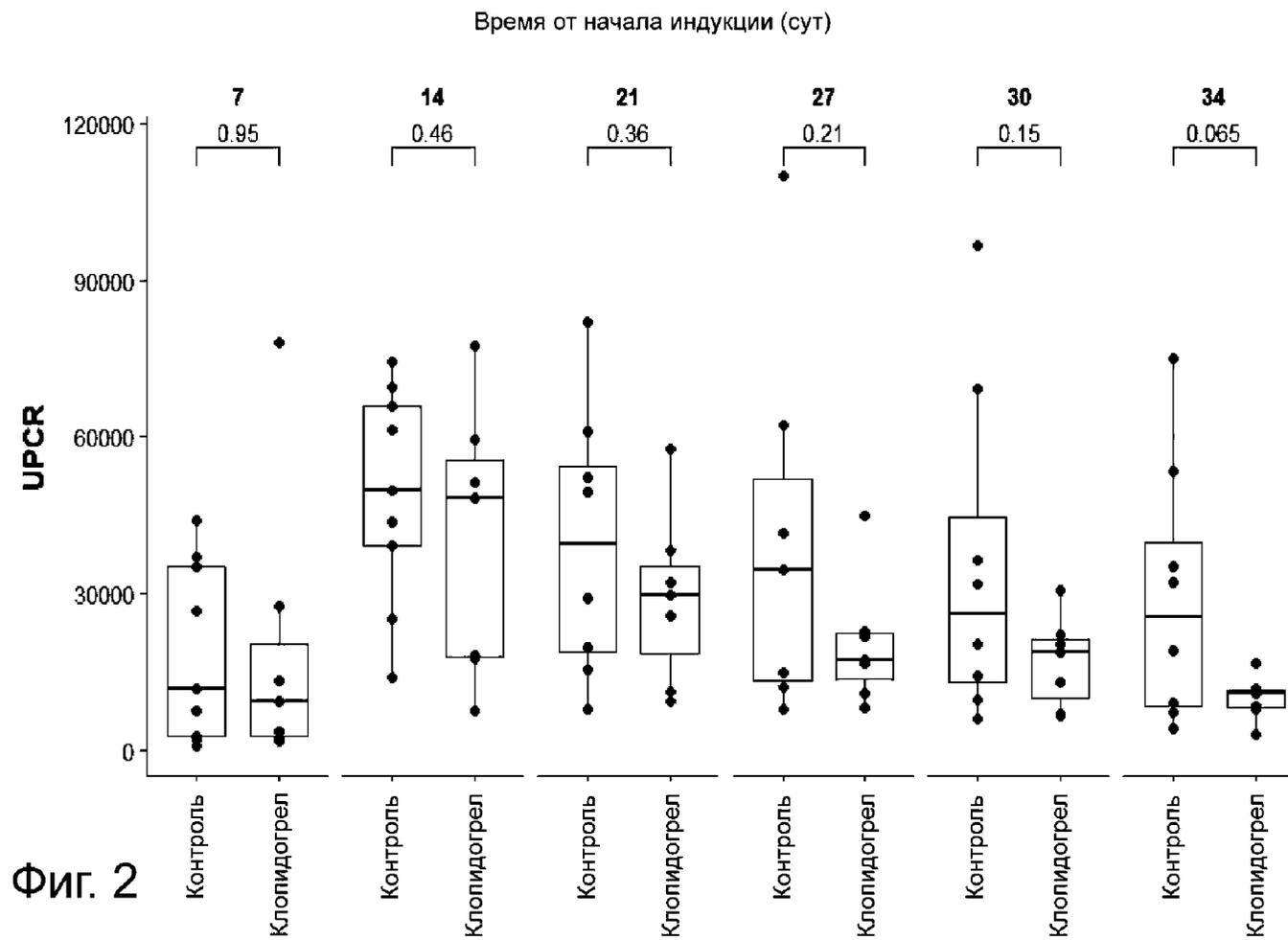
11. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 10, в котором указанный фармацевтический препарат вводят в качестве единственного вещества, или в

котором препарат используют в виде комбинации с другим препаратом, включающим одно или более действующих веществ.

