

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092366 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.26

(22) Дата подачи заявки
2019.04.08

(51) Int. Cl. A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ PEDF КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОАРТРИТА

(31) 62/654,468

(32) 2018.04.08

(33) US

(86) PCT/US2019/026347

(87) WO 2019/199679 2019.10.17

(71) Заявитель:
БРИМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(TW)

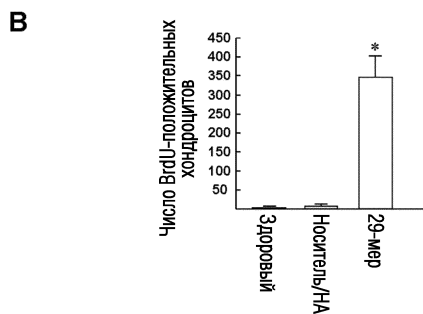
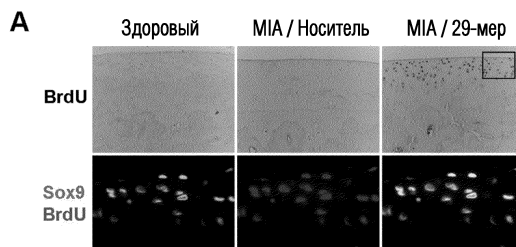
(72) Изобретатель:

Ли Юань-Мин, Тсао Йоу-Пин, Хо
Тсун-Чуань (TW), Ли Фрэнк Вэнь-Чи
(US)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Способ лечения и/или предупреждения остеоартрита включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции, включающей происходящий из PEDF короткий пептид (PDSP) или вариант PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого пигментного эпителий-производного фактора (PEDF) и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержит одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем номера местонахождения остатков основаны на номерах в человеческом PEDF.



202092366 A1

202092366

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565208EA/23

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ REDF КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ОСТЕОАРТРИТА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[001] Настоящее изобретение относится к происходящим из REDF пептидам и их применениям при лечении остеоартрита.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Остеоартрит (ОА), наиболее распространенный тип заболевания суставов, представляет собой дегенеративное заболевание, являющееся результатом разрушения суставного хряща в синовиальных соединениях. С возрастом суставной хрящ дегенерирует на клеточном уровне (т.е., хондроцитов). Имеет место снижение числа хондроцитов и протеогликанов, ведущее к общему уменьшению толщины хряща. Нарушение структуры и функции суставных хондроцитов (АС) ведет к остеоартриру, который поражает миллионы людей по всему миру. Однако АС имеет ограниченную способность к самоизлечиванию при более крупном повреждении из-за бессосудистого происхождения и «дремлющего» характера суставных хондроцитов (Khan et al., 2008, «Cartilage integration: evaluation of the reasons for failure of integration during cartilage repair,» Eur. Cell. Mater., 2008, Sep. 3; 16: 26-39). Кроме того, хрящ часто повреждается, например, при травме, связанной со спортом. Поэтому хрящевые дефекты и ранний остеоартрит представляют большую проблему для хирургов-ортопедов.

[003] Остеоартрит является прогрессирующим гетерогенным дегенеративным заболеванием суставов и наиболее обычной формой артрита, особенно у пожилых людей. Остеоартрит связан с разрушением хряща в суставах и может происходить почти в любом суставе в организме. Он обычно происходит в несущих вес суставах тазобедренных, в коленях и позвоночнике, но также может поражать пальцы, шею и большие пальцы стопы. Однако остеоартрит редко поражает другие суставы, если не вовлечено предшествующее повреждение или чрезмерное напряжение. Потеря суставного хряща из-за повреждения или заболевания представляет большую клиническую проблему.

[004] Хондроциты в хряще дифференцируют из мезенхимальных клеток во время эмбрионального развития. Дифференцированные хондроциты, которые являются единственным типом клеток, обнаруженным в здоровом зрелом хряще, синтезируют достаточные количества хрящевого специфического внеклеточного матрикса (ЕСМ) для поддержания целостности матрикса. Основными составляющими ЕСМ являются вода, агреканы и коллаген типа II, который сопротивляется прилагаемым сжимающим усилиям, генерированным передвижением нижележащей кости.

[005] Варианты лечения ОА весьма ограничены. Они включают анальгетики, нестероидные противовоспалительные лекарственные средства (NSAID) и внутрисуставные инъекции стероидов или гиалуронана (НА, для улучшения смазывания сустава). Вариантом является физиотерапия. Хирургические варианты колеблются от

артроскопических процедур до полной артропластики сустава. Кроме того, разрабатывается хирургическая процедура трансплантации аллотрансплантата. Эти ограниченные варианты могут предоставить некоторое облегчение. Однако все еще существует потребность в более совершенных способах лечения остеоартрита.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Воплощения изобретения относятся к способам лечения и/или предупреждения остеоартрита с использованием происходящих из пигментного эпителий-производного фактора (PEDF) коротких пептидов. Некоторые воплощения изобретения относятся к способам промотирования хондрогенеза.

[007] Один аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям или способам лечения и/или предупреждения остеоартрита. Способ согласно воплощениям изобретения включает введение субъекту, нуждающемуся в этом, фармацевтической композиции происходящего из PEDF короткого пептида (PDSP) или варианта PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого пигментного эпителий-производного фактора (PEDF), и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержит одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем номера местонахождения остатков основаны на номерах в человеческом PEDF. PDSP включает последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-75.

[008] Один аспект изобретения относится к фармацевтической композиции или способам промотирования хондрогенеза. Способ согласно воплощениям изобретения включает контактирование мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток с композицией, включающей происходящий из PEDF короткий пептид (PDSP) или вариант PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого пигментного эпителий-производного фактора (PEDF), и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержит одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем номера местонахождения остатков основаны на номерах в человеческом PEDF. PDSP включает последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 1-75.

[009] Другой аспект изобретения станет очевидным из последующего подробного описания и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0010] Фигура 1 показывает действие 29-мера и гиалуроновой кислоты на крысиную модель вызванных MIA изменений в распределениях нагрузки на задние лапы. Крысам дают инъекцию 1 мг моноиодацетата (MIA) в правые колени и физиологического раствора в левые (контралатеральный контроль) колени. Обработку 29-мером и 1% НА проводят в день 8 после инъекции MIA в течение последующих 2 недель. Изменения в распределении нагрузки на задние лапы (несущие вес) оценивают, используя тест на недееспособность. Приведенные величины представляют собой среднее±ср.-кв.ош. (SE) от по меньшей мере 3 крыс из каждой экспериментальной группы. *P<0,05 против группы

без обработки.

[0011] Фигура 2 показывает результаты гистологического анализа действия 29-мера PDSP (происходящего из PEDF короткого пептида) на поврежденный МІА суставной хрящ. В коленные суставы крысы инъецируют один раз МІА. Проводят обработку смесями носитель/НА и 29-мер/НА в день 8 после инъекции МІА в течение последующих 2 недель. Характерные микрофотографии окрашенных Н&Е срезов суставного хряща из трех независимых экспериментов. F: бедренный мышцелок; T: тибиаальный мышцелок, M: мениск. * показывают бедренно-большеберцовые суставы и вид латерального тибиаального хряща при увеличении на правом снимке. Звездочки показывают хондроциты в зоне некроза.

[0012] Фигура 3 показывает результаты полуколичественного анализа богатого гликозаминогликаном (GAG) внеклеточного матрикса с помощью окрашивания альциановым синим после хондрогенной дифференцировки крысиных MSC в течение 3 недель. MSC в среде для хондрогенной дифференцировки с добавлением различных вариантов 29-мера (10 мкМ) в течение 14 дней. Величины OD альцианового синего, экстрагированного хлоридом гуанидиния, показаны относительно полного содержания ДНК микромассы. Данные представлены как среднее±ср.-кв.ош.. Черные и серые столбцы, представляющие величины $OD \leq 0,16$ и $0,25$, соответственно, показывают мутации, которые полностью и частично ухудшают активность 29-мера, способствующую хондрогенезу.

