

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202092646 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.02.11

(22) Дата подачи заявки
2019.05.04

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/06 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)
A61K 38/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/57 (2006.01)

(54) ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ PEDF ПЕПТИДЫ ДЛЯ ПРОМОТИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МЕЙБОМИЕВОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/667,415

(32) 2018.05.04

(33) US

(86) PCT/US2019/030767

(87) WO 2019/213640 2019.11.07

(88) 2020.07.23

(71) Заявитель:

БРИМ БАЙОТЕКНОЛОДЖИ, ИНК.
(TW)

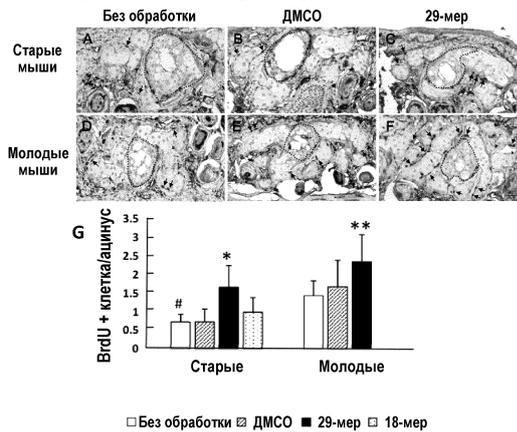
(72) Изобретатель:

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

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Описывается фармацевтическая композиция или способ для промотирования регенерации мейбомиевой железы или для лечения/предупреждения синдрома сухого глаза, причем способ 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 эпителий-производного фактора (PEDF).



A1

202092646

202092646

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-565599ЕА/23

ПРОИСХОДЯЩИЕ ИЗ PEDF ПЕПТИДЫ ДЛЯ ПРОМОТИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ МЕЙБОМИЕВОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[001] Настоящее изобретение относится к происходящим из PEDF пептидам и их применениям при регенерации мейбомиевой железы или лечении сухости глаз.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[002] Дисфункция мейбомиевой железы (MGD) характеризуется пониженным количеством и/или качественными изменениями секретов мейбомиевой железы, нестабильностью липидного слоя слезной пленки и симптомами раздражения глаз¹⁻³. Так как на долю MGD приходится целых две трети всех случаев болезни сухих глаз (DED), ее считают растущей общественной проблемой, особенно среди пожилых людей^{1,2}. Однако в настоящее время клинические методы лечения MGD, включая местное лечение, экспрессию мейбомиевой железы (MG), липифлоу и интенсивное импульсное световое (IPL) лечение, в основном являются паллиативными, так как они часто направлены в первую очередь на симптоматическое облегчение DED, предотвращая дальнейшую атрофию MG, а не непосредственно на устранение патологий, лежащих в основе MGD^{1,2,4}.

[003] Существуют три формы MGD: гиперсекреторная MGD, гипосекреторная MGD и обструктивная MGD⁵. Обструктивная MGD считается наиболее распространенной, и, как полагают, вовлекается в гиперкератинизацию отверстия протока, вызывая обструкцию протока и дальнейшую ацинарную атрофию^{3,5}. Однако полученные данные о переднем смещении слизисто-кожной каймы у пациентов с MGD и некератинизированных эпителиальных клетках протока в отверстии мышины MG не подтверждают общепринятой теории гиперкератинизации как первичного механизма для MGD^{5,6}. В случае связанной с возрастом MGD наблюдают атрофию железы с уменьшенной клеточной пролиферацией как в человеческих, так и в мышинных мейбомиевых железах^{7,8}. Ацинарная атрофия тканей может являться первичной этиологией, которая приводит к дисбалансу между липидными и протоковыми клетками или изменению соотношения липиды/белок, способствующему образованию пробок в отверстии^{5,9}.

[004] Хотя дисфункция мейбомиевой железы (MGD) поражает многих пациентов, современные методы лечения являются в основном паллиативными. Поэтому существует необходимость в более эффективных методах лечения в случае MGD.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[005] Воплощения изобретения относятся к способам промотирования регенерации мейбомиевой железы и лечения сухости глаз с использованием коротких пептидов, происходящих из пигментного эпителий-производного фактора (PEDF).

[006] Один аспект изобретения относится к способам промотирования регенерации мейбомиевой железы. Способ согласно одному воплощению изобретения 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 эпителий-производного фактора (PEDF).

[007] Один аспект изобретения относится к способам лечения синдромов сухого глаза. Способ согласно одному воплощению изобретения 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 эпителий-производного фактора (PEDF).

[008] Другие аспекты изобретения станут очевидны из следующего далее подробного описания и прилагаемой формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[009] **Фигура 1** показывает атрофию MG и нестабильность слезной пленки у мышей в возрасте. Панель (A) показывает верхние и нижние глазные веки, взятые у молодых и старых мышей, окрашенные масляным красным O (ORO). Мейбум (красный) виден в главном протоке (стрелки) и ацинусах (острия стрелок). Представленные изображения являются изображениями из 7 глазных век старых мышей и 6 век молодых мышей. Панель (B) показывает классификацию атрофии мейбомиевой железы, вычисленную и преобразованную в оценки MG на основании процентов площадей атрофии. Панель (C) показывает криосрезы верхних глазных век старых и молодых мышей, окрашенные ORO. Панель (D) показывает время разрушения слезной пленки, оцененное для 16 глаз 8 молодых мышей и 12 глаз 6 старых мышей. Данные приводятся как среднее±SE. *P<0,05 против молодых мышей. **P<0,001 против молодых мышей.

[0010] **Фигура 2** показывает экспрессию PEDF в верхних глазных веках молодых и старых мышей. Представленные PEDF-окрашенные поперечные срезы показывают ацинусы молодых мышей (A) и старых мышей (B). Иммуноокрашивание одним вторым антителом служит в качестве отрицательного контроля (C). Рамки на изображениях с небольшим увеличением (верхняя панель) показывают локацию изображений с большим увеличением (нижние панели), которые показывают, что PEDF экспрессируется главным образом в ядрах клеток-предшественников (черные стрелки; (D) и (E)). Экспрессия PEDF визуализируется в целых ацинусах и сильнее в цитоплазме в ацинарной основе. (F) Гистопатологические оценки PEDF вычисляют на основании интенсивности окрашивания, интенсивности цитоплазмы в ацинарном основании и процента ядер PEDF-положительных клеток. Для анализа берут 3 рандомизированных изображения каждого глазного века. Представленные изображения являются изображениями из 6 глазных век 6 различных мышей в каждой группе (заявленное увеличение ×400). *P<0,05 против молодой группы. Масштаб 50 мкм.

[0011] **Фигура 3** показывает, что 29-мер промотирует пролиферацию ацинарных клеток-предшественников у мышей в возрасте. Для того, чтобы обнаружить синтез ДНК, сразу после обработки 29-мером инъецируют интраперитонеально BrdU, и глазные веки собирают через 24 часа. В нормальных состояниях (без какой-либо обработки) старые

мышь (А) показывают меньше BrdU-положительных клеток, чем молодые мышь (D). 29-Мер увеличивает число BrdU-положительных клеток в ацинарном основании у старых мышей (С) и молодых мышей (F), в то время как ДМСО (F) не имеет такого действия (В и Е). Красные пунктирные кружочки показывают центральные протоки. Черные стрелки показывают BrdU-положительные клетки. (G) Действие обработки PEDF вычисляют, основываясь на BrdU-положительных клетках в ацинарном основании. Для анализа берут три рандомизированных изображения каждого глазного века. Представленные изображения являются изображениями из 6 глазных век 6 различных мышей в каждой группе (заявленное увеличение $\times 400$). Представленные изображения являются изображениями из 3 глазных век 3 различных мышей в каждой группе (заявленное увеличение $\times 400$). $\#P < 0,05$ против молодых мышей в нормальном состоянии, $*P < 0,05$ против старых мышей, обработанных ДМСО или 18-мером. $**P < 0,05$ против молодых мышей в нормальном состоянии или молодых мышей, обработанных носителем ДМСО. Масштаб 50 мкм.

[0012] Фигура 4 показывает пролиферацию клеток в верхних веках через 5 дней после обработки. После однократной субконъюнктивальной инъекции инъецируют интраперитонеально BrdU в день 0 и день 3. Затем глазные веки собирают в день 5. (А) и (С) показывают контроль с обработкой ДМСО для старых и молодых мышей, соответственно. (С) и (D) показывают обработку PDSP старых и молодых мышей, соответственно. BrdU-положительными клетками являются главным образом ацинарные клетки-предшественники (черные стрелки), и немного мейбоцитов положительны в случае окрашивания BrdU (D, красная стрелка). Действие обработки PEDF вычисляют, основываясь на BrdU-положительных клетках в ацинарном основании. Для анализа берут три рандомизированных изображения каждого глазного века. Представленные изображения являются изображениями из 3 глазных век 3 различных мышей в каждой группе (заявленное увеличение $\times 400$). $*P < 0,001$ против старых мышей, обработанных ДМСО. Масштаб 50 мкм.

