

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037698**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.05.12**

**(21)** Номер заявки  
**201990885**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2017.08.24**

**(51)** Int. Cl. **C07K 7/08** (2006.01)  
**C07K 14/515** (2006.01)  
**A61K 38/00** (2006.01)  
**A61K 9/06** (2006.01)  
**A61K 9/08** (2006.01)

---

**(54) КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩИЕ КОРОТКИЕ ПЕПТИДЫ, ПОЛУЧЕННЫЕ ИЗ PEDE, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

---

**(31)** 62/405,522

**(32)** 2016.10.07

**(33)** US

**(43)** 2019.08.30

**(86)** PCT/US2017/048340

**(87)** WO 2018/067244 2018.04.12

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**БРИМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.**  
**(TW)**

**(72)** Изобретатель:  
**Линь Куаньинь Карен (US), Тсао Йоу-Пин, Хо Тсун-Чуань (TW), Ли Фрэнк Вэнь-Чи (US)**

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

**(56)** US-A1-20150079094  
US-A1-20130333068  
US-A1-20050260180

---

**(57)** Фармацевтическая композиция для лечения офтальмологического заболевания у субъекта включает пептид и фармацевтически приемлемый наполнитель, где пептид содержит последовательность SEQ ID NO:1: S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R, где каждый X независимо представляет собой любую аминокислоту.

**B1**

**037698**

**037698**

**B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

Настоящая заявка испрашивает приоритет согласно заявке на патент США № 62/405522, поданной 7 октября 2016 г., раскрытие которой включено во всей полноте посредством ссылки.

### Известный уровень техники

Область техники, к которой относится изобретение.

Изобретение относится к коротким пептидам, полученным из PEDF, и их применению для лечения и/или улучшения течения глазных заболеваний, в частности заболеваний "сухого глаза".

Предшествующий уровень техники.

Заболевание или синдром "сухого глаза" (DED или DES), также известное как сухой кератит, являются сложным заболеванием, которое вызывает симптомы дискомфорта, нарушения зрения и нестабильности слезной пленки, что создает потенциал для повреждения поверхности глаза. "Сухие глаза" сопровождаются повышенной осмоляльностью слезной пленки и воспалением поверхности глаза. Степень тяжести признаков/симптомов "сухого глаза" также очень варьируется среди пациентов. В то время как некоторые пациенты испытывают лишь незначительное раздражение, другие сталкиваются со значительными осложнениями, которые приводят к серьезным повреждениям роговицы и нарушению зрения.

Заболевание "сухого глаза" (DED) или синдром "сухого глаза" (DES), также известное как сухой кератит, представляет собой мультифакториальное заболевание поверхности глаза, которое влияет на составы слезной пленки (липидные, водные и муциновые), на поверхность глаза или выработку слезной жидкости, что приводит к глазной сухости, ощущению инородного тела, раздражению и боли. DED может возникать по разным причинам, которые влияют на выработку любого состава слезной жидкости или стабильность слезной пленки (например, быстрое испарение слез).

Кроме того, гиперосмолярность слезной жидкости, нестабильность слезной пленки, недостаточная поддержка целостности эпителия поверхности глаза также могут вызывать "сухие глаза".

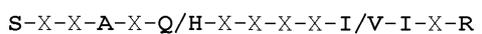
Состояние гиперосмолярности слезной жидкости может потенциально повредить и стимулировать каскад воспаления эпителиальных клеток глаза, что приводит к потере поверхностных эпителиальных клеток, в том числе бокаловидных клеток конъюнктивы. Потеря бокаловидных клеток снижает секрецию муцина, что впоследствии приводит к потере защиты на поверхности эпителия и нестабильности слезной пленки, и, в конечном итоге, приводит к развитию симптомов "сухого глаза", а также к повреждению клеток эпителия роговицы. Эта последующая нестабильность слезной пленки часто приводит к хроническому циклу воспаления и повреждению поверхности глаза, которые вызывают DED.

Существует колоссальная неудовлетворенная потребность в лечении этого многофакторного расстройства глаз у пациентов с DED. В настоящее время доступно несколько вариантов лечения для пациентов с DED, включая слезозаменитель, противовоспалительные препараты и анальгетики. Несмотря на то, что эти методы лечения могут облегчить некоторые симптомы у некоторых пациентов, крайне желательны более эффективные средства лечения и профилактики DED.

### Сущность изобретения

Варианты осуществления изобретения относятся к реактивам и способу профилактики и/или лечения "сухих глаз".

Один аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям для лечения офтальмологического заболевания у субъекта. Фармацевтическая композиция по одному из вариантов осуществления изобретения содержит пептид и фармацевтически приемлемый наполнитель, где пептид содержит последовательность SEQ ID NO:1:



где каждый X независимо представляет собой любую аминокислоту, при условии, что пептид не содержит последовательность **SLGAEQRTEIHR** (SEQ ID NO:2) или **SLGAENRTESVIHR** (SEQ ID NO:3), которые представляют собой последовательности PDSP человека и мыши соответственно. Композиция может быть в форме раствора, мази или геля.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения пептид содержит последовательности по любой из SEQ ID NO:6-75. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения пептид состоит из 20, 22, 24 или 29 аминокислотных остатков.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления изобретения офтальмологическое заболевание представляет собой заболевание, связанное с повреждением роговицы, которое может представлять собой синдром "сухого глаза" (DES).

Один аспект изобретения относится к способам лечения офтальмологического заболевания. Способ в соответствии с одним вариантом осуществления изобретения включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции, содержащей любой из вышеописанных пептидов. Офтальмологическое заболевание представляет собой заболевание, связанное с повреждением роговицы, которое может представлять собой синдром "сухого глаза" (DES).

Другой аспект изобретения станет очевидным из следующего описания и прилагаемых чертежей.

### Краткое описание чертежей

На фиг. 1(A) показаны эффекты короткого пептида, полученного из PEDF (PDSP), при стрессе по-

тери влаги "сухого глаза", выявленные окрашиванием флуоресцеином роговицы, которое используется для оценки повреждения роговицы. Мышей линии C57BL6 содержали в камере с контролируемой средой (СЕС) в течение 14 дней, чтобы вызвать разрушение поверхности глаз (день 0), а затем лечили PDSP или носителем в течение дополнительных 5 дней (день 5). На фиг. 1(B) показана величина выработки слезной жидкости, оцененная с помощью теста с фенольной красной нитью. NS: Мышей, не подвергавшихся стрессу, содержали в нормальных условиях окружающей среды. UT: не получавших лечение мышей содержали в СЕС в течение 14 дней;

на фиг. 2(A) - репрезентативные изображения окрашивания бокаловидных клеток реактивом Шиффа (PAS) в своде конъюнктивы. Исходное увеличение  $\times 100$ . Кратко, мышей линии C57BL6 содержали в СЕС в течение 14 дней и затем обрабатывали PDSP или носителем в течение дополнительных 5 дней. Фиг. 2(B) - среднее количество положительно окрашенных PAS клеток было значительно увеличено после обработки PDSP. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;

на фиг. 3 - результаты местного применения PDSP, демонстрирующие предотвращение разрушения поверхностного барьера глаза, вызванного стрессом потери влаги. Мышей содержали в СЕС в течение 14 дней и, начиная с начала содержания в СЕС, вводили им 100 мкМ PDSP. Значения выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;

на фиг. 4 - влияние местного применения PDSP на вызванное стрессом потери влаги воспаление глаз. Мышей линии C57BL6 содержали в СЕС в течение 14 дней (день 0) и затем обрабатывали PDSP или носителем в течение дополнительных 5 дней (день 5). Уровни мРНК различных воспалительных факторов оценивали с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Значения выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка в каждой группе. \* $P < 0,05$  по сравнению с NS: мыши, не подвергавшиеся стрессу. \*\* $P < 0,05$  по сравнению с группой, получавшей носитель;

на фиг. 5 показано, что местное применение PDSP предотвращает перекисное окисление липидов, вызванное окислительным стрессом. Мышей содержали в СЕС в течение 14 дней и, начиная с начала содержания в СЕС, вводили им 100 мкМ PDSP. На фиг. 5(A) показана репрезентативная иммуногистохимия маркера окислительного стресса 4-HNE в эпителии роговицы при "сухом глазе". На фиг. 5(B) показаны результаты количественного анализа положительно окрашенных на 4-HNE клеток. Значения выражены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение. \* $P < 0,00002$  по сравнению с группой, получавшей носитель. (C) Репрезентативная иммуногистохимия 4-HNE в конъюнктивальном эпителии при "сухих глазах";

на фиг. 6 - влияние PDSP на внутриклеточные уровни АФК и GSH в обработанных NaCl клетках эпителия роговицы кролика. Клетки эпителия роговицы кролика предварительно обрабатывали 10 мкМ PDSP или контрольным пептидом (ConP, остатки 93-110 PEDF) в течение 20 ч и затем обрабатывали NaCl для индукции гиперосмотического стресса. После обработки NaCl в течение еще 24 ч клетки подвергали детектированию АФК с помощью зонда  $H_2DCFDA$  (A) или глутатиона (GSH) с помощью зонда OPA (B). \* $P < 0,002$  по сравнению с необработанными клетками (клетки в изотонической среде). # $P < 0,05$  по сравнению с клетками, обработанными ContP/NaCl (клетки в гиперосмотической среде);