[0013] Фигура 4 показывает действие вариантов 29-мера на крысиную модель вызванных МІА изменений в распределениях нагрузки на задние лапы. Крысам дают инъекцию 1 мг МІА в правые (с остеоартритом) колени и физиологического раствора в левые (контралатеральный контроль) колени. Обработку смесями 29-мер/НА, вариант 29-мера/НА и носитель/НА проводят в день 8 после инъекции МІА в течение последующих 2 недель. Изменения в нагрузке на задние лапы оценивают, используя тест на недееспособность. Приведенные величины представляют собой среднее±ср.-кв.ош. от по меньшей мере 3 крыс из каждой экспериментальной группы.

[0014] Фигура 5 показывает результаты вызванной PDSP пролиферации хондрогенных клеток в поврежденном суставном хряще в зависимости от дозы. (А) Верхний ряд: гистологический анализ репликации клеток в день 14 после обработки 29-мером. Образцы окрашивают BrdU для указания репликации ДНК (темно-коричневый цвет). Заявленное увеличение 200×. Нижний ряд: характерные картины, показывающие экспрессию Sox9 (зеленый; маркер хондроцитов) и BrdU (красный) в суставном хряще, оцененную двойным иммуноокрашиванием. Заявленное увеличение 1000×. (В) Число BrdU-положительных клеток в оцениваемом участке хряща. *P <0,001 против группы носитель/НА.

[0015] Фигура 6 показывает митогенное действие вариантов 29-мера на поврежденный суставной хрящ на крысиной модели вызванного МІА ОА. Крысам дают инъекцию 1 мг МІА в правые (с остеоартритом) колени и физиологического раствора в

левые (контралатеральный контроль) колени. Обработку смесями 29-мер/НА, вариант 29-мера/НА и носитель/НА проводят в день 8 после инъекции МІА в течение последующих 2 недель. Коленные суставы окрашивают BrdU для идентификации пролиферирующих клеток. Подсчитывают BrdU-положительные клетки в поле зрения на участке хряща срезов коленных суставов (заявленное увеличение $\times 100$). Все BrdU⁺ клетки оценивают из 6 срезов/образец коленного сустава от 3 крыс из каждой группы.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0016] Воплощения изобретения относятся к способам лечения и/или предупреждения остеоартрита с использованием происходящих из PEDF коротких пептидов (PDSP). Изобретение основано на неожиданных открытиях, что некоторые короткие пептиды, происходящие из пигментного эпителий-производного фактора (PEDF), могут облегчать боль при остеоартрите и способствовать восстановлению суставного хряща путем индукции дифференцировки мезенхимальных клеток с образованием хондроцитов.

[0017] Остеоартрит является дегенеративным заболеванием в результате разрушения суставного хряща (АС) в синовиальных соединениях. Однако АС имеет ограниченную способность к самоизлечиванию из-за бессосудистого происхождения и «дремлющего» характера суставных хондроцитов. Здоровый зрелый хрящ включает хондроциты, которые дифференцируют из мезенхимальных клеток во время эмбрионального развития. Дифференцированные хондроциты, которые являются единственным типом клеток, обнаруженным в здоровом зрелом хряще, синтезируют достаточные количества хрящевого специфического внеклеточного матрикса (ЕСМ) для поддержания целостности матрикса.

[0018] Человеческий пигментный эпителий-производный фактор (PEDF) представляет собой секретированный белок, содержащий 418 аминокислот, с молекулярной массой примерно 50 кДа. PEDF является многофункциональным белком со многими биологическими функциями (см., например, публикацию заявки на патент США № 2010/0047212). Обнаружено, что различные пептидные участки PEDF ответственны за различные функции. Например, 34-мерный фрагмент (остатки 44-77 PEDF) идентифицирован как имеющий антиангиогенную активность, в то время как 44-мерный фрагмент (остатки 78-121 PEDF) идентифицирован как имеющий нейротрофические свойства.

[0019] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые короткие пептиды PEDF могут облегчать боль при остеоартрите. Также обнаружено, что ослабление боли происходит из способности таких PDSP вызывать регенерацию хряща. Авторы изобретения показали, что PDSP могут побуждать мультипотентные стволовые клетки (MSC), которые присутствуют в окружении хряща, к дифференцировке в хондроциты. Иными словами, эти PDSP могут промотировать хондрогенез. Это может объяснить способность PDSP вызывать регенерацию хряща и ослабление боли.

[0020] Как отмечалось выше, дифференцировка мезенхимальных клеток в

хондроциты обычно происходит во время эмбрионального развития. В хряще мезенхимальные стволовые клетки теряют свою полипотентность и пролиферируют с образованием совокупности хондрогенных клеток, которые затем дифференцируют в хондробласты, которые синтезируют хрящевой внеклеточный матрикс (ECM). Хондробласты становятся зрелыми хондроцитами, которые обычно неактивны, но еще секретируют и разрушают матрикс в зависимости от условий. Поэтому открытие, что PDSP могут побуждать мезенхимальные клетки (в или вблизи хряща) к продуцированию хондроцитов в хряще, действительно является неожиданным.

[0021] PDSP по изобретению имеют в основе пептидный участок, соответствующий остаткам человеческого PEDF 93-121 (⁹³SLGAEQRTEIHRALYYDLISSPDIHGT¹²¹; SEQ ID NO:1). На основе этого 29-мера авторы идентифицировали, что серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 являются критичными для активности, что подтверждается существенной потерей активности, когда эти остатки заменяют по отдельности аланином (или глицином в случае аланина-96). Напротив, замены на аланин (или глицин) других остатков в 29-мере не изменяют существенно активность, что предполагает, что варианты PDSP, имеющие аминокислотные замены (в частности, гомологичные аминокислотные замены) в этих других остатках (т.е., остатках 94, 95, 97, 99-102, 105 и 107-121), также можно использовать для предупреждения и/или лечения остеоартрита и/или индукции хондрогенеза.

[0022] Эти результаты показывают, что коровый пептид, обладающий антиноцицептивным действием, находится в участке, включающем остатки 93-106 (⁹³SLGAEQRTEIHR¹⁰⁶; SEQ ID NO:2). Таким образом, самый короткий пептид PDSP, имеющий антиноцицептивную активность, может представлять собой 14-мер. Специалисту в данной области техники будет понятно, что добавление дополнительных аминокислот к этому коровому пептиду по С- и/или N-концу не должно влиять на эту активность. Иными словами, PDSP по изобретению может представлять собой любой пептид, включающий остатки 93-106 (-) человеческого PEDF. Следовательно, пептид PDSP по изобретению может представлять собой 14-мер, 15-мер, 16-мер и т.д., включая 29-мер, используемый в экспериментах.

[0023] Кроме того, как отмечено выше, замены в этих коротких пептидах могут сохранять активность до тех пор, пока сохранены критичные остатки (серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106). Кроме того, мышинные варианты (которые имеют две замены: гистидин-98 и валин-103 по сравнению с человеческой последовательностью) также являются активными. Соответствующие мышинные последовательности представляют собой mo-29-мер (SLGAENRTEIHRALYYDLITNPDIHST, SEQ ID NO: 3) и mo-14-мер (SLGAENRTEIHR, SEQ ID NO: 4). Таким образом, общей последовательностью для активного коры является (⁹³S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R¹⁰⁶, где X представляет собой любой аминокислотный остаток; SEQ ID NO: 5).

[0024] Пептиды PDSP по изобретению можно синтезировать химически или экспрессировать с использованием систем, экспрессирующих белки/пептиды. Эти пептиды PDSP можно использовать в фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения остеоартрита. Фармацевтическая композиция может включать любой фармацевтически приемлемый эксципиент, и фармацевтическая композиция может быть составлена в форме, подходящей для введения, такой как для топического применения, орального применения, инъекции и т.д.. Различные препараты для таких применений известны в технике и могут использоваться в воплощениях изобретения.

