

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202092368** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.01.18

(22) Дата подачи заявки
2019.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/02 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ PEDF КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ СУХОЖИЛИЙ

(31) **62/654,466**

(32) **2018.04.08**

(33) **US**

(86) **PCT/US2019/026307**

(87) **WO 2019/199661 2019.10.17**

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

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

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

(57) Способ лечения повреждения сухожилия 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.

A



202092368

A1

A1

202092368

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565153EA/23

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОИСХОДЯЩИХ ИЗ PEDF КОРОТКИХ ПЕПТИДОВ ПРИ ЗАЖИВЛЕНИИ СУХОЖИЛИЙ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к происходящим из PEDF пептидам и их применениям при заживлении сухожилий после травм.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0002] Сухожилия содержат плотные волокнистые соединительные ткани и осуществляют передачу мышечного усилия на кость, что является критичным для регулирования движения тела. Повреждения сухожилий являются обычными и часто вызываются перенапряжением сухожилия. Однако сухожилие имеет ограниченную способность самозаживления после тяжелого повреждения из-за его аваскуляризации и ацеллюлярности. В отличие от других типов соединительных тканей, в месте повреждения сухожилия трудно мобилизовать мезенхимальные стромальные клетки костного мозга (BM-MSC). Таким образом, восстановление сухожилия является медленным и относительно трудным процессом.

[0003] Последнее время прилагаются интенсивные усилия для использования подходов на основе клеточной терапии для ускорения регенерации и восстановления сухожилий. Однако для трансплантации клеток требуется длительное развитие процесса. Кроме того, расходы, технические проблемы и проблемы безопасности являются препятствиями при обеспечении пользы для пациентов. Фактор роста, который стимулирует пролиферацию стволовых клеток/клеток-предшественников сухожилий (TSCP), может являться альтернативным выбором для промотирования восстановления сухожилий. В недавней работе показано, что TSCP, содержащие маркер CD146 на периферии сухожилия, можно стимулировать для пролиферации в ране сухожилия после предоставления локально фактора роста соединительной ткани (CTGF). Инъекция богатой тромбоцитами плазмы (PRP) является другим примером использования потенциала тромбоцитарного фактора роста (PDGF) для заживления повреждения сухожилия, хотя эффект ограничен возможно из-за низкой концентрации PDGF в препарате. Кроме того, лечение фактором роста легко доступно в случае острой травмы сухожилия, пропуская период ожидания клеточной терапии.

[0004] Сообщается, что некоторые факторы роста обладают способностью индуцировать пролиферацию TSCP. Показано, что фактор роста соединительной ткани (CTGF) усиливает клоногенную способность CD146+ TSCP. Фактор роста фибробластов (FGF)-2 промотирует рост TSCP, помеченных Scleraxis (Scx), и экспрессии генов SRY и 9 (Sox9). Кроме того, сообщается, что гидрогелевые комбинации bFGF, инсулиноподобных факторов роста (IGF)-1 и PDGF-BB могут улучшить выживаемость происходящих из жира мезенхимальных стволовых клеток (ASC), способствующих заживлению сухожилий *in vivo*.

[0005] Пигментный эпителий-производный фактор (PEDF) широко экспрессируется в большинстве тканей организма. Сообщается, что PEDF опосредует пролиферации некоторых стволовых клеток/клеток-предшественников. Например, PEDF эффективен при стимуляции пролиферации предшественников нервных клеток и эмбриональных стволовых клеток человека. Недавние исследования также показали, что PEDF и происходящие из PEDF короткие пептиды (PDSP) могут стимулировать пролиферацию лимбальных стволовых клеток, клеток-сателлитов мышечной ткани и стволовых клеток печени. Эти наблюдения предполагают, что PDSP могут являться терапевтическим агентом с многообещающим потенциалом для некоторых типов повреждений тканей, включая повреждения сухожилий.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] Один аспект изобретения относится к фармацевтическим композициям или способам лечения повреждений сухожилий. Способ согласно одному воплощению 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 любых последовательностей из SEQ ID NO: 1-75.

[0007] Другой аспект изобретения станет очевидным из последующего подробного описания и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0008] Фигура 1 показывает действие вариантов 29-мера на пролиферацию нуклеостемин-положительных TSCP. Первичные кроличьи TSCP культивируют почти до слияния в колбе для культивирования клеток 75T и затем проверяют иммуноокрашиванием маркера TSCP нуклеостемина (>98% зеленый цвет). Ядра окрашивают Hoechst 33258 (*синий цвет*) и визуализируют эпифлуоресцентной микроскопией. Нуклеостемин-положительные TSPC обрабатывают 10 мкМ 29-мером или его вариантами в течение 24 час. Число TSPC после 24-час роста детектируют с помощью набора для анализа клеточной пролиферации (BioVision; каталожный номер K307). TSPC, обработанные растворителем PDSP, принимают за 100%. Результаты выражают как среднее \pm ср.-кв. ош. (SE) из трех независимых экспериментов.

[0009] Фигура 2 показывает анализ методом вестерн-блоттинга экспрессии циклина D1 в TSPC, обработанных вариантами 29-мера. Первичные кроличьи TSCP обрабатывают 10 мкМ 29-мером или его вариантами в течение 24 час. Показаны характерные пятна (A) и денситометрический анализ с помощью SD (B) из трех независимых экспериментов. Экспрессия циклина D1 нормализована к β -актину. *P<0,05 против клеток, обработанных 29-мером.

[00010] Фигура 3 показывает гистологическую картину обработанных вариантом 29-мера сухожилий через 1 неделю после операции. Характерные микрофотографии гистопатологического анализа с помощью окрашивания Н&Е. Окрашенные Н&Е срезы при более высоком увеличении показывают неповрежденную ткань сухожилий с относительным недостатком клеток среди коллагеновых волокон. Поврежденный участок показывает дегенерацию и воспаление, помеченные желтыми стрелками для того, чтобы показать жировые отложения, черными стрелками для того, чтобы показать зону с высокой целлюлярностью, и * для того, чтобы показать сосуды.