на фиг. 7 - влияние PDSP на экспрессию мРНК MMP-9 и ее активность в обработанных NaCl клетках эпителия роговицы кролика. На фиг. 7(A) показаны уровни мРНК MMP-9, оцененные с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Значения выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка в каждой группе. \* $P < 0,005$  по сравнению с необработанными клетками. # $P < 0,02$  по сравнению с клетками, обработанными ContP/NaCl. На фиг. 7(B) показана активность MMP-9, оцененную с помощью желатиновой зимографии. Значения выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка в каждой группе. \* $P < 0,0001$  по сравнению с необработанными клетками. # $P < 0,0003$  по сравнению с клетками, обработанными ContP/NaCl;

на фиг. 8 - эффекты различных аланин-замещенных пептидов при профилактике или лечении вызванных высыханием повреждений роговицы, выявленных окрашиванием флуоресцеином. Мышей содержали в среде СЕС в течение 14 дней, чтобы вызвать "сухие глаза", и в течение 5 дней наносили на глаза различные пептиды. Через 5 дней роговицы окрашивали флуоресцеином для оценки повреждений поверхности;

на фиг. 9 - влияние различных аланин-замещенных пептидов на усиление выработки слезной жидкости, выявленного методом с фенольной красной нитью;

на фиг. 10 - влияние различных аланин-замещенных пептидов на жизнеспособность клеток C2C12 в культуре. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста;

на фиг. 11 - терапевтические эффекты вариантов PDSP 29-мер человека и moPDSP 29-мер при "сухом глазе", вызванном стрессом потери влаги. Мышей линии C57BL6 содержали в камере с контролируемой средой (СЕС) в течение 14 дней, чтобы вызвать разрушение поверхности глаз (день 0), а затем начинали обработки пептидом или носителем в течение 3 дней (день 3). Повреждения роговицы оценивались с помощью окрашивания роговицы флуоресцеином. Средняя оценка окраски роговицы у мышей в ответ на разные пептиды в течение 3 дней. \* $P < 0,05$  по сравнению с днем 0;

на фиг. 12 - результаты выработок слезной жидкости, оцененные с помощью тестов с фенольной красной нитью. Мышей линии C57BL6 содержали в камере с контролируемой средой (СЕС) в течение 14

дней, чтобы вызвать разрушение поверхности глаз (день 0), а затем начинали обработки пептидом или носителем в течение 3 дней (день 3). NS: Мышей, не подвергавшихся стрессу, содержали в нормальных условиях окружающей среды. \*P<0,05 по сравнению с днем 0.

#### Подробное описание изобретения

Фактор пигментного эпителия человека (PEDF) представляет собой секретлируемый белок, содержащий 418 аминокислот, с молекулярной массой около 50 кДа. PEDF является многофункциональным белком со многими биологическими функциями (см., например, опубликованную патентную заявку США № 2010/0047212). Обнаружено, что разные пептидные области PEDF ответственны за разные функции. Например, 34-мерный фрагмент (остатки 44-77 PEDF) был идентифицирован как обладающий антиангиогенной активностью, тогда как 44-мерный фрагмент (остатки 78-121 PEDF) был идентифицирован как обладающий нейротрофическими свойствами.

Опубликованная патентная заявка США № 2010/0047212 раскрывает, что PEDF может способствовать самообновлению стволовых клеток. Патент США № 9051547 и патент США № 9617311 раскрывают, что фрагменты PEDF, длиной 20-39 аминокислот (остатки 93-121 PEDF), могут способствовать пролиферации стволовых клеток и заживлению ран, в частности пролиферации лимбальных эпителиальных стволовых клеток.

Варианты осуществления изобретения относятся к коротким пептидным фрагментам, полученным из PEDF, и их вариантам. Варианты осуществления изобретения также относятся к применению этих пептидов в профилактике и/или лечении синдромов "сухого глаза" (DES).

"Сухой глаз" возникает в тех случаях, когда глаз не вырабатывает достаточное количество слезной жидкости или когда слезная жидкость испаряется слишком быстро. Наличие "сухих глаз" в течение некоторого времени может привести к истиранию поверхности глаз. В запущенных случаях эпителий может подвергаться патологическим изменениям, таким как плоскоклеточная метаплазия или потеря бокаловидных клеток. В тяжелых случаях у пациентов могут появиться повреждения роговицы, в том числе утолщение поверхности роговицы, эрозия роговицы, точечная кератопатия, дефекты эпителия, изъязвление роговицы, неоваскуляризация роговицы, рубцевание роговицы, истончение роговицы и даже перфорация роговицы.

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что определенные пептидные фрагменты, полученные из PEDF, могут предотвращать и/или лечить повреждения роговицы, вызванные сухостью.

В животной модели для заболеваний "сухого глаза" мышей помещали в камеру с контролируемой средой (СЕС), чтобы вызвать сухость глаз, как описано ранее (Barabino et al., 2005). Мышей, помещенных в СЕС, подвергали воздействию относительной влажности (RH)<25%, температуры от 20 до 22°C с потоком воздуха 15 л/мин, 12 ч в день. Мышей, не подвергавшихся стрессу, содержали в нормальной среде (RH>50%, отсутствие воздушного потока, температура 21-23°C) такой же период времени. Через 14 дней мышей, не подвергавшихся стрессу, обрабатывали носителем, тогда как мышей, подвергавшихся стрессу, обрабатывали или исследуемым пептидом (например, 29-мерным PDSP), или раствором носителя (Группа носителя) в течение 5 дней. Затем роговицу исследовали окрашиванием флуоресцеином.

Как показано на фиг. 1(A), на 14-й день повреждения роговицы были очевидны при окрашивании флуоресцеином как в группе, не подвергавшейся стрессу, так и в тестируемой группе. После обработки коротким пептидом, полученным из PEDF (PDSP, остатки 93-121 PEDF), в течение 5 дней, повреждения на поверхности роговицы фактически исчезли, в то время как в контрольной группе (обработка носителем) повреждения роговицы все еще наблюдались.

Кроме того, в настоящем изобретении обнаружено, что PDSP различной длины (20-29 аминокислот, начиная с остатка 93 PEDF) способны восстанавливать повреждения роговицы на животных моделях заболеваний "сухого глаза" с концентрациями от 10 до 200 мкМ.

На фиг. 1(B) показаны результаты выработки слезной жидкости, выявленные с помощью теста с фенольной красной нитью (подробно описанного в следующем разделе). На фиг. 1(B), NS обозначает мышей, не подвергавшихся стрессу, а UT обозначает подвергавшихся стрессу и не получавших лечение мышей. Как показано на фиг. 1 (B), лечение с помощью PDSP значительно увеличивало выработку слезной жидкости, по сравнению с UT и группой, получавшей носитель.

У людей слезная пленка, покрывающая глаз, известная как прекорнеальная пленка, имеет три отдельных слоя: липидный слой (секретлируемый мейбомиевыми железами), водный слой (секретлируемый слезными железами) и слизистый слой (секретлируемый бокаловидными клетками конъюнктивы). "Сухой глаз", вызванный стрессом, может быть результатом снижения выработки любого или всех этих компонентов.

Снижение выработки муцина может быть результатом уменьшения количества бокаловидных клеток. Настоящее изобретение показывает, что PDSP может предотвращать уменьшение количества бокаловидных клеток из-за "сухого глаза". На фиг. 2(A) показаны результаты окрашивания реактивом Шиффа (PAS) глаз мыши. Говоря кратко, мышей линии C57BL6 содержали в СЕС в течение 14 дней и затем лечили PDSP или носителем в течение дополнительных 5 дней. Глаза, подвергавшиеся стрессу, включены в качестве контроля с отсутствием стресса (NS). На фиг. 2(A) показано репрезентативное окрашива-

ние бокаловидных клеток в глазу, не подвергавшемся стрессу (NS), обработанном носителем, и обработанном PDSP глазу. На фиг. 2 (B) показано, что глаза, обработанные PDSP, включают больше бокаловидных клеток (больше PAS-положительных клеток) по сравнению с необработанными глазами, подвергшимися стрессу, и глазами, обработанными носителем.

Помимо возможности инвертировать течение или вылечить синдромы "сухого глаза", изобретатели также обнаружили, что PDSP может предотвратить повреждения, вызванные патологическими состояниями "сухого глаза". В эксперименте PDSP в концентрации 100 мкМ или носитель (в качестве контроля) наносили на глаза мышей линии C57BL6, а затем мышей помещали в камеру с контролируемой средой (с низкой влажностью и потоком воздуха) на 14 дней. Затем с помощью окрашивания флуоресцентным визуализировали разрушение поверхностного барьера глаза, вызванное стрессом потери влаги. Разрушение поверхностного барьера глаза, вызванное стрессом потери влаги, оценивалось в диапазоне от 0 до 3 в зависимости от степени повреждения поверхности глаза. Как показано на фиг. 3, PDSP эффективно предотвращал повреждение поверхности глаза по сравнению с группой, получавшей носитель.

