

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2010114713/10, 12.09.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.09.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:

14.09.2007 EP 0701813.8

03.04.2008 EP 08006810.9

(43) Дата публикации заявки: 20.10.2011 Бюл. № 29

(45) Опубликовано: 27.10.2013 Бюл. № 30

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 2005074556 A2, 18.08.2005. WO 0210217 A2, 07.02.2002. WO 0206315 A2, 24.01.2002. RU 2221563 C2, 20.01.2004. WO 0055321 A2, 21.03.2000. WO 02081745 A2, 17.10.2002. LITTLE M.H. ET al. Dual trafficking of Slit3 to mitochondria and cell surface demonstrates novel localization for Slit protein, Am J Physiol Cell Physiol, 2011, v. 281, no. 2, pp.486-495. МАРРИ Р. и др. Биохимия человека. - М.: МИР, 1993, с.34.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 14.04.2010

(86) Заявка РСТ:
EP 2008/007579 (12.09.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2009/033715 (19.03.2009)

Адрес для переписки:

103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. И.С.Саломатиной

(72) Автор(ы):

БОССЕРХОФФ Аня (DE),
ШУБЕРТ Томас (DE),
ХУШТЕРТ Элизабет (DE)

(73) Патентообладатель(и):

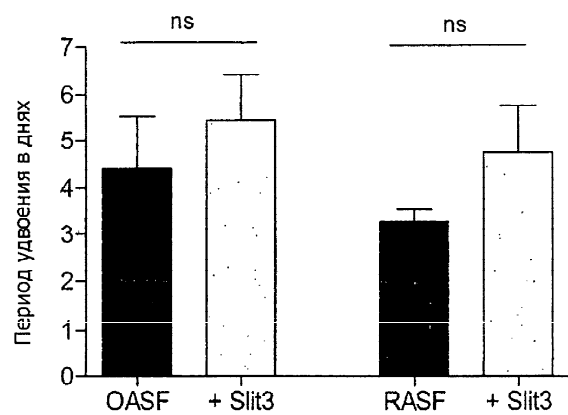
ФОРМИКОН АГ (DE)

(54) НЕЙРОЭНДОКРИННЫЕ ФАКТОРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ДЕГЕНЕРАТИВНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии и может быть использовано в медицине. Белок SLIT применяется при производстве фармацевтической композиции для

предупреждения или лечения повреждений хряща. Предложенное изобретение позволяет эффективно предупреждать или лечить повреждения хряща. 14 з.п. ф-лы, 9 ил., 9 пр.



Фиг. 3

RU 2 4 9 6 7 9 0 C 2

RU 2 4 9 6 7 9 0 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07K 14/00 (2006.01)*A61P 19/02* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21)(22) Application: **2010114713/10, 12.09.2008**(24) Effective date for property rights:
12.09.2008

Priority:

(30) Convention priority:

14.09.2007 EP 07018131.8**03.04.2008 EP 08006810.9**(43) Application published: **20.10.2011 Bull. 29**(45) Date of publication: **27.10.2013 Bull. 30**(85) Commencement of national phase: **14.04.2010**

(86) PCT application:

EP 2008/007579 (12.09.2008)

(87) PCT publication:

WO 2009/033715 (19.03.2009)

Mail address:

**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. I.S.Salomatinov**

(72) Inventor(s):

**BOSSERKhOFF Anja (DE),
ShUBERT Tomas (DE),
KhUSHTERT Ehlizabet (DE)**

(73) Proprietor(s):

FORMIKON AG (DE)**(54) NEUROENDOCRINE FACTORS FOR TREATING DEGENERATIVE DISORDERS**

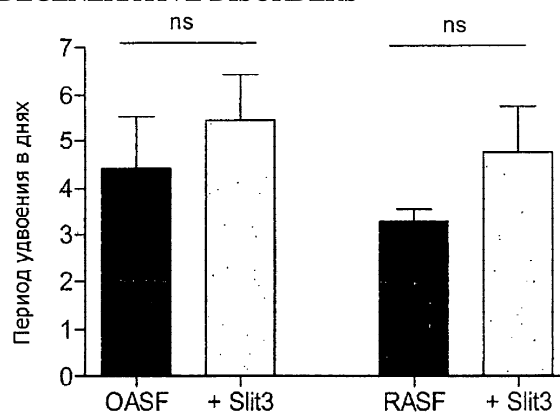
(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology and may be used in medicine. The SLIT protein is applied in preparing a pharmaceutical composition for preparing or treating cartilage disorders.

EFFECT: invention enables preventing or treating the cartilage disorders effectively.

15 cl, 9 dwg, 9 ex

**Фиг. 3**

Настоящее изобретение имеет отношение к применению фактора и/или полипептида, изменяющего направление роста, в особенности белков нетрин1, SLIT3 или их фрагментов, для производства фармацевтической композиции для лечения или предупреждения дегенеративных заболеваний, в особенности повреждения хрящей.

Изобретение дополнительно имеет отношение к фрагменту полипептида SLIT3, к фармацевтической композиции, включающей полипептид, и к его применению.

Восстановление и регенерация хряща при травматическом и дегенеративном поражении сустава остается по-прежнему основной проблемой в ортопедии.

Повреждения хрящей и дегенеративные заболевания представляют собой основную причину возникновения сильных болей и постепенной потери функций суставов с потерей трудоспособности и ограничению подвижности во взрослой популяции. Собственная способность хряща к восстановлению ограничена низкой способностью хондроцитов к делению *in vivo*, и ткани взрослых обычно уступают по свойствам нормальному хрящу. Обычно считается, что поврежденный хрящ не получает достаточных стимулов для того, чтобы произошла стимуляция восстановления, поскольку, например, суставной хрящ не обладает системой сосудов. Хондроциты в хрящевой ткани в норме не подвергаются воздействию достаточного количества агентов, стимулирующих восстановление, таких как факторы роста и фибриновые сгустки, которые присутствуют в поврежденной ткани, обладающей системой сосудов.

Функциональная целостность суставов зависит от строгого разделения границ компартментов. Пересечение отделов хряща и разрушение хрящевого компартмента обнаруживают при воспалительном и дегенеративном поражении сустава, таком как ревматоидный артрит (РА) и остеоартрит (ОА).

Часто нарушения в хряще (например, ревматоидный артрит) характеризуются или усиливаются инвазивным и разрушительным поведением клеточных популяций в окружающих тканевых компартментах, таких как фибробласты синовиальной ткани (SF), которые мигрируют в хрящ из синовиальной ткани. Разрушение сочленовных структур сустава, таких как хрящ и кость, под действием синовиальных фибробластов (SF) представляет собой критическое событие в развитии РА и ОА (Pap, 2003; Pap, 2007; Yasuda, 2006; Huber, et al., 2006).

С разной степенью успеха было опробовано множество стратегий, направленных на ингибирование дальнейшего прогрессирования разрушительных структурных изменений, а также новых подходов, направленных на обращение заболевания с помощью восстановительного лечения пораженного хряща, включая поиск новых средств, способных восстанавливать разрушенный хрящ. Эти стратегии включают методики стимулирования костного мозга, аутологическую и аллогенную трансплантацию, аутологическую трансплантацию хондроцитов, имплантацию надкостницы, просверливание по Приди, абразивную хондропластику, включающую микроразрушение и мозаичную пластику. Однако эти процедуры не надежны и ограничены очаговыми хрящевыми и костно-хрящевыми нарушениями небольших и средних размеров. Мозаичная пластика ограничена тем, что приходится производить разрушения в области донорского участка, а также неудовлетворительным результатом восстановления и техническими трудностями, с которыми сталкиваются при восстановлении поверхности исходного изгиба сустава (Kuroda, et al., 2007). Методики аутологической трансплантации хондроцитов обладают несколькими недостатками, включая отсутствие достаточного числа хондроцитов, необходимости производить разрушения в области донорского участка, низкой эффективностью и высокой стоимостью лечения.

Было установлено, что несколько факторов роста, таких как TGF- β 1, FGF-2, IGF-1, TP-508, OP-1 или другие BMP, включая GDF или их комбинации, индуцируют пролиферацию и дифференциацию клеток-предшественников в функционирующей кости и/или хрящевой ткани. В особенности, было показано, что TGF-R1 активирует хондрогенную дифференциацию клеток-предшественников и усиливает дифференциацию хондроцитов. IGF-1 исходно действует по анаболическому сценарию, увеличивая синтез протеогликана и коллагена II-го типа. Однако эти факторы роста довольно неспецифичны, и существует риск того, что они могут вызвать нежелательные побочные эффекты. Другие, такие как BMP, обладают возможностью индуцировать остеогенные гены и, следовательно, индуцировать нежелательное образование костной ткани. Другое ограничение применения этой методики с факторами роста заключается в относительно коротком времени биологической полужизни экзогенного фактора роста, который способен производить только временные биологические эффекты после доставки.

За некоторые признаки и симптомы, а также за структурные изменения, присутствующие у пациентов с ОА и РА, вероятно, ответственны провоспалительные цитокины, протеазы и металлопротеиназы. Ингибирование синтеза/активности этих ферментов, в качестве лечения ОА и РА, интенсивно изучается.

В настоящее время наиболее многообещающая стратегия по-прежнему заключается в применении небольших химических соединений, которые могут блокировать активность MMP. Однако ингибиторы MMP могут давать побочные эффекты, и пока не было продемонстрировано значительного снижения в прогрессировании заболевания.

Кроме того, ниже перечислены прочие новые стратегии, в настоящее время находящиеся в стадии разработки.

US2003068705 раскрывает триста пять последовательностей нуклеиновых кислот, кодирующих полипептиды PRO, некоторые из которых (например, гомологичные или родственные IL-17 полипептидам) по непроверенным данным полезны для стимуляции пролиферации или дифференциации хондроцитов и, как таковые, могут быть полезны для лечения различных нарушений в кости и/или в хряще, таких как спортивные травмы или артрит.

WO20001090357 обеспечивает белки для лечения пороков развития, воспалительного заболевания или для модуляции иммунных ответов.

US2003044917 имеет отношение к полипептидам PRO человека для стимуляции пролиферации и дифференциации хондроцитов и к их применению для лечения различных заболеваний кости и/или хряща, таких как артрит и спортивные травмы. Однако только последовательность 6029 дала положительный результат.

Предполагается, что другой класс белков, такие как молекулы, управляющие направлением роста аксонов (например, нетрины, белки Slit), модулируют движение клеток при воспалении (WO0164837, WO05074556, WO00055321, WO0190357).

WO0164837, WO03075860, WO06019904 и US 2006/0153840 раскрывают способы стимуляции ангиогенеза, пролиферации и/или стимуляции миграции клеток для лечения нейропатии и рака.

WO2002081745 раскрывает применение SLIT3 для диагностики остеопороза/заболевания кости, стимуляции остеогенеза и/или предупреждения остеопороза/заболевания кости.

WO99/23219, JP11164690 и JP11075846 раскрывают последовательность полипептида SLIT3 человека.

WO00/55321 раскрывает последовательности DNA SLIT позвоночных (т.е. Slit2 Хенопус и человека), белок и их применение.