[00011] Фигура 4 показывает действие варианта 29-мера в альгинат-геле на заживление ахиллова сухожилия. (А) Характерные окрашенные Н&Е продольные срезы при более высоком увеличении показывают морфологию ядер в неповрежденной ткани сухожилия, обработанного смесью носитель/альгинат и смесью 29-мер/альгинат в течение 1 недели. (В) Гистопатологические оценки. Все оценки определяются структурой волокон, расположением волокон, округлением ядер, плотностью резидентных клеток и воспалением (инфильтрация клеток зоны воспаления, неоваскуляризация и жировые отложения). Данные сообщаются как среднее \pm ср.-кв.ош.. * $P < 0,0005$ против сухожилия, обработанного смесью носитель/альгинат; # $P < 0,05$ против сухожилия, обработанного смесью 29-мер/альгинат.

[00012] Фигура 5 показывает действие варианта 29-мера в альгинат-геле на рост CD146-положительных TSPC в поврежденном ахилловом сухожилии. (А) Характерные окрашенные CD146 продольные срезы. (Заявленное увеличение $\times 200$). (В) Число CD146-положительных TSPC в поле зрения при $200\times$ на срезах поврежденного сухожилия. Данные приводятся как среднее \pm ср.-кв.ош.. Все CD146⁺ клетки оценивают по 6 срезам образца сухожилия у 3 крыс в каждой группе. * $P < 0,001$ против сухожилия, обработанного смесью носитель/альгинат; # $P < 0,001$ против сухожилия, обработанного смесью 29-мер/альгинат.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[00013] Воплощения изобретения относятся к способам лечения повреждений сухожилий с использованием происходящих из PEDF коротких пептидов (PDSP). 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.

[00014] Авторы настоящего изобретения обнаружили, что некоторые короткие пептиды PEDF можно использовать для лечения повреждений сухожилий. Также обнаружено, что терапевтический эффект может проистекать из способности таких PSDP

индуцировать развитие CD146⁺ TSPC. CD146⁺ TSPC распределяются в периферической области сухожилия крысы, и обнаружено, что CD146⁺ TSPC способствуют заживлению раны пателлярного сухожилия крысы.

[00015] PDSP по изобретению имеют в основе пептидный участок, соответствующий остаткам человеческого PEDF 93-121 (⁹³SLGAEQRTEСIIHRALYYDLISSPDIHGT¹²¹; 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 повреждений сухожилий.

[00016] Эти результаты показывают, что коровый пептид, обладающий антиноцицептивным действием, находится в участке, включающем остатки 93-106 (⁹³SLGAEQRTEСIIHR¹⁰⁶; SEQ ID NO:2). Таким образом, самый короткий пептид PDSP, имеющий терапевтическую активность в отношении повреждений сухожилий, 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.

[00017] Кроме того, как отмечено выше, замены в этих коротких пептидах могут сохранить 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 (SLGAENRTEСVIHRALYYDLITNPDIHST, SEQ ID NO: 3) и mo-14-мер (SLGAENRTEСVIHR, SEQ ID NO: 4). Таким образом, общей последовательностью для активного кора 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).

[00018] Пептиды PDSP по изобретению можно синтезировать химически или экспрессировать с использованием систем, экспрессирующих белки/пептиды. Эти пептиды PDSP можно использовать в фармацевтической композиции для лечения повреждений сухожилий. 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.

[00019] Некоторые воплощения изобретения относятся к способам лечения поврежденных сухожилий 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.

[00020] 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

[00021] Модифицированную по способу Дульбекко среду Игла (DMEM), фетальную бычью сыворотку (FBS), антибиотические-антимикотические растворы и трипсин закупают у Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). 5-Бром-2'-дезоксинуридин (BrdU), добавку к средам инсулин-трансферрин-селенит натрия (ITSE), краситель Hoechst 33258, натриевую соль альгиновой кислоты и все химикаты - от Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Диспазу II и коллагеназу I получают от Roche (Indianapolis, IN, USA). Анти-BrdU антитело (GTX42641) от GeneTex (Taipei, Taiwan). Антитела против нуклеостемина (ab70346) от Abcam (Cambridge, MA, 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). PDSP 29-мер и варианты 29-мера синтезируют, модифицируют ацетилированием по NH₂-концам и амидированием по COOH-концам для устойчивости и характеризуют масс-спектрометрией (чистота >90%) в GenScript (Piscataway, NJ, USA). Каждый происходящий из PEDF синтетический пептид восстанавливают в ДМСО в качестве исходного раствора (10 мМ).

Исследования на животных

[00022] Всех животных 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.

Выделение и культивирование стволовых клеток сухожилия

[00023] В этом исследовании используют ахилловы сухожилия новозеландских белых кроликов (возраст 6-8 месяцев, 3,0-4,0 кг). Ахилловы сухожилия промывают два раза стерильным забуференным фосфатом физиологическим раствором (PBS), содержащим 50 мкг/мл гентамицина. Сухожилие и влагалище сухожилия нарезают на небольшие кусочки (1-2 мм³). Затем каждые 100 мг фрагмента расщепляют в растворе, содержащем 3 мг/мл коллагеназы типа I и 4 мг/мл диспазы в 1 мл сбалансированного солевого раствора (BSS; Alcone), при 37°C в течение 4 часов. Расщепленные ткани промывают три раза PBS и собирают центрифугированием (800 g в течение 10 мин). Расщепленные ткани помещают в планшеты для культивирования тканей (Falcon Labware; NJ, USA) и ресуспендируют в DMEM с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% FBS и 50 мкг/мл гентамицина, и выдерживают при 37°C в атмосфере с 5% CO₂. Через 5 дней среду заменяют для удаления остатков разрыхленной ткани. Затем клетки сухожилия инкубируют со средой с 10% FBS в течение 2 дней, и затем культивируют с базальной средой (2% FBS, 1% ITSE, 300 мкг/мл L-глутамина, 1% антибиотических-антимикотических растворов) еще в течение 10 дней. Культуральную среду заменяют каждые 3 дня. Для посева клетки сухожилий собирают с помощью смеси 0,25% трипсина/ЭДТК, клетки подсчитывают с помощью гемоцитометра, приблизительно 5×10^3 клеток высевают в каждую лунку 96-луночного культурального планшета или 2×10^5 клеток высевают в каждую лунку 6-луночного культурального планшета на 24 часа. Затем эти выращенные клетки сухожилия обрабатывают еще в течение 24 час 10 мкМ 29-мером или его вариантами в свежей базальной среде и подвергают анализу на пролиферацию клеток и анализу вестерн-блоттингом, соответственно.