[0025] Некоторые воплощения изобретения относятся к способам лечения и/или предупреждения остеоартрита у субъекта (например, человека, домашних животных или других субъектов). При использовании в настоящем описании термин «лечить» или «лечение» включает частичное или полное улучшение состояния, которое может или не может включать полное исцеление. Способ может включать введение фармацевтической композиции субъекту, причем фармацевтическая композиция включает эффективное количество PDSP по изобретению (включая активные варианты PDSP). Специалисту в данной области техники будет понятно, что эффективное количество будет зависеть от состояния субъекта (например, массы, возраста и т.д.), пути введения и других факторов. Установление такого эффективного количества включает только рутинные методы, и специалисту в данной области техники не потребуются изобретательские усилия или чрезмерное экспериментирование для того, чтобы найти эффективное количество.

[0026] Воплощения изобретения будут поясняться следующими далее конкретными примерами. В конкретных примерах используется 29-мер (SEQ ID NO:1). Однако для достижения таких же результатов можно использовать другие PDSP (например, 14-мер, SEQ ID NO:2 или SEQ ID NO:3, и т.д.). Специалисту в данной области техники будет понятно, что эти примеры приводятся только для пояснения, и что возможны вариации и модификации без отступления от объема изобретения.

Материалы и методы

[0027] Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), фетальную бычью сыворотку (FBS), 0,25% трипсин и антибиотики закупают у Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Гиалуроновую кислоту (HA), моноиодацетат (MIA), диметилсульфоксид (DMCO), перколл, инсулин, гидрокортизон, бычий сывороточный альбумин (BSA), 5-бром-2'-дезоксинуридин (BrdU), краситель Hoechst 33258 и альциановый синий 8-GX закупают у Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Все конъюгированные с флуоресцентным красителем вторичные антитела закупают у BioLegend (San Diego, CA, USA). Красители гематоксилин и эозин (H&E) закупают у Merck (Rayway, NJ, USA). Синтетические PEDF пептиды синтезируют и модифицируют ацетилированием по NH₂-концам и/или амидированием по COOH-концам для устойчивости. Синтетические PEDF пептиды характеризуют масс-спектрометрией (чистота >95%) в GenScript (Piscataway, NJ, USA). Каждый происходящий из PEDF синтетический пептид восстанавливают в DMCO в качестве исходного раствора (5 мМ).

[0028] Всех животных, используемых в настоящих исследованиях, содержат в помещении для животных в условиях регулируемой температуры (24-25°C) и цикла чередования света и темноты 12:12. Обычный корм для лабораторных животных и водопроводная вода доступны *ad libitum*. Экспериментальные процедуры одобрены Наблюдательным Советом больницы Мемориала Маккея (New Taipei City, Taiwan, R.O.C.) и выполняются в соответствии с национальными правилами защиты животных.

Животная модель остеоартрита и обработки

[0029] Взрослым 10-недельным самцам крыс Sprague-Dawley (начальная масса тела=312±11 г) дают наркоз интраперитонеальной инъекцией ксилазина (10 мг/кг). После этого их правые колени, каждое, обрабатывают одной интраартикулярной инъекцией 1 мг MIA в 25 мкл стерильного физиологического раствора. Раствор инъецируют через пателлярную связку с использованием иглы 27G, причем лапу фиксируют под углом 90° в колене. Через семь дней после инъекции MIA крыс произвольно распределяют в различные экспериментальные группы ($n \geq 3$, каждая группа). Для обработки крысиной модели вызванного MIA OA пептид PDSP растворяют в 25 мкл 1% НА, и растворитель пептида ДМСО используют в качестве контроля в смеси носитель/НА.

Оценка изменений распределения нагрузки на задние лапы

[0030] Изменения в распределении нагрузки на задние лапы между правой (с остеоартритом) и левой (контралатеральный контроль) конечностями используют в качестве показателя дискомфорта сустава в колене с остеоартритом. Используют тестер недееспособности для определения распределения нагрузки на задние лапы, как описано ранее (Bove et al., *Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis. Osteoarth. Cart.*, 2003;11:821-830). Крыс помещают в угловую камеру из плексигласа, распложенную так, что каждая задняя лапа находится на отдельной силовой платформе. Силу, проявленную каждой задней конечностью (измеренную в граммах), усредняют за период 5 с. Каждая экспериментальная точка представляет собой среднее из трех 5-с отсчетов. Изменение в распределении нагрузки на задние лапы вычисляют, определяя различие в общей сумме весов (г), проявленных на тестере, между левыми и правыми конечностями. Результаты представляют или как различие в весе, который несут левые (контралатеральный контроль) конечности и правые (с остеоартритом) конечности, или как различие в % между базовым отсчетом и отсчетом после обработки, которое вычисляют с использованием следующего уравнения:

$$(1 - (\text{среднее } \Delta \text{ веса обработанной группы} / \text{среднее } \Delta \text{ веса группы носителя})) \times (100).$$

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток (MSC)

[0031] Взрослым 8-недельным самцам крыс Sprague-Dawley (начальная масса тела=312±11 г) дают наркоз интраперитонеальной инъекцией ксилазина (10 мг/кг). После этого их бедренные кости асептически собирают, промывают в смеси PBS и антибиотиков в течение 5 минут, и затем их отсекают от всех мягких тканей, рассекают в их эпифизе, и

их костномозговую полость промывают повторно смесью гепарина (AGGLUTEX INJ 5000 Е/мл, 5 мл; рабочая конц. 100 Е/мл) и DMEM. Собранные клетки коллектируют, диспергируют пипетированием и центрифугируют при $1000 \times g$ в течение 5 минут при RT. Клеточные осадки ресуспендируют с DMEM, и затем клеточную суспензию переносят в 15-мл центрифужную пробирку, содержащую 5 мл перколла (1,073 г/мл). После центрифугирования при $1500 \times g$ в течение 30 минут в среднем слое получают моноклеарные клетки, промывают три раза PBS и затем суспендируют в DMEM с низким содержанием глюкозы с 10% инактивированной нагреванием FBS и 1% пенициллина/стрептомицина. Затем клетки помещают на 75-см^2 матрасы (Corning, MA, USA) и инкубируют в смеси 95% воздуха и 5% CO_2 при 37°C . Среду заменяют каждые 4 дня. Неприсоединившиеся клетки отбрасывают, а прилипшие клетки сохраняют. Первичные MSC вырастают до приблизительно 80%-90% слияния после культивирования в течение 1 недели.

Хондрогенная дифференцировка MSC

[0032] В каждую лунку 96-луночного планшета помещают 5×10^3 выращенных MSC и подвергают воздействию 150 мкл хондрогенной среды (DMEM с высоким содержанием глюкозы со 100 нМ дексаметазона, 0,17 мМ фосфата аскорбиновой кислоты-2, 10 мкг/мл инсулина, 5 мкг/мл трансферрина, 5 нг/мл селена, 1 мМ пирувата натрия, 2 мМ L-глутамина и 2% FBS) с добавлением 10 нг/мл TGF- β 3 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) и 10 мкМ пептида PDSP. Среду заменяют каждые 3 дня, и клетки культивируют в течение 2 недель.

Гистологическая проверка коленного сустава

[0033] Коленные суставы вскрывают и удаляют окружающую мягкую ткань. Образцы фиксируют в 4% растворе параформальдегида (PFA), и затем декальцинируют с помощью декальцинатора Shandon TBD-2 (Thermo Scientific, Logan, UT). Затем суставы рассекают в срединной сагиттальной плоскости и заделывают в парафиновые блоки. Срезы (толщиной 5 мкм) нарезают продольно и окрашивают гематоксилином и эозином (H&E) или используют для иммуногистохимической проверки. Тщательно получают 20 срезов на колено так, чтобы включить самую сильно дегенерированную область.

Обнаружение синтеза ДНК *in vivo*

[0034] Для обнаружения клеточной пролиферации BrdU восстанавливают в ДМСО в качестве исходного раствора (80 мМ). Смешанные с 350 мкл PBS 150 мкл BrdU интраперитонеально инъецируют крысе в день 1, 4 и 8 после инъекции MIA через 7 дней (т.е., день 7 после инъекции MIA принимают за день 0). Синтез ДНК оценивают с помощью мечения BrdU, что обнаруживается с помощью анти-BrdU антител.