"Сухой глаз" связан с нарушениями прерокарнальной слезной пленки и последующими воспалительными изменениями на всей поверхности глаза, включая придаточный аппарат, конъюнктиву и роговицу (см. Hessen et al., "Dry eye: An Inflammatory Ocular Disease", J. Ophthalmic Vis. Res., 2014, 9(2): 240-250). Таким образом, затем были изучены эффекты PDSP на воспалительные реакции роговицы. Говоря кратко, мышей линии C57BL6 содержали в СЕС в течение 14 дней (день 0), а затем проводили лечение PDSP или носителем в течение дополнительных 5 дней (день 5). Затем оценивали уровни мРНК факторов воспаления с помощью количественной ПЦР в реальном времени.

Как показано на фиг. 4, экспрессия различных факторов, связанных с воспалением, например, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , и MCP-1 (монокитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1/CCL2), являющийся ключевым воспалительным хемокином, который контролирует рекрутмент лейкоцитов при воспалении и тканевой реакции), была увеличена в вызванных стрессом "сухих глазах" (см. группу UT, не получавшую лечение). Лечение PDSP значительно снижало экспрессию этих воспалительных факторов по сравнению с группой UT, не получавшей лечение, или группой, получавшей носитель. Таким образом, PDSP может эффективно уменьшить воспаление "сухих глаз", вызванных стрессом.

Кроме того, предполагается, что существует связь между синдромом "сухого глаза" и нарастанием окислительного стресса (см. Nakamura et al. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2007, 48(4): 1552-8). Поэтому было также исследовано, может ли PDSP снизить или предотвратить окислительный стресс при "сухих глазах".

Для этого испытания мышей содержали в СЕС в течение 14 дней и начинали лечение PDSP в начале содержания в СЕС. Затем исследовали продукцию продуктов окислительного стресса (например, 4-гидрокси-2-нонenal, 4-HNE). 4-HNE был обнаружен во всех тканях животных и в более высоких количествах во время окислительного стресса из-за увеличения перекисного окисления липидов. 4-HNE содержит реактивный альдегид, который может модифицировать белки. 4-HNE-модифицированные белки могут быть обнаружены с помощью антител, специфичных к фрагменту 4-HNE.

Как показано на фиг. 5(A), глаза, не подвергавшиеся стрессу, содержат минимальное количество 4-HNE. Вызванный стрессом "сухих глаз" обладает повышенным уровнем окрашивания на 4-HNE (группа, получавшая носитель). В отличие от этого лечение с помощью PDSP "сухого глаза", вызванного стрессом, привело к значительному снижению выработки 4-HNE. На фиг. 5 (B) показаны результаты количественного анализа положительно окрашенных на 4-HNE клеток. На фиг. 5(C) показывает репрезентативное иммуногистохимическое окрашивание на 4-HNE в конъюнктивальном эпителии при "сухих глазах".

Принято считать, что высокое осмотическое давление (НОР) слезной жидкости является причиной воспаления и повреждения глаз. НОР может индуцировать выработку активных форм кислорода (АФК), которые являются побочными продуктами клеточного метаболизма. Сообщалось, что генерация АФК увеличивается в фибробластах роговицы у пациентов с кератоконусом и в клетках эпителия роговицы на животных моделях "сухого глаза". Это наблюдение позволяет предположить, что АФК могут играть роль в повреждениях роговицы при "сухих глазах". С другой стороны, глутатион (GSH) является природным продуктом, который может противодействовать свободным радикалам или АФК и облегчать или предотвращать повреждения, вызванные свободными радикалами или АФК.

Поэтому мы изучили влияние PDSP на внутриклеточные уровни АФК и GSH в обработанных NaCl (НОР) клетках эпителия роговицы кролика. Говоря кратко, клетки эпителия роговицы кролика предварительно обрабатывали 10 мкМ PDSP или отрицательным контрольным пептидом (ConP) в течение 20 ч с последующей обработкой NaCl для индукции гиперосмотического стресса. После обработки NaCl в течение еще 24 ч клетки оценивали на АФК с использованием зонда 2',7'-дихлордигидрофлуоросцеина диацетата (H<sub>2</sub>DCFDA), который является индикаторным красителем АФК. H<sub>2</sub>DCFDA может диффундировать в клетки, где его ацетатные сложноэфирные связи расщепляются внутриклеточными эстеразами и окисляется АФК, что превращает нефлуоресцирующий дихлордигидрофлуоросцеина диацетат (H<sub>2</sub>DCFDA) в сильно флуоресцирующий 2',7'-дихлордигидрофлуоросцеина диацетат (DCF).

Как показано на фиг. 6(A), без НОР, только PDSP не увеличивал флуоресценцию DCF, по сравне-

нию с не получавшими лечение мышами. Когда НОР индуцировался NaCl, предварительная обработка PDSP приводила к снижению выработки АФК (т.е. к снижению флуоресценции DC) по сравнению с предварительной обработкой отрицательным контрольным пептидом (ConP). Этот результат указывает на то, что PDSP может снизить образование АФК, вызванное НОР.

На фиг. 6(B) показаны относительные уровни GSH в разных лечебных группах. Интересно, что без стресса НОР только один PDSP индуцировал небольшое повышение уровня GSH по сравнению с необработанными мышами. Этот повышенный уровень GSH, антиоксиданта, позволил бы клеткам лучше переносить окислительный стресс. В условиях НОР лечение с помощью PDSP также приводило к увеличению GSH по сравнению с обработками контрольным пептидом (ConP). Эти результаты показывают, что лечение PDSP минимизирует выработку АФК и в то же время повышает уровень GSH. Комбинированные действия делают клетки гораздо более устойчивыми к окислительному стрессу или гиперосмотическому стрессу.

Синдром "сухого глаза" (DES) включает повышенную осмолярность слезной пленки и воспаление поверхности глаза. Гиперосмолярность слезной жидкости способствует воспалительному каскаду, который побуждает поврежденные эпителиальные клетки продуцировать повышенные уровни цитокина MMP-9. Повышенная активность MMP-9 при "сухих глазах" может способствовать нарушению функции барьера эпителия роговицы, усилению десквамации эпителия роговицы и неровности поверхности роговицы. (Chotikavanich et al., "Production and activity of matrix metalloproteinase-9 on the ocular surface increase in dysfunctional tear syndrome," Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009; 50: 3203-3209).

Поэтому мы также исследовали влияние PDSP на экспрессию мРНК MMP-9 и ее активность в обработанных NaCl клетках эпителия роговицы кролика. Говоря кратко, клетки эпителия роговицы кролика обрабатывали, как описано выше. На фиг. 7(A) показано, что без гиперосмотического стресса только PDSP не влиял на уровни мРНК MMP-9, оцененные с помощью количественной ПЦР в реальном времени. Гиперосмотический стресс вызывал значительное (приблизительно 2-кратное) повышение уровня мРНК MMP-9 (отрицательный контрольный пептид, ConP, с последующей обработкой NaCl). Для сравнения, обработка PDSP эффективно подавляла большую часть увеличения уровня мРНК MMP-9 при гиперосмотическом стрессе (обработка PDSP с последующим NaCl). Повышение уровней мРНК MMP-9 в значительной степени коррелирует с экспрессией белка MMP-9, измеренной с помощью электрофореза в геле с додецилсульфатом натрия, и ферментативной активностью, как показано на фиг. 7(B).

Вышеуказанные результаты наглядно показывают, что PDSP по изобретению может предотвращать и лечить заболевания "сухого глаза" (DED) или синдром "сухого глаза" (DES). В частности, эффекты PDSP по изобретению при профилактике и лечении DED включают: (1) профилактику и лечение повреждений поверхности роговицы, вызванных стрессом "сухого глаза"; (2) увеличение выработки слезной жидкости; (3) поддержку или защиту бокаловидных клеток конъюнктивы; (4) подавление воспаления, вызванного "сухим глазом"; (5) облегчение или минимизация перекисного окисления липидов, вызванного окислительным стрессом; (6) подавление образования внутриклеточных активных форм кислорода (АФК) и повышение уровней внутриклеточного глутатиона (GSH); и (7) подавление экспрессии MMP-9.

Поскольку PDSP по изобретению являются эффективными агентами для профилактики и лечения DED, мы дополнительно исследовали взаимосвязь структура-активность PDSP с помощью аланинового сканирования. В экспериментах по аланиновому сканированию мы используем 29-мер из остатков 93-121 PEDF человека: <sup>93</sup>SLGAEQRTESIHRALYYDLISSPDINGT<sup>121</sup> (SEQ ID NO:4). Каждую из аминокислот в 29-мере заменяли аланином (или глицином, если остаток представляет собой аланин) и оценивали активность аланин-замещенных или глицин-замещенных мутантов.

На фиг. 8 показаны иллюстративные результаты анализов окрашивания глаз. В этих испытаниях повреждения поверхности роговицы, вызванные потерей влаги (оцениваемые с помощью окрашивания флуоресцеином), индуцировали в СЕС, как описано выше, и подробно экспериментально описано в следующем разделе. Эти результаты показывают, что аланиновые или глициновые замены по остаткам 1 (L93A), 4 (A96G), 6 (Q98A), 11 (I103A), 12 (I104A) и 14 (R106A) в 29-мере приводили к значительной потере активности PDSP, указывая на то, что эти остатки необходимы для активности PDSP.