[0013] Фигура 5 показывает иммуногистохимический анализ экспрессии маркера стволовых клеток р63 в верхних глазных веках через 5 дней после одной обработки. (А) и (В) показывают исходную экспрессию р63 у старых и молодых мышей, соответственно. (С) и (D) показывают обработку ДМСО и PDSP старых мышей, соответственно. Красные пунктирные кружочки показывают центральные протоки. (Е) Оценивают число р63-положительных клеток на ацинус. Представленные изображения являются изображениями из 3 глазных век 3 различных мышей в каждой группе (заявленное увеличение $\times 400$). Для анализа берут три рандомизированных изображения каждого глазного века. $*P < 0,001$ против молодых мышей, $**P < 0,001$ против старых мышей, обработанных ДМСО. Масштаб 50 мкм.

[0014] Фигура 6 показывает, что 29-мер повышает стабильность слезной пленки у стареющих мышей. Время разрушения слезной пленки (TBUT) (А) и объем секреции слезы (В) приводятся для недель 1, 2, 3, 4 и 8 после инъекции 29-мера. Объемы выражены

как среднее \pm SE. Приводятся данные для 6 глазных век 6 различных мышей в каждой группе. Регистрируют три измерения времени разрушения слезной пленки для каждого глазного века. *P<0,05 против группы носителя в один и тот же момент времени.

[0015] **Фигура 7** показывает, что 29-мер повышает размер ацинуса у старых мышей. (A) Слева: окрашивание ORO тотального препарата верхних глазных век. Справа: площадь MG анализируют с использованием инструмента для вычисления площади Adobe Photoshop 7.0. (B) показывает гистограмму размера MG верхних глазных век, измеренного Photoshop, представленную в пикселях. Криосрезы верхних глазных век окрашены ORO. Гистограмма размера ацинуса, измеренного Photoshop 7.0, представлена в пикселях. Представленные изображения полных срезов являются изображениями из 7 глазных век 7 различных мышей в каждой группе. Представленные изображения криосрезов являются изображениями из 3 глазных век 3 различных мышей в каждой группе. *P<0,05 против группы носителя.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0016] Воплощения изобретения относятся к способам промотирования регенерации мейбомиевой железы с использованием происходящих из PEDF коротких пептидов (PDSP). Мейбомиевы железы являются железами голокринового типа. Мейбомиевы железы локализованы на краю глазных век в хрящевых частях века и ответственны за снабжение мейбомом, маслянистым веществом, которое предотвращает испарение слезных пленок глаз. Дисфункция мейбомиевых желез (MGD) является наиболее обычной причиной синдрома сухого глаза (или болезни сухих глаз). MGD может привести к воспалению век, называемому блефаритом, особенно краев.

[0017] При нормальном гомеостазе MG мейбоциты в ацинусах MG непрерывно дифференцируют из стволовых клеток в слое базальных клеток на периферии ацинуса⁴. Здесь впервые авторы изобретения обнаружили, что белок PEDF экспрессируется главным образом в ядрах ацинарных базальных клеток (клеток-предшественников) и цитоплазме ацинарного основания. С возрастными изменениями экспрессия белка PEDF значительно снижается.

[0018] Человеческий пигментный эпителий-производный фактор (PEDF) представляет собой секретированный гликопротеин, содержащий 418 аминокислот, с молекулярной массой примерно 50 кДа. PEDF является многофункциональным белком, который впервые идентифицирован и выделен из кондиционированной среды культуры клеток пигментного эпителия сетчатки плода человека¹¹⁻¹². PEDF широко экспрессируется в печени, жировой ткани, глазу, сердце, поджелудочной железе, и играет фундаментальную роль в органогенезе и гомеостатическом поддержании зрелой ткани¹²⁻¹⁴.

[0019] Различные мотивы PEDF проявляют различную биологическую активность. Например, 44-мерный мотив (аминокислоты в позициях Val⁷⁸-Thr¹²¹) определяет нейротрофическую активность PEDFHYPHERLINK \l "_ENREF_12" \o "Sagheer, 2015 #40" 12, HYPHERLINK \l "_ENREF_15" \o "Ho, 2015 #38" 15. С другой стороны, 34-мерный

фрагмент (остатки 44-77 PEDF) идентифицирован как имеющий антиангиогенную активность. Авторы изобретения обнаружили, что 44-мер (Val⁷⁸-Thr¹²¹) может индуцировать пролиферацию стволовых клеток и регенерацию в лимбе кролика ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 16-18. Кроме того, обнаружено, что более короткий пептид 29-мер (остатки Ser⁹³-Thr¹²¹) индуцирует пролиферацию миогенных стволовых клеток и C₂C₁₂ миобластов ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 15. Настоящее изобретение основано на открытии, что экспрессия белка PEDF в аднусах MG снижается с возрастом.

[0020] Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что некоторые происходящие из PEDF короткие пептиды (PDSP) могут повышать пролиферацию ацинарных клеток-предшественников, а также размер ацинуса и стабильность слезной пленки *in vivo*. Эти PDSP могут промотировать регенерацию мейбомиевых желез и могут использоваться для лечения или предупреждения болезней сухих глаз.

[0021] PDSP по изобретению основаны на участке пептида, соответствующем остаткам человеческого PEDF 93-121 (⁹³SLGAEQRTEIHRALYYDLISSPDINGT¹²¹; SEQ ID NO:1). На основе этого 29-мера авторы изобретения определили, что серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 являются критическими для активности, о чем свидетельствует существенная потеря активности, когда эти остатки заменяют по отдельности на аланин (или глицин в случае аланина-96). Напротив, замена аланином (или глицином) других остатков в 29-мере не производит ощутимого изменения активности, что предполагает, что варианты PDSP, имеющие аминокислотные замены (в частности, гомологичные аминокислотные замены) этих других остатков (т.е., остатков 94, 95, 97, 99-102, 105 и 107-121), также можно использовать для предупреждения и/или лечения остеоартрита или для индукции хондрогенеза.

[0022] Эти результаты показывают, что коровий пептид, содержащий антиноцицептивное действие, 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 присоединение 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, PDSP пептид 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 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 то-29-мер

(SLGAEHRTESVIHRALYDDLITNPDIHST, SEQ ID NO: 3) и mo-14-мер (SLGAEHRTESVIHR, 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). 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
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	5
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	6
$^1\text{S}^2\text{A}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	7
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	8
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{A}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	9
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	10
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{A}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	11
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{R}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	12
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{A}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	13
$^1\text{S}^2\text{A}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{T}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	14
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{A}^9\text{E}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	15
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{A}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{A}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	16
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{S}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	17
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{A}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{A}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	18
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{H}^{14}\text{R}$	19
$^1\text{S}^2\text{X}^3\text{X}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{A}^{14}\text{R}$	20
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	21
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	22
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{A}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	23
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{R}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	24
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{A}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	25
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{T}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	26
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{A}^9\text{E}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	27
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{A}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	28
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{S}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	29
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{A}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	30
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{S}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{H}^{14}\text{R}$	31
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{X}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{A}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{A}^{14}\text{R}$	32
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	33
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{R}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	34
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{A}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	35
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{T}^9\text{X}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	36
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{A}^9\text{E}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	37
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{A}^{10}\text{X}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	38
$^1\text{S}^2\text{L}^3\text{G}^4\text{A}^5\text{E}^6\text{Q/H}^7\text{X}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{S}^{11}\text{I/V}^{12}\text{I}^{13}\text{X}^{14}\text{R}$	39

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

[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 лечения и/или предупреждения 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] Производные PEDF по изобретению, например PDSP 29-мер длиной в 29 аминокислот, стимулируют пролиферацию ацинарных клеток-предшественников, а также липогенез, о чем свидетельствует большее число рб3-положительных базальных клеток, большее окрашивание масляным красным O (ORO) в тотальных препаратах образцов и криосрезов от обработанных PDSP старых мышей по сравнению с мышами, обработанными пустышкой. Также 29-мер улучшает стабильность слезной пленки у старых мышей.

[0026] Результаты, описанные в настоящем изобретении, показывают, что PEDF сильнее экспрессируется в ацинарных недифференцированных клетках-предшественниках, чем в дифференцированных мейбоцитах. Экспрессия белка PEDF в MG снижается у старых мышей вместе с сокращением клеточного цикла и снижением мечения рб3 ацинарных клеток-предшественников. Другие результаты показывают, что с возрастом уровни экспрессии PEDF снижаются в комплексе хороид/RPE и коже. Снижение количества белков PEDF в различных тканях при нормальном процессе старения может быть критичным для связанных с возрастом заболеваний.

[0027] Результаты исследований также показывают, что прямые инъекции PDSP (например, 29-мера) молодым и старым мышам приводят к пролиферации базальных ацинарных клеток за 24 часа. В день 5 старые мыши показывают существенное отличие клеточной пролиферации при инъекциях 29-мера и ДМСО, а молодые мыши этого не показывают. У молодых мышей присущий им уровень PEDF выше, чем у старых мышей, и добавление 29-мера может подтянуть стационарную концентрацию PEDF и занятость рецепторов. Поэтому существенное повышение у молодых мышей не обнаруживается.