Иммунофлуоресценция и окрашивание BrdU

[0035] Для того, чтобы обнаружить *in vivo* синтез ДНК, залитые парафином образцы суставов депарафинируют в ксилоле и регидратируют в присутствии этанола в ступенчато изменяющихся концентрациях, и затем подвергают воздействию 1 N HCl при RT в течение 1 часа для последующей иммуногистохимии. Затем срезы тканей блокируют

10% козьей сывороткой и 5% BSA в течение 1 часа. Иммуноокрашивание осуществляют с использованием первичных антител против SOX9 (разведение 1:100) и BrdU (разведение 1:100) при 37°C в течение 2 час с последующей инкубацией с соответствующим родамин-или FITC-конъюгированным ослиным IgG в течение 1 часа при RT. Местонахождения ядер обнаруживают с помощью контрокрашивания Hoechst 33258 в течение 7 мин. Изображения получают с использованием эпифлуоресцентного микроскопа, Zeiss, с камерой CCD и измеряют в 20 произвольно выбранных областях в каждом образце, и выполняют количественную оценку вслепую при трехкратном повторе, производя подсчеты вручную в каждом срезе.

[0036] Депарафинированные образцы коленных суставов также блокируют 10% козьей сывороткой в течение 60 мин и затем инкубируют с антителом против BrdU. Затем слайды инкубируют с меченым соответствующей пероксидазой козьим иммуноглобулином (разведение 1:500; Chemicon, Temecula, CA) в течение 20 мин, и затем инкубируют с хромогенным субстратом (3,3'-диаминобензидин) в течение 2 мин перед контрокрашиванием гематоксилином.

Окрашивание альциановым синим и количественная оценка

[0037] Для окрашивания альциановым синим культуры дважды промывают PBS, фиксируют в 4% (мас./об.) параформальдегиде в течение 15 мин и затем инкубируют в 1% (мас./об.) альциановом синем 8-GX (Sigma) в 0,1 N HCl (pH 1,0) в течение ночи, как описано ранее (Ji Y.H. et al., Quantitative proteomics analysis of chondrogenic differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells by iTRAQ labeling coupled with on-line two-dimensional LC/MS/MS, Mol. Cell. Proteom., **2010**, 9(3): 550-564.). Для полуколичественного анализа окрашенные альциановым синим культуры экстрагируют 6 M гуанидином-HCl в течение 2 час при комнатной температуре. Абсорбцию экстрагированного красителя измеряют при 650 нм с помощью ридера для прочтения микропланшетов (Bio-Rad). Для того, чтобы измерить содержание ДНК, 100 мкл экстрактов объединяют со 100 мкл 0,7 мкг/мл Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) в воде. Регистрируют флуоресценцию при Ex/Em 340 нм/465 нм и сравнивают с флуоресценцией признанного стандарта гомогената ДНК, полученного при воздействии ультразвука на тимус телят (Sigma-Aldrich).

Статистика

[0038] Результаты выражают в виде среднее±среднеквадратическая ошибка от среднего (SEM). Для статистического сравнения используют однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). P<0,05 рассматривают как значимый, если не указано иное.

PDSP показывает антиноцицептивное действие уменьшения интенсивности дискомфорта суставов у животных с ОА

[0039] Остеоартрит (ОА) коленного сустава является общим хроническим дегенеративным заболеванием, характеризующимся потерей суставного хряща. Сообщается, что инъекция ингибитора гликолиза МІА в бедренно-большеберцовое

суставное пространство грызунов вызывает потерю АС, схожую с отмеченной у человека с ОА (Bove et al., 2003). Кроме того, установлено, что инъекция МІА в коленный сустав крысы приводит к зависимому от дозы и времени возрастанию дискомфорта сустава, определяемого по смещению нагрузки на задние лапы от конечности с инъекцией.

[0040] Для того, чтобы исследовать оказывает ли PDSP (короткий пептид PEDF) антиноцицептивное действие уменьшения интенсивности дискомфорта суставов, 10-недельным самцам крыс Sprague-Dawley (n=15) дают интраартикулярную инъекцию 1 мг МІА (растворенного в 25 мкл стерильного физиологического раствора) в правый сустав, чтобы вызвать максимальную степень смещения нагрузки (с правой лапы на левую), и затем используют для исследования фармакологической реакции от 29-мера PDSP (SEQ ID NO:1). Через 7 дней после инъекции МІА (установленных как день 0), крыс произвольно распределяют в 4 экспериментальные группы (n=3, каждая группа) и обрабатывают в течение последующих 14 дней следующими смесями: (I) носитель PDSP, растворенный в 25 мкл 1% гиалуроновой кислоты (НА), смешанный с носителем PDSP, (II) 29-мер PDSP/НА (конечная концентрация 0,2 мМ PDSP с 1% НА), (III) один PDSP 29-мер (болюс). Обработки осуществляют путем одной интраартикулярной инъекции один раз в день 1, 4, 8 и 12 (дважды в неделю). Для проверки терапевтического действия при пониженной частоте обработки группе IV (29-мер/НА) дают интраартикулярную инъекцию один раз в день 1 и один раз в день 8 (т.е., один раз в неделю).

[0041] Как видно на фиг.1, результаты показывают, что обработка 29-мером PDSP значительно уменьшает вызванное МІА смещение нагрузки по сравнению со смещением в группе носитель/НА (группа II и IV против группы I: $63,3 \pm 12,5\%$ и $58,1 \pm 4,6\%$ против $75,9 \pm 4,7\%$; $P < 0,05$). С другой стороны, в группах болюсной инъекции не происходит снижения вызванных МІА изменений в распределении нагрузки на задние лапы ($77,2 \pm 1,2\%$). Эти результаты показывают, что 29-мер PDSP в комбинации с гиалуроновой кислотой показывает антиноцицептивное действие на вызванный МІА дискомфорт сустава у крыс. Результат болюсной инъекций 29-мера PDSP также предполагает, что в отсутствие гиалуроновой кислоты 29-мер PDSP может быстро проникнуть в большой круг кровообращения.

[0042] Установлено, что инъекция МІА в коленные суставы крысы может привести к экстенсивной дегенерации/некрозу хондроцитов к 7 дню после обработки МІА быстро и воспроизводимо. Поэтому авторы изобретения также исследовали гистопатологические особенности бедренно-большеберцовых суставов у крыс из группы с обработкой смесью носитель/НА и группы с обработкой смесью 29-мер/НА.

[0043] Как видно на фигуре 2, группа с обработкой смесью носитель/НА показывает меньшую потерю целостности хряща, что показывает хорошая целостность поверхности. Под микроскопом группа с обработкой смесью носитель/НА показывает, что хондроциты пропали из поверхностной зоны хряща, и рассеянные клеточные кластеры находятся в переходной зоне и радиальной зоне в значительной степени. Напротив, группа с обработкой смесью 29-мер/НА показывает заполненность хряща большим

числом заново образовавшихся хондроцитов. Гистологические данные предполагают, что способность 29-мера PDSP вызывать регенерацию хряща может быть отчасти ответственной за ослабление болей при ОА.

29-Мер промотирует хондрогенную активность MSC и пролиферацию хондрогенных клеток *in vivo*

[0044] Хондрогенный потенциал мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (MSC) делает их перспективным источником для клеточной терапии дефектов хряща (M.F. Pittenger et al., 1999, Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells, *Science*, 284(5411): 143-7). Кроме того, резидентные MSC в ответ на повреждение хряща могут подвергаться хондрогенной дифференцировке для заживления хряща (T. V. Kurth et al., 2011, Functional mesenchymal stem cell niches in adult mouse knee joint synovium *in vivo*, *Arthritis Rheum.*, 63(5): 1289-300). Данные авторов изобретения показали, что в культуре происходящий из пигментного эпителий-производного фактора (PEDF) короткий пептид (29-мер; позиции Ser93-Thr121) проявляет *in vitro* промотирование хондрогенной активности MSC в присутствии определенной среды, содержащей 100 нМ дексаметазона и 10 нг/мл TGF-β3.