Анализ на клеточную пролиферацию

[00024] Набор для анализа клеточной пролиферации (Fluorometric) закупают у BioVision (каталожный № K307) и используют для оценки клеточной пролиферации согласно рекомендациям изготовителя. Флуоресценцию считывают при 480 нм в случае возбуждения и 538 нм в случае испускания на флуоресцентном спектрофотометре для прочтения микропланшетов SPECTRAmax GEMINI XS (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

Иммуноцитохимия

[00025] Клетки фиксируют 4% параформальдегидом, и затем обрабатывают при 4°C метанолом в течение 1 мин и блокируют 1% козьей сывороткой и 5% BSA в течение 1 часа. Клетки окрашивают антителами к нуклеостемину (разведение 1:100) при RT в течение 3 час. Затем слайды инкубируют с FITC-ослиным антикроличьим IgG (разведение 1:500; BioLegend, San Diego, CA) в течение 20 мин, и затем контрокрашивают Hoechst 33258 в течение 6 мин. Слайды промывают PBS с тритоном X100 (0,5%) три раза.

Наконец, срезы монтируют с помощью реагента FluorSave™ (Calbiochem), и рассматривают в эпифлуоресцентном микроскопе, Zeiss.

Анализ методом вестерн-блоттинга

[00026] Лизис клеток, SDS-PAGE и работу с антителами, используемыми для иммуноблоттинга, выполняют так, как описано в литературе (Ho et al., 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2 induces vascular endothelial cell apoptosis through the sequential activation of MAPKS and p53. *J Biol. Chem.*, 2008; 283(44): 30273-30288). Интенсивность полос иммуноблоттинга оценивают с помощью денситометра Imaging Densitometer, Model GS-700 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), и анализируют с использованием программы Labworks 4.0.

Хирургическая процедура для повреждения ахиллова сухожилия крысы

[00027] Для того, чтобы исследовать действие 29-мерного пептида на заживление сухожилия, создают крысиную модель повреждения ахиллова сухожилия так, как описано Orhan et al. (The effect of extracorporeal shock waves on a rat model of injury to tendon Achilles. A histological and biomechanical study. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2004; 86(4): 613-618). Взрослым 10-недельным самцам крыс Sprague-Dawley (начальная масса тела=312±11 г) дают наркоз интраперитонеальной инъекцией ксилазина (10 мг/кг). Затем создают повреждение левого ахиллова сухожилия путем введения на всю толщину ахиллова сухожилия иглы 18-G в 1 см от места прикрепления к пяточной кости. Это создает горизонтальную рану, которая фланкирована неповрежденной тканью сухожилия для предотвращения ретракции концов разреза. Рассечение кожи закрывают после ирригации раны стерильным физиологическим раствором. Пространство вокруг раны обрабатывают подкожной инъекцией 150 мкл альгинат-геля, смешанного со 100 мкМ 29-мера или носителя ДМСО (шесть крыс на эксперимент).

Обнаружение *in vivo* синтеза ДНК

[00028] Для обнаружения роста клеток BrdU восстанавливают в ДМСО в качестве исходного раствора (80 мМ). Смешанные с 350 мкл PBS 150 мкл BrdU интраперитонеально инъецируют крысе в день 0, 3, 5 после операции. Синтез ДНК оценивают с помощью мечения BrdU анти-BrdU антителами.

Гистологическая проверка повреждения сухожилия

[00029] Иссекают сухожилие и окружающую мягкую ткань. Образцы фиксируют в 4% растворе параформальдегида (PFA) и затем заливают в парафиновые блоки. Срезы (толщиной 5 мкм) нарезают продольно и окрашивают гематоксилином и эозином (H&E) или используют для иммуногистохимической проверки. Тщательно получают 36 срезов на сухожилие так, чтобы включить самую сильно дегенерированную область. Изображения собирают с использованием микроскопа Nikon Eclipse 80i (Nikon Corporation, Токио, Япония), снабженного камерой Leica DC 500 (Leica Microsystems, Wetzlar, Германия). Отбирают четыре среза каждого образца, содержащих поврежденные ткани сухожилия, которые оценивают два исследователя вслепую, для того, чтобы оценить морфологию сухожилия в соответствии с модифицированной полуколичественной оценкой от 0 до 3,

предложенной Chen et al. (Tendon derived stem cells promote platelet-rich plasma healing in collagenase-induced rat Achilles tendinopathy. *Cell Physiol. Biochem.*, 2014; 34(6): 2153-68). Оценки анализируют структуру волокон (0-3), расположение волокон (0-3), округление ядер (0-3), плотность резидентных клеток (0-3) и воспаление (0-3; инфильтрация клеток зоны воспаления, неоваскуляризация и жировые отложения). Согласно этой системе оценок вполне здоровое сухожилие получает оценку 0, в то время как оценка 15 предназначена для максимально аномальных сухожилий.

Иммуногистохимическое окрашивание

[00030] Фиксированные в формалине залитые парафином образцы сухожилий депарафинируют в ксилоле и регидратируют в присутствии этанола в ступенчато изменяющихся концентрациях. Слайды блокируют 10% козьей сывороткой в течение 60 мин и затем инкубируют с первичным антителом против CD146 (разведение 1:50) при комнатной температуре (RT) в течение 2 час. 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.

Статистика

[00031] Результаты выражают в виде $\text{среднее} \pm \text{среднеквадратическая ошибка}$. Для статистического сравнения используют однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA). $P < 0,05$ рассматривают как значимый, если не указано иное.

Идентификация критичных аминокислотных остатков в 29-мере, требуемых для митогенной активности для индукции пролиферации TSCP в культуре

[00032] Авторы изобретения показали, что фрагменты коротких пептидов, происходящие из пигментного эпителий-производного фактора (PEDF) (29-мер; остатки Ser93-Thr121, 24-мер; Ser93-Pro, и 20-мер; Ser93-Leu112) облегчают заживление разрыва сухожилия, как показано с помощью крысиной модели. Результаты предыдущего исследования также показывают, что 29-мер, 24-мер и 20-мер, добавленные в культуральную среду, способны индуцировать пролиферацию стволовых клеток/клеток-предшественников сухожилия (TSPC). В данном исследовании в последовательности 29-мера создают замены одного остатка на аланин или глицин и осуществляют синтез для выяснения критичных остатков, ответственных за митогенную активность 29-мера. В целом синтезируют 29 вариантов пептидов на основе аминокислотной последовательности остатков PEDF 93-121, в том числе 27 с одной заменой на аланин и 2 с одной заменой на глицин (A96G и A107G). В первую очередь авторы исследовали действие вариантов 29-мера на пролиферацию TSPC.