На фиг. 9 показаны примерные результаты анализов на выработку слезной жидкости, которые были выполнены, как описано выше, и подробно в следующем разделе. Результаты по выработке слезной жидкости, показанные на фиг. 9, согласуются с результатами по окрашиванию флуоресцеином, показанными на фиг. 8. Т.е. аланиновые или глициновые замены по остаткам 1 (S93A), 4 (A96G), 6 (Q98A), 11 (I103A), 12 (I104A) и 14 (R106A) в 29-мере привели к значительным потерям способности PDSP индуцировать выработку слезной жидкости, указывая на то, что эти остатки необходимы для активности PDSP.

Тот факт, что PDSP по изобретению может предотвращать повреждение поверхности роговицы, уменьшать окислительный стресс в клетках и минимизировать воспалительные реакции, предполагает, что PDSP может обладать способностью в целом поддерживать жизнеспособность клеток. Это было проверено с помощью жизнеспособности клеток в клеточных культурах. На фиг. 10 показаны результаты экспериментов по аланиновому сканированию с использованием культуры клеток C2C12. Жизнеспособность клеток можно оценить с помощью окрашивания и подсчета количества клеток или с помощью МТТ-теста. Такие методы хорошо известны в данной области техники.

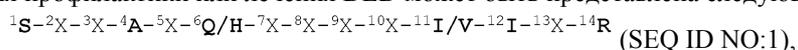
Как показано на фиг. 10, аланиновые (или глициновые) замены для остатков в позициях 1 (S93A), 4 (A96G), 6 (Q98A), 11 (I103A), 12 (I104A) и 14 (R106A) в 29-мере, по существу, отменили способности этих пептидов поддерживать/улучшать жизнеспособность клеток. Эти результаты аланинового сканирования согласуются с результатами, показанными на фиг. 8 и фиг. 9, с использованием животных моделей "сухого глаза".

В то время как вышеупомянутые эксперименты были выполнены с последовательностями PDSP человека (PDSP 29-мер: SLGAEQRTESIHRALYYDLISSPDIHGT, SEQ ID NO:4), мы обнаружили, что соответствующая последовательность мыши (moPDSP 29-мер: SLGAEHRTESVIHRALYYDLITNPDIHST, SEQ ID NO:5) функционирует аналогично. Например, на фиг. 11 показаны результаты защиты от повреждений поверхности роговицы, вызванных потерей влаги, как у человека (PDSP 29-мер), так и у мыши (moPDSP 29х-мер), выявленные окрашиванием глаз. Понятно, что последовательность мыши имеет те же эффекты, что и последовательность человека. Аналогичным образом, на фиг. 12 показано, что как PDSP человека, так и PDSP мыши в одинаковой степени улучшали выработку слезной жидкости. Эти результаты подтверждают, что не существует заметного функционального различия между PDSP человека и PDSP мыши в способности предотвращать и/или лечить DES.

Различия аминокислотных остатков между PEDF человека и PEDF мыши в этой области состоят из двух гомологичных замен, т.е. Q-98 в последовательности человека соответствует H-98 в последовательности мыши и I-103 в последовательности человека соответствует V-103 в последовательности мыши. Следовательно, существенные остатки в этих двух позициях (98 и 103) могут быть заменены соответствующими остатками (<sup>98</sup>Q/H и <sup>103</sup>I/V).

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что гомологичные аминокислотные замены обычно не оказывают заметного влияния на биологическую активность, даже если обнаружено, что эти два остатка имеют решающее значение для лечения и профилактики "сухого глаза". Кроме того, специалисту в данной области техники должно быть понятно, что подобные гомологичные замены в несущественных позициях будут даже лучше переноситься. Какие аминокислотные замены считаются гомологичными хорошо известно в данной области техники. Некоторые примеры: (I, V, L, M), (Q, N, H), (D, E), (R, K, H), (S, T, C) и (F, Y, W), при этом аминокислоты в одной и той же группе скобок обычно могут заменять друг друга без значительного влияния на биологическую активность пептида или белка.

На основании этих результатов можно сделать вывод, что существенная пептидная последовательность для PDSP для профилактики или лечения DED может быть представлена следующим образом:



где каждый X обозначает несущественный остаток и может представлять собой любую аминокислоту, предпочтительно природную аминокислоту. Соответствующая последовательность для PDSP человека: SLGAEQRTESIHR (SEQ ID NO:2) и для PDSP мыши: SLGAEHRTESVIHR (SEQ ID NO:3).

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что пептид, содержащий эти существенные остатки, может быть использован для профилактики или лечения "сухих глаз". Такие пептиды обычно называют PDSP (т.е. короткие пептиды, полученные из PEDF). Некоторые примеры этих PDSP проиллюстрированы в следующей таблице:

Пептидные последовательности	SEQ NO	ID
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	1	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	6	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> A- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	7	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	8	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> A- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	9	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	10	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> A- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	11	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> R- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	12	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> A- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	13	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> A- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> T- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	14	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> A- <sup>9</sup> E- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	15	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> A- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> A- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	16	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> S- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	17	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> A- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> A- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	18	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> H- <sup>14</sup> R	19	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> X- <sup>3</sup> X- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> A- <sup>14</sup> R	20	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	21	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	22	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> A- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	23	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> R- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	24	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> A- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	25	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> T- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	26	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> A- <sup>9</sup> E- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	27	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> A- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	28	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> S- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	29	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> A- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	30	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> S- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> H- <sup>14</sup> R	31	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> X- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> A- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> A- <sup>14</sup> R	32	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	33	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> R- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	34	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> A- <sup>8</sup> X- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	35	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> T- <sup>9</sup> X- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	36	
<sup>1</sup> S- <sup>2</sup> L- <sup>3</sup> G- <sup>4</sup> A- <sup>5</sup> E- <sup>6</sup> Q/H- <sup>7</sup> X- <sup>8</sup> A- <sup>9</sup> E- <sup>10</sup> X- <sup>11</sup> I/V- <sup>12</sup> I- <sup>13</sup> X- <sup>14</sup> R	37	

${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{X}-{}^9\text{A}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	38
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	39
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	40
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	41
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{A}-{}^{14}\text{R}$	42
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	43
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	44
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{A}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	45
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{A}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	46
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	47
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	48
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	49
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{A}-{}^{14}\text{R}$	50
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	51
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	52
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{A}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	53
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	54
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	55
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	56
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{A}-{}^{14}\text{R}$	57
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	58
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{A}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	59
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	60
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{X}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{A}-{}^{14}\text{R}$	61
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{X}-{}^{14}\text{R}$	62
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{A}-{}^{14}\text{R}$	63
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{X}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	64
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{A}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	65
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{X}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	66
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{A}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	67
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{X}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	68
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{A}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	69
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{X}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	70
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{A}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	71
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{X}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	72
${}^1\text{S}-{}^2\text{L}-{}^3\text{A}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	73
${}^1\text{S}-{}^2\text{X}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	74
${}^1\text{S}-{}^2\text{A}-{}^3\text{G}-{}^4\text{A}-{}^5\text{E}-{}^6\text{Q}/\text{H}-{}^7\text{R}-{}^8\text{T}-{}^9\text{E}-{}^{10}\text{S}-{}^{11}\text{I}/\text{V}-{}^{12}\text{I}-{}^{13}\text{H}-{}^{14}\text{R}$	75

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что пептидные последовательности, перечисленные в приведенной выше таблице, приведены только для иллюстрации, и возможны другие сочетания в пределах объема изобретения. Кроме того, хотя вышеперечисленное может представлять собой короткие или минимальные пептиды, которые эффективны для профилактики и/или лечения синдрома "сухого глаза", также могут использоваться более длинные пептиды. В частности, более длинные пептиды могут обладать более подходящей фармакокинетикой и/или биологической доступностью.

Для более длинных пептидов, дополнительные аминокислоты могут быть включены в N- и/или C-конец любого из указанных выше пептидов. Дополнительные аминокислоты могут представлять собой любые подходящие остатки, например остатки из PEDF человека или мыши, фланкирующие области вышеуказанных пептидов. Конкретные примеры более длинных пептидов могут включать 20-мер (остат-

ки 93-112 PEDF; SEQ ID NO:76), 22-мер (остатки 93-114 PEDF; SEQ ID NO:77), 24-мер (остатки 93-116 PEDF; SEQ ID NO:78) и 29-мер (остатки 93-121 PEDF; SEQ ID NO:4).

Варианты осуществления изобретения также относятся к способам профилактики и/или лечения "сухого глаза" у субъекта. Субъект в соответствии с вариантами осуществления изобретения может быть человеком или животным. Способ в соответствии с вариантом осуществления изобретения может включать введение субъекту, нуждающемуся в профилактике или лечении "сухого глаза", композиции, содержащей пептид, выбранный из любого, описанного выше. В соответствии с примерами изобретения композиции могут содержать пептид по изобретению или соль такого пептида вместе с фармацевтически приемлемым носителем или наполнителем, например дистиллированной водой, водным раствором хлорида натрия, маслом или гелем.

Композиция по изобретению может быть составлена в любых подходящих лекарственных формах, таких как раствор, мазь, суспензия, гель или эмульсия, которые могут быть составлены в любых подходящих концентрациях, например, 10-200 мкМ. Специалист в данной области сможет составить их в подходящей концентрации для доставки эффективной дозы без изобретательских усилий. Эти лекарственные формы могут быть составлены для местного нанесения на глаза или других подходящих способов введения (например, перорального или инъекционного).