Однако ни один из способов и композиций, раскрытых в этой области техники, не продемонстрировал значительного снижения в прогрессировании подвергаемого лечению заболевания без побочных эффектов или не привел к прекращению разрушительных процессов и фактическому восстановлению и восполнению хрящевой ткани.

Следовательно, существует необходимость в композициях и их применении для усовершенствования лечения и/или предупреждения прогрессирующего разрушения хряща, в особенности, после травмы и в случае хронических заболеваний, таких как полнослойные нарушения и поверхностные нарушения и артрит (например, остеоартрит, ревматоидный артрит), слезы мениска, (ACL)-повреждение передней крестообразной связки, которые позволяют преодолеть проблемы, связанные с доступными на данный момент способами и композициями.

Следовательно, цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способов восстановления или регенерации повреждений хрящей и/или ингибирования прогрессирования заболеваний или нарушений хряща, таких как артрит и спортивные травмы.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способов ингибирования миграции синовиальных клеток и, следовательно, ингибирования разрушения хряща.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в обеспечении способов, которые подходят для лечения заболеваний хряща, а точнее воспалительных заболеваний хряща, и заболеваний без вовлечения инвазии синовиальных фибробластов или образование паннуса.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в обеспечении композиций и их применении для притяжения/хемотаксиса мезенхимальных стволовых клеток для регенерации хряща из его окружения.

Еще одна цель настоящего изобретения заключается в обеспечении композиций и их применении для индукции образования хряща и/или стимуляции пролиферации или дифференциации хондроцитов.

Проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, решают путем применения фактора, изменяющего направление роста, производства фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения повреждений хряща. Изобретение, в особенности, имеет отношение к применению фактора, изменяющего направление роста, для производства фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения дегенеративного заболевания, предпочтительно дегенеративного заболевания хряща, а) связанного с инфильтрацией или миграцией синовиальных фибробластов предпочтительно в суставной или несуставной хрящ и/или связанного с образованием паннуса, или б) связанного с ослабленным прикреплением клеток, предпочтительно фибробластов или синовиальных фибробластов, к суставному или несуставному хрящу. В особенности, фактор, изменяющий направление роста, модулирует или ингибирует миграцию фибробласто-подобных клеток, таких как синовиальные фибробласты, торможение гиперплазии синовиальных клеток и/или усиливает миграцию, пролиферацию и/или дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток и/или хондроцитов для индукции и/или регенерации хряща и, таким образом, изменяет, ингибирует, предупреждает и/или лечит прогрессирование дегенеративного заболевания. В особенности, фактор, изменяющий направление роста, ингибирует,

изменяет или предупреждает образование остеофитов, предпочтительно у пациента.

В особенности, изобретение имеет отношение к применению фактора, изменяющего направление роста, для производства фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения повреждений хряща, в которой фактор, изменяющий

направление роста, представляет собой фрагмент белка SLIT3 (SEQ ID NO:1). Фрагмент предпочтительно имеет длину, равную <1523 АА, предпочтительно <1200 АА, более предпочтительно <1000 АА и наиболее предпочтительно ≤ 800 АА и, в особенности, >20 АА, предпочтительно >50 АА, более предпочтительно >100 АА.

Предпочтительно, фрагмент белка SLIT3 включает последовательность SEQ ID NO:1 от 34 до 917 положения, от 47 до 863 положения, от 66 до 857 положения, от 279 до 863 положения, от 279 до 857 положения, от 279 до 724 положения, от 279 до 504 положения, от 311 до 432 положения, от 335 до 432 положения или от 312 до 437 положения. В соответствии с изобретением было обнаружено, что факторы, изменяющие направление роста, в особенности, SLIT3 экспрессируются на границах хрящевого компартмента, где они поддерживают целостность суставного хряща. Дополнительно, факторы, изменяющие направление роста, ингибируют миграцию фибробластов, нервных волокон и сосудов в суставной хрящ. Поскольку инвазия

паннусной ткани в хрящ при хроническом заболевании сустава возможна только после измененной экспрессии фактора, изменяющего направление роста, эту инвазия можно модулировать с помощью факторов, изменяющих направление роста, в особенности, с помощью SLIT3, и, таким образом, становится возможным лечение связанных с этим дегенеративных заболеваний.

Авторы изобретения продемонстрировали, что факторы, изменяющие направление роста, и их рецепторы избирательно экспрессируются в синовиальных фибробластах пациентов, страдающих дегенеративными заболеваниями, такими как остеоартрит и артрит. Наблюдение было проанализировано методом количественной RT-PCR генов, выполненной с помощью cDNA компании «Lightcycler», изолированной из культуры первичных синовиальных фибробластов человека. Белки ROBO и SLIT сходным образом экспрессируются в синовиальных фибробластах пациентов с остеоартритом (OASF) и в синовиальных фибробластах пациентов с ревматоидным артритом (RASf), за исключением экспрессии mRNA ROBO3, которая поразительно увеличивается в RASf по сравнению с очень слабой экспрессией в OASF. Уровень mRNA SLIT1 явно снижается по сравнению с SLIT2 или SLIT3, но, похоже, что экспрессия всех белков SLIT в OASF бывает обычно выше, чем в RASf.

ROBO1 и ROBO2 экспрессируются как в дифференцированных, так и в ОА хондроцитах, но экспрессия в ОА хондроцитах в 10 раз (ROBO1) и даже в 100 раз (ROBO2) выше по сравнению с экспрессией в дифференцированных хондроцитах. В обоих типах клеток не удалось зарегистрировать никакой экспрессии ROBO3. Все три белка SLIT экспрессируются в дифференцированных и ОА хондроцитах, обнаруживая снова более высокие уровни в ОА, по сравнению с уровнем в дифференцированных хондроцитах.

UNC5B и UNC5C подвержены значительной стимулирующей регуляции в синовиальных фибробластах пациентов с ОА и РА.

Дополнительно было обнаружено, что значительная потеря в экспрессии ROBO3 в RASf на более поздних пассажах синовиальных фибробластов может быть важной стадией в процессе утраты активности, изменяющей направление роста, в отношении SLIT3. Эти данные, полученные авторами изобретения, позволяют предположить, что нарушение в регуляции рецептора ROBO3 в синовиальных

фибробластах у RA (и OA) коррелирует с агрессивностью фибробластов.

Кроме того, изобретение основано на обнаружении того, что факторы, изменяющие направление роста, такие как нетрин1, SLIT3, а также их фрагменты вовлечены в регуляцию агрессивного поведения клеток, таких как синовиальные фибробласты, и миграции этих клеток к хрящу или в него, что представляет собой основную проблему при дегенеративных заболеваниях, таких как ревматоидный артрит. Не будучи ограниченными специфическими молекулами, изобретение основано на обнаружении того, что факторы, изменяющие направление роста, такие как нетрин1 и SLIT3 и их фрагменты, ингибируют миграцию клеток OASF и RASF. Благодаря этому удивительному открытию, факторы, изменяющие направление роста, могут быть применены для лечения различных заболеваний, которые возникают в результате миграции и инфильтрации клеток, включая измененную миграцию фибробласто-подобных клеток, таких как синовиальные фибробласты и/или образование паннуса, которые не могут в дальнейшем вызвать разрушение или изменить функцию ткани, такой как суставной или несуставной хрящ. Принимая во внимание раскрытое в этом документе удивительное открытие, факторы, изменяющие направление роста, могут быть применены в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения различных заболеваний и болезненных состояний, описанных в этом документе. Соответствующие заболевания, среди прочих, представляют собой предпочтительно дегенеративные заболевания хряща, такие как дегенеративные заболевания сустава и/или межпозвоночного диска, включая те, что дополнительно описаны выше. В особенности, в соответствии с изобретением, заболевание выбирают из дегенеративного заболевания дисков, слез мениска, повреждения передней крестообразной связки (ACL), артрита, остеоартрита, ревматоидного артрита, псориатического артрита, юношеского хронического артрита, псевдоартрита тазобедренного или плечевого сустава, ревматоидного полиартрита, синовита или виллезонодулярного синовита.

В соответствии с изобретением повреждения хрящей или заболевания хряща можно предупредить или лечить.

Авторы изобретения обнаружили также влияние факторов, изменяющих направление роста на миграционное поведение мезенхимальных стволовых клеток человека, о которых известно, что они способны дифференцировать в хондроциты. За индукцией миграции наблюдают, применяя анализ в камере Бойдена после добавления таких факторов, как нетрин1, в нижнюю камеру, что указывает на то, что факторы, изменяющие направление роста, могут действовать как хемоаттрактанты для мезенхимальных стволовых клеток, таких как клетки синовиальной мембраны или выстилающие клетки. В свете этого открытия может быть заторможено не только разрушительное поведение мигрирующих клеток, но также могут быть вовлечены клетки, способные к регенерации разрушенной ткани. Факторы, изменяющие направление роста, следовательно, дополнительно улучшают лечение дегенеративных заболеваний.

Дополнительно, была обнаружена индукция дифференциации мезенхимальных стволовых клеток человека в сторону линии хондрогенных клеток, следовательно, факторы, изменяющие направление роста, такие как SLIT3, могут индуцировать хондрогенез и, следовательно, полезны для регенерации и лечения заболеваний хряща.

Следовательно, изобретение охватывает применение факторов, изменяющих направление роста, для производства фармацевтической композиции для лечения повреждений хряща, в особенности дегенеративного заболевания у пациента,

вызываемого агрессивными фибробластами, путем введения эффективного количества фактора, изменяющего направление роста, который модулирует миграцию, пролиферацию и/или прикрепление клеток к хрящу.

Предпочтительно, эффективное количество фактора, изменяющего направление роста, которое вводят пациенту, равно от 0,001 мг/кг массы тела пациента до 100 мг/кг массы тела пациента, предпочтительно 0,01 мг/кг массы тела пациента до 20 мг/кг массы тела пациента, более предпочтительно от 0,01 до 10 мг/кг массы тела пациента, наиболее предпочтительно 0,1 мг/кг до 1 мг/кг массы тела пациента.

Для цели настоящего изобретения термин «фактор, изменяющий направление роста» означает активное средство, которое в определенной концентрации или диапазоне концентраций способно ингибировать миграцию клеток через границу ткани, например границу хряща. По этой причине, например, миграция агрессивных синовиальных фибробластов в хрящ и/или кость может быть заторможена или изменена. Это также включает ингибирование дальнейшего прогрессирования в образовании паннуса или инвазии паннуса в хрящ. Факторы, изменяющие направление роста, могут влиять на процесс прорастания нервных волокон в качестве стимулов, определяющих направление роста аксона, например, с помощью отталкивающего или привлекающего действия.

Факторы, изменяющие направление роста, включают большое число молекул, также известных как молекулы, определяющих направление роста аксона, которые модулируют аксональный рост в нервной системе. Они включают белки нетрин, белки SLIT, SEMAPHORE и ЭФРИН и их рецепторы НЕЙРОФИЛИН, ROUNDABOUT (ROBO) и членов семейств UNC5 и DCC (Klagsbrun и Eichmann, 2005).