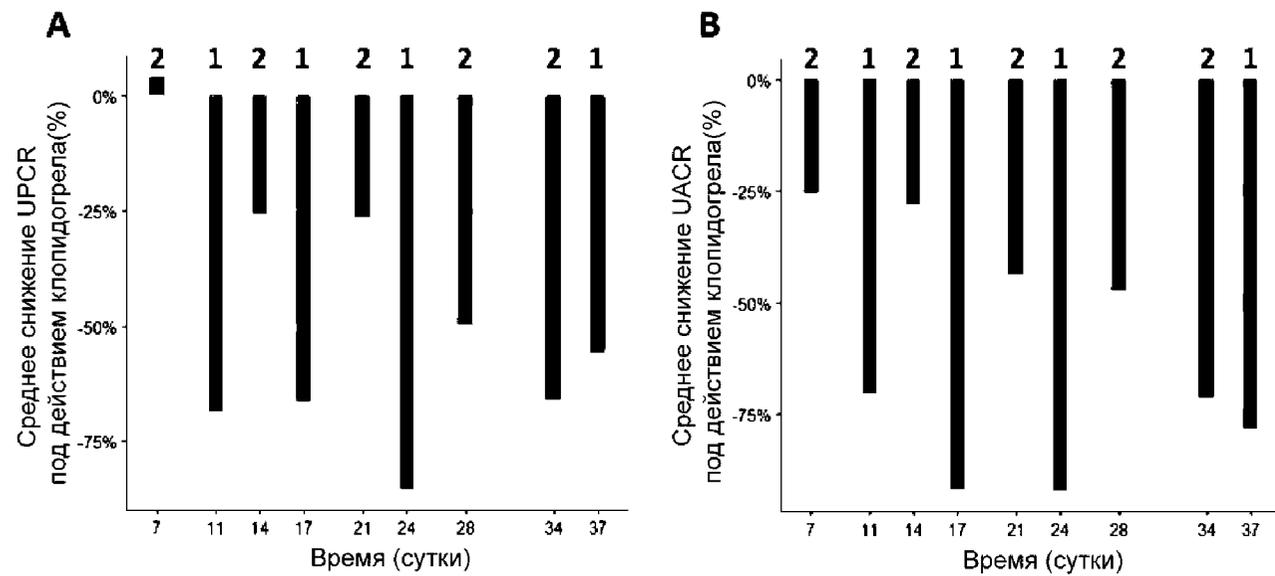
12. Фармацевтический препарат для применения по любому из пп. 1 - 11, в котором указанный фармацевтический препарат вводят в комбинации