[00033] Выделение кроличьих TSPC описано выше. TSPC в средах с малым содержанием сыворотки обрабатывают 10 мкМ одним из вариантов 29-мера в течение 24 час. Пролиферацию клеток проверяют с помощью набора для клеточной пролиферации, основанного на наборе, обеспеченном красителем Nuclear, который специфически связывается с нуклеиновой кислотой в клетке и генерирует зеленую флуоресценцию.

Обработка 29-мером усиливает пролиферацию TSPC по сравнению с контролем растворителем ДМСО ($135 \pm 6,1\%$ против $100 \pm 4,0\%$, **фигура 1**). Результаты также показывают, что мутации S93A ($106 \pm 3,8\%$), A96G ($102 \pm 4,0$), Q98A ($106 \pm 5,4\%$), I103A ($106 \pm 5,3\%$), I104A ($112 \pm 1,7\%$) и R106A ($106 \pm 3,5\%$) значительно ухудшают митогенную активность 29-мера ($102 \sim 112\%$ против 135%). Такие результаты предполагают, что 6 из 29 аминокислот являются критичными для активности 29-мера. Кроме того, мутации L94A ($113 \pm 5,2\%$), R99A ($116 \pm 7,0$), A107G ($117 \pm 3,8\%$) и P116A ($115 \pm 3,7\%$) вызывают частичное снижение митогенной активности 29-мера до $112 \sim 117\%$. Остальные замены сохраняют более половины митогенной активности по сравнению с 29-мером ($>117\%$). Такие результаты предполагают, что остальные 19 остатков в 29-мере могут допускать аминокислотные замены.

[00034] Между тем, воздействие 29-мера и его вариантов на TSCP в течение 24 час приводит к $2,9 \pm 0,5$ -кратной индукции маркера пролиферации белка циклина D1 по сравнению с клетками, обработанными растворителем. Варианты T100A и H105A показывают действие на экспрессию белка циклина D1, подобное 29-меру ($2,7 \pm 0,5$ и $2,7 \pm 0,3$ -кратное; **фигура 2**). Однако воздействие 29-мера на индукцию белка циклина D1 почти устраняется заменой на аланин/глицин в остатках S93, A96, Q98, I103, I104 и R106, соответственно ($1,3 \pm 0,1$, $1,5 \pm 0,3$, $1,3 \pm 0,1$, $0,9 \pm 0,1$, $1,3 \pm 0,2$ и $1,0 \pm 0,3$). В целом, данные сканирования аланина показывают, что на митогенное действие 29-мера на TSPC влияют аминокислотные замены. Данные также предполагают, что PDSF в позициях Ser93, Ala96, Gln98, Ile103, Ile104 и Arg106 являются важными для поддержания действия PDSF на индукцию пролиферации TSPC.

Терапевтическое действие вариантов 29-мера на крысиной модели экспериментального повреждения сухожилия

[00035] Для того, чтобы исследовать действие 29-мерного пептида на поврежденное сухожилие, создают крысиную модель повреждения ахиллова сухожилия путем введения на всю толщину ахиллова сухожилия иглы 18-G. Авторы доставляли 29-мер в 150 мкл альгинат-геля, который высвобождает 90% загруженного 29-мера за 5 дней, как описано в протоколе ранее (Ho et al., PEDF-derived peptide promotes skeletal muscle regeneration through its mitogenic effect on muscle progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2015, Aug 1; 309(3): C159-68). Как видно на **фигуре 3**, отображающей гистологический анализ путем окрашивания H&E через 1 неделю после операции, обработка смесью носитель/альгинат-гель показывает потерю структуры волокон и отображает значительное присутствие матрикса воспаления (помеченного желтыми стрелками) и жировых отложений и/или некротического участка (помеченных черными стрелками) в области восстановления, в то время как группа, обработанная смесью 29-мер/альгинат-гель, показывает равномерное появление хорошо выровненных коллагеновых волокон, что показывает, что 29-мер промотирует заживление сухожилия. Примечательно, что через 1 неделю после операции поврежденное сухожилие в группе, обработанной носителем, показывает присутствие большого числа округленных клеток

(фибробластов и клеток зоны воспаления; **фигура 4А**). Напротив, обработка 29-мером показывает сильное возрастание плотности клеток, и морфология их ядер показывает нормальные веретенообразные теноциты и слегка скругленные резидентные клетки, расположенные параллельно коллагеновым волокнам. Под микроскопом поврежденное сухожилие, обработанное альгинат-гелем, содержащим вариант T100A или H105A, также показывает равномерное появление хорошо выровненных коллагеновых волокон и отсутствие дегенеративных событий подобно обработке 29-мером. Важно, что обработка S93A, A96G, Q98A, I103A, I104A и R106A показывает утрату структуры волокон и сопровождается заметным возрастанием матрикса воспаления, жировых отложений и наличия кровеносных сосудов (отмечены звездочкой) в поврежденном участке сухожилия (**фигура 3**).

[00036] Скоринг-анализ выполняется двумя исследователями вслепую. Общие гистопатологические оценки описаны выше и представлены на гистограммах на **фигуре 4В**, обработка смесью 29-мер/альгинат значительно снижает общую оценку по сравнению с группой, обработанной смесью носитель/альгинат ($7,9 \pm 0,4$ против $12,7 \pm 0,6$; $P < 0,0005$). Варианты T100A и H105A также способны снижать общие гистопатологические оценки ($8,0 \pm 0,5$ и $7,8 \pm 0,7$). Примечательно, что обработка S93A, A96G, Q98A, I103A, I104A и R106A не имеет действия снижения общих гистопатологических оценок (величины в диапазоне 11,2~13,7) по сравнению с обработкой 29-мером.