Белки NETRIN представляют собой семейство секретируемых белков, обладающих гомологией к ламининовому домену. Это семейство состоит из нетрина 1, 2, 3 и 4. Они содержат домен ламинина-VI, EGF-подобные повторы и гепарин-связывающий C-концевой домен. Рецепторы нетрина представляют собой семейство рецепторов, удаленных в колоректальном раке (DCC), которое состоит из DCC и неогенина, или семейство некоординированных-5 (UNC5), которое включает UNC5A, 5B, 5C, 5D. Нетрины вовлечены в ангиогенез и в ход морфогенеза, такого как ветвление легких, развитие молочных желез и образование опухоли. Показано, что связывание нетрина с DCC и неогенином приводит к привлечению клеток, тогда как связывание с UNC-рецептором модулирует отталкивание.

Белки SLIT исходно были обнаружены в *Drosophila* как молекулы, направляющие рост аксона. Ортологи SLIT1, SLIT2 и SLIT3 у млекопитающих представляют собой более крупные секретируемые белки с четырьмя обогащенными лейцином повторяющимися (LRR) доменами, девятью EGF-доменами, доменом ламинина G (LamG) и C-концевым цистеиновым узлом. mRNA SLIT1 экспрессируется в мозге, анапластической олигодендроглиоме и Т-клетках линии Jwkat. mRNA SLIT2 и SLIT3 соэкспрессируются в эмбриональных стволовых клетках (ES) с образованием эмбрионного тельца (Katoh и Katoh, 2005; Vargesson, et al., 2001). Slit3, но не Slit2, локализован внутри митохондрий, что позволяет предположить, что Slit3 потенциально обладает уникальными функциями, не свойственными другим Slit-белкам (Little, et al., 2001). Белок Slits действует посредством связывания с рецепторами Roundabout. Существует четыре трансмембранных рецептора Robo человека (Robo1, Robo2, Robo3 и Robo4), которым свойственны домены фибронектинового типа III и иммуноглобулин-подобные домены (Ig), но которые различаются по своим цитоплазматическим доменам (Itoh, et al., 1998; Howitt, et al.,

2004; Hohenester, et al., 2006). Исходно было известно, что Slit-белки вовлечены в регуляцию взаимодействий по типу клетка-клетка и взаимодействий по типу клетка-подложка в мигрирующих клетках в ходе эмбрионального развития и регулируют направление роста аксона путем привлечения или отталкивания конуса роста. В последнее десятилетие было также описано, что система Robo-/Slit вовлечена в адгезию клеток и индуцирует опухолевый ангиогенез. Белки Slits также вовлечены в другие процессы развития, такие как миграция предшественников мышечных клеток у дрозофилы, направленная миграция лейкоцитов и индукция почки (Klagsbrun и Eichmann, 2005).

Семафорины представляют собой поверхностно или локально секретируемые факторы, изменяющие направление роста нервов, со специфическим отталкивающим действием на нервные волокна через определенные поверхностные рецепторы, такие как нейрофилин 1 и нейрофилин 2. Семафорины класса III включают SEMA A, B, C и F. Эфрины и их рецепторы Eph представляют собой лиганды и тирозинкиназные рецепторы, вовлеченные во множество процессов развития, включая развитие нервной системы и ангиогенез. Лиганды эфрина A (Эфрин A1, A2, A3, A4, A5) представляют собой заякоренные через GPI молекулы, которые связываются с рецепторами EphA, тогда как белки эфрина B (Эфрин B 1-3) связываются с рецепторами Eph B. Эфрины могут также, наоборот, функционировать в качестве рецепторов, которые связываются с помощью Ephs как лиганды.

В некоторых воплощениях фактор, изменяющий направление роста, настоящего изобретения представляет собой агониста или антагониста рецептора ROUNDABOUT (например, ROBO1, 2, 3), рецептор, отсутствующий при колоректальной карциноме (например, DCC) или UNC-рецептор (например, UNC5A-D). Так как применен в этом документе, агонист или антагонист активирует или ингибирует активность рецептора ROUNDABOUT, DCC- или UNC-рецептора, который предпочтительно представляет собой сигнал, передаваемый путем взаимодействия между рецептором и лигандом, или ингибирование сигнала, который передается с помощью рецептора, не занятого лигандом.

В некоторых предпочтительных воплощениях агонист, антагонист и/или фактор, изменяющий направление роста, настоящего изобретения выбирают из группы нетринов (такие как нетрин1, нетрин2, нетрин4, нетринG1), белков SLIT (таких как SLIT1, SLIT2, SLIT3), белков эфринов (таких как ЭФРИН A2, A4, A5) и белков SEMAPHRIN (таких как семафорин 3A, 3B, 3C и 3F), их фрагментов и аминокислотных последовательностей.

Термин «излечение или лечение», так как применен в этом документе, означает смягчение нарушения или заболевания или смягчение симптомов, связанных с нарушением или заболеванием, прекращение дополнительной прогрессии или нарастания выраженности симптомов.

Термин «предупреждение» включает предупреждение или профилактику заболевания или нарушения.

Термин «нарушение хряща» имеет отношение к любому отклонению от нормы в хряще, включая заболевания хряща, изменения в хряще, вызванные, например, травмой или дегенеративным процессом.

Термин «дегенеративные заболевания» означает заболевания или нарушения в пораженной структуре хряща, такие как деградация или разрушение хряща с вовлечением костной структуры или без этого. Предпочтительно, дегенеративные заболевания представляют собой дегенеративные заболевания хряща. Эти

заболевания включают нарушения височно-челюстного сустава (ТМД), нарушения хрящевого кольца сустава, артрит, остеоартрит, ревматоидный артрит, псориатический артрит, юношеский хронический артрит, псевдоартрит тазобедренного или плечевого сустава, ревматоидный полиартрит, дегенеративные

5 заболевания межпозвоночных дисков, костно-хрящевые нарушения, поверхностные хрящевые нарушения, рассекающий остеохондрит, глубокие хрящевые нарушения, хрящевые нарушения средней глубины, слезы мениска, повреждение передней крестообразной связки, синовиальный остеохондроматоз, анкилозирующий

10 спондилит, синовит, villonodularный синовит.

Термины нарушение хряща и дегенеративные заболевания, так как применены в этом документе, в частности, не включают остеопороз.

«Дегенеративные заболевания межпозвоночных дисков (DDD)» представляют собой хронический процесс, характеризующийся частично прогрессирующей потерей

15 протеогликана и воды в студенистом ядре одного или нескольких межпозвоночных дисков, что впоследствии может проявиться во множественных нарушениях, таких как идиопатическая боль в нижней части спины, образование грыжи межпозвоночного диска, разрушение внутренних межпозвоночных дисков или растрескивание

20 межпозвоночных дисков, радикулопатия, стеноз спинномозгового канала, индуцированное грыжей межпозвоночного диска воспаление седалищного нерва, воспаление седалищного нерва, идиопатический сколиоз и/или миелопатия. Степень дегенерации межпозвоночного диска может быть оценена с помощью дооперационного MRI-анализа.

Термин «суставной хрящ» означает ту поверхность части кости в суставах, которая функционирует как упругая прокладка между двумя костями и которая дает

возможность суставам двигаться. Нормальный здоровый хрящ описывают как гиалиновый хрящ. Суставной хрящ состоит из специализированных клеток

30 (хондроцитов), встроенных в подложку из внутриклеточного вещества, обогащенного протеогликаном, главным образом, агреканом, волокнами коллагена типа II, другими белками и водой. Хондроциты, встроенные внутрь матрикса, создают и поддерживают его. Хрящевая ткань представляет собой ткань, лишенную нервов и сосудов, и ее питание осуществляется с помощью лежащей ниже ткани.

Несуставной хрящ не покрывает шарнирно-сочлененные поверхности и включает соединительнотканый хрящ (включая межсуставной соединительнотканый хрящ, например, мениск и соединительнотканый хрящ межпозвоночных дисков) и эластический хрящ.

Термин «синовиальный клетки», «синовиальный слой» или «синовиальные фибробласты», так как применен в этом документе, имеет отношение к клетке, физиологически связанной с синовиальной мембраной или присутствующей в синовиальном пространстве; к клетке, полученной из синовиальной мембраны сустава или синовиальной жидкости. Он также имеет отношение к клеточной выстилке,

45 покрывающей нехрящевые поверхности синовиальных суставов. Синовиальный слой состоит из синовиальных выстилающих клеток и синовиальной подвыстилки (субсиновиального слоя), которая сливается с суставной капсулой.

Термин «паннусная ткань» означает пролиферацию синовиальных клеток и/или эрозию ткани, такой как отложение клеток или вещества внутри хряща (например, суставного хряща), инвазию или разрушение суставного хряща с вовлечением субхрящевой области или без нее. Термин также включает инвазию клеток в подхрящевой костный мозг.

В предпочтительном воплощении проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, решают путем применения фактора, изменяющего направление роста, для производства фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения дегенеративного заболевания, которое, предпочтительно, не представляет собой

5 остеопороз, в котором фактор, изменяющий направление роста, выбирают из группы, состоящей из полипептидов, имеющих последовательность, которая а) имеет, по меньшей мере, 85% гомологии, предпочтительно 90%, 95% гомологии, более предпочтительно, идентична аминокислотной последовательности белка SLIT3 (SEQ ID NO:1) или нетрина1 (SEQ ID NO:10), б) представляет собой активный фрагмент

10 белка SLIT3 или нетрина1 или в) имеет, по меньшей мере, 85%, 90%, 95% гомологии с аминокислотной последовательностью активного фрагмента б).

Термин «активный фрагмент» предпочтительно означает активность полипептида, который связывается с тем же рецептором или партнером по связыванию, как и

15 зрелый полноразмерный полипептид, например зрелый полипептид SLIT3. Связывание, например, может активировать или ингибировать рецептор и расположенный ниже каскад. Активность фрагмента SLIT3 может, например, быть определена с помощью связывания с его ROBO рецептором с помощью способов, известных в этой области техники, таких как анализ связывания методом «Biacore», in vitro методом «pulldown assay», как описано в работе (Marlot et al., 2007), исследование связывания белка методом ELISA или иммунопреципитации. Активность фрагмента также может быть определена с помощью анализов, описанных в примерах 2, 3, 4, 6, 7 или 9 изобретения, например, анализ миграции в камере Бойдена, анализ

20 пролиферации или функциональный анализ in vivo, такие как описаны в примерах 6 и 7.

Для определения процента гомологии двух аминокислотных последовательностей последовательности выравнивают для оптимизации сравнения (например, в последовательность одного белка или нуклеиновой кислоты для оптимального

30 сравнительного анализа первичной структуры с другим белком или нуклеиновой кислотой могут быть введены разрывы). Затем сравнивают аминокислотные остатки в соответствующих позициях аминокислот. Если позиция в одной из последовательности занята тем же аминокислотным остатком, что и соответствующая позиция в другой последовательности, то молекулы гомологичны по этой позиции.

Процент гомологии между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных позиций, являющихся общими для двух последовательностей (т.е. % гомологии = число идентичных позиций / общее число позиций × 100).