с активным агентом, выбранным из группы, состоящей из противовирусных препаратов, антикоагулянтов, иммуномодуляторов, препаратов антител человека, моноклональных антител, препаратов для интенсивной терапии, антигипертензивных средств, статинов, вазодилататоров, стероидов, цитотоксических препаратов, диуретиков, нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП), средств, снижающих уровень холестерина или триглицеридов, и агонистов PPAR.



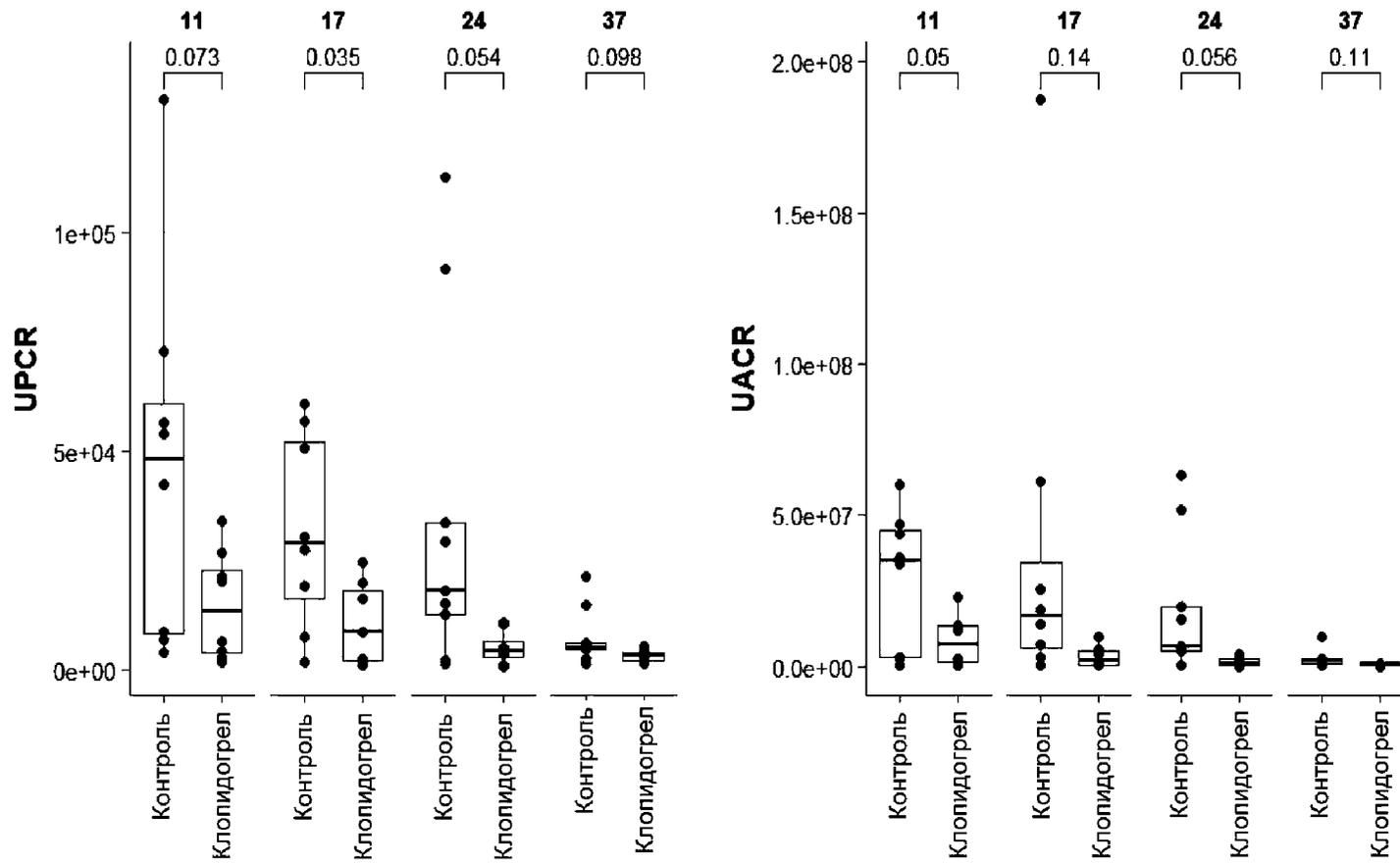
Фиг. 1



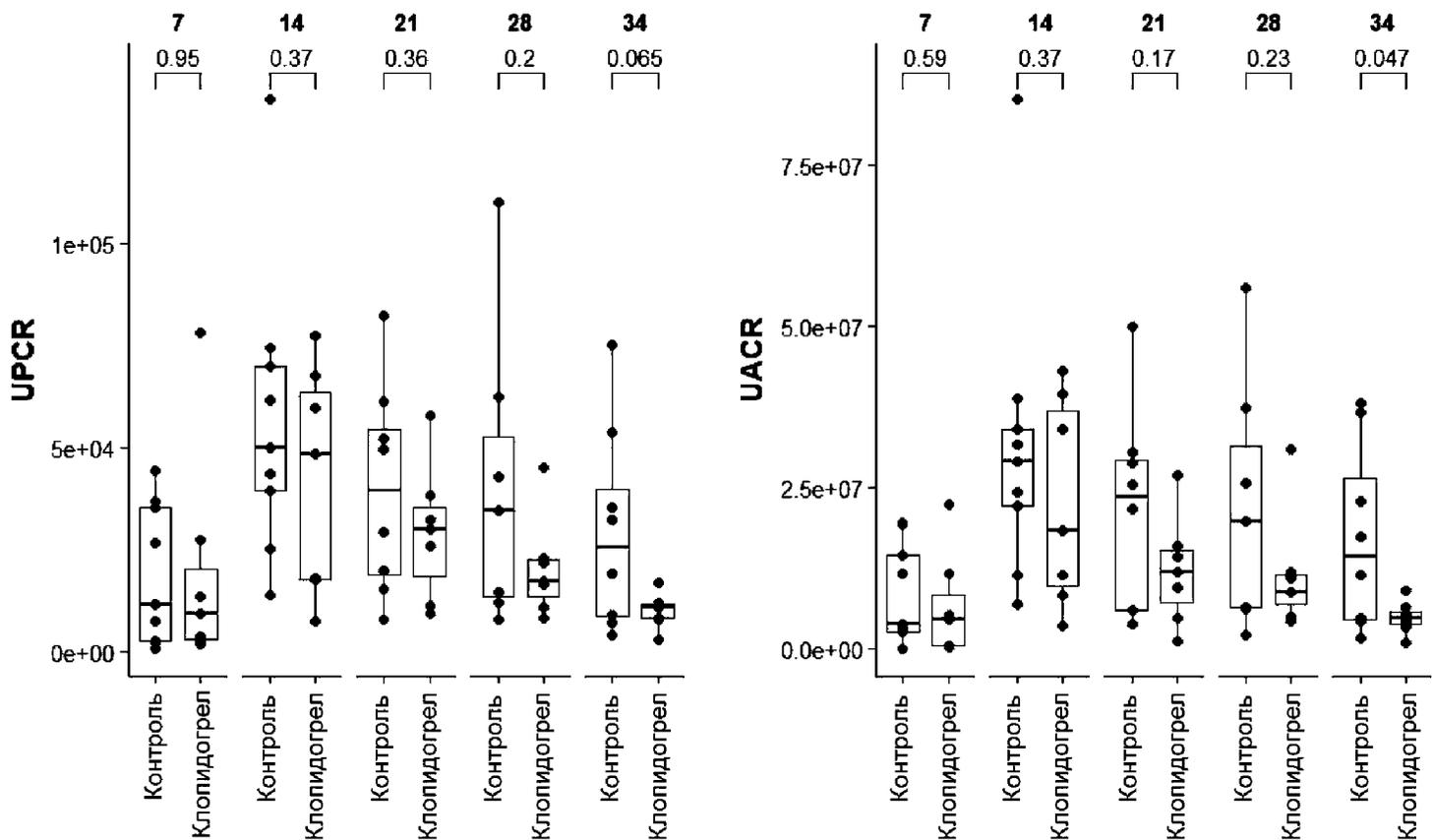