Варианты осуществления изобретения будут дополнительно проиллюстрированы следующими экспериментальными деталями и примерами. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что эти экспериментальные детали и примеры приведены только для иллюстрации и что возможны другие модификации и варианты в пределах объема изобретения.

#### Материалы и методы.

Натрий-карбоксиметилцеллюлоза (КМЦ), реактив Шиффа (PAS) и дексаметазон были от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). КМЦ (1% мас./об.) в солевом растворе Balance (BSS; Alcone) использовали в качестве носителя для PDSP. PDSP и отрицательный контрольный пептид (CопP) были синтезированы и модифицированы ацетилированными на концах NH<sub>2</sub> и амидированы на концах COOH для стабильности и охарактеризованы масс-спектрометрией (>95% чистоты), чтобы заказать в GenScript (Piscataway, NJ, USA).

#### Животные.

Для данных экспериментов использовали самок мышей линии C57BL/6 в возрасте 7-8 нед. Экспериментальные исследования были одобрены Экспертным советом Мемориальной больницы Маккей и проведены в соответствии с Положением ARVO (Ассоциация по исследованиям зрения и офтальмологии) об использовании животных в исследованиях офтальмологии и зрения.

#### Модель "сухого глаза".

"Сухой глаз" индуцировали путем помещения мышей в камеру с контролируемой средой (СЕС), как описано ранее (Varabino et al., 2005). Говоря кратко, мышей, помещенных в СЕС, подвергали воздействию относительной влажности (RH)<25%, температуры от 20 до 22°C и потока воздуха 15 л/мин, 12 ч в день. Не подвергавшихся стрессу мышей (NS), без вызванного стрессом "сухого глаза", содержали в нормальной среде (RH>50%, отсутствие воздушного потока, температура 21-23°C) такой же период времени.

#### Окрашивание роговицы флуоресцеином.

Животных анестезировали с помощью внутрибрюшинного введения смеси золетила (6 мг/кг) и ксилазина (3 мг/кг). Эпителиальное повреждение роговицы определяли путем местного окрашивания флуоресцеином (Fluor-I-Strip, Ayerst Laboratories, Philadelphia, PA). Окраску роговицы флуоресцеином исследовали с помощью щелевой лампы (биомикроскопа) в кобальтовом голубом свете и фотографировали цифровой камерой. Окрашивание роговицы красителем оценивали следующим образом: 0 баллов за отсутствие точечного окрашивания; 1 балл, когда было окрашено менее одной трети роговицы; 2 балла, когда были окрашены две трети или менее; и 3 балла, когда было окрашено более двух третей (Horwath-Winter J. 2013).

#### Измерение выработки слезной жидкости.

Выработку слезной жидкости измеряли с помощью хлопковых нитей, пропитанных феноловым красным (Zone-Quick; Oasis, Glendora, CA). Достоверность этого теста на мышах была выполнена, как описано ранее (Dursun et al., 2002). Нити удерживали ювелирными пинцетами и помещали в латеральный угол глаза на 60 с. Выработка слезной жидкости выражена в миллиметрах нити, которая была мокрой от слезы и стала красной.

#### Окраска PAS бокаловидных клеток.

После того как животных умерщвляли, глаза удаляли хирургическим путем, фиксировали в 10% формалине, заключали в парафин и изготавливали срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали реактивом Шиффа (PAS; Sigma-Aldrich) для измерения бокаловидных клеток в верхнем и нижнем сводах конъюнктивы и исследовали, а также фотографировали с помощью микроскопа, оборудованного цифровой камерой. PAS-положительные бокаловидные клетки в конъюнктиве измерялись в пяти срезах каждого глаза.

#### Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени.

Суммарную РНК экстрагировали из клеток с использованием TRIzol (Invitrogen) и обрабатывали ДНКазой I свободной от РНКазы (Qiagen, Santa Clarita, CA) для удаления геномной ДНК, а затем очищали с помощью набора для очистки РНК (Dynabeads; Invitrogen). Синтез кДНК проводили с помощью Superscript III (Invitrogen). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на секвенаторе GeneAmp 7700 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Амплификацию проводили в общем объеме 40 мкл, содержащем 3 пмоль праймеров, серийно разведенный продукт RT и основные реагенты SYBR Green PCR (Applied Biosystems). Последовательность специфических праймеров для ПЦР представляла собой TNF- $\alpha$  мыши (номер доступа: NM\_013693) смысловая, 5'-CTACCTTGTTGCCCTCCTCTTT-3' (SEQ ID NO:79), антисмысловая, 5'-GAGCAGAGGTTTCAGTGATGTAG-3' (SEQ ID NO:80); IL- $\beta$  мыши (номер доступа: NM\_008361) смысловая, 5'-GGTGTGTGACGTTCCCATTA-3' (SEQ ID NO:81), антисмысловая, 5'-ATTGAGGTGGAGAGCTTTTCAG-3' (SEQ ID NO:82); IL-6 мыши (номер доступа: NM\_031168) смысловая, 5'-GTCTGTAGCTCATTCTGCTCTG-3' (SEQ ID NO:83), антисмысловая, 5'-GAAGGCAACTG GATGGAAGT-3' (SEQ ID NO:84); MCP-1 мыши (номер доступа: NM\_011333) смысловая, 5'-STCGGACTGTGATGCCTTAAT-3' (SEQ ID NO:85), антисмысловая, 5'-TGGATCCACACCTTGCATTTA-3' (SEQ ID NO:86); MMP-9 кролика (номер доступа: NM\_001082203) смысловая, 5'-TGCGAGTTT CCGTTCATCTT-3' (SEQ ID NO:87), антисмысловая, 5'-GTAGAGCTTGTCTTGTCTCGTAG-3' (SEQ ID NO:88); Программа шагов цикла была настроена на денатурирование при 95°C в течение 15 с, а отжиг и удлинение при 62°C в течение 1 мин, в общей сложности 40 циклов. Все определения измеряли в трех повторностях. Значения порогового цикла (Ct) соответствовали номеру цикла ПЦР, при котором флуоресценция в реальном времени достигает порогового значения выше базовой линии, анализировали с использованием программного обеспечения GeneAmp 7700 SDS. Значение Ct исследуемого продукта ПЦР и контрольной мРНК (GAPDH) затем использовали для расчета относительных количеств мРНК между образцами.

#### Иммуногистохимия.

Вызванное окислительным стрессом перекисное окисление липидов оценивали иммуногистохимическим выявлением 4-гидрокси-2-ноненаля (4HNE) в роговице и конъюнктиве. Фиксированные в формалине и заключенные в парафин образцы глаз депарафинизировали в ксилоле и регидратировали в градуированной серии концентраций этанола. Срезы блокировали с 10% козьей сыворотки в течение 60 мин и затем инкубировали с первичным антителом против 4-HNE (разведение 1:100) (ab46545, Abcam) 4 ч при комнатной температуре. Затем срезы инкубировали с соответствующим меченым пероксидазой козьим иммуноглобулином (разведение 1:500; Chemicon, Temecula, CA) в течение 20 мин, а затем инкубировали с хромогенным субстратом (3,3'-диаминобензидин) в течение 2 мин перед контрастным окрашиванием гематоксилином.

#### Культура клеток эпителия роговицы и лечение.

Лимбальные стволовые клетки выделяли у 6-мес. новозеландских белых кроликов и непрерывно культивировали в течение 14 дней с помощью культуры суспензий клеток на основе на базальной среде DMEM/F-12 для достижения дифференцировки в эпителиальные клетки, подобные клеткам роговицы, как описано ранее (Ho et al., 2013). Чтобы индуцировать активность АФК или MMP-9, вызванную гиперосмотическим стрессом, клетки инкубировали в течение ночи в гипертонической среде (463 мосм), полученной путем добавления 90 мМ NaCl. Клетки, культивируемые в базальной среде DMEM/F-12 (309 мосм), использовали в качестве отрицательного контроля. Чтобы обнаружить профилактический эффект на активность АФК или MMP-9, вызванную гиперосмотическим стрессом, клетки предварительно обрабатывали 10 мкМ PDSP за 20 ч до обработки NaCl.

#### Желатиновая зимография.

Для выявления активности MMP-9 использовали 10 мкл культуральной среды для проведения желатиновой зимографии по ранее описанному методу (Li et al., 2004). Интенсивность полосы в зимографии оценивали с помощью денситометра для визуализации, модель GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) и анализировали с использованием программного обеспечения Labworks 4.0.

#### Измерение внутриклеточного содержания АФК и глутатиона.

Внутриклеточную генерацию ROS анализировали с использованием 2', 7'-дихлордигидрофлуоросцеина диацетата (H<sub>2</sub>DCFDA; Molecular Probes, Eugene, OR), который при окислении ROS высвобождает зеленое флуоресцентное соединение 2',7'-дихлорфлуоресцеин (DCF). Для выявления АФК с помощью спектрофлуориметрического анализа клетки промывали PBS и затем лизировали с помощью буфера для лизиса NP-40 (10 мМ Трис-Cl, pH 7,4, 10 мМ NaCl и 0,5% NP-40) и инкубировали с PBS, содержащим 5 мкМ H<sub>2</sub>DCFDA в темноте в течение 15 мин при 37°C. Флуоресценцию (возбуждение 488 нм; эмиссия 520 нм) измеряли с помощью прибора Spectra MAX GEMINI Reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Фоновая флуоресценция контрольных лунок без добавления H<sub>2</sub>DCFDA была вычтена из экспериментальных показаний.