[00037] В целом, результаты исследования на животных подтверждают, что остатки 29-мера, включающие S93, A96, Q98, I103, I104 и R106, являются критическими остатками для поддержания терапевтического действия 29-мера на сухожилие. Эти результаты также предполагают, что коровый пептид с терапевтическим действием на сухожилия локализован в остатках 93-106 человеческого PEDF ($^{93}\text{SLGAEQRTESSHR}^{106}$; SEQ ID NO:2). Следовательно, согласно воплощениям изобретения, PDSP для лечения повреждений сухожилий может быть таким коротким, как 14-мер (остатки 93-106). Специалисту в данной области техники будет понятно, что пептид, содержащий этот коровый участок, может сохранять одну и ту же активность, даже если по С- и/или N-концу могут быть включены дополнительные аминокислоты. Иными словами, пептид для лечения повреждений сухожилий согласно воплощениям изобретения может представлять собой 14-мер, 15-мер, 16-мер и т.д., включая 29-мер, используемый в примерах.

[00038] Кроме того, как отмечено выше, замены в этих коротких пептидах могут сохранять активность до тех пор, пока сохранены критические 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, при сравнении с человеческой последовательностью) также являются активными. Соответствующими мышинными последовательностями являются mo-29-мер (SLGAENRTESSVHRALYYDLITNPDHST, SEQ ID NO: 3) и mo-14-мер (SLGAENRTESSVHR, SEQ ID NO: 4). Таким образом, общая последовательность для активного кора представляет собой ($^{93}\text{S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R}^{106}$, где X

представляет собой любой аминокислотный остаток; SEQ ID NO: 5).

Действие вариантов 29-мера на распространение TSPC в поврежденном сухожилии [00039] Одним из маркеров TSPC является CD146. CD146⁺ TSPC распределяются по периферийной области крысиного сухожилия, и обнаружено, что CD146⁺ TSPC способствуют заживлению ран пателлярного сухожилия крысы. Для того, чтобы проверить механизм вызываемого 29-мером восстановления сухожилия, оценивают иммуноокрашивание CD146 TSPC, локализованных в поврежденном сухожилии, через 1 неделю после ранения. Результаты показывают, что многочисленные CD146⁺ TSPC обнаруживаются в выздоравливающем участке сухожилий, обработанных смесью 29-мер/альгинат-гель, в то время как в сухожилиях, обработанных смесью носитель/альгинат-гель, имеется меньше CD146⁺ TSPC (фигура 5; 86,8±6,0 клеток против 38,3±7,8 в поле зрения при 200×). Таким образом, активация роста TSPC путем обработки 29-мером поддерживает быстрое заживление раны сухожилия.

[00040] Затем авторы проверили распределение CD146⁺ TSPC в поврежденных сухожилиях, обработанных вариантами 29-мера в течение 1 недели. Поврежденное сухожилие, обработанное альгинат-гелем, содержащим вариант T100A или H105A, показывает значительный рост CD146⁺ TSPC (85,0±8,4 и 88,5±7,8 клеток в поле зрения при 200×), схожий с обработкой смесью 29-мер/альгинат. Примечательно, что иммуноокрашивание CD146 показывает, что обработка с S93A, A96G, Q98A, I103A, I104A и R106A не оказывает действие на возрастание CD146-положительных TSPC в поврежденном сухожилии (40,5~49,5 клеток в поле зрения при 200×). Исследование на животных также подтверждает, что эти критичные остатки играют ключевую роль для сохранения биологической активности 29-меров.

[00041] Вместе взятые, данные сканирования аланина показывают, что на терапевтическое действие 29-мера влияет аминокислотная замена, как показано на крысиной модели разрыва ахиллова сухожилия. Кроме того, остатки в 29-мере в позициях S93, A96, Q98, I103, I104 и R106 являются важными для действия 29-мера на восстановление сухожилия. 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 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

[00042] Воплощения изобретения иллюстрируются ограниченным числом примеров. Специалисту в данной области техники будет понятно, что возможны вариации и модификации без отступления от объема изобретения. Следовательно, объем изобретения должен ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения при лечении повреждения сухожилия, 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 SLGAEQRTEPIHRALYYDLISSPDINGT (SEQ ID NO: 1).

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

6. Способ лечения повреждения сухожилия, включающий 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.

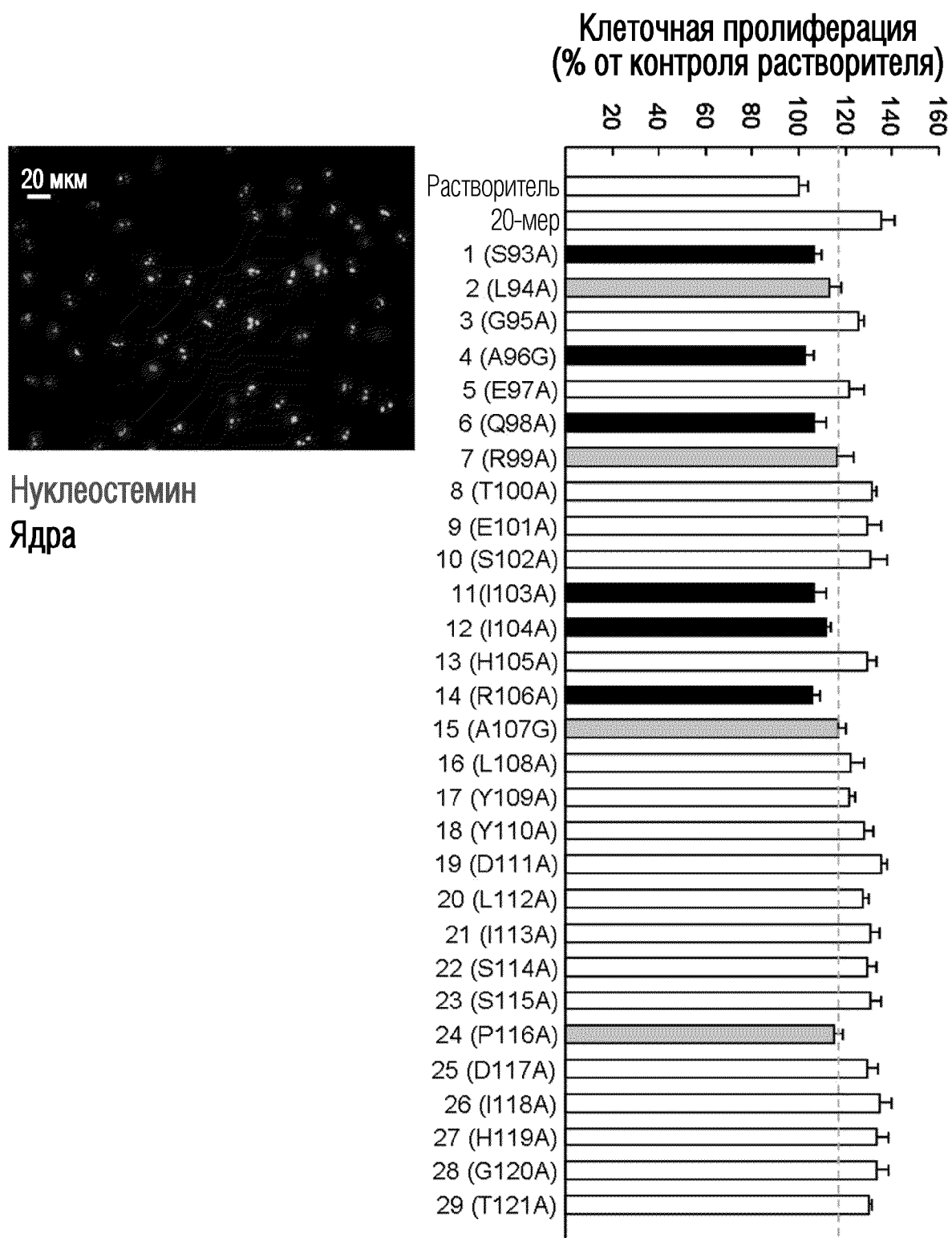
7. Способ по п.6, причем PDSP включает последовательность S-X-X-A-X-Q/H-X-X-X-X-I/V-I-X-R (SEQ ID NO: 5).