Фиг. 2



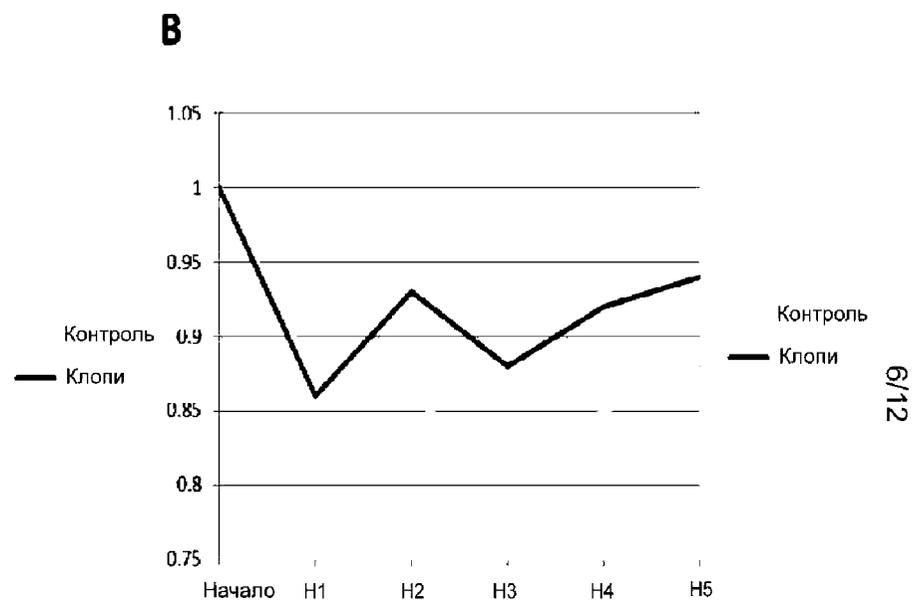
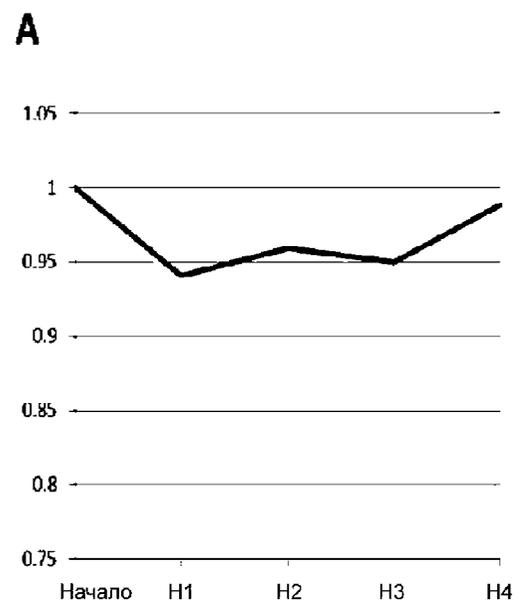
Фиг. 3



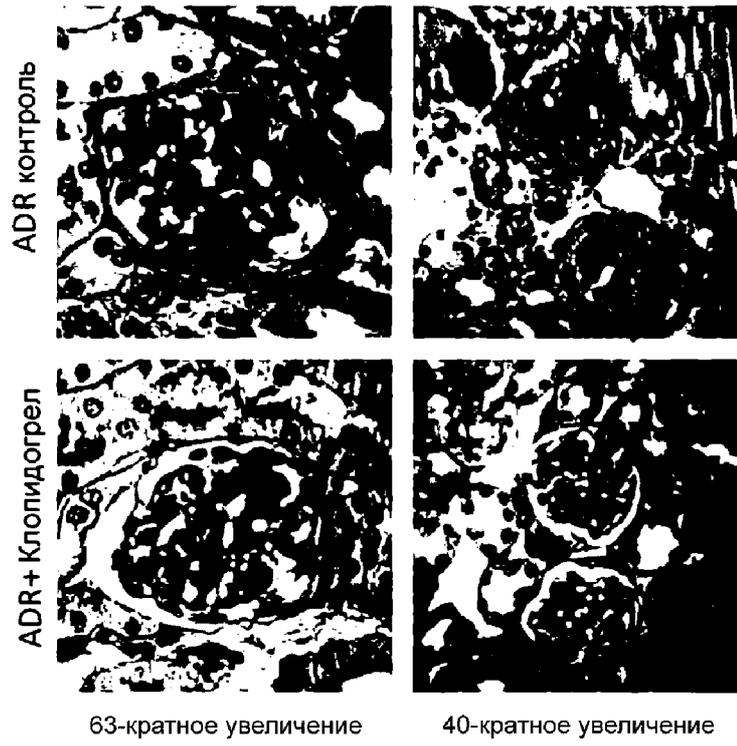
Фиг. 4