Кроме вышеописанных способов, определение процента гомологии между двумя последовательностями может быть завершено с помощью математического алгоритма. Предпочтительный неограничивающий пример математического алгоритма, применяемого для сравнения двух последовательностей, представляет собой алгоритм, приведенный в работе Karlin и Altschul (1990 Proc. Natl. Acad. Sci. USA

40 90:5873-5877). Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST, предложенные Altschul, et al. (1990 J. Mol. Biol. 215:403-410).

Поиски белка BLAST могут быть выполнены с помощью программы XBLAST, счет = 50, длина слова = 3, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательностям CCSRP настоящего изобретения. Для получения выравниваний с пропусками для сравнения первичных структур можно применить программу Gapped BLAST такую, как описана в работе Altschul et al. (1997 Nucleic

50 Acids Res. 25:3389-3402). При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно

воспользоваться параметрами, используемыми по умолчанию, в соответствующих программах (например, XBLAST и NBLAST). Другой предпочтительный неограничивающий пример математического алгоритма, применяемого для сравнения последовательностей, представляет собой алгоритм, предложенный Myers и Miller (CABIOS 1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая представляет собой часть пакета программ сравнительного анализа первичной структуры последовательности GCG. При применении программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей могут быть применены таблица массы остатков РАМ 120, ограничение на длину пропуска, равное 12, и штраф за пропуск в последовательности, равный 4, для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных последовательностям CCSRP настоящего изобретения. При выравнивании с пропусками для сравнения может быть применена программа Gapped BLAST так, как описано в работе Altschul et al. (1997 Nucleic Acids Res. 25:3389-3402). При применении программ BLAST и Gapped BLAST могут быть применены параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Другой предпочтительный неограничивающий пример математического алгоритма, применяемого для сравнения последовательностей, представляет собой алгоритм, предложенный Myers и Miller (CABIOS 1989). Такой алгоритм включен в программу ALIGN (версия 2.0), которая представляет собой часть пакета программ GCG сравнительного анализа первичной структуры последовательностей. При применении программы ALIGN для сравнения аминокислотных последовательностей могут быть применены таблица массы остатков РАМ 120, ограничение на длину пропуска, равное 12, и штраф за пропуск в последовательности, равный 4.

Фрагменты предпочтительно имеют длину, равную менее чем 1523 или 1522 аминокислоты, предпочтительно равную менее чем 1491, 900, 500, 400, 300, 200 аминокислот, предпочтительно, по меньшей мере, 20, 50, 100 аминокислот и вплоть до 100, 200, 300, 400, 500 аминокислот. В предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, в соответствии с изобретением включает аминокислотную последовательность, которую выбирают из последовательностей SEQ ID NO:2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 и 9, и предпочтительно полипептида, аминокислотная последовательность которого короче, чем зрелый белок SLIT3. Предпочтительно аминокислотная последовательность короче, чем 1523 или 1522, предпочтительно короче, чем 1491 или короче, чем 900 аминокислот в длину, предпочтительно от 200 до 900 аминокислот в длину или более предпочтительно от 220 до 760, от 240 до 520, от 250 до 300 аминокислот в длину. В дополнительном предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, в соответствии с изобретением включает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, 7, 8 или 9 и аминокислотную последовательность короче, чем зрелый белок SLIT3.

Термин «зрелый белок SLIT3» имеет отношение к белку SLIT3 человека без сигнальной пептидной последовательности. Предпочтительно зрелый белок SLIT3 начинается с позиции 33 или 34 в последовательности SEQ ID NO:1 или начинается с позиции 1 или 2 в последовательности SEQ ID NO:2.

В некоторых воплощениях фактор, изменяющий направление роста, включает аминокислотную последовательность, которую выбирают из последовательностей SEQ ID NO: от 1 до 9 или которая имеет, по меньшей мере, 85% гомологии в аминокислотной последовательности с последовательностями SEQ ID NO:

от 1 до 9, в которой аминокислотная последовательность предпочтительно короче, чем зрелый белок SLIT3.

В другом предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, в соответствии с изобретением включает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность последовательностей SEQ ID NO:1 от 34 до 917 положения, от 47 до 863 положения, от 66 до 857 положения, от 279 до 863 положения, от 279 до 857 положения, от 279 до 724 положения, от 279 до 504 положения, от 311 до 432 положения, от 335 до 432 положения или от 312 до 437 положения. Более предпочтительно, фактор, изменяющий направление роста, в соответствии с изобретением включает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность последовательностей SEQ ID NO:1 от 308 до 413 положения, от 308 до 317 положения, от 331 до 340 положения, от 344 до 352 положения, от 357 до 366 положения, от 380 до 389 положения, от 394 до 402 положения или от 404 до 413 положения или их комбинации.

Дополнительно, факторы, изменяющие направление роста, в которых один или несколько Cys заменены другой аминокислотой, в особенности Ala, представляют собой предпочтительные факторы, изменяющие направление роста. Факторы, изменяющие направление роста, включающие последовательность, которую выбирают из последовательностей SEQ ID NO: от 1 до 9, в особенности из последовательностей SEQ ID NO: от 2 до 9, в которых один или несколько Cys заменены другой аминокислотой, в особенности Ala, представляют собой предпочтительные факторы, изменяющие направление роста. Последовательность SEQ ID NO:21, которая получена из последовательности SEQ ID NO:9 путем замещения Cys в положении 85 на Ala, представляет собой предпочтительный пример такого фактора, изменяющего направление роста.

В предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, негликозилирован, по меньшей мере, во втором обогащенном лейцином повторяющемся домене или в гомологичном обогащенном лейцином повторяющемся домене.

Термин «второй обогащенный лейцином повторяющийся домен» настоящего изобретения имеет отношение к консервативной обогащенной лейцином аминокислотной последовательности, присутствующей в белках SLIT. Обогащенный лейцином повторяющийся (LRR) домен белка SLIT3 состоит из четырех LRR (LRR1-4), фланкированных амино- и карбокси-концевыми консервативными участками (LRJR-NR и LRR-CR) (Itoh, et al., 1998; Howitt, et al., 2004; Hohenester, et al., 2006). Второй обогащенный лейцином домен охватывает аминокислотную последовательность от 248 до 467 положения последовательности SEQ ID 1. Гомологичный обогащенный лейцином повторяющийся домен имеет отношение к аминокислотной последовательности с консервативными аминокислотными заменами во втором обогащенном лейцином повторяющемся домене, гомологичному участку членов другого семейства SLIT, таких как белки SLIT1 и SLIT2, и/или имеет 80%, 85%, 90%, 95% гомологии к аминокислотной последовательности от 248 до 467 положения последовательности SEQ ID 1.

В дополнительном предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, в соответствии с настоящим изобретением не гликозилирован, более предпочтительно фактор, изменяющий направление роста, представляет собой рекомбинантный белок, полученный в *E.coli*.

В дополнительном предпочтительном воплощении дегенеративные заболевания,

предпочтительно дегенеративные заболевания хряща выбирают из группы, состоящей из дегенеративного заболевания межпозвоночного диска, слез мениска, повреждения передней крестообразной связки (ACL), артрита, остеоартрита, ревматоидного артрита, псориатического артрита, юношеского хронического артрита, псевдоартрита тазобедренного или плечевого сустава, ревматоидного полиартрита, виллезнодулярного синовита или синовита.

В другом предпочтительном воплощении суставной хрящ представляет собой гиалиновый суставной хрящ.

В предпочтительном воплощении несуставной хрящ выбирают из группы, состоящей из мениска и межпозвоночного диска.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция настоящего изобретения и/или фармацевтическая композиция, включающая изолированный полипептид по любому из воплощений изобретения, представляет собой композицию, которую вводят с помощью инъекции, которую предпочтительно локально вводят с помощью инъекции рядом с повреждением или несистематично, или даже более предпочтительно вводят внутрисуставно, в синовию и/или в синовиальную жидкость.

В дополнительном предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция настоящего изобретения и/или фармацевтическая композиция, включающая изолированный полипептид по любому из воплощений изобретения, представляет собой композицию, которую вводят с помощью инъекции, которую вводят систематически, например, с помощью внутривенного введения.

В специальном воплощении, фармацевтическую композицию вводят местно в область, нуждающуюся в лечении. Этого можно достигнуть, например, с помощью местной инфузии в ходе хирургического вмешательства, местного нанесения, с помощью инъекции, с помощью катетера или с помощью имплантата, указанного имплантата, пористого или непористого.

Другие способы введения фармацевтической композиции, охваченные настоящим изобретением, представляют собой внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, подкожный, интраназальный или пероральный пути введения. Адаптированный диапазон доз будет зависеть, среди прочего, от способов введения и возраста, массы и состояния пациента, которого лечат.

Подходящее количество полипептида, вводимого пациенту, предпочтительно равно от 0,001 мг/кг массы тела пациента до 100 мг/кг массы тела пациента, предпочтительно от 0,01 мг/кг массы тела пациента до 20 мг/кг массы тела пациента, более предпочтительно от 0,01 до 10 мг/кг массы тела пациента, наиболее предпочтительно от 0,1 мг/кг до 1 мг/кг массы тела пациента.

Фармацевтическая композиция, включающая факторы, изменяющие направление роста, настоящего изобретения, и/или фармацевтическая композиция, включающая изолированный полипептид по любому из воплощений, описанных ниже и выше, может быть в форме разнообразных композиций, например включать фармацевтически приемлемые носители. Примеры подходящих фармацевтических носителей описаны в руководстве «Remington's Pharmaceutical Sciences», (18th Ed., 1990, ISBN #: 0912734027, Mack Pub Co). Композиция может доставлять фактор, изменяющий направление роста, быстро или может быть композицией с замедленным высвобождением. Такие композиции могут содержать терапевтически эффективное количество фактора, изменяющего направление роста, вместе с подходящим количеством носителя, обеспечивая, таким образом, формы для правильного введения пациенту. Композиция должна подходить для способа введения. Независимо от

способа введения фактор, изменяющий направление роста, входит в состав композиции в приемлемых стандартных лекарственных формах с помощью общепринятых способов, известные специалистам в фармацевтической области техники. В предпочтительном воплощении фактор, изменяющий направление роста, вводят в состав в соответствии с рутинными процедурами для фармацевтической композиции для внутривенного введения людям. Обычно фармацевтические композиции для внутривенного введения включают солюбилизирующее средство, например стерильный изотонический водный буфер с местным анестетиком, таким как лигнокаин, или без него. В общем, ингредиенты поставляются или по отдельности, или смешанными в стандартных лекарственных формах, например, в виде высушенного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытых контейнерах, таких как ампула или пакетик. В случае если фармацевтическую композицию вводят с помощью инфузии, то она может быть распылена с помощью бутылочки для инфузии, содержащей солюбилизирующее средство.

В предпочтительном воплощении композиция включает водный раствор, солевой раствор, твердое вещество, полутвердое вещество, жидкость, пастообразную массу, лекарственные формы в виде пластического материала, дисперсии, суспензии, гели, липосомы, подложку, материал, сохраняющий форму, материалы, создаваемые *in situ*, биоматериал, представляющий собой тканевой клей, которые можно вводить с помощью инъекции, и представляют собой минимально инвазивные, а также пригодная для имплантации формы нанесения.