Результаты сканирования аланина 29-мера PDSP с одной заменой на аланин или глицин

[0045] В этом исследовании вдоль последовательности 29-мера одну замену остатка на аланин или глицин проводят и синтезируют для того, чтобы вскрыть в 29-мере критичные для промотирования хондрогенной активности остатки. В целом синтезируют 29 вариантов пептидов на основе аминокислотной последовательности PEDF позиций 93-121, включая 27 вариантов с одной заменой на аланин и 2 варианта с одной заменой на глицин (A96G и A107G). Для оценки хондрогенеза крысиных MSC в культуре, обработанной дексаметазоном, TGF-β3 и вариантами 29-мера, с помощью окрашивания альциановым синим определяют уровни экспрессии гликозаминогликанов (GAG), маркера зрелых хондроцитов.

[0046] Как видно на фигуре 3, MSC в определенной среде (содержащей дексаметазон и TGF-β3) подвергают воздействию 10 мкМ вариантов 29-мера в течение 21 дня с последующим анализом сульфированных GAG с использованием окрашивания альциановым синим. Результаты показывают четкое возрастание интенсивности окрашивания в культуре MSC, обработанной 29-мером PDSP, по сравнению с контролем растворителем ДМСО, как свидетельствует определение количества положительного на альциановый синий материала по OD при 650 нм ($0,34 \pm 0,013$ против $0,15 \pm 0,024$). Результаты также показывают, что мутации S93A ($0,12 \pm 0,015$), A96G ($0,14 \pm 0,023$), Q98A ($0,14 \pm 0,017$), I103A ($0,15 \pm 0,013$), I104A ($0,15 \pm 0,027\%$) и R106A ($0,16 \pm 0,029$) значительно ухудшают промотирование 29-мером PDSP хондрогенной активности MSC ($0,12-0,16$ против $0,34$). Эти результаты предполагают, что 6 из 29 аминокислот могут являться критичными для активности 29-мера.

[0047] Кроме того, мутации L94A ($0,22 \pm 0,032$), E97A ($0,25 \pm 0,023$), R99A ($0,2 \pm 0,02$),

A107G (0,23±0,035) и P116A (0,23±0,029) вызывают частичное снижение промотирования хондрогенной активности 29-мером PDSP (O.D. 0,2~0,25 против 0,34). Остальные замены не влияют существенно на промотирование хондрогенной активности 29-мером PDSP (O.D.>0,26).

[0048] Все вместе данные по сканированию аланина показывают, что на хондрогенное промотирующее действие 29-мера (SEQ ID NO:1) на MSC влияет аминокислотная замена, и коровый пептид представляет собой 14-мер (SEQ ID NO:2). Кроме того, в смысле стимуляции хондрогенной дифференцировки MSC, в 29-мере PDSP в позициях 93, 96, 98, 103, 104 и 106 нельзя осуществить замены без воздействия на его функцию. С другой стороны, остальные аминокислотные остатки в последовательности 29-мера PDSP отображают большую гибкость в отношении отдельных аминокислотных замен без воздействия на функцию 29-мера PDSP. Таким образом, минимальный коровый пептид можно представить как ⁹³S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R¹⁰⁶, где X представляет собой любой аминокислотный остаток (SEQ ID NO:5). Несколько примеров последовательности PDSP, которые можно использовать в воплощениях изобретения, показано в следующей далее таблице (нумерация позиций основана на позициях в 14-мерах). Эти примеры не предназначены для ограничения.

Пептидные последовательности	SEQ ID NO
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	5
¹ S- ² L- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	6
¹ S- ² A- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	7
¹ S- ² X- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	8
¹ S- ² X- ³ A- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	9
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	10
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ A- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	11
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ R- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	12
¹ S- ² L- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ A- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	13
¹ S- ² A- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ T- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	14
¹ S- ² X- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ A- ⁹ E- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	15
¹ S- ² X- ³ A- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ A- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	16
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ S- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	17
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ A- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ A- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	18
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ H- ¹⁴ R	19
¹ S- ² X- ³ X- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ A- ¹⁴ R	20
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	21
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	22
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ A- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	23
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ R- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	24
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ A- ⁸ X- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	25
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ T- ⁹ X- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	26
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ A- ⁹ E- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	27
¹ S- ² L- ³ G- ⁴ A- ⁵ X- ⁶ Q/H- ⁷ X- ⁸ X- ⁹ A- ¹⁰ X- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ X- ¹⁴ R	28

¹ S- ² L- ³ A- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ R- ⁸ T- ⁹ E- ¹⁰ S- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ H- ¹⁴ R	73
¹ S- ² X- ³ G- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ R- ⁸ T- ⁹ E- ¹⁰ S- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ H- ¹⁴ R	74
¹ S- ² A- ³ G- ⁴ A- ⁵ E- ⁶ Q/H- ⁷ R- ⁸ T- ⁹ E- ¹⁰ S- ¹¹ I/V- ¹² I- ¹³ H- ¹⁴ R	75

Действие вариантов 29-мера на крысиную модель экспериментального ОА

Антиноцицептивное действие вариантов 29-мера PDSP на вызванные MIA смещения нагрузки на задние лапы

[0049] В исследовании на животных варианты 29-мера PDSP вводят в 1% НА до конечной концентрации 0,2 мМ и затем применяют посредством одной интраартикулярной инъекции каждого в день 1 и день 8 после инъекции MIA. После обработки вариантами 29-мера в течение 14 дней оценивают антиноцицептивное действие вариантов (n=3 в каждой группе) 29-мера на вызванные MIA смещения нагрузки на задние лапы тестером на недееспособность.

[0050] Как видно на фигуре 4, обработка смесью 29-мер/НА значительно уменьшает смещения нагрузки, вызванные MIA, по сравнению с группой, обработанной смесью носитель/НА (22,0±0,66% против 47,1±3,7%; P<0,0004). Вариант H105A также способен уменьшать смещение нагрузки, вызванное MIA (21,4±1,4%). Важно, что обработка вариантами с S93A, A96G, Q98A, I103A, I104A и R106A не оказывает действия на уменьшение смещений нагрузки на задние лапы, вызванных MIA (величины в диапазоне 45-51%). Исследование на животных поддерживает мнение, что эти критичные остатки играют ключевую роль в поддержании антиноцицептивного действия 29-мера PDSP, и что замены в некритичных местоположениях не оказывают воздействия на активность PDSP.

Действие вариантов 29-мера на пролиферацию Sox9-положительных хондроцитов

[0051] Обработку BrdU начинают в день 1 после инъекций MIA в течение 7 дней (принятых за день 0) для контроля за клеточной пролиферацией сразу при обработке смесью 0,2 мМ 29-мер/НА. Как видно на фигуре 5A (верхние снимки), почти все регенеративные хрящеподобные ткани содержат BrdU-положительные клетки в группе, обработанной смесью 29-мер/НА. Однако имеется немного BrdU-положительных клеток на поверхности хряща коленей, обработанных смесью носитель/НА, что показывает, что почти всем хондроцитам предопределена некротическая гибель клеток после обработки MIA.

[0052] Фактор транскрипции Sox9 играет существенную роль в хондрогенезе стволовых клеток/клеток-предшественников путем управления экспрессией генов, специфичных для хондроцитов. Иммуноокрашиванием Sox9 обнаружено, что BrdU-положительные клетки являются также Sox9-положительными, что показывает, что BrdU-положительные клетки потенциально стимулируются 29-мером к развитию хондроцитов (фигура 5A; нижние снимки). Обработка 0,2 мМ 29-мером отображает важную способность вызывать рост BrdU-положительных хондроцитов в регенеративном хряще по сравнению с обработкой смесью носитель/НА (фигура 5B; 346±57 против 7±3; P<0,001). В сумме эти результаты показывают, что 29-мер может стимулировать

пролиферацию хондрогенных клеток для заживления хряща.