Уровни GSH определяли количественно с использованием набора для анализа глутатиона (BioVision Research Products, Mountain View, CA) в соответствии с рекомендациями производителя. Говоря кратко, клеточный лизат, обработанный хлорной кислотой, инкубировали с зондом OPA (ортофталевый

альдегид) и буфером GSH в течение 40 мин при комнатной температуре. Флуоресценцию считывали при 340 нм для возбуждения и 420 нм для излучения на флуоресцентном микропланшетном спектрофотометре SPECTRAmax GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Местное лечение PDSP восстанавливает повреждение поверхности глаза, вызванное стрессом потери влаги.

Чтобы определить, оказывают ли PDSP терапевтические эффекты на вызванные стрессом потери влаги (DS) дефекты поверхности глаза, мышей содержали в камере с контролируемой средой (СЕС) в течение 14 дней, чтобы вызвать разрушение поверхности глаза. После 14 дней в СЕС мы использовали мышей с показателями флуоресценции, которые были выше 2 для первых экспериментов (фиг. 1А). Впоследствии "сухие глаза" лечили местно с помощью PDSP в концентрации 25-200 мкМ (3 раза в день) или носителя PDSP (1% КМЦ в BSS) в течение еще 5 дней, сохраняя тот же самый протокол стресса потери влаги.

В день 0 средний объем слезной жидкости значительно уменьшился у мышей в сравнении с мышами, не подвергавшимися стрессу (NS), при определении с помощью теста с хлопковой нитью ( $3,8 \pm 0,5$  мм по сравнению с  $5,4 \pm 0,4$  мм; фиг. 1В). Выработка слезной жидкости в глазах была значительно увеличена после того, как мышей лечили PDSP в течение 5 дней ( $5 \pm 0,3$  по сравнению с  $4,5 \pm 0,2$ ) в сравнении с группой носителя.

PDSP частично восстанавливает количество бокаловидных клеток в конъюнктиве.

Бокаловидные клетки находятся главным образом в поверхностном эпителии свода конъюнктивы и отвечают за выработку слизистой слезной жидкости. Окрашивание реактивом Шиффа (PAS) NS-глаза показало, что бокаловидные клетки демонстрируют непрерывный однородный рисунок в конъюнктивальном эпителии (фиг. 2А). Тем не менее через 14 дней после стресса потери влаги (день 0) окраска PAS конъюнктивы показала, что количество бокаловидных клеток заметно уменьшилось по сравнению с группой NS ( $58 \pm 3,1$  по сравнению с  $38 \pm 3,2$ ; фиг. 2В). При лечении PDSP или носителем в виде глазных капель в течение 5 дней количество бокаловидных клеток конъюнктивы было значительно выше в глазах, обработанных PDSP, по сравнению с контрольными группами, обработанными носителем ( $46 \pm 3,8$  по сравнению с  $37 \pm 1,1$ ). В совокупности, обработка PDSP действительно сохранила число бокаловидных клеток.

Местное лечение с помощью PDSP предотвращает повреждение поверхности глаза, вызванное стрессом потери влаги.

Чтобы выяснить, может ли PDSP подавлять вызванное DS поражение эпителия роговицы, мы применяли для мышей 14-дневный протокол стресса потери влаги и обрабатывали этих мышей местно PDSP 3 раза в день. Через 14 дней дефект эпителия роговицы оценивали окрашиванием красителем флуоресцеином (фиг. 3), и результаты выявили, что показатели окрашивания роговицы флуоресцеином были значительно выше в обработанных носителем глазах, в сравнении с глазами, обработанными PDSP ( $1,7 \pm 0,3$  по сравнению с  $0,7 \pm 0,2$ ). Этот результат указывает на то, что PDSP может также оказывать профилактический эффект на поверхность глаза против стресса потери влаги.

Сопоставимая функция PDSP человека и мыши в животной модели стресса потери влаги.

Исследовать, одинаково ли функционирует одна и та же область PEDF у человека и мыши при лечении субъекта с DED. Активность PDSP человека и PDSP мыши исследовали на модели "сухого глаза", вызванного стрессом потери влаги, у мышей. Показано, что PDSP человека и мыши способны восстанавливать повреждения поверхности глаза, вызванные стрессом потери влаги (фиг. 11), а также выработку слезной жидкости (фиг. 12) у мышей с вызванной стрессом "сухих глазах".

PDSP подавляет вызванную стрессом потери влаги воспалительную реакцию.

Было высказано предположение, что воспаление может увеличить повреждение поверхности глаза при "сухом глазе", вызванном стрессом потери влаги, у экспериментальных животных (Luo et al., 2004; De Paiva et al., 2006). Сообщалось, что среди провоспалительных медиаторов, вызванный стрессом потери влаги "сухой глаз" был устранен у мышей, предварительно получавших блокатор TNF- $\alpha$  или интерлейкина-1 (IL-1) [Ji YW 2013; Okanobo A. 2012]. Как показано на фиг. 4, после того как мыши содержались в СЕС в течение 14 дней (установлено как день 0; мыши, не получавшие лечения), уровни мРНК провоспалительных медиаторов, включая IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и MCP-1, были значительно повышены, 3,9-, 2,8-, 2,6- и 2,4-кратно соответственно, по сравнению с мышами, содержащимися в среде без стресса (NS). Тем не менее местное лечение с помощью PDSP в течение 5 дней у мышей, вероятно, подавляло экспрессию мРНК IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 и MCP-1 глаза 2,4-, 1,9-, 2,0- и 1,7-кратно соответственно, по сравнению с группой, обработанной носителем. В целом наши результаты показывают, что PDSP ослаблял воспалительные реакции глаз, индуцированные DS.

PDSP частично предотвращает связанное с перекисным окислением липидов повреждение поверхности глаза.

Окислительное повреждение на поверхности глаза в результате повышенной выработки активных форм кислорода (АФК) вовлечено в патогенез "сухого глаза" (Wakamatsu et al., 2013). Мы исследовали, может ли PDSP подавлять повреждение мембран, связанное с перекисным окислением липидов, посред-

ством иммуногистохимического окрашивания на 4-HNE. Как показано на фиг. 5А, 4-HNE-окрашивание в эпителии роговицы после того, как мыши содержались в СЕС в течение 14 дней, продемонстрировало ядерную и/или перинуклеарную локализацию в многоугольных клетках эпителия, что согласуется с предыдущим сообщением (Nakamura et al., 2007). Количество клеток, положительно окрашенных на 4-HNE, составило  $1,9 \pm 0,6$ ,  $20,1 \pm 1,4$  и  $5,3 \pm 1,0$  в группах NS, носителя и PDSP соответственно (фиг. 5В), что указывает на то, что PDSP способен предотвращать перекисное окисление липидов. Кроме того, вызванное DS перекисное окисление липидов в конъюнктиве также оценивалось с помощью 4-HNE-окрашивания, и результаты иммуногистохимического окрашивания показали, что сигнал 4-HNE был очевидно сильнее в глазах, обработанных носителем, чем в глазах, подвергавшихся лечению PDSP, дополнительно подтверждая обнаружение антиоксидантного эффекта PDSP (Фиг. 5С). В совокупности лечение с помощью PDSP значительно подавляло индуцированное DS окислительное повреждение поверхности глаза.

PDSP предотвращает накопление АФК, вызванное гиперосмотическим стрессом, и уменьшение содержания глутатиона в клетках эпителия роговицы.

Считается, что повышенная осмолярность слезы является основным механизмом при "сухом глазе", вызывающим воспаление и повреждение поверхности глаза (Stahl et al., 2012). Текущая предельная концентрация для диагностики "сухого глаза" составляет 316 мосм по сравнению с 300-310 мосм для нормальных глаз (Liu et al., 2009). Тем не менее в *in vitro* исследованиях гиперосмолярности в клетках эпителия роговицы для того, чтобы вызвать активность АФК и MMP-9 требуется длительное воздействие на клетки более высоких уровней осмолярности слезы (350-500 мосм) (Li DQ 2004; Li J. 2016).

Чтобы исследовать влияние гиперосмотического стресса на формирование внутриклеточных АФК, клетки эпителия роговицы кролика культивировали в гиперосмотической среде (463 мосм), добавляя 90 мМ NaCl в течение 24 ч. Внутриклеточные уровни АФК детектировали с помощью зонда H<sub>2</sub>DCFDA и измеряли образование DCF-флуоресценции с помощью спектрофлуориметра.

Как показано на фиг. 6А, флуоресценция DCF увеличилась 1,6-кратно после культивирования клеток в гиперосмотической среде в течение 24 ч по сравнению с клетками, культивируемыми в изотонической среде (309 мосм). Тем не менее, клетки эпителия роговицы кролика, предварительно обработанные PDSP, показали 1,3-кратное снижение уровня флуоресценции DCF по сравнению с клетками, которые обрабатывались только NaCl ( $P < 0,04$ ). Предварительная обработка контрольным пептидом (ContP) не имела таких эффектов. Индуцированный NaCl гиперосмотический стресс также заметно уменьшил уровни глутатиона (GSH), антиоксиданта, по сравнению с контрольными клетками в изотонической среде (фиг. 6В;  $46,7 \pm 15,4\%$  по сравнению с  $100 \pm 7,0\%$ ), тогда как в клетках, повторно обработанных PDSP, значительно повысился уровень GSH до  $70,5 \pm 11,4\%$ . Эти результаты показывают, что PDSP обладает антиоксидантным эффектом в клетках эпителия роговицы, которые обрабатывали при помощи гиперосмотического стресса, вызванного NaCl (463 мосм), по крайней мере, частично, путем повышения уровня GSH.