В некоторых других воплощениях фармацевтическую композицию настоящего изобретения выбирают из группы, состоящей из водного раствора, твердого вещества, полутвердого вещества, пасты, пластического материала, липосом, материала, сохраняющего форму, подложки, материалов, создаваемых *in situ*, биоматериала, представляющего собой тканевой клей.

В предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция включает фактор, изменяющий направление роста, и/или изолированный полипептид фактора, изменяющего направление роста, заключенный в липосомы. Композиции в виде липосом имеют по сравнению с растворами то преимущество, что белок защищен от деградации в биологическом окружении, кроме того, удлиняется срок действия терапевтического средства и замедляется клиренс в месте применения.

Липосомы обычно включают замкнутую липидную каплю, имеющую ядро, обычно содержащее соединение в водной среде. В некоторых воплощениях соединение химически связано с липидным компонентом или просто содержится во внутреннем водном компартменте липосомы.

Фармацевтические композиции, обеспечиваемые в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно обеспечивают в виде высушенной липосомной композиции, которая может быть реконструирована для получения липосом, в которые заключен фактор и/или полипептид, изменяющий направление роста, предпочтительно липосомный препарат представляет собой высушенные реконструируемые везикулы (DRV), которые после реконструкции в водном растворе образуют липосомы, в которые заключен белок. Липосомная композиция, примененная в этом документе, представляет собой, например, сухие гранулированные изделия, которые после добавления воды диспергируют для образования многослойных липосомных композиций, включающих биологически активный компонент. Предпочтительно проблем со стабильностью, таких как агрегация или окисление, удается избежать путем применения высушенных липосом.

Липиды, подходящие для применения в композициях, присутствующие индивидуально или в смесях, включают нейтральные или положительно заряженные липиды, такие как холестерин, фосфатидилхолин, тидрогенизированный фосфатидилхолин, дистеароилфосфатидилхолин, сфингомиелин, диолеилфосфатидилхолин, диолеилфосфатидилглицерин, фосфатидилглицерин, димиристоилфосфатидилхолин, дипальмитоилхолин, ганглиозиды, церамиды, фосфатидилинозитол, фосфатидные кислоты, диацетилфосфат, димиристоилфосфатидилхолин, стеариламин, дипальмитоилфосфатидилглицерин и другие похожие липиды. Предпочтительно липидная смесь представляет собой смесь заряженных липидов. Липосомная композиция обычно представляет собой смесь, по меньшей мере, из двух липидов, таких как холестерин и фосфатидилхолин, и чаще из трех или более липидов.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает изолированный полипептид, имеющий, по меньшей мере, 85%-ную гомологию аминокислотной последовательности, предпочтительно 90%-ную, более предпочтительно 95%-ную гомологию аминокислотной последовательности последовательностям SEQ ID NO: от 1 до 9, и в которой аминокислотная последовательность короче, чем зрелый белок SLIT3, предпочтительно в которой изолированный полипептид короче, чем 1523, предпочтительно короче, чем 1491, или короче, чем 900 аминокислот в длину, предпочтительно от 200 до 900 аминокислот в длину или более предпочтительно от 200 до 760, от 200 до 520, от 200 до 300 аминокислот в длину. В предпочтительном воплощении изолированный полипептид включает аминокислотную последовательность, которую выбирают из группы, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: от 1 до 9, более предпочтительно изолированный полипептид содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9, и в которых аминокислотная последовательность короче, чем зрелый белок SLIT3, предпочтительно в которых изолированный полипептид короче, чем 1523, предпочтительно короче, чем 1491, или короче, чем 900 аминокислот в длину, предпочтительно от 200 до 900 аминокислот в длину или более предпочтительно от 220 до 760, от 240 до 520, от 250 до 300 аминокислот в длину.

В предпочтительном воплощении настоящее изобретение дополнительно обеспечивает изолированный полипептид, который включает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 от 34 до 917 положения, от 47 до 863 положения, от 66 до 857 положения, от 279 до 863 положения, от 279 до 857 положения, от 279 до 724 положения, от 279 до 504 положения, от 311 до 432 положения, от 335 до 432 положения или от 312 до 437 положения.

Более предпочтительно, настоящее изобретение обеспечивает изолированный полипептид, который включает, по меньшей мере, аминокислотную последовательность последовательности SEQ ID NO: 1 от 308 до 413 положения, от 308 до 317 положения, от 331 до 340 положения, от 344 до 352 положения, от 357 до 366 положения, от 380 до 389 положения, от 394 до 402 или от 404 до 413 или их комбинации.

В предпочтительном воплощении изолированный полипептид и/или фактор, изменяющий направление роста, настоящего изобретения пегилирован. Таким образом, модифицированный полипептид и/или фактор, изменяющий направление роста, имеет более продолжительный период биологического полураспада, по сравнению с немодифицированным средством, и, следовательно, улучшает эффективность средства для медицинского лечения дегенеративных заболеваний.

Дополнительно снижается тенденция белка к агрегации.

Пегелирования достигают через стабильные ковалентные связи между amino- или сульфгидрильной группой в белке и химически реакционноспособной группой (карбонат, сложный эфир, альдегид или трезилат) на полиэтиленгликоле (PEG).

Полученная структура может быть линейной или разветвленной. PEG реагенты, например, описаны в работе Roberts et al. (Roberts, et al., 2002). Другие средства для пегелирования представляют собой, но не ограничиваются, метоксиполи(этиленгликоль) (mPEG), метил-PEO12-малеинимид-PEO, блокированные метилом полиэтиленоксид-(PEO)-содержащие модифицирующие средства с реакционноспособным амином (метил-PEOn-NHS сложные эфиры, n=4, 8, 12).

Могут быть также применены модифицированные и/или стабилизированные пептиды, такие как стабилизированные пептиды, имеющие модифицированные соединения для предотвращения деградации пептидов.

Настоящее изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию, включающую изолированный полипептид или фактор, изменяющий направление роста, по любому из описанных выше воплощений.

В другом предпочтительном воплощении изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию по любому из воплощений, в которых белок объединяют с основой, имплантом или системой доставки.

Носитель, имплантат или устройство для доставки, примененное в изобретении, предпочтительно биологически совместимы, в том смысле, что они не токсичны и не вызывает воспалительных реакций в организме. Они могут включать подложку или трехмерную подложку-носитель и могут быть твердыми, жидкими, гелем, пастой или другими лекарственными формами, вводимыми с помощью инъекции.

Предпочтительно, основа, имплантат или устройство для доставки включают гидрогель, такой, например, как описан в WO2005/113032, в особенности гидрогели, вводимые с помощью инъекции, сульфатированная гиалуроновая кислота, высокозамещенная карбоксиметилцеллюлоза и их соли, альгинат, гидроксипропилаьгинат, хитозан, гидроксипропилаьгинат, коллаген, желатин, обратные термальные гели (например, Pluronic F128), термочувствительный сополимер на основе хитозана (например, хитозан-Pluronic® гидрогель), пористый шелковый каркас, разнообразные микросферы, липосомная композиция и гидроксиапатитные пористые волокна.

В предпочтительном воплощении основа в соответствии с настоящим изобретением включает фибриновый гель, составленный из обогащенной тромбоцитами плазмы, обогащенная тромбоцитами плазма с поддающимся биологическому разложению желатиновым гидрогелем, композиты фибрин/гиалуроновая кислота, фактор, заключенный в микросферы из желатинового гидрогеля, вводимые с помощью инъекции поддающийся биологическому разложению гидрогелевые композиты, включающие, например, полимеры, такие как олиго(поли(этиленгликоль)фумарат, полилактид-(PLA) /полигликолевая кислота (PGA) и поли(эпсилон-капронолактон).

Предпочтительно основа включает хитозан-глицеролфосфат или стабилизированные in situ сгустки крови с хитозан-глицеролфосфатным раствором.

В еще одном воплощении система доставки включает поддающийся разложению гидрогелевый каркас, такой как желатиновые микрочастицы, полимер, основанный на поддающихся биологическому разложению и биологически совместимых гидрогелях, укрепленный полимером гибридный сгусток или другой полимер, основанный на поддающихся биологическому разложению и биологически совместимых

имплантатах, или системами доставки для доставки фактора, изменяющего направление роста, и/или изолированного полипептида настоящего изобретения.

Предпочтительные полимеры изобретения включают коллаген, хондроитина сульфат, гиалуроновую кислоту, гиалуронат, гиалуроновый эфир, бензиловый эфир гиалуроновой кислоты, олиго(поли)(этиленгликоль)фумарат, хитозан, хитозана глицеролфосфат, включая тройные сополимеры, такие как тойной сополимер желатин/хондроитин-6-сульфат/гиалуронат, или любые их комбинации.

В дополнительном воплощении фармацевтическую композицию составляют как композицию с замедленным высвобождением. В еще одном воплощении фармацевтическую композицию составляют как композицию с замедленным высвобождением, которая обеспечивает периодическое высвобождение.

Лечение дегенеративного заболевания может быть дополнительно улучшено путем стабилизации сгустка крови, сформированного при повреждении дегенерированной ткани полимером, который обладает тромбообразующей активностью и способен стимулировать процесс заживления раны. Следовательно, в дополнительном предпочтительном воплощении фармацевтическая композиция дополнительно включает, по меньшей мере, одно вещество, добавку или подложку с тромбообразующей активностью.

В дополнительном предпочтительном воплощении полимер представляет собой тромбообразующий полимер, и/или он стимулирует агрегацию и дегрануляцию тромбоцитов.

В другом предпочтительном воплощении полимер представляет собой кровоостанавливающее средство, более предпочтительно полимер представляет собой кровоостанавливающее средство и стимулирует реваскуляризацию тканей раны и/или восстановление соединительной ткани.

В еще одном воплощении полимер солюбилизируется в физиологических условиях и формирует твердый имплантат после смешивания с кровью. Эти имплантаты имеют то преимущество, что они лучше срастаются с тканевыми нарушениями, по сравнению с нормальными сгустками, и, следовательно, улучшают регенерацию хряща.

В некоторых воплощениях фармацевтическая композиция по любому из воплощений настоящего изобретения дополнительно включает клетки хряща, предпочтительно клетки в них хряща представляют собой хондроциты.

Совместное заключение в капсулу хондроцитов человека, полученных из различных тканей, например, из клеток уха, носа, ребра, клеток внутреннего мениска (IMC), клеток жирового тела (FPC), клеток синовиальной мембраны (SMC), хондроцитов суставов или хондроцитов других тканей, мезенхимальных стволовых клеток (MSC) и/или клеток костномозговой стромы человека, как в упомянутых выше воплощениях, так и в их комбинации, также представляет собой воплощение изобретения. В частности, эти клетки растут с факторами роста или без него для усиления хондрогенеза различных типов хондроцитов и затем индуцируют формирование хрящевой ткани после имплантации.