[0053] Затем проверяют способность вариантов 29-мера стимулировать клеточную пролиферацию в суставном хряще после обработки 29-мером в течение 14 дней. Иммуноокрашивание BrdU коленных суставов показывает, что обнаруживается множество BrdU-положительных клеток в области хряща в группах, обработанных смесями 29-мер/НА и H105A/НА, в то время как при обработке смесью носитель/НА в них содержится меньше BrdU-положительных клеток (**фигура 6**; 346 ± 57 и 297 ± 22 против 7 ± 3). С другой стороны, обработка с S93A, A96G, Q98A, I103A, I104A и R106A не увеличивает число BrdU-положительных клеток в хряще (величины в диапазоне 30-62). Это исследование на животных подтверждает, что эти критичные остатки играют существенные роли в поддержании биологической активности 29-мера PDSP.

[0054] В совокупности данные сканирования аланина показывают, что на терапевтическое действие 29-мера влияет выбранная аминокислотная замена, что подтверждено с помощью крысиной модели остеоартрита. Кроме того, остатки 29-мера в позициях S93, A96, Q98, I103, I104 и R106 являются важными для активности 29-мера PDSP при лечении ОА, в то время как другие остатки могут быть заменены без существенного воздействия на активность.

[0055] Воплощения изобретения иллюстрированы ограниченным числом примеров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны вариации и модификации без существенного отступления от объема изобретения. Следовательно, объем изобретения должен ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения при лечении и/или предупреждении остеоартрита, включающая происходящий из PEDF короткий пептид (PDSP) или вариант PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого пигментного эпителий-производного фактора (PEDF), и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержит одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем номера местонахождения остатков основаны на номерах в человеческом PEDF.

2. Фармацевтическая композиция по п.1, причем PDSP включает последовательность S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R (SEQ ID NO: 5).

3. Фармацевтическая композиция по п.1, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHR (SEQ ID NO: 2).

4. Фармацевтическая композиция по п.1, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHRALYYDLISSPDIHGT (SEQ ID NO: 1).

5. Фармацевтическая композиция по п.1, причем PDSP включает последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 6-75.

6. Фармацевтическая композиция для промотирования хондрогенеза, включающая происходящий из PEDF короткий пептид (PDSP) или вариант PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого пигментного эпителий-производного фактора (PEDF), и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержит одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем номера местонахождения остатков основаны на номерах в человеческом PEDF.

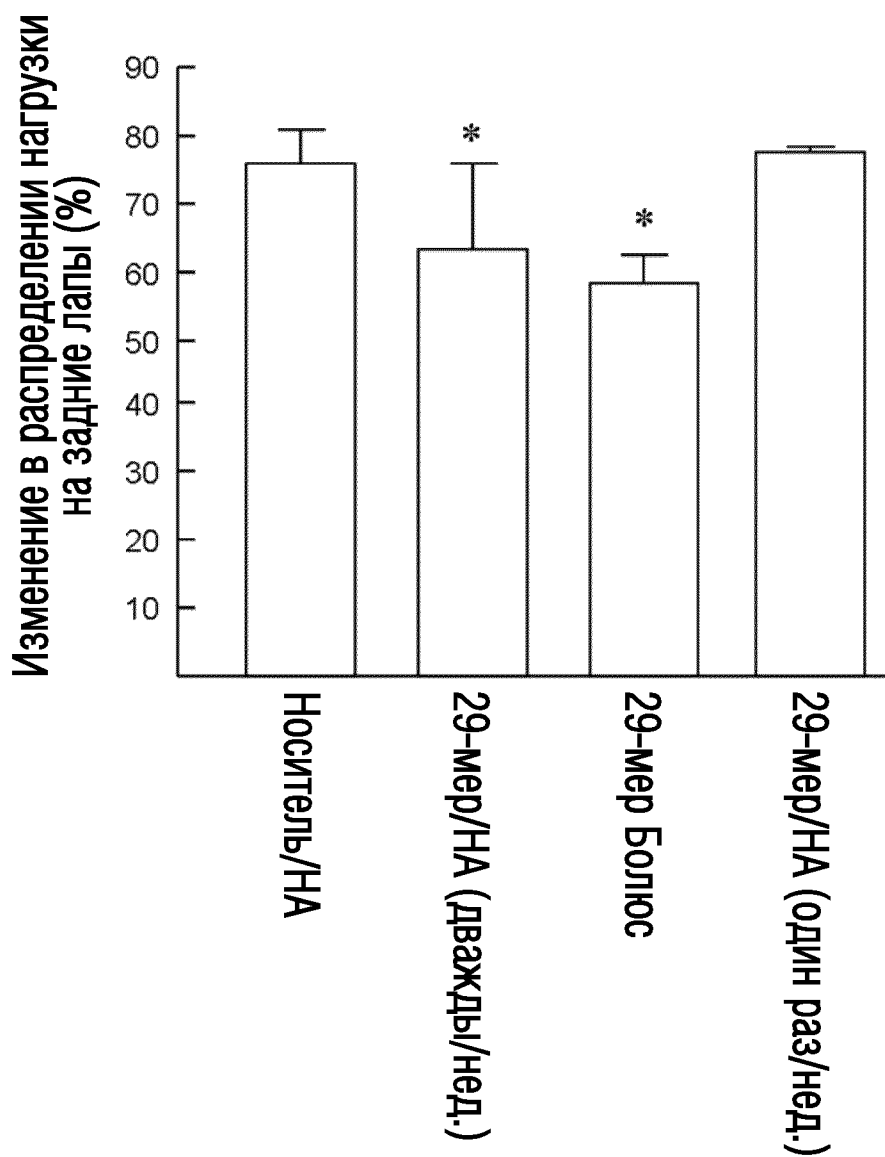
7. Фармацевтическая композиция по п.6, причем PDSP включает последовательность S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R (SEQ ID NO: 5).

8. Фармацевтическая композиция по п.6, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHR (SEQ ID NO: 2).

9. Фармацевтическая композиция по п.6, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHRALYYDLISSPDIHGT (SEQ ID NO: 1).

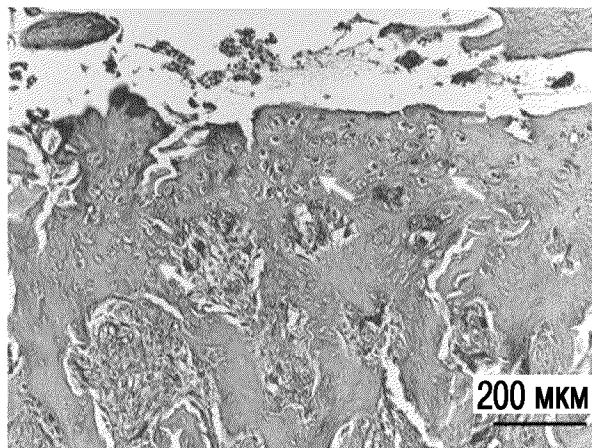
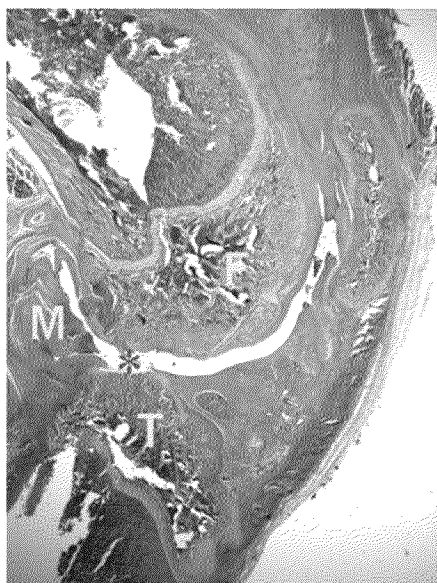
10. Фармацевтическая композиция по п.6, причем PDSP включает последовательность любой из последовательностей SEQ ID NO: 6-75.