[0028] Мейбомиева железа представляет собой модифицированную салную железу с дифференцировкой по голокриновому типу. Дифференцировка себоцитов тесно связана с усиленным синтезом и накоплением липидов в клетках. Исследование авторов изобретения показывает, что PDSP не только проявляет промотирующее действие на ацинарные клетки-предшественники, но также усиливают ацинарную дифференцировку. Путь передачи сигнала при PEDF-опосредуемом липогенезе возможно включает передачу сигнала PPAR γ . Таким образом, PEDF может промотировать ацинарную дифференцировку через регулирование PPAR γ .

[0029] Показано, что MGD ассоциируется с провоспалительными цитокинами IL-1 α и зрелым IL-1 β на поверхности глаза ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 37. PEDF известен из-за своей противовоспалительной активности ADDIN EN.CITE <EndNote><Cite><Author>Sagheer</Author><Year>2015</Year><RecNum>40</RecNum><DisplayText><style face="superscript">12</style></DisplayText><record><rec-number>40</rec-number><foreign-keys><key app="EN" db-id="rt9sz5rxodrs5veazd9vrsf1pz5rfprxwedw">40</key></foreign-keys><ref-type name="Journal Article">17</ref-type><contributors><authors><author>Sagheer, U.</author><author>Gong, J.</author><author>Chung,

C. </author></authors></contributors><auth-address>Department of Medicine, Yale University School of Medicine, New Haven, CT 06510, USA; VA CT Healthcare System, West Haven, CT 06516, USA.</auth-address><titles><title>Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) is a Determinant of Stem Cell Fate: Lessons from an Ultra-Rare Disease</title><secondary-title>J Dev Biol</secondary-title><alt-title>Journal of developmental biology</alt-title></titles><periodical><full-title>J Dev Biol</full-title><abbr-1>Journal of developmental biology</abbr-1></periodical><alt-periodical><full-title>J Dev Biol</full-title><abbr-1>Journal of developmental biology</abbr-1></alt-periodical><pages>112-128</pages><volume>3</volume><number>4</number><dates><year>2015</year><pub-dates><date>Dec</date></pub-dates></dates><isbn>2221-3759 (Print)2221-3759 (Linking)</isbn><accession-num>27239449</accession-num><urls><related-urls><url>http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27239449</url></related-urls></urls><custom2>4883593</custom2><electronic-resource-num>10.3390/jdb3040112</electronic-resource-num></record></Cite></EndNote>12.

Показано, что PEDF блокирует IL-1 β путем подавления активации медиатора воспаления c-Jun N-киназы в гепатоцитах человека ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 40. Таким образом, PEDF может улучшать симптомы у пациентов с MGD через снижение концентрации белков фазы воспаления на поверхности глаза. Результаты, представленные в настоящем описании, показывают, что 29-мер не оказывает действия на секрецию слезы, но может увеличить продукцию липидов и повысить стабильность слезной пленки, о чем свидетельствует возросшее TBUT.

[0030] В общем, результаты, приведенные в настоящем описании, показывают, что происходящий из PEDF пептид может промотировать пролиферацию ацинарных клеток-предшественников. Прямая стимуляция пролиферации ацинарных клеток-предшественников и улучшенные липогенез и стабильность слезной пленки *in vivo* указывают на происходящий из PEDF пептид как на возможное лекарство в случае MGD.

[0031] Воплощения изобретения будут поясняться следующими далее конкретными примерами. В конкретных примерах используется 29-мер (SEQ ID NO:1). Однако для достижения таких же результатов также 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.

Химикаты и антитела

[0032] Антитела, используемые в настоящем исследовании, представляют собой анти-PEDF антитела (sc-25594, Santa Cruz Biotechnology, CA), BrdU (GTX42641, GeneTex, San Antonio, TX) и p63 (mab4135, Millipore, Billerica, MA). 29-Мер (Ser⁹³-Thr¹²¹) и 18-мер (Glu⁹⁷-Ser¹¹⁴; контрольный пептид) синтезируют, модифицируют ацетилированием по NH₂-концам и амидированием по COOH-концам для устойчивости и характеризуют масс-спектрометрией (чистота >90%) в GenScript (Piscataway, NJ).

Животные и обработка

[0033] Используют мышей C57BL/6 в возрасте двенадцати-пятнадцати (12-15) месяцев и мышей C57BL/6 в возрасте 4-8-месяцев. Этим мышам содержат в стандартной беспатогенной среде при $24^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, относительная влажность $60\%\pm 10\%$. Все процедуры одобрены Наблюдательным Советом больницы Мемориала Маккея (New Taipei City, Taiwan, R.O.C.) по исследованиям на животных и выполняются в соответствии с декларацией об использовании животных в офтальмологических исследованиях и исследованиях зрения. Мышам дают наркоз интраперитонеальной инъекцией смеси золетила (6 мг/кг) и ксилазина (3 мг/кг). Перед любой глазной процедурой дают одну каплю 0,5% гидрохлорида пропаракана (Alcaine; Alcon, Fort Worth, TX, USA).

[0034] Восстанавливают 29-мер в ДМСО до конечной концентрации 100 мкМ. Отдельную дозу 10 мкл 29-мера (100 мкМ), смешанного с 90 мкл забуференного фосфатом физиологического раствора (PBS), инъецируют в верхний и нижний конъюнктивальный свод. В качестве контроля служат 10 мкл ДМСО, смешанные с 90 мкл PBS. Для оценки действия 29-мера на время разрушения слезной пленки (TBUT) и секрецию слезы у старых мышей субконъюнктивальную инъекцию 29-мера вводят еженедельно один месяц и затем продолжают в течение двух месяцев.

[0035] Через один месяц выполняют окрашивание масляным красным O (ORO) тотального препарата верхних глазных век. Размер ткани MG в тотальном препарате определяют количественно с использованием выбора цветового диапазона и инструмента гистограммы с помощью компьютерного анализатора изображений (Adobe Photoshop 7.0) и вычисляют в пикселях.

Время разрушения слезной пленки

[0036] Для того, чтобы избежать пониженной секреции липидов в результате немигания глаз при длительном наркозе, определение времени разрушения слезной пленки (TBUT)^{19,20} выполняют сразу же после дачи наркоза мышам. Капают на поверхность глаза 1,5 мкл 0,1% местнодействующего флуоресцеина (Fluor-I-Strip; Ayerst Laboratories, Philadelphia, PA, USA). После трех принудительных миганий регистрируют TBUT в миллисекундах под щелевой лампой с барьерным фильтром без синего цвета. Берут три измерения для каждого глаза. TBUT в аналогичное время суток (2-3 часа дня) в стандартной окружающей среде снимает один офтальмолог вслепую относительно групп обработки.

Тотальный препарат глазного века

[0037] После удаления волосков собирают свежие мышинные веки и сразу же фиксируют 4% параформальдегидом в течение ночи и промывают PBS⁴. Получают раствор масляного красного O (ORO), перемешивая исходный раствор (300 мг порошка ORO в 100 мл 99% изопропанола), и фильтруют его. Глазные веки помещают в 60% 2-пропанол на 15 минут, окрашивают раствором ORO в течение 30 минут и затем обесцвечивают 60% 2-пропанолом в течение 15-20 минут для того, чтобы достичь оптимального окрашивания липидов. ADDIN EN.CITE ADDIN EN.CITE.DATA 4. Затем глазные веки заделывают и фотографируют с использованием микроскопа.

Мейбошкала (meiboscale)

[0038] MG молодых и старых мышей классифицируют согласно мейбошкале для мейбографии изображений²¹. Коротко, атрофию MG отмечают оценкой 0, когда потери площади нет, оценкой 1, когда площадь потери составляет <25%, оценкой 2, когда площадь потери составляет 25%-50%, оценкой 3, когда площадь потери составляет 51%-75%, и оценкой 4, когда площадь потери составляет 75%. Оценки MG, которые проанализированы, следующие: оценка 0, 5; оценка 1, 4; оценка 2, 3; оценка 3, 2; оценка 4, 1.

Масляный красный O для липидов

[0039] Ткани глазных век заделывают в OCT, и делают срезы толщиной 8 мкм. Замороженные срезы помещают в 60% 2-пропанол на 1 минуту, окрашивают фильтрованным раствором ORO в течение 15 минут, промывают PBS и контрокрашивают гематоксилином⁴.

Анализ внедрения 5-бром-2'-дезоксинуридина

[0040] После субконъюнктивальной инъекции 29-мера или ДМСО инъецируют интраперитонеально 5-бром-2'-дезоксинуридин (BrdU), 0,1 мг/г массы тела. Через 24 часа собирают верхние веки для оценки пролиферации ацинарных клеток-предшественников. Для исследования митоза клеток мышам вводят ежедневно в течение 3 дней BrdU интраперитонеальными инъекциями, и собирают верхние веки в день 5. Перед выполнением иммуногистохимического анализа BrdU слайды обрабатывают 1 N HCL при 95°C в течение 20 минут.