«Мезенхимальные стволовые клетки (MSC)» в соответствии с настоящим изобретением представляют собой популяцию примитивных или покоящихся клеток, которые свойственны многим зрелым тканям скелетам как некоммутированные мезенхимальные клетки-предшественники. MSC представляют собой лабильные клетки, обладающие способностью дифференцировать в некоторые типы зрелых тканей, включая хрящ, кость, жир и другие ткани, в зависимости от окружения и биологических сигналов, получаемых этими покоящимися клетками. MSC доступны из

многих аутологических источников, включая костный мозг, кровь, мышечную ткань и жир, из которых эти клетки могут быть получены и изолированы без существенных осложнений в области, из которой была получена ткань, или без иммунных осложнений.

Кроме того, проблему, лежащую в основе настоящего изобретения, решают с помощью применения полипептида по любому из описанных выше воплощений для производства фармацевтической композиции для предупреждения и/или лечения заболевания, такого как дегенеративное заболевание. В предпочтительном воплощении дегенеративные заболевания представляют собой такие дегенеративные заболевания, как приведены в любом из описанных выше воплощений. Предпочтительно дегенеративное заболевание представляет собой артрит, такое как остеоартрит или ревматоидный артрит, включая хронический или острый ревматоидный артрит.

В еще одном воплощении изобретение имеет отношение к применению фактора, изменяющего направление роста, по любому из упомянутых выше воплощений для воздействия на миграционное поведение мезенхимальных стволовых клеток.

Кроме того, изобретение охватывает применение фактора, изменяющего направление роста, по любому из упомянутых выше воплощений для индукции миграции или привлечения мезенхимальных стволовых клеток.

Предпочтительно, изобретение имеет отношение к применению фактора, изменяющего направление роста, по любому из упомянутых выше воплощений для индукции образования хряща и/или для стимуляции пролиферации или дифференциации хондроцитов.

Изобретение дополнительно включает изолированный полипептид, включающий консенсусную последовательность

$C(Y)_3CYS(Y)_6C(Y)_{99}C(Y)_{47}CYS(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{13-22}C$.

Изолированный полипептид, включающий консенсусную последовательность $C(Y)_3CYS(Y)_6C(Y)_{99}C(Y)_{47}CYS(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{13-22}C$, в которой C обозначает цистеин и Y обозначает любую аминокислоту, в которой, по меньшей мере, один цистеин замещен любой другой аминокислотой за исключением цистеина, дополнительно представляет собой предпочтительный полипептид. Путем замещения, по меньшей мере, одного цистеина другой аминокислотой можно повлиять на фолдинг последовательности и/или образование димера этой последовательностью.

Изобретение дополнительно обеспечивает фармацевтическую композицию для генной терапии для предупреждения и/или лечения дегенеративного заболевания, включающей DNA гена фактора, изменяющего направление роста, или ее части, кодирующие фактор, изменяющий направление роста, или его активный фрагмент, который обладает терапевтическим влиянием на дегенеративное заболевание, такое как одно из заболеваний, описанных в рамках изобретения.

В соответствии с фармацевтической композицией настоящего изобретения DNA гена фактора, изменяющего направление роста, или ее части могут быть обеспечены предпочтительно с помощью ретровирусного вектора, аденовирусного вектора, ассоциированного с аденовирусом вирусного вектора (AAV), вирусного вектора простого герпеса (HSV), вирусного вектора лейкоза мышей (MLV), лентивирусного вектора или с помощью плазмиды, которая может быть экспрессирована в клетках человека или в рекомбинантной клетке, которую трансформировали или трансфицировали рекомбинантным вектором, включающим DNA, которая кодирует фактор, изменяющий направление роста, или его активный фрагмент, с целью

нанесения фактора, изменяющего направление роста, местно на пораженную ткань (местное введение), систематически или непрерывно.

Термин «DNA гена фактора, изменяющего направление роста», означает DNA, которая кодирует фактор, изменяющий направление роста, или его активный фрагмент. Термин не ограничен природной изолированной DNA, но также включает любую форму модификации природной нуклеотидной последовательности, которая после трансляции формирует полипептид по любому из воплощений настоящего изобретения или которая формирует полипептид, который сохраняет активность фактора, изменяющего направление роста, предпочтительно дополнительно к элементам для экспрессии регуляции, функционально связанной с нуклеиновыми кислотами (например, элементы индуцируемого промотора и/или элемент(элементы) энхансера), подходящие для цели настоящего изобретения. Рекомбинантный вектор также может включать нуклеотидную последовательность для сигнального пептида, необходимого для секреции полипептида из клетки. Вектор может дополнительно включать один или несколько избранных генов-маркеров или генов-репортеров.

DNA может быть получена из фактора, изменяющего направление роста, человека, мыши, крысы или другого позвоночного. Нуклеотидные последовательности, кодирующие эти белки, доступны специалистам. Предпочтительно, чтобы DNA была получена из фактора, изменяющего направление роста, человека. Последовательности могут быть, например, найдены в базах данных GenBank, SwissProt и в других базах данных. Они могут представлять собой cDNA или геномную DNA и клоны, включающие нуклеиновые последовательности, которые могут быть получены из банков клеток, таких как ATCC, или могут быть клонированы с помощью PCR-подходов, или могут быть синтезированы химически. Последовательность DNA может быть дополнительно оптимизирована для частоты использования кодона.

Примеры DNA последовательностей для факторов, изменяющих направление роста, представляют собой GI4507060 (Slit1), GI4759145 (Slit2), GM 1321570 (Slit3), GM48613883 (Netrini) или нуклеиновые кислоты, представляющие собой их фрагменты.

Предпочтительно рекомбинантные клетки представляют собой аутологические фибробласты синовиального слоя, клетки кожи, костного мозга, лимфоциты или дендритные клетки. Наиболее предпочтительно, рекомбинантные клетки представляют собой аутологические фибробласты синовиального слоя, клетки кожи или дендритные клетки.

В одном из воплощений настоящее изобретение обеспечивает фармацевтическую композицию и ее применение для местной доставки молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих фактор, изменяющий направление роста, или его активный фрагмент в пораженную ткань, такую как пораженные артритом суставы, в особенности в ревматоидный синовиальный слой. В особенности, фармацевтическая композиция и ее применение облегчают эффективную трансфекцию или трансформацию молекул нуклеиновой кислотой, кодирующих фактор, изменяющий направление роста, в клетки ткани, такие как синовиальные клетки, в терапевтически эффективном количестве и в течение достаточного периода времени с предпочтительно высокой экспрессией терапевтического белка клетки-мишени.

Предпочтительно вектор или плазмиду не интегрируют в геном трансформированной клетки, например, для экспрессии белка по внехромосомному типу.

Предпочтительно вектор или плазмиду стабильно интегрируют в геном трансформированной клетки и предпочтительно обеспечивают долговременное и/или

замедленное высвобождение терапевтического белка.

Местное введение фармацевтической композиции в пораженную ткань, такую как пораженный артритом сустав, предпочтительно имеет отношение к введению *in vivo* или *ex vivo* в пораженный артритом синовиальный слой. Доставка нуклеиновой кислоты *ex vivo* включает трансформацию аутологической или неаутологической синовиальной клетки вирусным вектором или трансфекцию плазмидой, которая включает нуклеиновую кислоту, кодирующую фактор, изменяющий направление роста, или ее части, отбор трансформированных клеток и введение трансформированных клеток в ревматоидный сустав субъекта, например, с помощью реимплантации, инъекции или реинфузии клеток в сустав субъекта. Введение *in vivo* имеет отношение к прямому введению вектора или плазмиды, включающей нуклеиновую кислоту, кодирующую фактор, изменяющий направление роста, или ее части в сустав субъекта, например, с помощью внутрисуставной инъекции. Преимущество местного введения заключается в том, что можно применять меньшее количество генного продукта, и, таким образом, меньшее количество вектора требуется для лечения индивидуальных суставов.

Для систематической доставки вектор предпочтительно вводить во внесуставную область, например, с помощью внутримышечной, подкожной или внутривенной инъекции с помощью единственной инъекции или повторных инъекций или инфузии.

Предпочтительно фармацевтическая композиция описанных выше воплощений дополнительно включает дополнительные фармацевтически приемлемые эксипиенты, такие как, но не ограничиваясь, физиологические жидкости, вода, солевые растворы, буферы, эмульгаторы, стабилизаторы, лиофилизирующие средства и им подобные.

Альтернативно, фармацевтическая композиция для генной терапии для предупреждения и/или лечения дегенеративного заболевания, включающая DNA гена фактора, изменяющего направление роста, или ее части, которые кодируют фактор, изменяющий направление роста или его активный фрагмент, вводят внутрь липосом и вводят с помощью инъекции непосредственно в область сустава, в которой липосомы сливаются с синовиальными клетками, что приводит к *in vivo* экспрессии фактора, изменяющего направление роста, по любому из приведенных выше воплощений.

Предпочтительно фармацевтическую композицию по любому из описанных выше воплощений вводят с помощью инъекции в виде оголенной DNA.

Изобретение дополнительно проиллюстрировано с помощью фигур и примеров, которые предназначены только для иллюстративных целей, а не для ограничения объема настоящего изобретения.

Фиг.1 показывает ингибиторный эффект нетрина1 на миграцию синовиальных фибробластов. Влияние нетрина1 на OA (A) и RA (B) синовиальные фибробласты на 3-ем пассаже и 10-ом пассаже определяют с помощью анализа в камере Бойдена. NETRIN 1 наносят в верхнюю или в нижнюю ячейку, соответственно.

Фиг.2 показывает миграцию OASF и RASF после добавления белка SLIT3, определяемую с помощью анализа миграции в камере Бойдена.

Инкубация с белком Slit3 (0,1 мкг/мл) снижает миграцию OASF на ранних пассажах (P3 и P4) до примерно 60% (Slit3 в верхнюю ячейку вместе с OASF) по сравнению с контролем и до примерно 40% (Slit3 в нижнюю ячейку). В эксперименте с RASF (P3/P4) Slit3 снижает миграцию до примерно 45% (Slit 3 в верхнюю ячейку) и 50% (Slit3 в нижнюю ячейку), соответственно.

Фиг.3 показывает влияние белка SLIT3 на пролиферацию синовиальных фибробластов у пациентов с остеоартритом (OASF) и у пациентов ревматоидным

артритом (RASf). Инкубация с белком Slit3 (0,1 мкг/мл) вместе с OASF и RASF слабо снижает рост OASF и RASF.

Фиг.4 показывает дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток человека (HMSC) после добавления Slit3.

А Slit3 увеличивает экспрессию агреккана после 7 дней лечения.

В TGFβ-индуцированная дифференциация HMSC в направлении хондроцитов дополнительно усиливается обработкой Slit3, согласно анализу экспрессии MIA.

Фиг.5 показывает анализ с помощью SDS PAGE экспрессии конструктора LRR2, экспрессированного с системой RTS 500 (Roche Molecular Biochemicals).

Дорожка 1: рекомбинантный белок RTS 500 (без His-Tag) в качестве контроля, 10 мкл.

Дорожка 2: рекомбинантный фрагмент LRR2 белка SLIT3, 10 мкл.