PDSP подавляет вызванную гиперосмотическим стрессом экспрессию MMP-9 в клетках эпителия роговицы.

Чтобы исследовать влияние PDSP на вызванную гиперосмотическим стрессом экспрессию MMP-9 в клетках эпителия роговицы, клетки предварительно обрабатывали PDSP или контрольным пептидом (ContP) в течение 20 ч, а затем подвергали клетки воздействию гиперосмотической среды (463 мосм) в течение еще 24 ч. Как показано на фиг. 7А, уровень мРНК MMP-9 в клетках, обработанных ContP/гиперосмотической средой, был значительно повышен, 3-кратно по сравнению с клетками, культивируемыми в изотонической среде (необработанный контроль). Тем не менее, предварительная обработка PDSP подавляла экспрессию мРНК MMP-9 в 2 раза.

Желатиновая зимография также продемонстрировала, что гиперосмотический стресс индуцировал активность MMP-9 в 2,7 раза по сравнению с необработанным контролем (величина около 90 кДа; фиг. 7В). Зимография также показала, что предварительная обработка PDSP подавляла активность MMP-9 в 3 раза. Эти результаты указывают на то, что PDSP подавляет экспрессию и активность MMP-9, вызванные гиперосмотическим стрессом.

При этом варианты осуществления изобретения были проиллюстрированы ограниченным количеством примеров. Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что возможны другие модификации или варианты в пределах объема изобретения. Таким образом, объем изобретения должен быть ограничен прилагаемой формулой изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для профилактики и/или лечения офтальмологического заболевания у субъекта, содержащая пептид и фармацевтически приемлемый наполнитель, где пептид включает последовательность SEQ ID NO:1: S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R, где каждый X независимо представляет собой любую аминокислоту.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, где указанный пептид не содержит последовательности SLGAEQRTESIHR (SEQ ID NO:2) или SLGAERTESVIHR (SEQ ID NO:3).

3. Фармацевтическая композиция по п.1, где пептид содержит последовательности по любой из

SEQ ID NO: 6-75.

4. Фармацевтическая композиция по п.1, где пептид состоит из 20, 22, 24 или 29 аминокислотных остатков.

5. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где пептид модифицирован ацелированием на N-конце или модифицирован амидированием на C-конце.

6. Фармацевтическая композиция по любому из пп.1-4, где офтальмологическое заболевание представляет собой заболевание, связанное с повреждением роговицы.

7. Фармацевтическая композиция по п.6, где заболевание, связанное с повреждением роговицы, представляет собой синдром "сухого глаза".

8. Фармацевтическая композиция по п.5, где концентрация указанного пептида составляет от 10 до 200 мкМ.

9. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанная композиция находится в форме раствора, мази или геля.

10. Фармацевтическая композиция по п.5, где указанный субъект является человеком.

11. Способ профилактики и/или лечения офтальмологического заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, композиции по любому из пп.1-5.

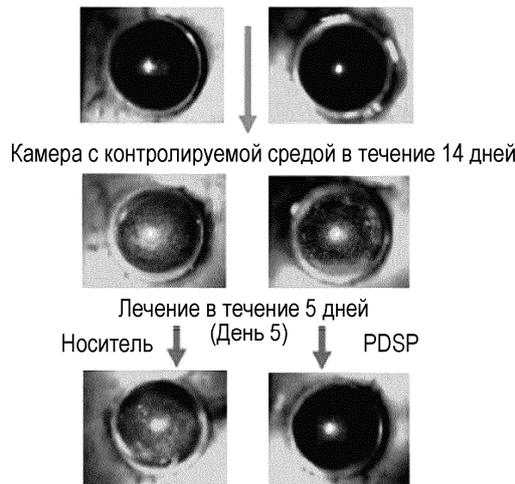
12. Способ по п.11, где офтальмологическое заболевание представляет собой заболевание, связанное с повреждением роговицы.

13. Способ по п.11, где указанное заболевание, связанное с повреждением роговицы, представляет собой синдром "сухого глаза".

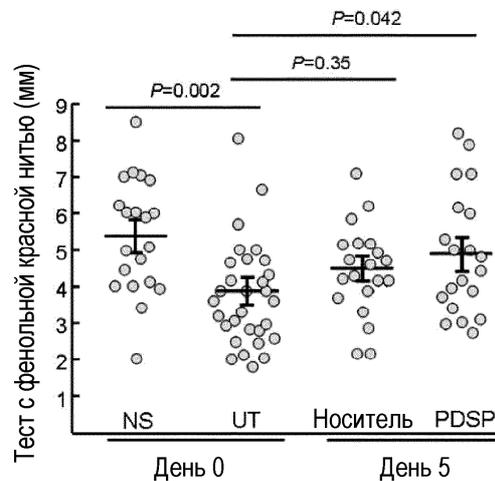
14. Способ по п.11, где концентрация указанного пептида составляет от 10 до 200 мкМ.

15. Способ по п.11, где указанная композиция находится в форме раствора, мази или геля.

16. Способ по п.11, где указанный субъект является человеком.

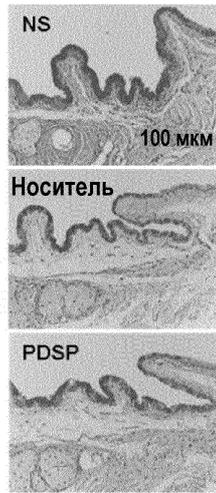


Фиг. 1(A)

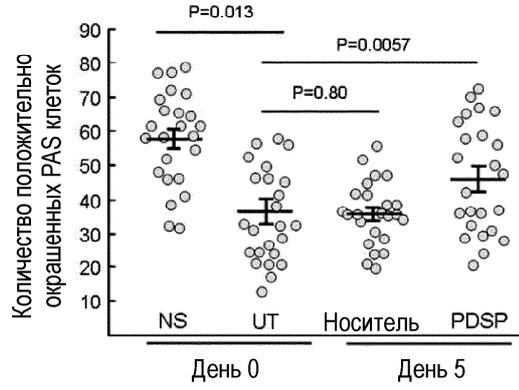


Фиг. 1(B)