Измерение объема слезы

[0041] Количество слез измеряют с помощью теста с использованием нити, пропитанной феноловым красным, с хлопковыми нитями ZONE-QUICK (Yokota, Tokyo, Japan)^{19,20}. После общего наркоза нижнее веко слегка оттягивают, и часть нити в 1 мм помещают на конъюнктиву века в точке на 1/3 расстояния от латерального угла глазной щели. Каждый глаз проверяют при открытых глазах в течение 1 минуты. Измеряют красную часть нити в миллиметрах.

Иммуногистохимия

[0042] Иммуногистохимию (ИНС) выполняют с модификацией как описано ранее²². Фиксированные в формалине залитые парафином мышинные образцы депарафинируют в ксилоле и регидратируют в присутствии этанола в ступенчато изменяющихся концентрациях. Слайды блокируют 10% козьей сывороткой в течение 60 минут и затем инкубируют с первичным антителом против BrdU (разведение 1:800), PEDF (1:50) или рб3 (1:200) в течение ночи при 4°C. Затем слайды инкубируют с меченым соответствующей пероксидазой козьим иммуноглобулином (разведение 1:500; Chemicon, Temecula, CA) в течение 20 минут, и затем инкубируют с хромогенным субстратом (3,3'-диаминобензидин) в течение 2 минут перед контрокрашиванием гематоксилином. Количество оценивают на основании высококачественных изображений, полученных с использованием слайд-сканеров Panoramic digital (3Dhistech Ltd. Budapest, Венгрия).

Оценка PEDF по окрашиванию

[0043] Экспрессию PEDF оценивают следующим образом: (A) слабое окрашивание всех ацинусов - 0; сильное окрашивание всех ацинусов - 1; (B) нет тенденции к более сильному окрашиванию в базальной цитоплазме, чем в других участках тех же самых ацинусов - 1; умеренное окрашивание базальной ацинарной цитоплазмы и более сильное, чем в других участках - 2; сильное окрашивание базальной ацинарной цитоплазмы и более сильное, чем в других участках - 3; (C) нет экспрессии в ядрах базальных клеток - 0; <50% ядер базальных клеток окрашено положительно для PEDF - 2. Оценки суммируют (A)+(B)+(C), и общие оценки могут колебаться от 0 до 6.

Статистический анализ

[0044] Результаты представляют в виде $\text{среднее} \pm \text{SD}$. Для статистического анализа используют SPSS, версия 18.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Тест Манна-Уитни используют для статистического сравнения. Значение $P < 0,05$ считается статистически значимым.

Атрофия MD у старых мышей

[0045] У старых мышей при окрашивании ORO тотального препарата в MG обнаруживают уменьшение размеров ацинусов (фиг.1A). Оценки MG в верхних глазных веках молодых и старых мышей составляют $4 \pm 0,82$, $2,5 \pm 0,63$ ($P = 0,015$), соответственно. Оценки MG в нижних глазных веках молодых и старых мышей составляют $2,5 \pm 0,84$, $1,8 \pm 0,84$ ($P = 0,006$), соответственно (фиг.1B). Данные для поперечных срезов глазных век, окрашенных ORO, коррелируют с морфологическим изменением, обнаруженным в тотальных препаратах (фиг.1C). У старых мышей уменьшение размера ацинуса вблизи центрального протока видно в криосрезах, окрашенных ORO. Время разрушения слезной пленки (TBUT) у старых мышей составляет $317,36 \pm 119,76$, которое значительно короче, чем $389,04 \pm 49,18$ у молодых мышей ($P < 0,001$) (фиг.1D). Эти результаты показывают, что старые мыши имеют значительную атрофию MG и нестабильность слезной пленки.

Уменьшение экспрессии белка PEDF в ацинусах MG у старых мышей

[0046] Для того, чтобы наблюдать распределение белка PEDF во всем ацинусе, исследуют поперечные срезы⁴ ацинусов верхних век с помощью ИНС. Результаты показывают, что PEDF экспрессируется в ядрах клеток-предшественников или раннедифференцированных мейбоцитах вблизи клеток-предшественников (фиг.2, A, B, D и F). Кроме того, интенсивность экспрессии PEDF больше в цитоплазме в основании ацинуса, чем в проксимальном конце вблизи протоковой ткани (фиг.2D). Тенденция к более высокой экспрессии белка PEDF в ацинарной базальной цитоплазме менее заметна у старых мышей (фиг.2E). У старых мышей интенсивность экспрессии PEDF в ткани ацинуса, включая ядра клеток-предшественников, существенно снижена по сравнению с молодыми мышами. Общие оценки экспрессии белка PEDF, показанные на фиг.2F, у старых мышей ниже по сравнению с молодыми мышами ($3,17 \pm 0,83$ против $4,72 \pm 1,04$, $P < 0,001$).

Белок PEDF промотирует пролиферацию ацинарных клеток-предшественников

[0047] У стареющих мышей обнаружено уменьшение числа клеток, проходящих цикл развития ацинуса MG⁷. Для того, чтобы оценить промитотическое действие PDSP на ацинарный размер MG, мышам интраперитонеально инъецируют BrdU, и умервщляют их через 24 часа после обработки. Обнаружено, что через 24 часа BrdU-положительными клетками являются все ацинарные клетки-предшественники, располагающиеся в основании ацинусов. Без какой-либо обработки молодые мыши имеют больше BrdU-положительных клеток на ацинус по сравнению со старыми мышами (фиг.3, А и В, $1,44 \pm 0,40$ против $0,73 \pm 0,21$, $P=0,001$). Скорость пролиферации в группе без обработки схожа со скоростью в группе молодых или старых мышей, обработанных ДМСО (фиг.3, А, В, D и E). Пептид 29-мер способен повысить число пролиферирующих клеток у молодых мышей по сравнению с ДМСО (фиг.3F, $2,35 \pm 0,73$ против $1,68 \pm 0,71$ $P=0,041$). Также происходит возрастание числа BrdU-положительных клеток у обработанных PDSP старых мышей по сравнению с группой, обработанной ДМСО (фиг.3С, $1,67 \pm 0,58$ против $0,74 \pm 0,34$ клеток на ацинус, $P=0,002$). Контрольный пептид 18-мер не показывает действия на пролиферацию у старых мышей (фиг.3G, $1,00 \pm 0,39$, $p=0,156$, по сравнению с ДМСО).

[0048] Для того, чтобы оценить воздействие на гомеостаз MG, мышам интраперитонеально инъецируют BrdU в течение 3 дней и умервщляют в день 5. Анализ с импульсным мечением BrdU показывает непрерывно возрастающую клеточную пролиферацию от 24 часов до дня 5, и обработанные PDSP старые мыши показывают более высокую пролиферацию, чем старые мыши, обработанные ДМСО (фиг.4, А, В и E, $4,29 \pm 1,19$ против $2,24 \pm 0,50$, $P<0,001$). Напротив, между обработанными PDSP и обработанными ДМСО молодыми мышами не имеется различия в клеточной пролиферации в день 5 (фиг.4, С и D, $6,70 \pm 1,35$ против $5,78 \pm 1,84$, $P=0,233$). Как примечание, некоторые мейбоциты являются положительными для окрашивания BrdU в день 5 (фиг.4D). Приведенные выше результаты показывают, что 29-мер, который способствует пролиферации ацинарных клеток-предшественников, полностью блокирует дифференцировку мейбоцитов.

[0049] Авторы изобретения также исследовали число ацинарных клеток-предшественников с использованием в качестве маркера р63⁴. Число р63-экспрессирующих клеток существенно снижается у стареющих мышей по сравнению с молодыми мышами (фиг.5, А и В, $6,51 \pm 1,48$ против $10,21 \pm 0,98$, $P<0,001$). 29-Мер повышает число р63-экспрессирующих клеток у стареющих мышей до уровня, который схож с уровнем у молодых мышей (фиг.5D, $10,98 \pm 2,75$). Кроме того, ДМСО не оказывает действия на увеличение числа ацинарных клеток-предшественников (фиг.5С, $7,06 \pm 1,9$, $P<0,001$, по сравнению с 29-мером).

Пептид PEDF улучшает TBUT и липогенез

[0050] Для того, чтобы оценить действие 29-мера на образование липидов (мейбума), вводят субконъюнктивальную инъекцию 29-мера еженедельно до 4 недель. Выполняют определение TBUT и тест на секрецию слезы с нитью, пропитанной

феноловым красным, в 1, 2, 3, 4 и 8 недели (фиг.6А). TBUT у мышей, обработанных 29-мером, от недели 1 до недели 4 значительно продолжительнее, чем у контрольных. Различие является статистически значимым до 8 недель. Тест на секрецию слезы в двух группах инвариантный (фиг.6). Эти результаты предполагают, что повышение TBUT происходит из-за улучшения липидного слоя.

[0051] Авторы также исследовали липиды, секретированные MG. Продукцию липида (мейбума) MG в верхних глазных веках оценивают с помощью тотальных препаратов, окрашенных ORO. Возрастание ацинарного размера MG после обработки 29-мером является видимым по сравнению с ДМСО (фиг.7А, $2347530 \pm 34986,4$ против $1921689 \pm 299347,1$ пиксели/веко, $P=0,048$). Поперечные срезы век, окрашенных ORO, показывают большее общее окрашивание ORO в цитоплазме дифференцирующих мейбоцитов у мышей, обработанных PDSP (фиг.7В).