По доверенности

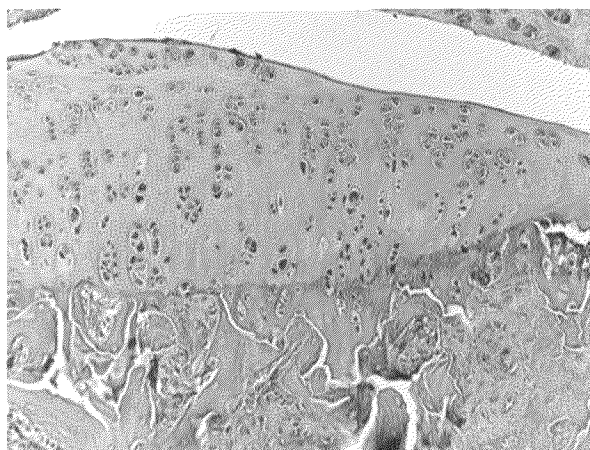
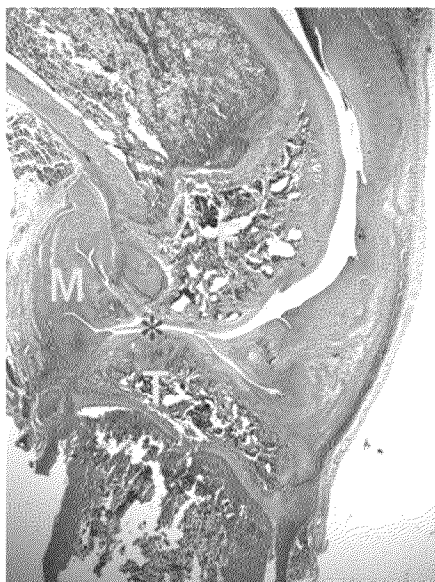