Дорожка 3: рекомбинантный фрагмент LRR2 белка SLIT3, 1 мкл.

Дорожка 4: рекомбинантный мышинный Slit3 (250 нг; R&D Systems).

Фиг.6 показывает опосредуемое белком SLIT3 ингибирование миграции MeI Im (R&D Systems) и клеток A 375 с помощью Slit3 (R&D Systems), LRR2, LRR2 dNC.

Фиг.7 и 8 показывают сниженную миграцию OASF и RASF при анализе миграции в камере Бойдена (в соответствии с примерами 2 и 5) на ранних пассажах при лечении с помощью Slit3 (R&D Systems, фиг.7, фиг.8, дорожка 2, LRR2 (фиг.7, фиг.8, дорожка 3), LRR2 dNC (фиг.7, фиг.8, дорожка 4), LRR 2dNCmut (фиг.8, дорожка 5) и LRR3 (фиг.8, дорожка 6). Дорожка 1: контроль.

Фиг.9 показывает ингибирование разрушения хряща, определяемое как уровень белка GAG в супернатанте ОА синовиальных фибробластов после совместного культивирования с различными белками, изменяющими направление роста.

Дорожка 1: хрящ, контроль (без ОА синовиальных фибробластов).

Дорожка 2: ОА синовиальные фибробласты.

Дорожка 3: ОА синовиальные фибробласты + нетрин1.

Дорожка 4: ОА синовиальные фибробласты + mSlit3.

Дорожка 5: ОА синовиальные фибробласты + LRR2 dNCmut.

Пример 1. Выделение первичных синовиальных фибробластов человека

Образцы синовиальной ткани получают путем синовэктомии и артропластической хирургии от четырех пациентов с РА и четырех пациентов с ОА (Клиника ортопедической хирургии, Schulthess Clinics, Zuerich, Switzerland) после согласования с местным комитетом по этике и с его одобрения. Диагноз ОА ставят в соответствии с клиническими и радиологическими критериями. Все РА пациенты отвечали критерию Американской коллегии ревматологии от 1987 в отношении диагноза РА. У ОА пациентов синовиальную ткань получают из бедренного и коленного суставов, демонстрирующих сужение щели сустава на последней стадии, тогда как у РА пациентов образцы материала получают из запястья или проксимальных межфаланговых суставов, из суставов, демонстрирующих багровый синовит и/или артритные разрушения. Синовиальную ткань измельчают механически, многократно промывают в стерильном солевом растворе с фосфатным буфером (PBS) и подвергают энзиматическому разрушению в присутствии 150 мг/мл Диспазы II (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) в течение 1-го часа при 37°C при постоянном перемешивании. Полученную суспензию клеток высевают на чашки для культуры тканей и культивируют в среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM; Gibco Life Technologies, Basel, Switzerland), содержащей 10%-ную фетальную сыворотку теленка и 100 Ед./мл пенициллина на 100 мкг/мл стрептомицина во влажной атмосфере

при 37°C, с последующим добавлением 5%-ного CO₂. На третьем, пятом и десятом пассаже прикрепленные фибробласты промывают, трипсинизируют и применяют для выделения RNA или для исследований. В качестве контроля применяют фибробласты

5 Пример 2. Ингибирование миграции первичных синовиальных фибробластов человека из RA- и ОА-пациентов

Способность факторов, изменяющих направление роста, ингибировать миграцию синовиальных фибробластов, полученных от пациентов с остеоартритом и

10 ревматоидным артритом, исследуют в миграционном анализе.
Влияние факторов, изменяющих направление роста, на миграцию клеток исследуют с помощью анализа в камере Бойдена, содержащей поликарбонатные фильтры с размером пор, равным 8 мкм (Costar, Bodenheim, Germany), в точности так, как было описано ранее (Jacob, et al., 1995). Фильтры покрывают желатином. Нижнюю ячейку
15 заполняют средой, подходящей для фибробластов, применяемых в качестве хемоаттрактантов. Клетки собирают с помощью трипсинизации в течение 2 мин, ресуспендируют в DMEM без FCS до плотности, равной 2×10^5 клеток/мл, и помещают в верхнюю ячейку камеры. После инкубация при 37°C в течение 4 часов фильтры
20 собирают и клетки, прикрепившиеся к нижней поверхности, фиксируют, окрашивают и подсчитывают. Фактор, изменяющий направление роста, например рекомбинантный нетрин1 (рекомбинантный белок нетрин1 человека, полученных из клеток НЕК293, аминокислоты 28-604, с N-концевой Flag-меткой, Alexis Biochemicals),
25 Slit3 (рекомбинантный белок SLIT3 мыши, Ser27-His901, R&D Systems) добавляют как в верхнюю, так и в нижнюю ячейку систему в концентрации, равной 0,1 мкг/мл.

Известно, что фенотипические изменения в синовиальных фибробластах имеют место при культивировании *in vitro* и что эти клетки постепенно теряют свой агрессивный фенотип за время роста *in vitro* (Zimmermann et al., 2001). Следовательно,
30 авторы изобретения хотели получить свежеизолированные синовиальные фибробласты с фенотипическими характеристиками, как можно более близкими к конфигурации, наблюдаемой *in vivo*, и проанализировать влияние факторов, изменяющих направление роста на миграцию, применяя клетки на ранних и поздних пассажах.

35 Эти эксперименты ясно продемонстрировали ингибирующее влияние этих факторов на миграцию свежеизолированных синовиальных фибробластов синовиальной ткани человека, полученных от пациентов с RA и ОА.

Результаты представлены на фиг.1 и 2.

40 Как показано на фиг.1 (А) и фиг.1 (В), наблюдается сильное ингибирование миграции RA и ОА синовиальных фибробластов на ранних пассажах (пассаж 3), тогда как фибробласты, полученных из здоровых доноров или из более высоких пассажей, не подвержены воздействию. Эффекты видны после добавления рекомбинантного нетрина1 в верхнюю и нижнюю ячейку, соответственно, следовательно, нетрин1
45 оказывает воздействие не на хемотаксис, а на молекулярные процессы миграции.

Эти результаты, представленные здесь, подтверждают тот факт, что нетрин снижает миграционную способность клеток, потенциально, за счет отталкивания клеток.

50 На фиг.2 представлены результаты анализа миграции OASF и RASF и влияние направляющего фактора Slit3 на клетки. На ранних пассажах (P3 и P4) зарегистрировано сильное ингибирующее влияние белка SLIT3 как на OASF, так и на RASF (n=2) по сравнению с необработанными клетками. Этот эффект виден не

только в присутствии белка SLIT3 в верхней ячейке вместе с SF, но также при комбинации белка SLIT3 с подходящей для фибробластов средой, применяемой в качестве хемоаттрактанта, в нижней ячейке.

Пример 3. Влияние рекомбинантных белков Slit 3 и нетрина1 на пролиферацию OASF и RASF

Пролиферация измеряют с помощью набора II для изучения пролиферации клеток (Cell Proliferation Kit II (Roche)) в соответствии с инструкциями производителя. Методика основана на нерадиоактивном, основанном на колориметрических измерениях, количественном анализе (ХТТ) пролиферации клеток, который выполняется в течение четырех дней. Рекомбинантный Slit3 или нетрин1 добавляют в концентрации, равной 0,1 мкг/мл. Исследования пролиферации клеток показали, что рассчитанное время удвоения равно примерно 4,5 дням (d) для OASF и 3,5 дням для RASF. Обработка с помощью Slit3 приводит к слабому ингибированию пролиферации, клеточный рост замедляется до примерно 1 дня для OASF и RASF после обработки в присутствии Slit3 (фиг.3). Слабое ингибирование клеточного роста также видно после обработки в присутствии NETRIN1; однако влияние не существенно.

Пример 4. Дифференциация мезенхимальных стволовых клеток человека (HMSC)

Для оценки влияния белка SLIT3 на дифференциацию клетки HMSC поддерживают в культуре в виде осадка и обрабатывают с помощью Slit3, TGFβ или Slit3fTGFβ, соответственно. Slit3 увеличивает экспрессию агрекана после 7-дневной обработки и MIA после 21-дневной обработки без индукции с помощью TGFβ (фиг.4). TGFβ-индуцированная дифференциация HMSC в направлении хондроциты слабо усиливается обработкой Slit3 согласно анализу экспрессии MIA (фиг.4 B).

Пример 5. Экспрессия конструкторов SLIT3 в системе RTS

Для анализа того, могут ли быть применены также фрагменты белка SLIT3 в качестве фармацевтически активного ингредиента для производства

фармацевтического изделия для лечения RA, были созданы различные SLIT3-конструкты человека и протестированы в функциональных анализах в соответствии с примерами 1-4, применяя клетки MeI Im, первичные клетки A375 человека, клетки RASF и OASF и HMSC и пример 9. Все конструкты были созданы с помощью PCR амплификации cDNA, полученной из RNA, изолированной из хондроцитов человека или фибробластов синовиоцитов от множества доноров.

Конструкт LRR1-4 (SEQ ID NO:7) амплифицируют, применяя праймеры 5' GAC CAT ATG GCC CCT GCC CCA CCA AGT GTA CC 3' и 5' GAC CCC GGG ATT GCA TTT GGC CAC AAT G 3', конструкт LRR2 (SEQ ID NO:8), применяя праймеры 5' GAC CAT ATG ATC TCC TGC CCT TCG CCC TGC 3' и 5' GAC CCC GGG GAA GCA CTC GCT GCT GAA CC 3', конструкт LRR2 dNC (SEQ ID NO:9), применяя праймеры 5' GAC CAT ATG ATC GTC GAA ATA CGC CTA GAA C 3' и 5' GAC CCC GGG TGG GTT TTG GGC TAA GTG GAG 3', и конструкт LRR3, применяя праймеры 5' GAC CAT ATG GAC CTC GTG TGC CCC GAG AAG 3' и 5' GAC CCC GGG GCT CAG CTG GCA GCT ACT CTC 3'. LRR2 dNCmut (SEQ ID NO:21), в котором оставшийся Cys заменяют на Ala (Cys85Ala), клонируют с помощью сайт-специфического мутагенеза, с помощью набора для выполнения сайт-направленного мутагенеза (QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands)) и праймеры 5' CCA ACA AGA TCA ACG CCC TGC GGG TTA ACA CGT TTC AGG 3' и 5' CCT GAA ACG TGT TAA CCC GCA GGG CGT TGA TCT TGT TGG 3'. Фрагменты клонируют в участок NdeI и SmaI вектора экспрессии pIVEX2. 3-MSC и инсерционные последовательности проверяют с помощью секвенирования. С-концевые HIS-меченые SLIT3 белки экспрессируют в

систему RTS 500 system (Roche Molecular Biochemicals). In vitro транскрипцию и трансляцию проводят в соответствии с инструкцией производителя. Экспрессию белка анализируют с помощью Вестерн-блоттинга (SDS PAGE), применяя различное количество белка (1 мкл, 10 мкл), полученного с помощью системы экспрессии RTS 500 (фиг.5). Активность фрагментов белка, полученного с помощью системы RTS 500, исследуют в анализе миграции а) применяя клетки MeI Im (описанные Jacob, et al., 1995), б) клетки A375 (CRL1619, ATCC) и с) клетки OASF и RASF по примеру 2, с помощью анализа в камере Бойдена, как описано в примере 2, за исключением того, что 1 мкл полученного белка в соответствии с системой RTS 500 добавляют или в верхнюю, или в нижнюю ячейку системы. Как показано на фиг.6А и В, фиг.7 и фиг.8, при применении Slit3, LRR2, LRR2 dNC и LRR2 dNCmut наблюдали ингибирование миграции всех клеточных линий. Удивительно, но белок LRR2 dNC, который утратил N- и C-концевые стабилизирующие части последовательности белка SLIT3, как и белок LRR2 dNCmut (вариант с заменой Cys85Ala), также ингибирует миграцию синовиальных фибробластов, следовательно, только минимальный связывающий домен белка, включающий часть вторичной структуры, достаточен для проявления ингибиторного эффекта.