[0052] Хотя в приведенных выше примерах используется 29-мер для пояснения воплощений изобретения, коровым пептидом, который имеет активность, является 14-мер. Как отмечалось выше, сканирование аланина идентифицировало существенные остатки в 14-мере, и замены допускаются по несущественным остаткам. Такие другие варианты PDSP также можно использовать в воплощениях изобретения.

[0053] 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.

Ссылки

1. Finis D, Hayajneh J, Konig C, Borrelli M, Schrader S, Geerling G.. Evaluation of an automated thermodynamic treatment (LipiFlow(R)) system for meibomian gland dysfunction: a prospective, randomized, observer-masked trial. *Ocul. Surf.* 2014; 12(2): 146-154.
2. Liu R, Rong B, Tu P, et al.. Analysis of Cytokine Levels in Tears and Clinical Correlations After Intense Pulsed Light Treating Meibomian Gland Dysfunction. *Am. J. Ophthalmol.* 2017; 183: 81-90.
3. Knop E, Knop N, Millar T, Obata H, Sullivan DA.. The international workshop on meibomian gland dysfunction: report of the subcommittee on anatomy, physiology, and pathophysiology of the meibomian gland. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011; 52(4): 1938-1978.
4. Reneker LW, Wang L, Irlmeier RT, Huang AJW. Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Is Required for Meibomian Gland Homeostasis in the Adult Mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2017;58(5):2638-2646.
5. Jester JV, Parfitt GJ, Brown DJ.. Meibomian gland dysfunction: hyperkeratinization or atrophy? *BMC Ophthalmol.*, 2015; 15 Suppl.1: 156.
6. Ong BL, Hodson SA, Wigham T, Miller F, Larke JR.. Evidence for keratin proteins in normal and abnormal human meibomian fluids. *Curr. Eye Res.*, 1991; 10(12): 1113-1119.
7. Nien CJ, Paugh JR, Massei S, Wahlert AJ, Kao WW, Jester JV.. Age-related changes in the meibomian gland. *Exp. Eye Res.*, 2009; 89(6): 1021-1027.

8. Nien CJ, Massei S, Lin G, et al.. Effects of age and dysfunction on human meibomian glands. *Arch. Ophthalmol.*, 2011; 129(4): 462-469.
9. Suhaim JL, Parfitt GJ, Xie Y, et al.. Effect of desiccating stress on mouse meibomian gland function. *Ocul. Surf.*, 2014; 12(1): 59-68.
10. Tombran-Tink J, Johnson LV.. Neuronal differentiation of retinoblastoma cells induced by medium conditioned by human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 1989; 30(8): 1700-1707.
11. Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J.. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1993; 90(4): 1526-1530.
12. Sagheer U, Gong J, Chung C.. Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) is a Determinant of Stem Cell Fate: Lessons from an Ultra-Rare Disease. *J. Dev. Biol.*, 2015; 3(4): 112-128.
13. He X, Cheng R, Benyajati S, Ma JX. PEDF and its roles in physiological and pathological conditions: implication in diabetic and hypoxia-induced angiogenic diseases.. *Clin. Sci. (Lond)*, 2015; 128(11): 805-823.
14. Tombran-Tink J, Mazuruk K, Rodriguez IR, et al.. Organization, evolutionary conservation, expression and unusual Alu density of the human gene for pigment epithelium-derived factor, a unique neurotrophic serpin. *Mol. Vis.*, 1996; 2: 11.
15. Ho TC, Chiang YP, Chuang CK, et al., PEDF-derived peptide promotes skeletal muscle regeneration through its mitogenic effect on muscle progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2015; 309(3): C159-168.
16. Ho TC, Chen SL, Wu JY, et al.. PEDF promotes self-renewal of limbal stem cell and accelerates corneal epithelial wound healing. *Stem Cells*, 2013; 31(9): 1775-1784.
17. Yeh SI, Ho TC, Chen SL, et al. Pigment Epithelial-Derived Factor Peptide Facilitates the Regeneration of a Functional Limbus in Rabbit Partial Limbal Deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2015; 56(4): 2126-2134.
18. Yeh SI, Ho TC, Chen SL, et al.. Pigment Epithelial-Derived Factor Peptide Regenerated Limbus Serves as Regeneration Source for Limbal Regeneration in Rabbit Limbal Deficiency. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2016; 57(6): 2629-2636.
19. Lin Z, Liu X, Zhou T, et al.. A mouse dry eye model induced by topical administration of benzalkonium chloride. *Mol. Vis.*, 2011; 17: 257-264.
20. Wang YC, Li S, Chen X, et al.. Meibomian Gland Absence Related Dry Eye in Ectodysplasin A Mutant Mice. *Am. J. Pathol.*, 2016; 186(1): 32-42.
21. Pult H, Nichols JJ.. A review of meibography. *Optom. Vis. Sci.*, 2012; 89(5): E760-769.
22. Ho TC, Chen SL, Shih SC, et al.. Pigment epithelium-derived factor is an intrinsic antifibrosis factor targeting hepatic stellate cells. *Am. J. Pathol.*, 2010; 177(4): 1798-1811.
23. Sarojini H, Estrada R, Lu H, et al.. PEDF from mouse mesenchymal stem cell secretome attracts fibroblasts. *J. Cell Biochem.*, 2008; 104(5): 1793-1802.

24. Li F, Song N, Tombran-Tink J, Niyibizi C.. Pigment epithelium-derived factor enhances differentiation and mineral deposition of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, 2013; 31(12): 2714-2723.
25. Gattu AK, Swenson ES, Iwakiri Y, et al.. Determination of mesenchymal stem cell fate by pigment epithelium-derived factor (PEDF) results in increased adiposity and reduced bone mineral content. *FASEB J.*, 2013; 27(11): 4384-4394.
26. Steinle JJ, Sharma S, Chin VC.. Normal aging involves altered expression of growth factors in the rat choroid. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, 2008; 63(2): 135-140.
27. Francis MK, Appel S, Meyer C, Balin SJ, Balin AK, Cristofalo VJ.. Loss of EPC-1/PEDF expression during skin aging in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 2004; 122(5): 1096-1105.
28. Morris DL, Rui L. Recent advances in understanding leptin signaling and leptin resistance. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009; 297(6): E1247-1259.
29. Knauer DJ, Wiley HS, Cunningham DD.. Relationship between epidermal growth factor receptor occupancy and mitogenic response. Quantitative analysis using a steady state model system. *J. Biol. Chem.*, 1984; 259(9): 5623-5631.
30. Hong I, Lee MH, Na TY, Zouboulis CC, Lee MO.. LXRalpha enhances lipid synthesis in SZ95 sebocytes. *J. Invest. Dermatol.*, 2008; 128(5): 1266-1272.
31. Hwang HS, Parfitt GJ, Brown DJ, Jester JV.. Meibocyte differentiation and renewal: Insights into novel mechanisms of meibomian gland dysfunction (MGD). *Exp. Eye Res.*, 2017; 163: 37-45.
32. Ho TC, Chen SL, Yang YC, et al.. Cytosolic phospholipase A2- α is an early apoptotic activator in PEDF-induced endothelial cell apoptosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 2009; 296(2): C273-284.
33. Ho TC, Chen SL, Yang YC, Liao CL, Cheng HC, Tsao YP.. PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc. Res.*, 2007; 76(2): 213-223.
34. Liu Y, Zhu Y, Rannou F, et al.. Laminar flow activates peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in vascular endothelial cells. *Circulation*, 2004; 110(9): 1128-1133.
35. Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, et al.. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J. Biol. Chem.*, 2006; 281(49): 38022-38037.
36. Yang SL, Chen SL, Wu JY, Ho TC, Tsao YP.. Pigment epithelium-derived factor induces interleukin-10 expression in human macrophages by induction of PPAR gamma. *Life Sci.*, 2010; 87(1-2): 26-35.
37. Solomon A, Dursun D, Liu Z, Xie Y, Macri A, Pflugfelder SC.. Pro- and anti-inflammatory forms of interleukin-1 in the tear fluid and conjunctiva of patients with dry-eye disease. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001; 42(10): 2283-2292.
38. Tosato G, Jones KD.. Interleukin-1 induces interleukin-6 production in peripheral blood monocytes. *Blood*, 1990; 75(6): 1305-1310.
39. Oliveira IC, Sciavolino PJ, Lee TH, Vilcek J.. Downregulation of interleukin 8 gene

expression in human fibroblasts: unique mechanism of transcriptional inhibition by interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 1992; 89(19): 9049-9053.

40. Gattu AK, Birkenfeld AL, Iwakiri Y, et al.. Pigment epithelium-derived factor (PEDF) suppresses IL-1beta-mediated c-Jun N-terminal kinase (JNK) activation to improve hepatocyte insulin signaling. Endocrinology, 2014; 155(4): 1373-1385.