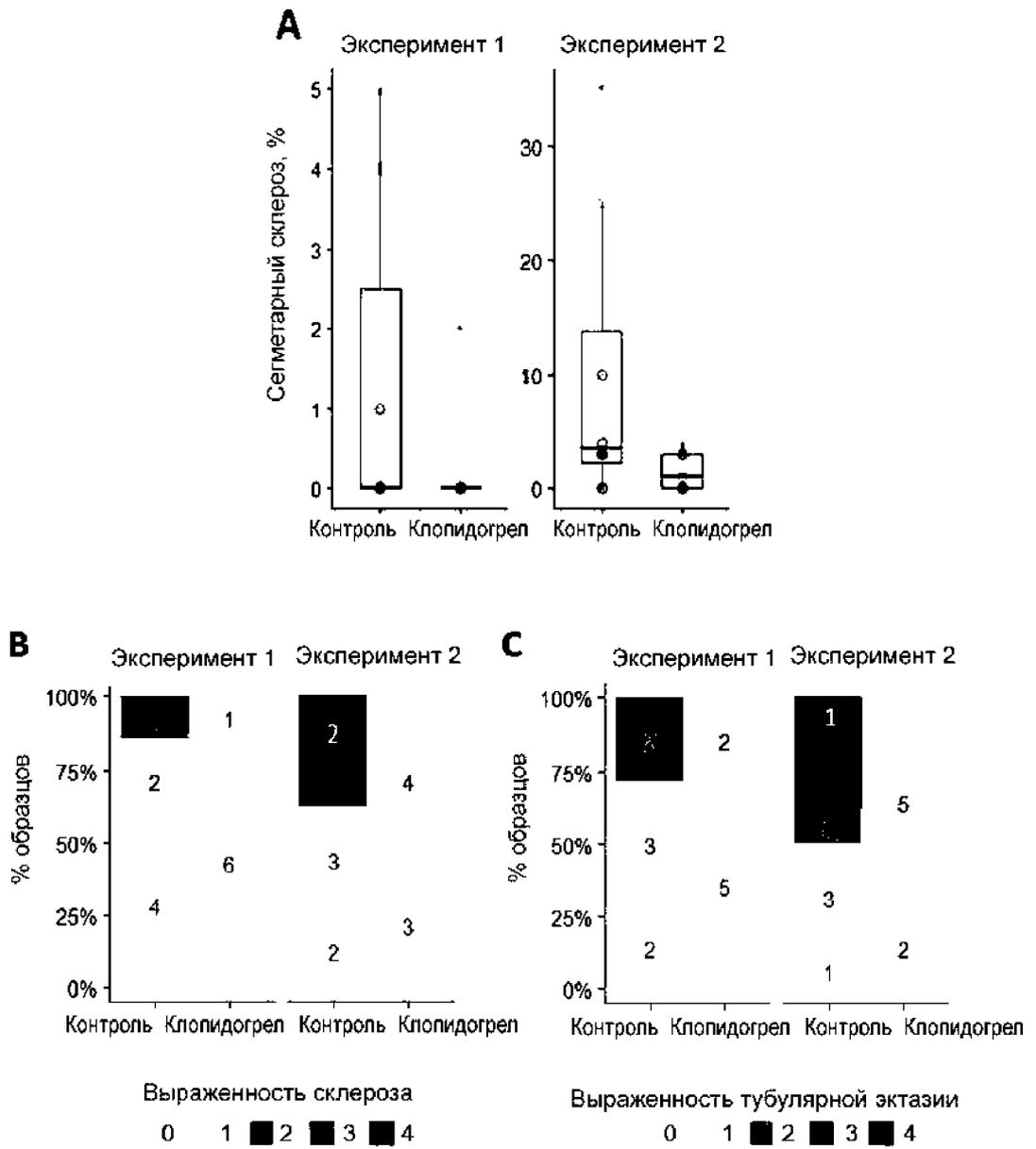
Фиг. 5



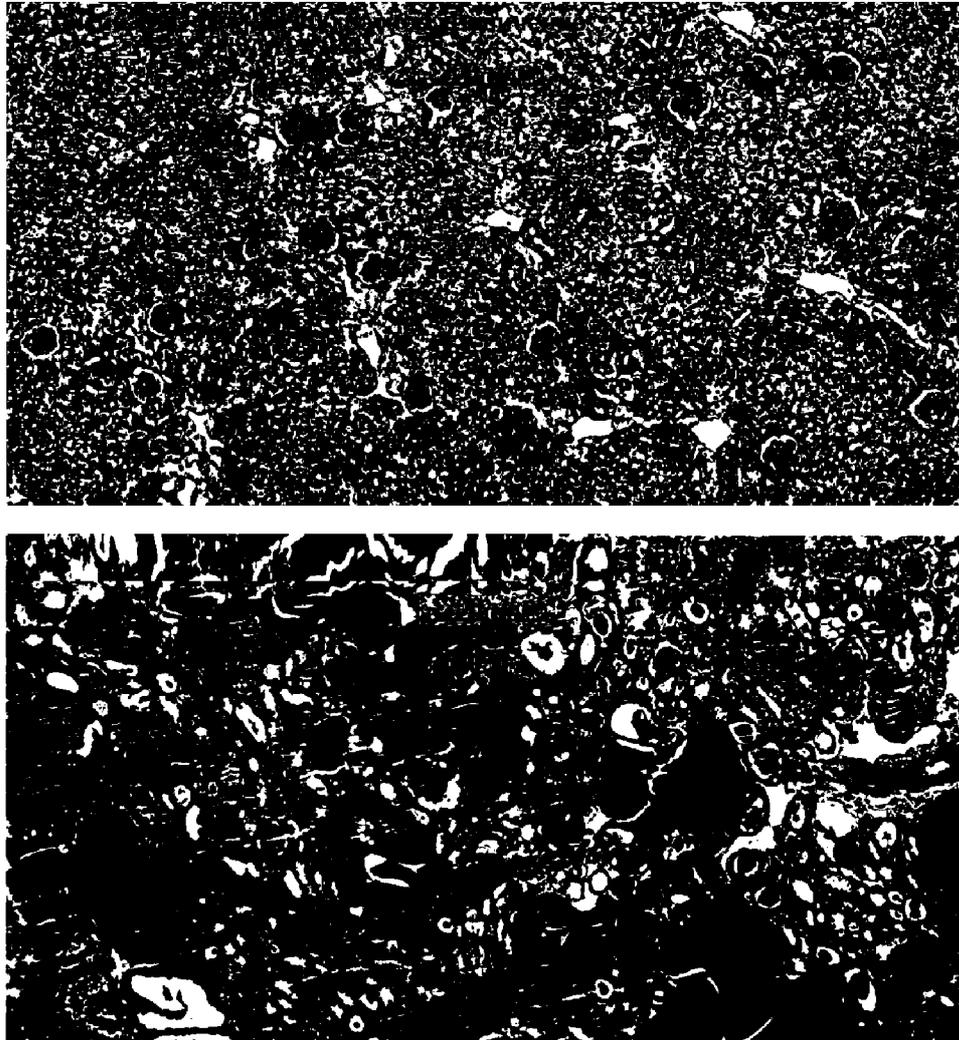
Фиг. 6



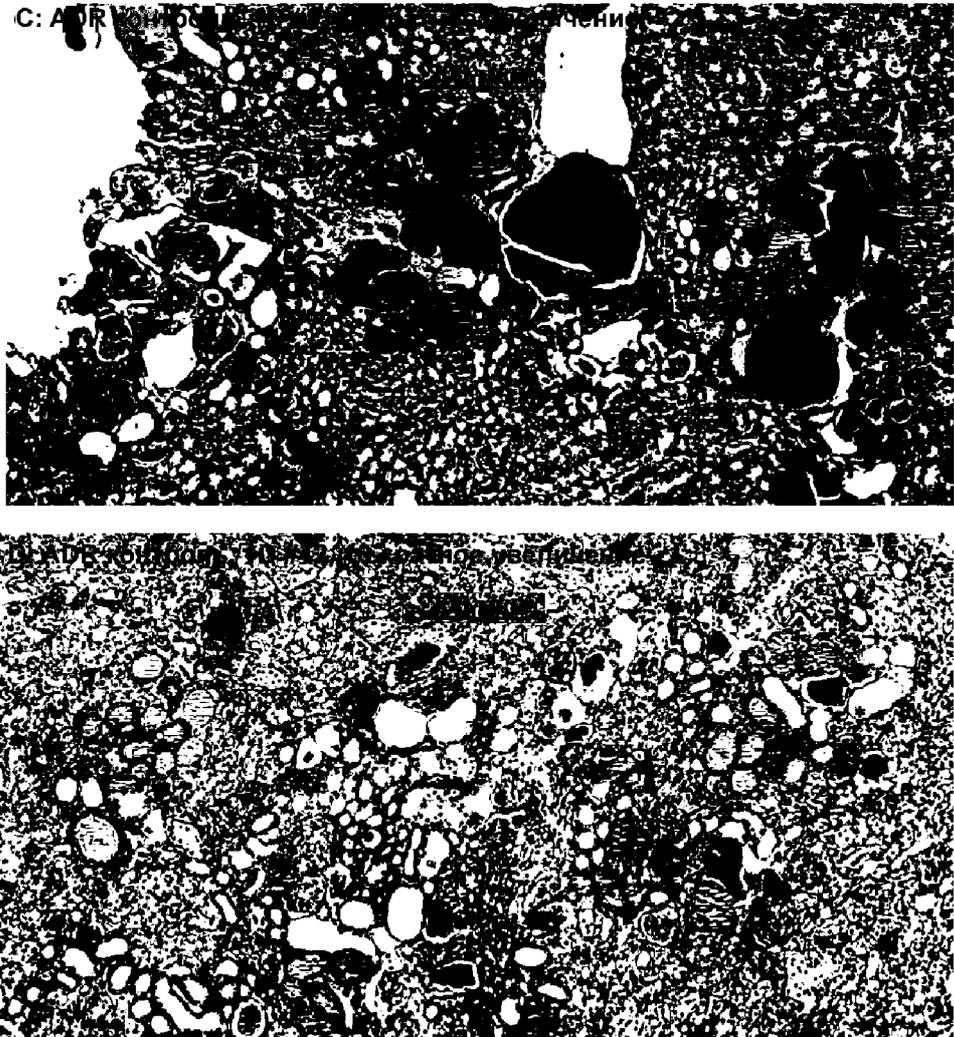
Фиг. 7



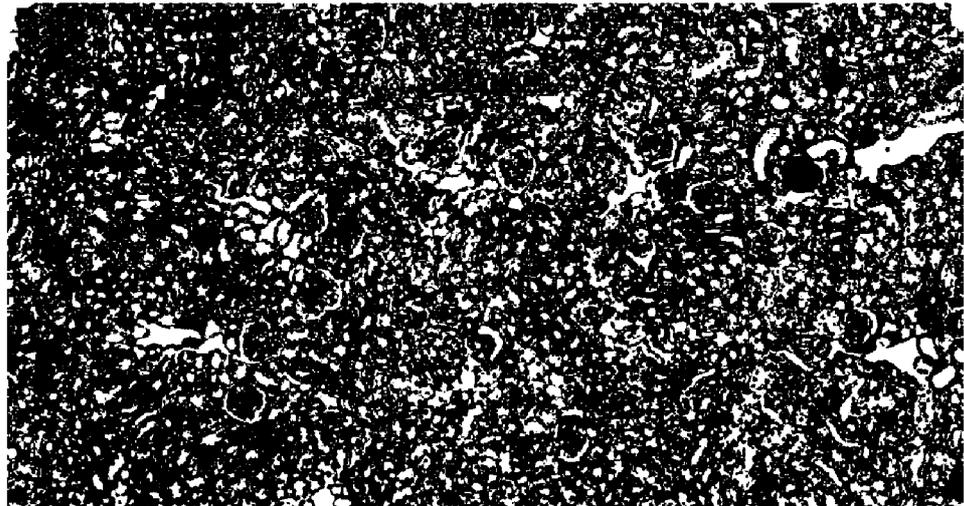