**A**

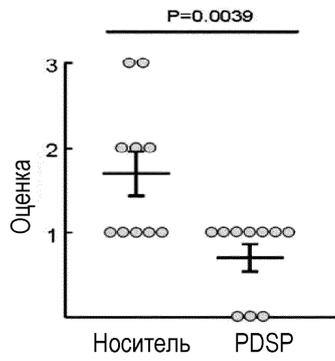


**B**

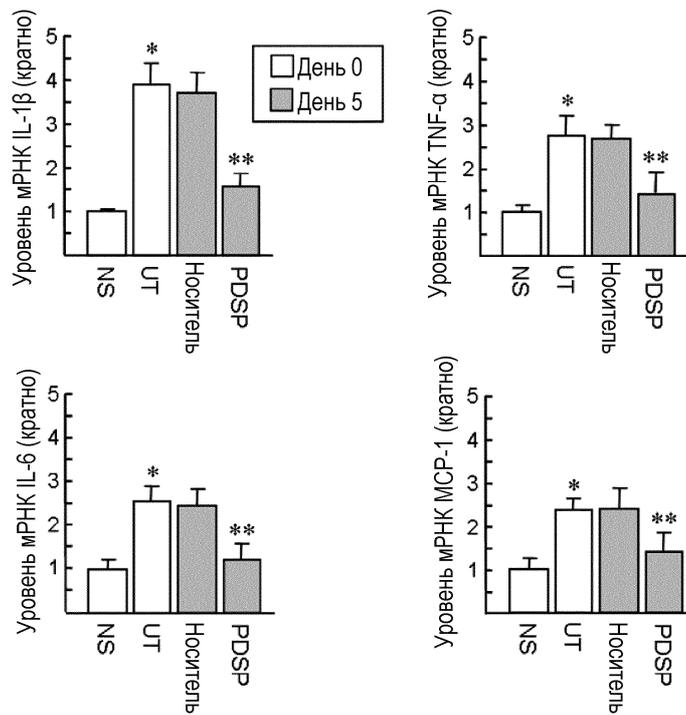


Фиг. 2

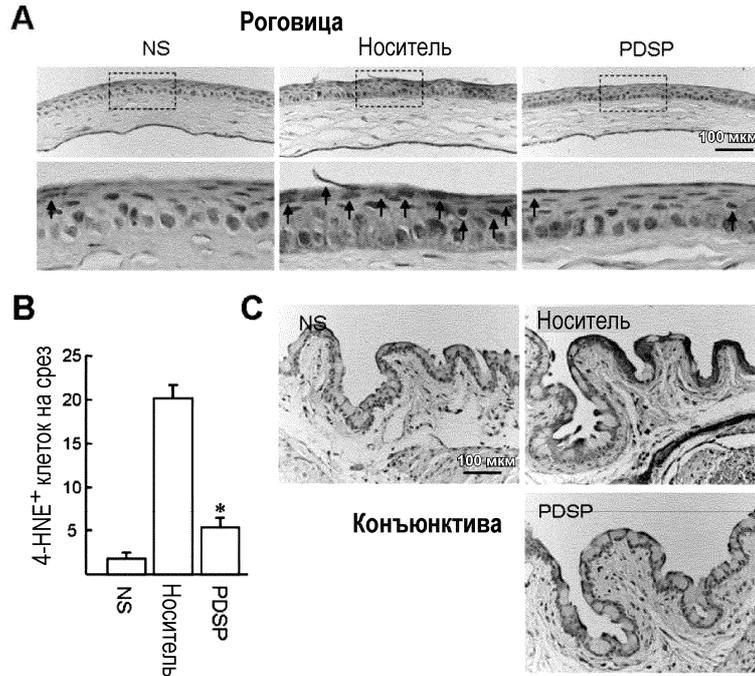
Окрашивание глаз



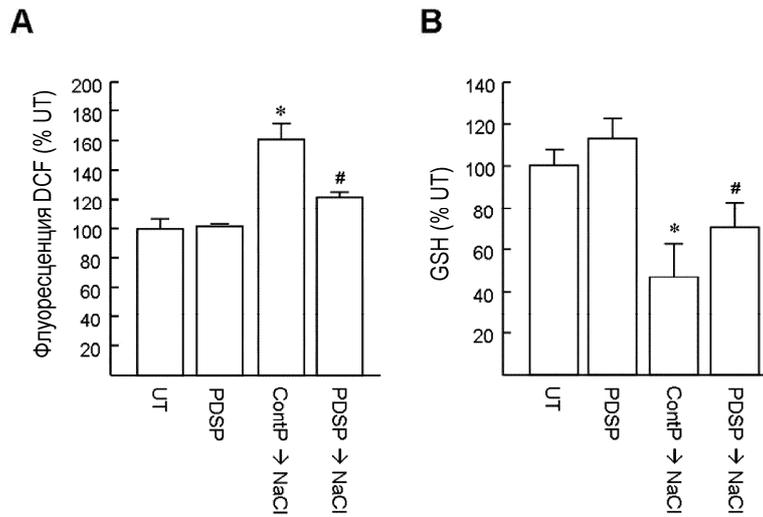
Фиг. 3



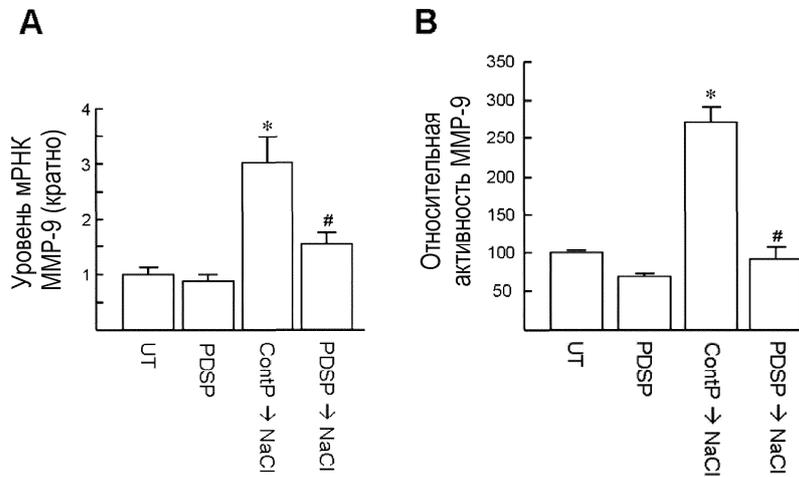
Фиг. 4



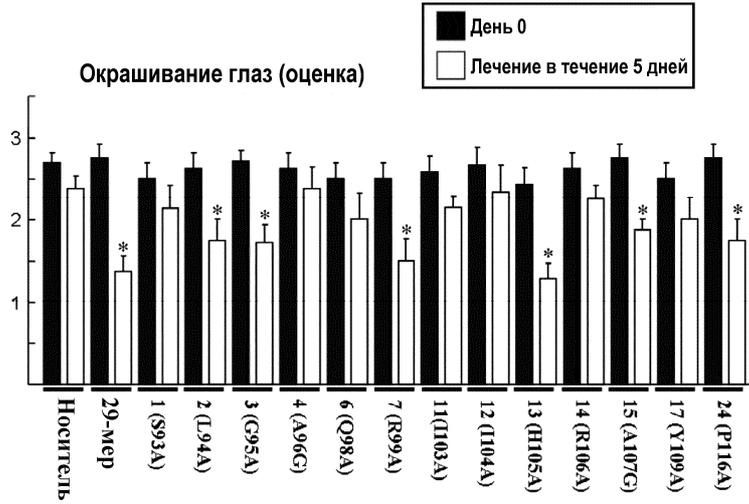
Фиг. 5



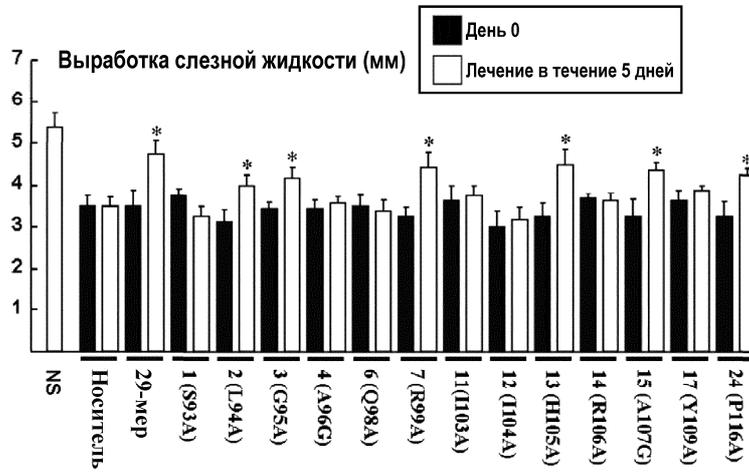
Фиг. 6



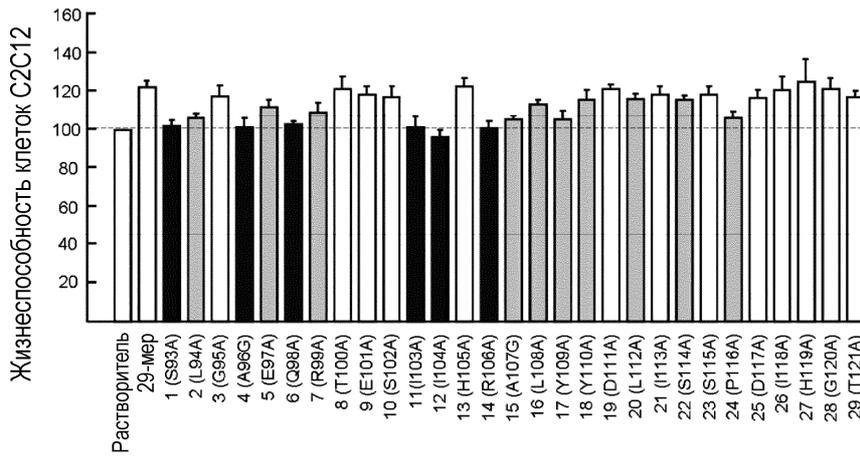
Фиг. 7



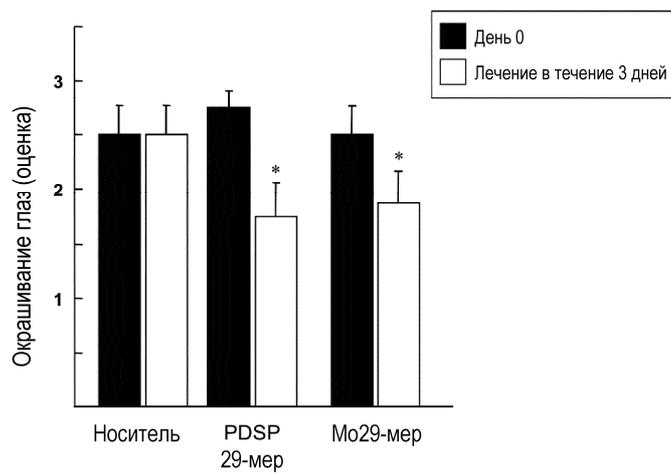
Фиг. 8



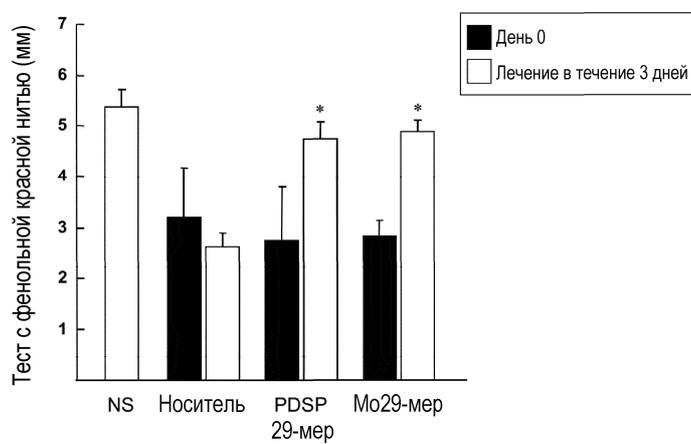
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