41. Cavaliere RM, Ghirardi F, Tirindelli R.. Lacrimal gland removal impairs sexual behavior in mice. Front. Neuroanat., 2014; 8: 101.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Фармацевтическая композиция для применения при промотировании регенерации мейбомиевой железы или при лечении и/или предупреждении синдрома сухого глаза, включающая происходящий из PEDF короткий пептид (PDSP) или вариант PDSP, причем PDSP включает остатки 93-106 человеческого эпителий-производного фактора (PEDF), и причем вариант PDSP содержит серин-93, аланин-96, глутамин-98, изолейцин-103, изолейцин-104 и аргинин-106 PDSP и содержат одну или несколько аминокислотных замен в других позициях, причем нумерация местоположений остатков основана на их местоположении 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).

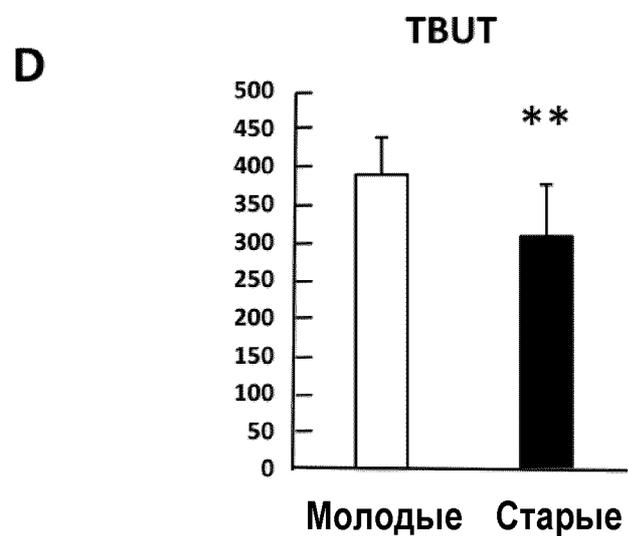
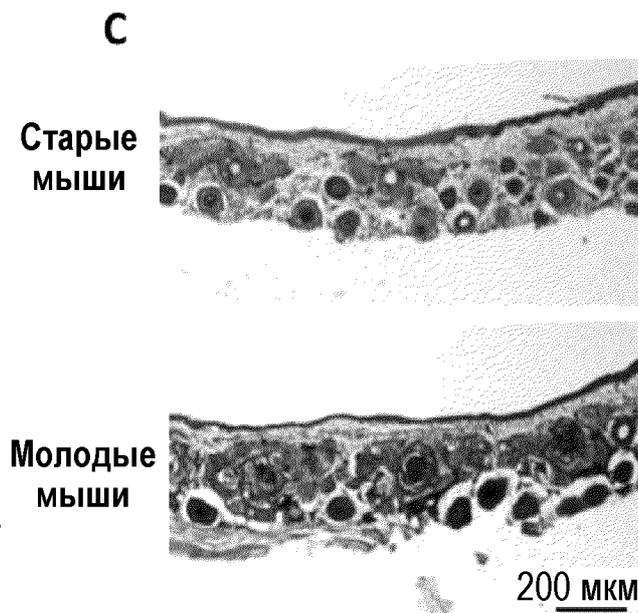
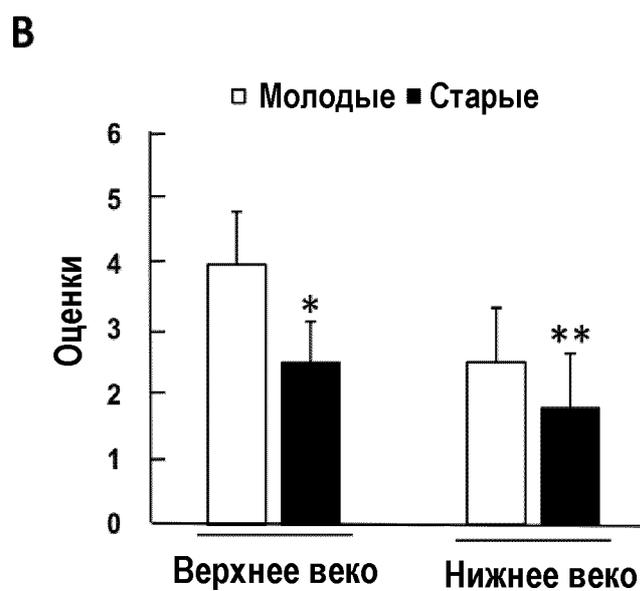
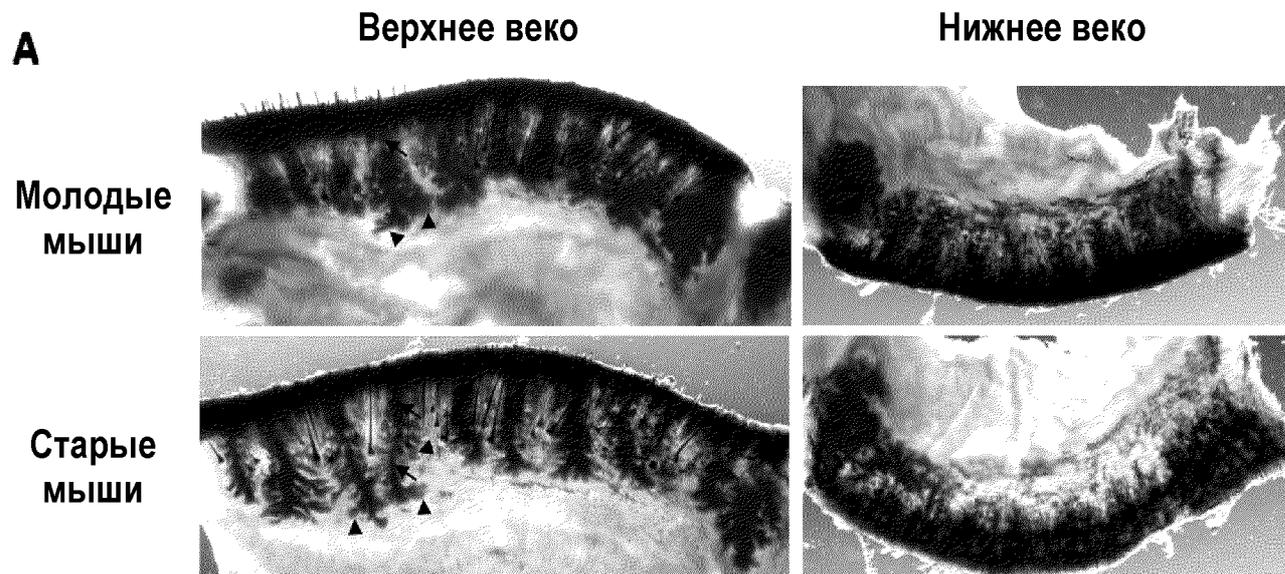
3. Фармацевтическая композиция по п.1, причем PDSP включает последовательность SLGAEQRTEPIHR (SEQ ID NO: 2).

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.