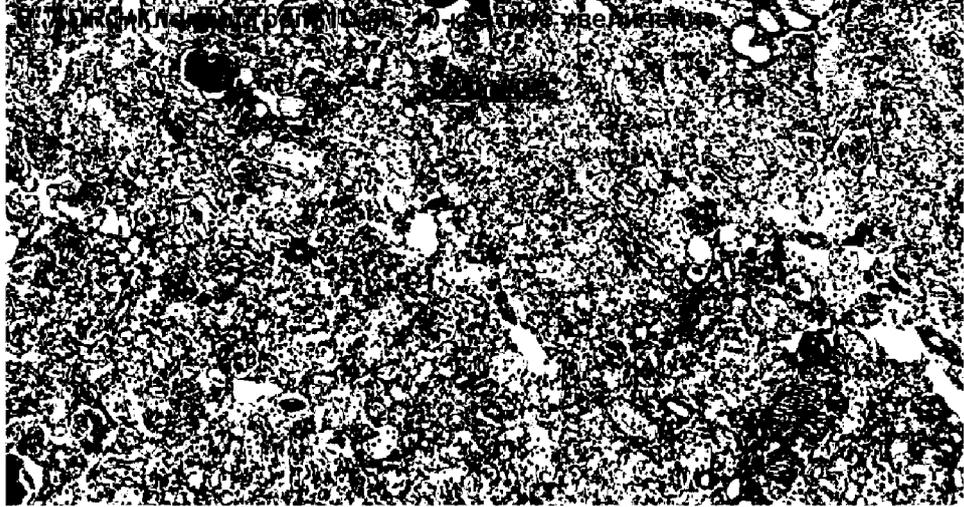
Фиг. 8



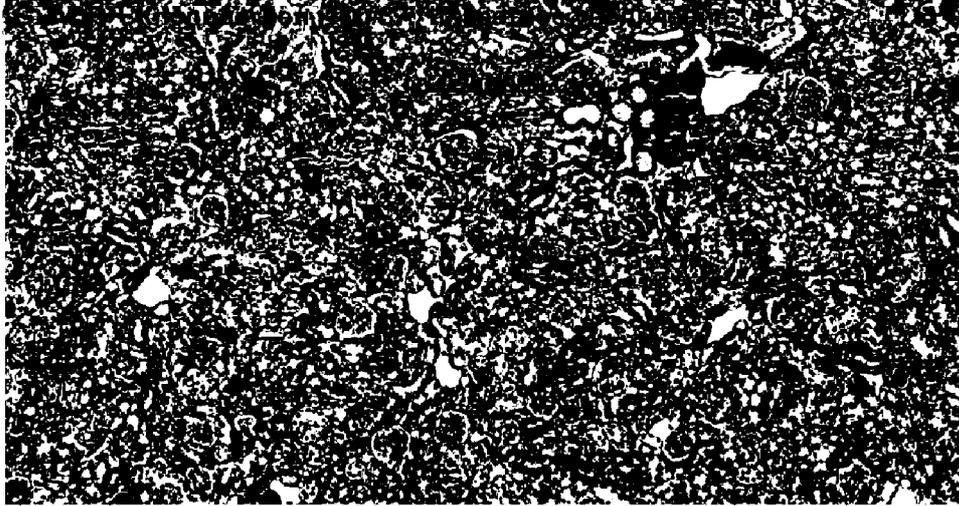
Фиг. 9



ФИГ. 9 (ПРОДОЖЕНИЕ)



ФИГ. 9 (ПРОДОЖЕНИЕ)



ФИГ. 9 (ПРОДОЖЕНИЕ)