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

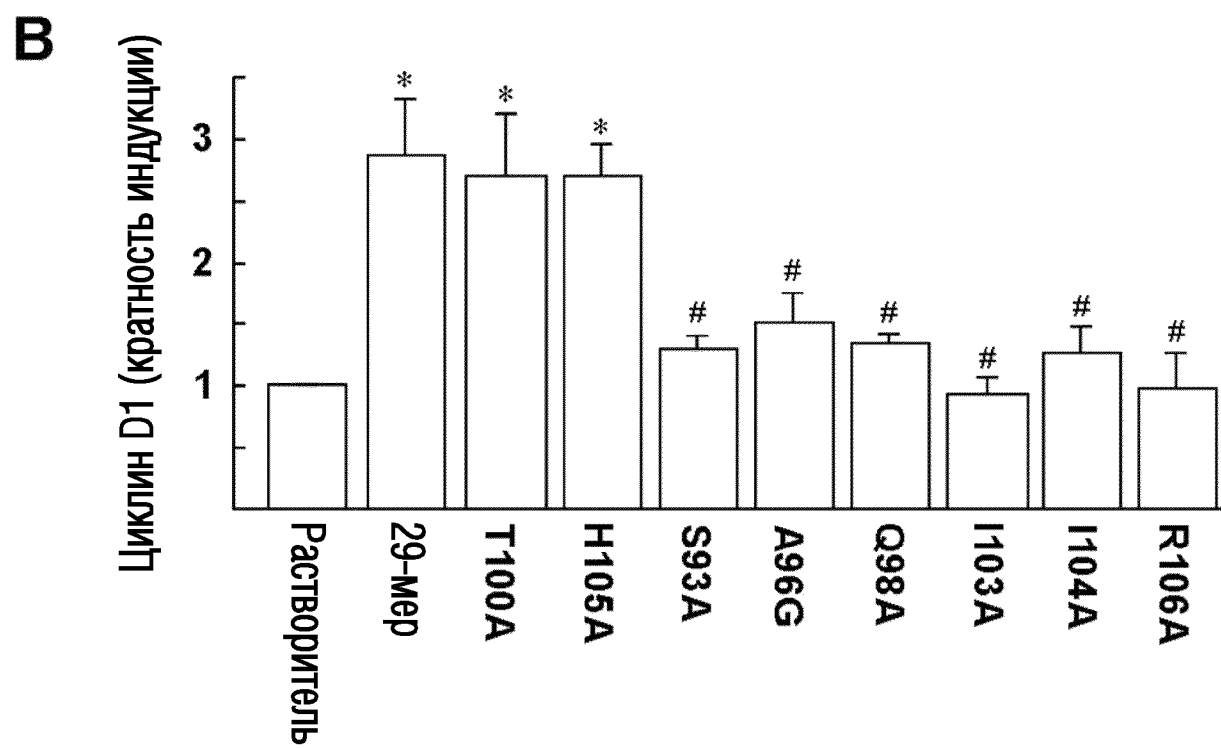
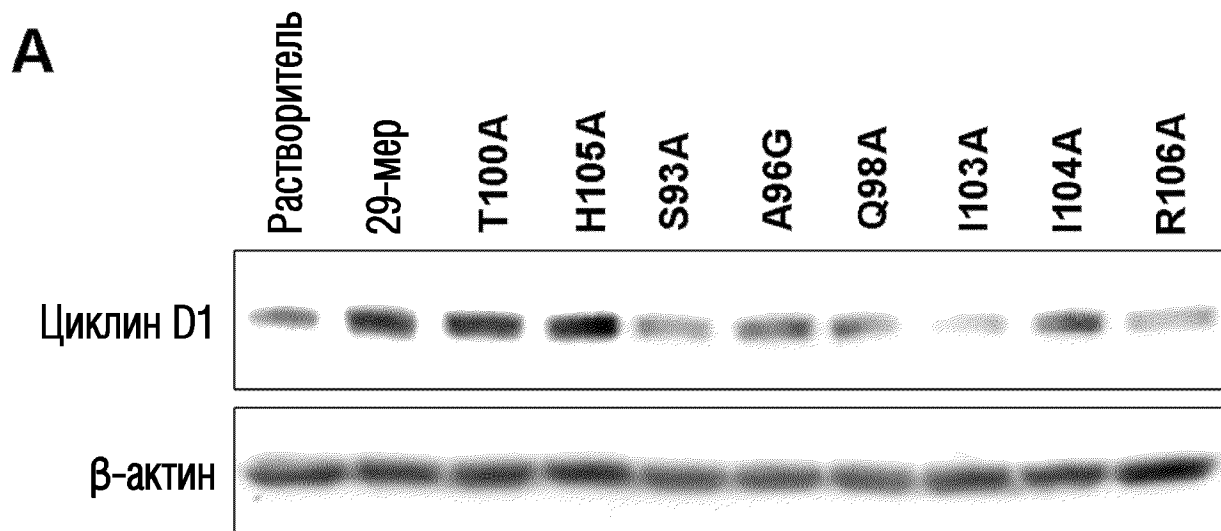
9. Способ по п.6, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHRALYYDLISSPDINGT (SEQ ID NO: 1).