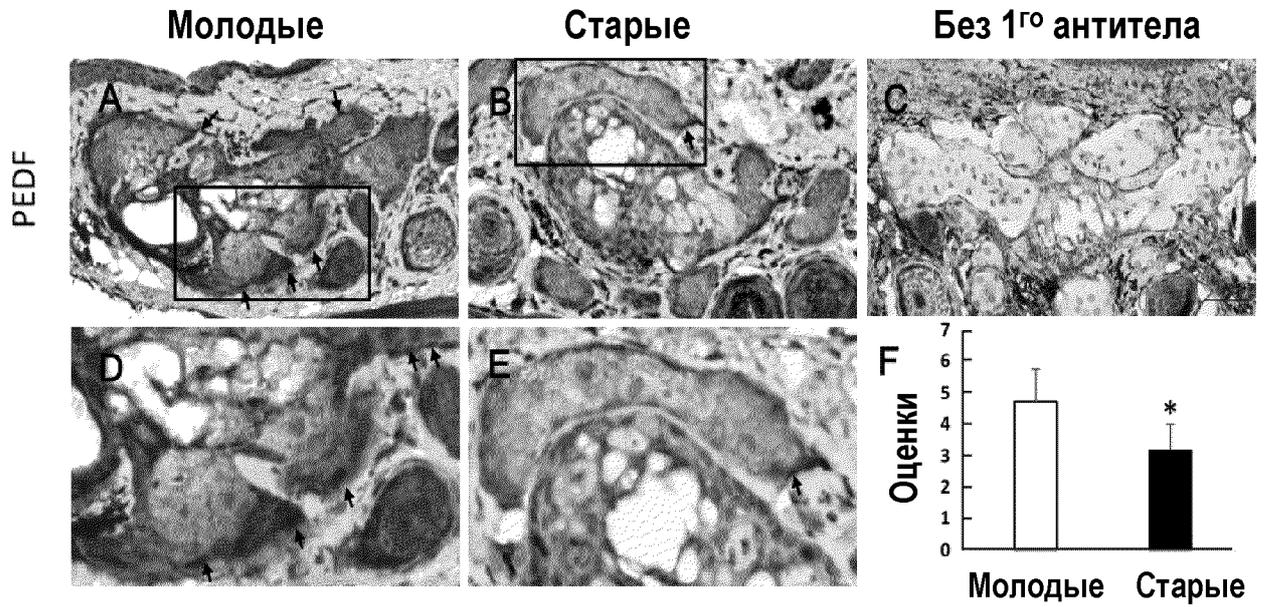
По доверенности

1/6

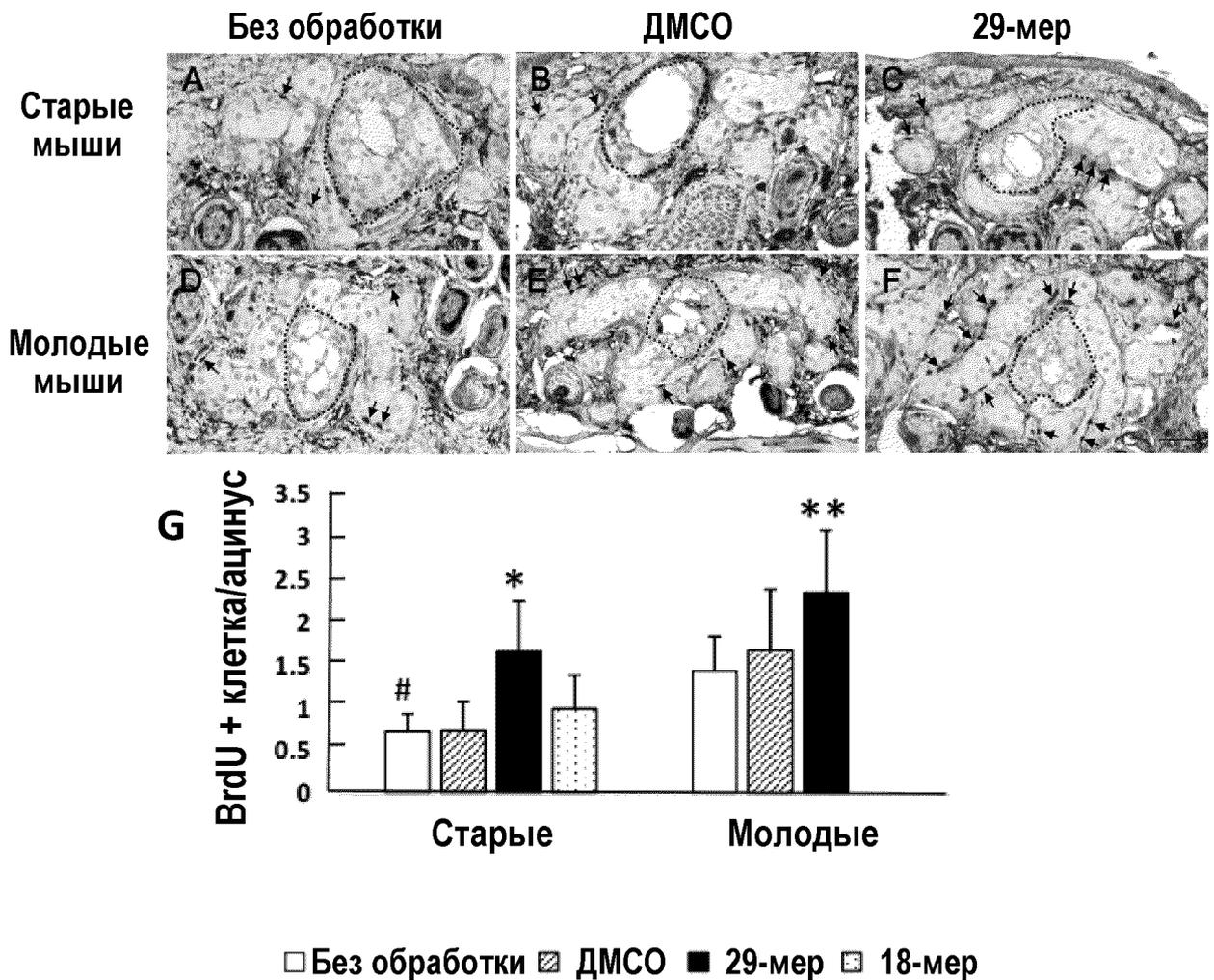


ФИГ.1

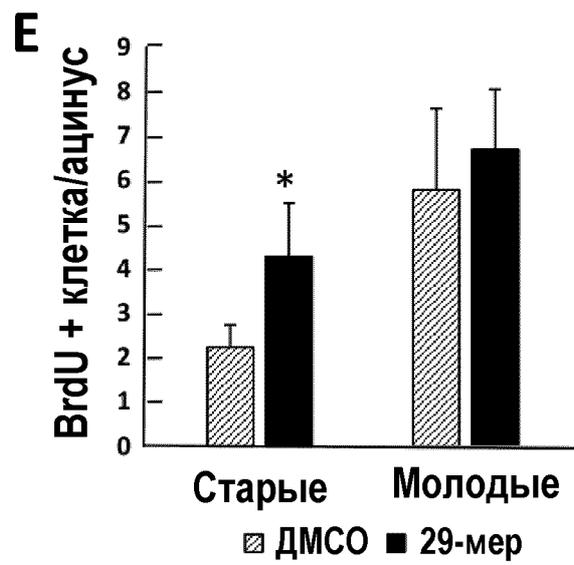
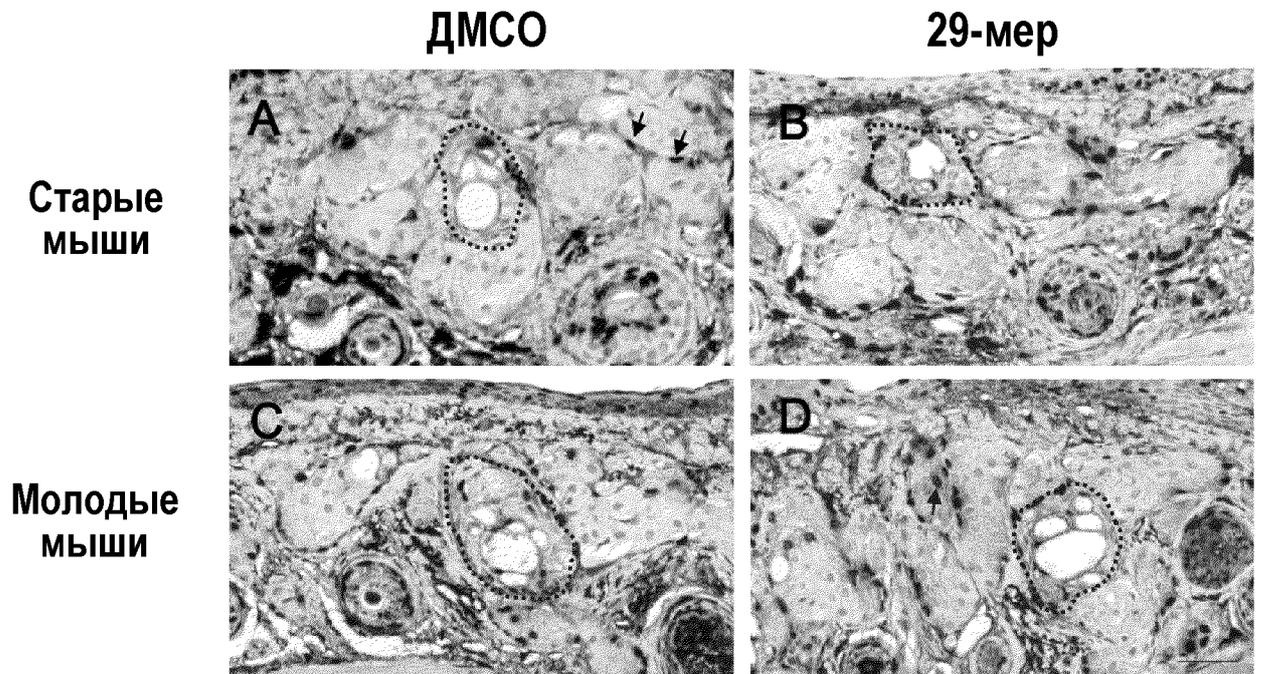
ФИГ.2