ФИГ. 1

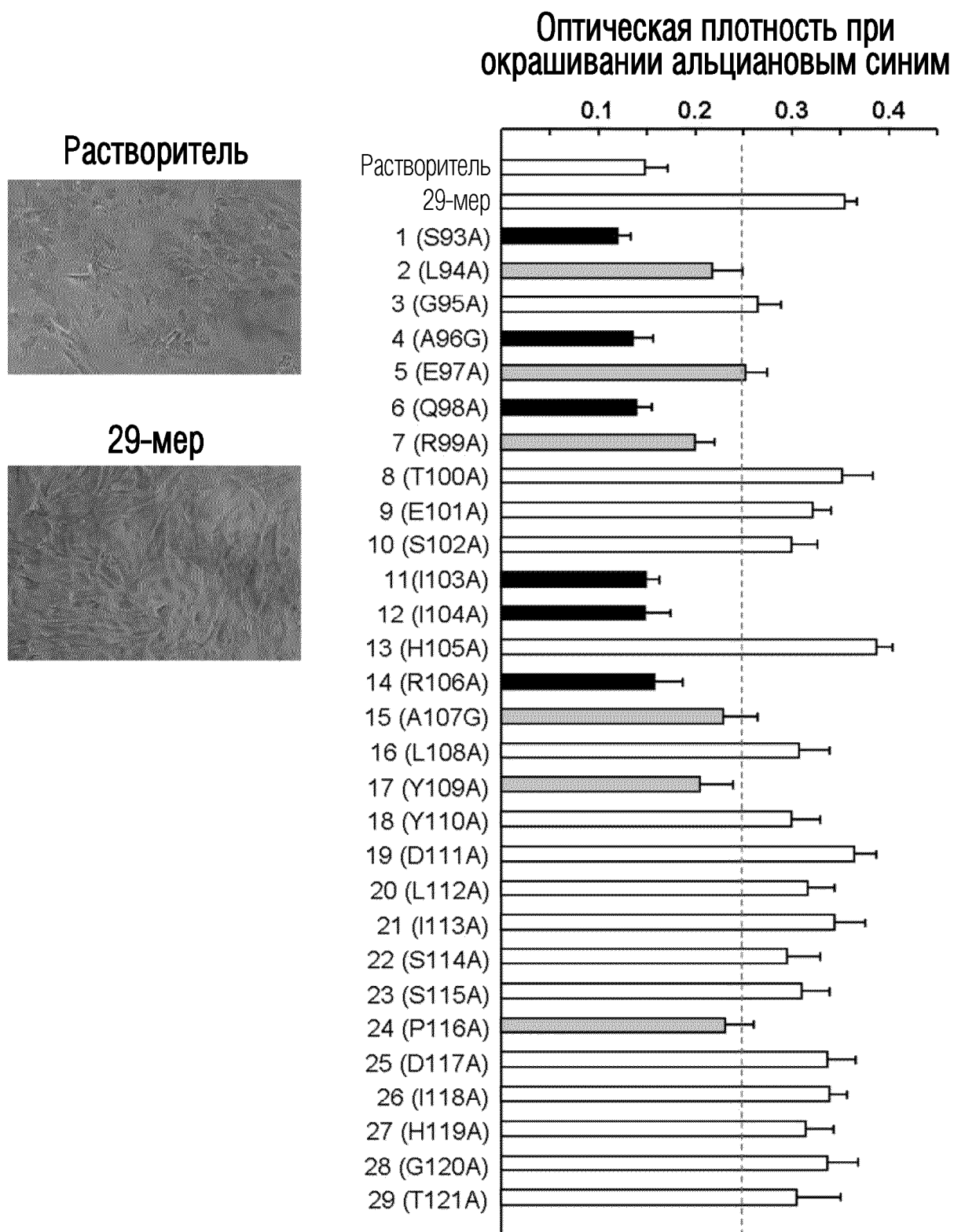
Носитель/НА



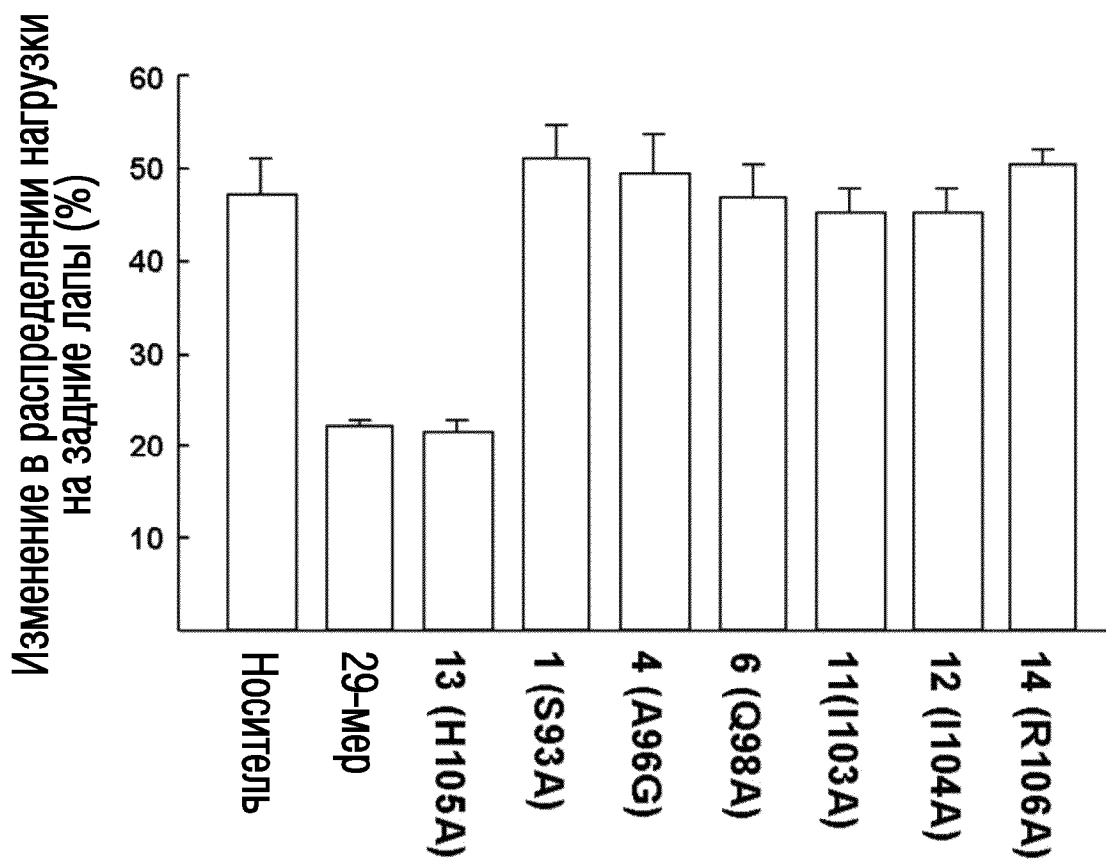
29-мер/НА



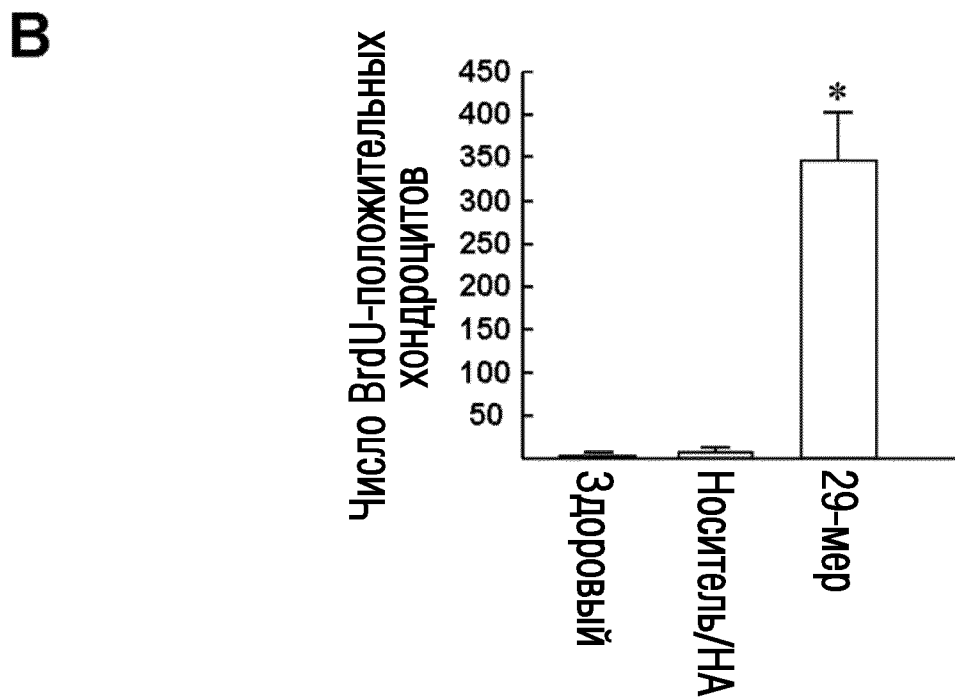
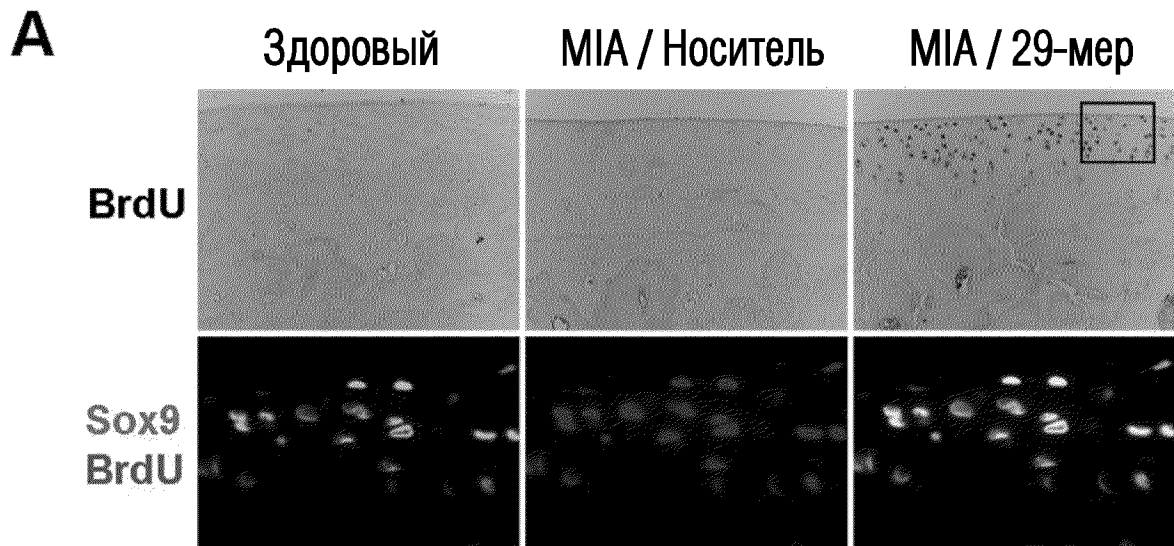
ФИГ. 2



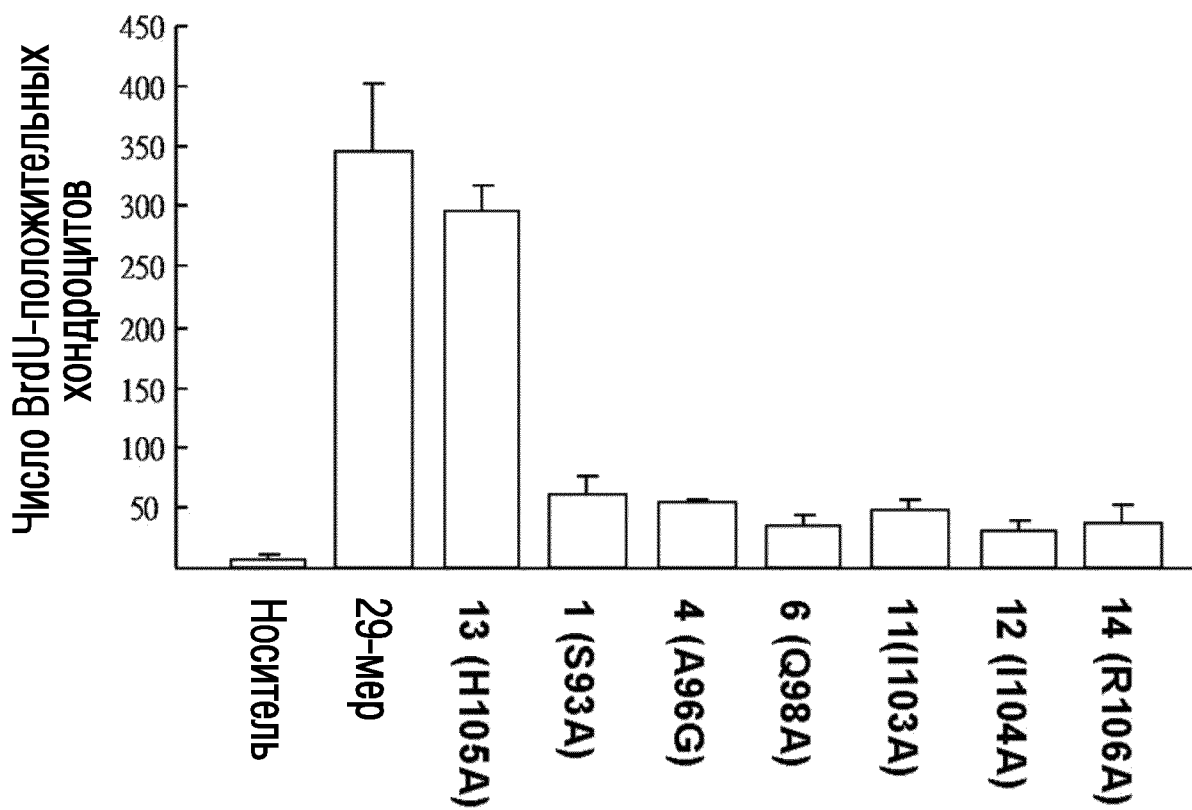
ФИГ. 3



Фиг. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6