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

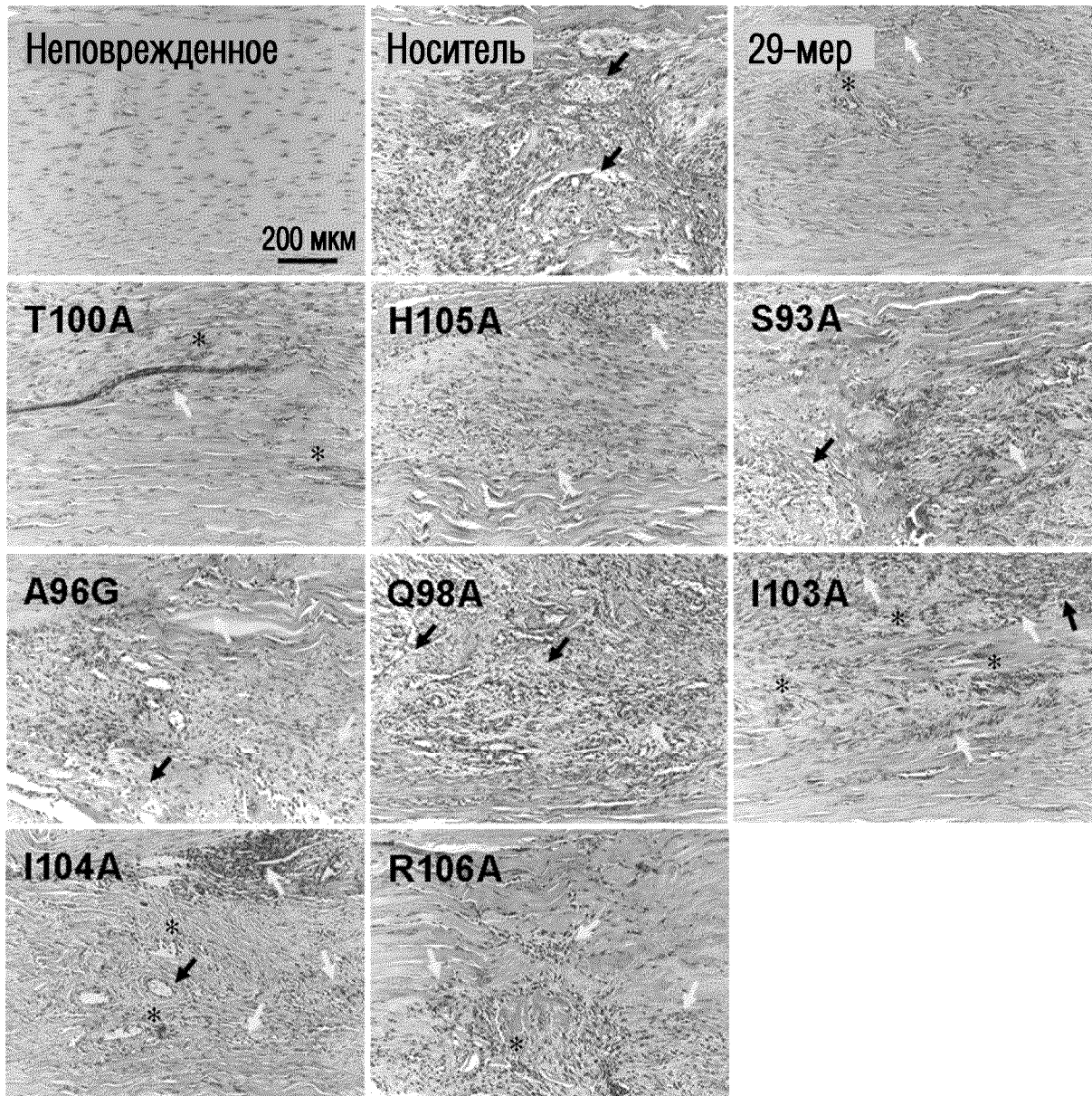
По доверенности



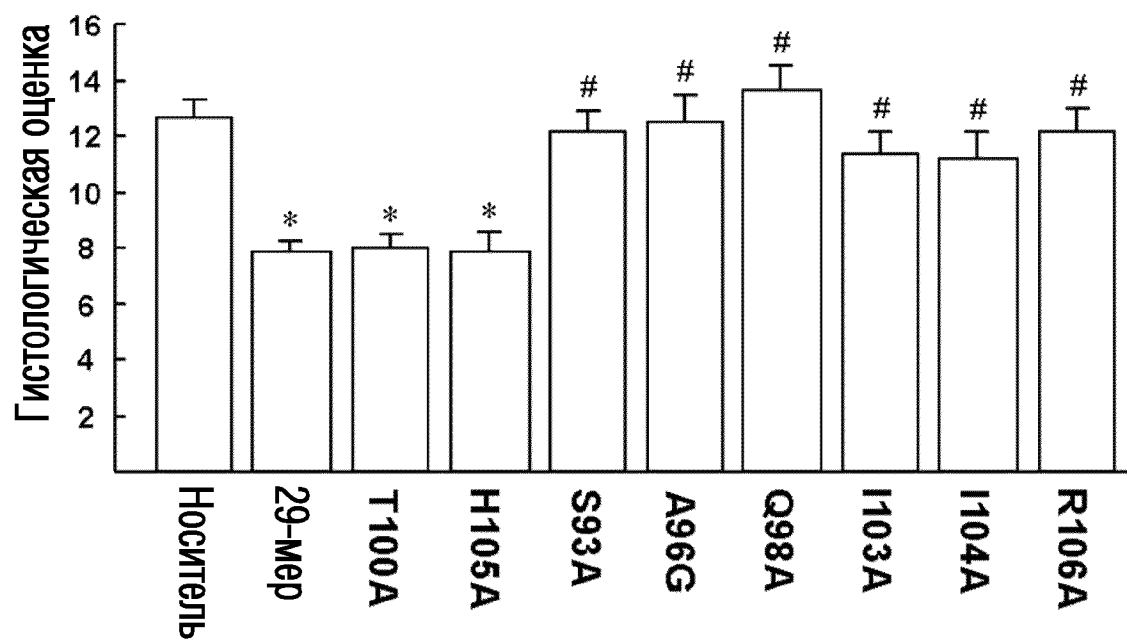