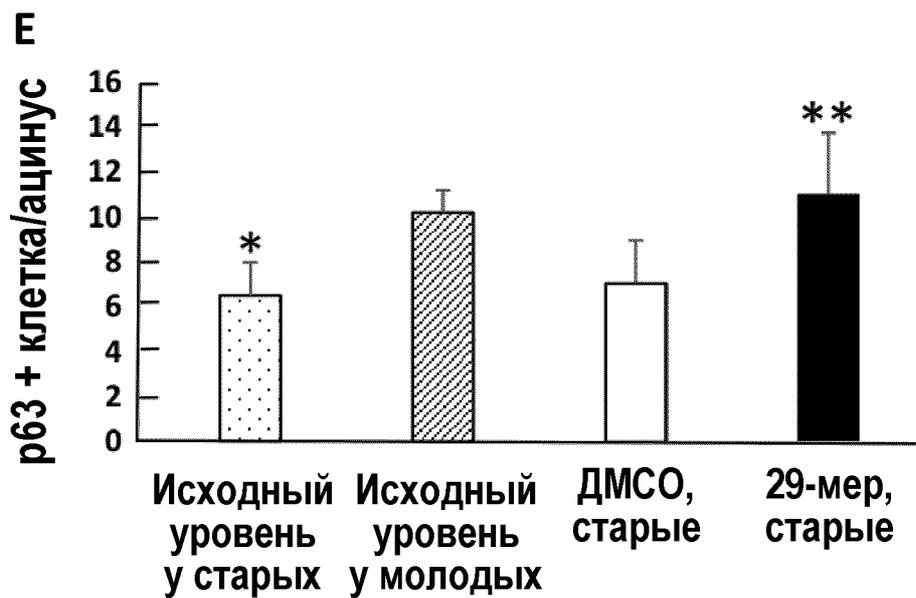
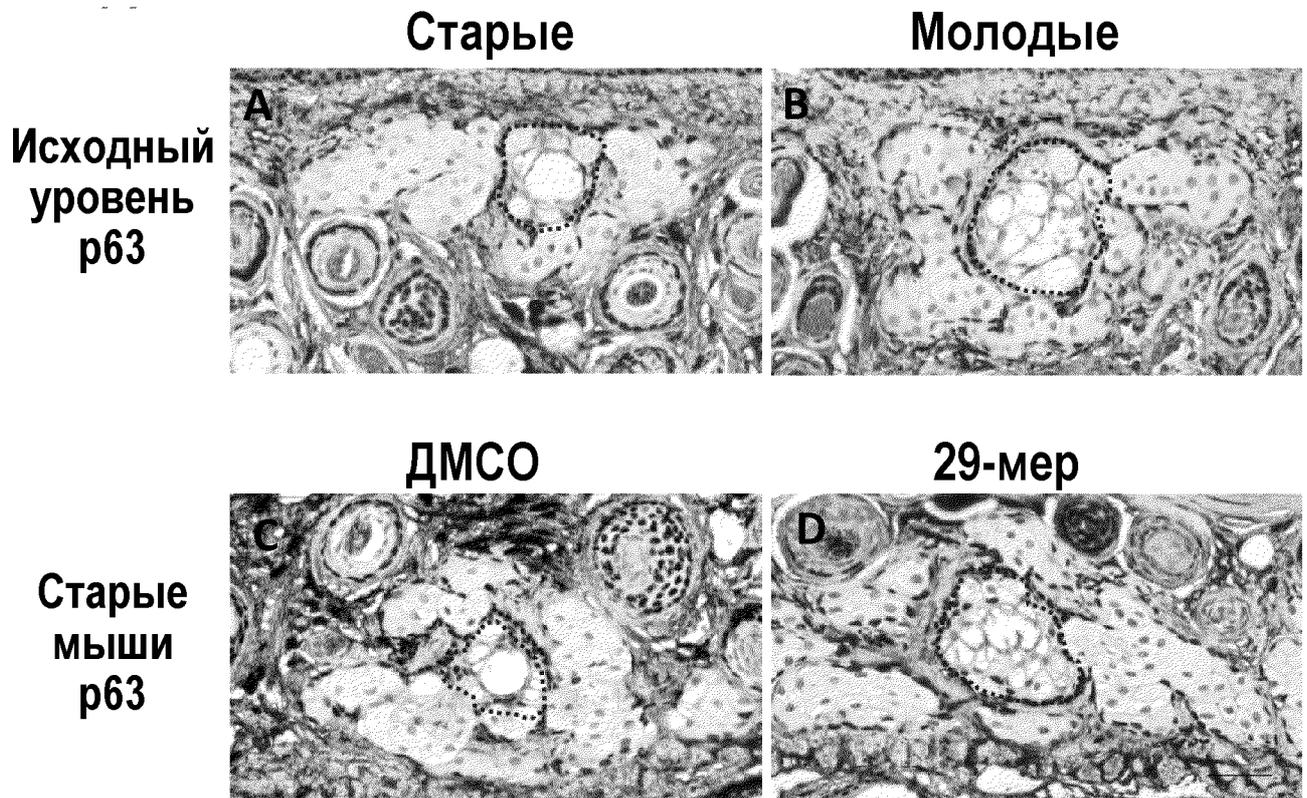
ФИГ.3



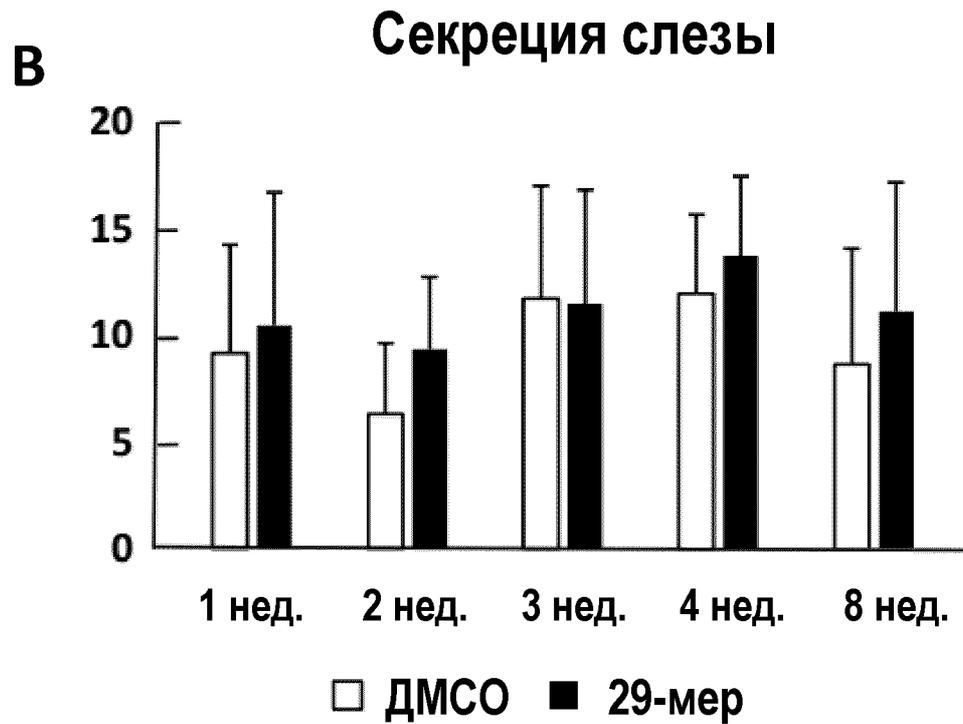
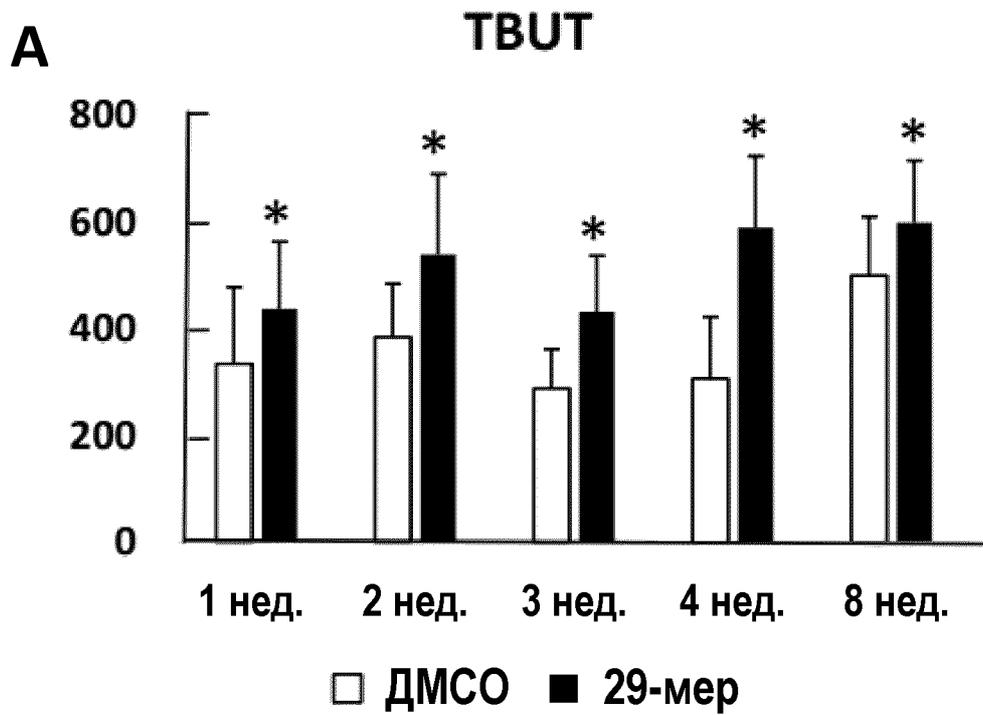
ФИГ.4



ФИГ.5



ФИГ.6



ФИГ.7