ФИГ. 1



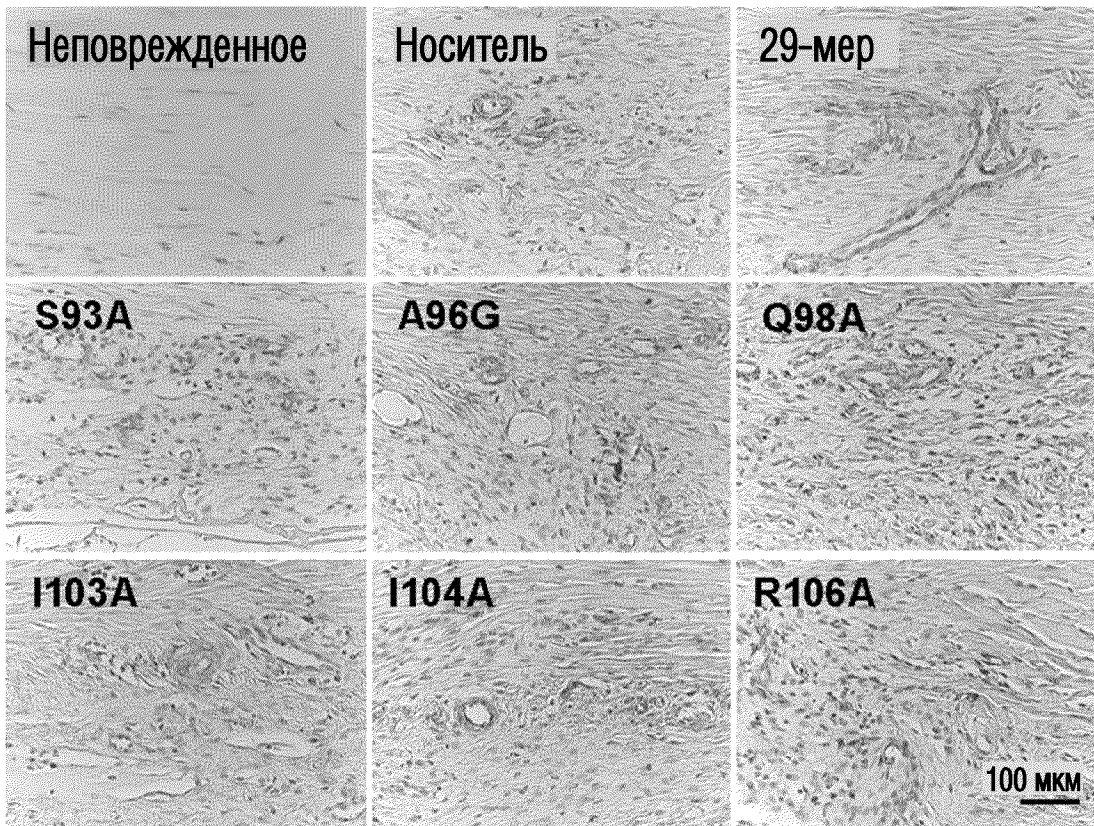
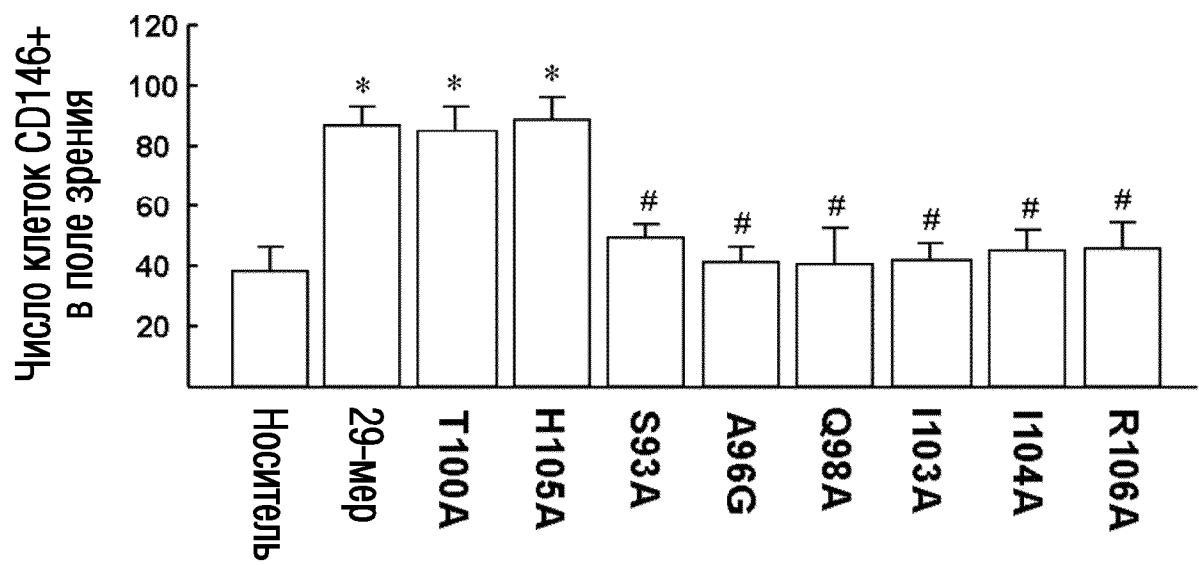
ФИГ. 2



ФИГ. 3

A**B**

ФИГ. 4

A**B**

ФИГ. 5