Пример 6. Экспериментальные модели на животных для лечения ревматоидного артрита (RA)

Миграция, разрушительное поведение синовиальных фибробластов и влияние факторов, изменяющих направление роста, настоящего изобретения могут быть проанализированы с помощью различных моделей на животных. Хорошо разработанная модель для анализа новых биологических лекарственных средств для лечения ревматоидного артрита (RA) представляет собой модель индуцированного коллагеном артрита (CIA) у грызунов, например у крыс или мышей (Bendele et al., 2000). RA индуцируют у самок крыс с помощью внутрикожной/подкожной инъекции бычьего коллагена типа II в неполном адьюванте Фрейнда. После развития заболевания крысам вводят фактор, изменяющий направление роста, с помощью системы доставки с замедленным высвобождением, такой, например, как липосомы, или в солевом растворе (PBS) или подкожно, или внутривенно. Лечение может быть проанализировано путем определения опухания голеностопного сустава и регистрации воспалительного процесса, а также путем гистологической оценки суставов в баллах после декальцификации.

Альтернативная модель представляет собой модель совместной имплантации на мышцах с тяжелым комбинированным иммунодефицитом (SCID). RASF человека и свежеизолированный хрящ человека совместно имплантируют вместе с инертной губкой (например, коллагеновой губкой) под почечную капсулу мышей SCID, и этих мышей содержат в течение 60 дней (Huber, et al., 2006). Клетки RASF захватывают и разрушают суставной хрящ человека.

Третья примененная модель представляет собой индуцированную антителами модель артрита, в которой внутривенная инъекция смеси моноклональных антител к коллагену типа II в LPS/PBS индуцирует RA у мышей, например у Balb/c мышей (Terato, et al., 1992).

Четвертая модель представляет собой модель хронического OVA-индуцированного или индуцированного антигеном артрита у кроликов (Podolin, et al., 2002). Животных сенсибилизируют с помощью подкожной инъекции 10 мг OVA в 2 мл CFA и поддерживают путем внутрикапсулярного введения OVA в IFA через каждые 3-4 недели. Животным с положительным кожным тестом вводят OVA в PBS внутрь

коленного сустава. Кролики получают перорально фактор, изменяющий направление роста, например, фрагмент SLIT3, или носитель. Для измерения эффекта соединения проводят определение синовиальных жидкостей для всех подсчитанных клеток, анализ дифференциации клеток, измерения уровня эйкозаноид/цитокина и измерения диаметра колена с помощью кронциркулей. Образцы крови отбирают перед введением и после введения соединения.

В случае, когда соединение тестируют на его участие в изменении миграции синовиальных фибробластов и способность лечить артрит, указанное соединение может быть добавлено в систему необязательно в солевом растворе или в виде фармацевтической композиции, такой как липосомный препарат.

Пример 7. Экспериментальная модель на животном для лечения остеоартрита (ОА)

Модель на животном для лечения остеоартрита представляет собой модель рассечения передней крестообразной связки кролика. Под общим наркозом и в стерильных условиях коленный сустав кроликов достигают посредством медиального парапателлярного разреза (между медиальной коллатеральной связкой и связкой надколенника). Надколенник смещают латерально и расположенное под коленной чашкой жировое тело освобождают и оттягивают, для того чтобы открыть неповрежденную переднюю крестообразную связку.

Хирургическое вмешательство и инъекции проводят по следующему протоколу: по 6 животных на группу (симуляция, основа и фактор, изменяющий направление роста). Животному вводят 1 или несколько (например, 5) инъекций, предпочтительно, каждые 10 дней. Животных забивают через 10 дней после последней инъекции и получают рентгенограммы.

Следующим шагом готовят образцы для гистологических исследований путем окрашивания сафранином О прочным зеленым и гематоксилином и эозином (например, фиксация 10%-ным нейтральным формалином в буферном растворе, декальцинирование с EDTA и заливка в парафин).

Пример 8. Доставка гена *in vivo*

Векторы для генной терапии могут быть сконструированы с помощью общепринятых в молекулярной биологии способов. Невирусная и вирусная трансформация синовиальных фибробластов описана, например, в работе Meinecke et al., 2007, включенной в настоящий документ путем отсылки. Местная внутрисуставная генная терапия может быть проанализирована с помощью различных моделей ревматоидного артрита и остеоартрита на животных, таких как, но не ограничиваясь, модели, описанные в примерах 6 и 7.

Каждая патентная заявка и патент, процитированные в этом тексте, а также каждый документ или ссылка, процитированные в этом тексте, недвусмысленным образом включены этим в настоящий документ путем отсылок и могут быть применены при практическом применении изобретения («ссылки, процитированные в настоящем документе»). Каждый из процитированных документов или ссылок, а также патентные заявки и патенты, и патенты, процитированные в процитированных ссылках, недвусмысленным образом включены этим в настоящий документ путем отсылок.

Поскольку предпочтительные воплощения были проиллюстрированы и описаны, следует понимать, что специалистом этой области техники могут быть внесены модификации без отклонения от изобретения в его более широком аспекте, как определено в формуле изобретения.

Пример 9. Ингибирование высвобождения GAG

Образцы хряща человека (кубик с длиной грани, равной 5 мм, 4 кубика для каждой обработки (50 мг)) инкубируют с ОА синовиальными фибробластами (50000 клеток) или без них. Образцы с ОА SF дополнительно обрабатывают или нетрином1, белком mSlit3 или LRR2 dNCmut, соответственно. Супернатант отбирают через 6 дней культивирования и концентрацию GAG измеряют с помощью коммерчески доступного набора для количественного измерения GAG-ELISA (Euro-Diagnostica, Maimo, Sweden; Wieslab sGAG quantitative Kit). Результаты показаны на фиг.9.

Список литературы

Bendele AM, Chlipala ES, Scherrer J, Frazier J, Sennello G, Rich WJ and Edwards CK, III (2000) Combination benefit of treatment with the cytokine inhibitors interleukin-1 receptor antagonist and PEGylated soluble tumor necrosis factor receptor type I in animal models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43(12):2648-2659.

Hohenester E, Hussain S and Howitt JA (2006) Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. *Biochem Soc Trans* 34:418-421.

Howitt JA, Clout NJ and Hohenester E (2004) Binding site for Robo receptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. *Embo J* 23:4406-4412.

Huber LC, Distler O, Tamer I, Gay RE, Gay S and Pap T (2006) Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 45:669-675.

Itoh A, Miyabayashi T, Ohno M and Sakano S (1998) Cloning and expressions of three mammalian homologues of Drosophila slit suggest possible roles for Slit in the formation and maintenance of the nervous system. *Brain Res Mol Brain Res* 62: 175-186.

Jacob K, Bosserhoff AK, Wach F, Knuchel R, Klein EC, Hein R and Buettner R (1995) Characterization of selected strongly and weakly invasive sublines of a primary human melanoma cell line and isolation of subtractive cDNA clones, *Int J Cancer* 60(5):668-675.

Katoh Y and Katoh M (2005) Comparative genomics on SLIT1, SLIT2 and SLIT3 orthologs. *OncolRep* 14(5):1351-1355.

Klagsbrun M and Eichmann A (2005) A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:535-548.

Kuroda R, Ishida K, Matsumoto T, Akisue T, Fujioka H, Mizuno K, Ohgushi H, Wakitani S and Kurosaka M (2007) Treatment of a full-thickness articular cartilage defect in the femoral condyle of an athlete with autologous bone-marrow stromal cells. *Osteoarthritis Cartilage* 15(2): 226-231.

Little MH, Wilkinson L, Brown DL, Piper M, Yamada T and Stow JL (2001) Dual trafficking of Slit3 to mitochondria and cell surface demonstrates novel localization for Slit protein. *Am J Physiol Cell Physiol* 281: C486-C495.

Meinecke, I., Rutkauskaitė, E., Cinski, A., Muller-Ladner, U., Gay, S., and Pap, T. (2007). Gene transfer to synovial fibroblast: methods and evaluation in the SCID mouse model. *Methods Mol. Med.* 135: 393-412.

Morlot, C., Hemrika, W., Romijn, R.A., Gros, P., Cusack, S., and McCarthy, A.A. (2007). Production of Slit2 LRR domains in mammalian cells for structural studies and the structure of human Slit2 domain 3. *Acta Crystallogr. D. Biol Crystallogr.* 63: 961-968.

Pap T (2003) New insights into integrin signalling: implications for rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 5: 154-155;

Pap T (2007) [Regulation of apoptosis in aggressive fibroblasts.]. *Z Rheumatol* 66: 239-242.

Podolin PL, Bolognese BJ, Foley JJ, Schmidt DB, Buckley PT, Widdowson KL, Jin Q, White JR, Lee JM, Goodman RB, Hagen TR, Kajikawa O, Marshall LA, Hay DW and Sarau HM (2002) A potent and selective nonpeptide antagonist of CXCR2 inhibits acute and chronic models of arthritis in the rabbit. *J Immunol* 169: 6435-6444.

Roberts MJ, Bentley MD and Harris JM (2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 54:459-476.

Terato K, Hasty KA, Reife RA, Cremer MA, Kang AH and Stuart JM (1992) Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J Immunol* 148(7):2103-2108.

5 Vargesson N, Luria V, Messina I, Erskine L and Laufer E (2001) Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev* 106:175-180.

Yasuda T (2006) Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 16: 197-205.

10 Zimmermann T, Kunisch E, Pfeiffer R, Hirth A, Stahl HD, Sack U, Laube A, Liesaus E, Roth A, Palombo-Kinne E, Emmrich F and Kinne RW (2001) Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture - primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res* 3: 72-76.

15 Формула изобретения

1. Применение белка SLIT при производстве фармацевтической композиции для предупреждения или лечения повреждений хряща.

2. Применение по п.1, где белок SLIT представляет собой а) фрагмент SLIT3 с
20 аминокислотной последовательностью SEQ ID NO:1, b) активный фрагмент SLIT3 с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, 8, 9 или 21.

3. Применение по п.1, где белок SLIT является агонистом или антагонистом ROBO-рецептора.

4. Применение по п.1 при производстве фармацевтической композиции для
25 предупреждения или лечения повреждений хряща, где повреждения хряща связаны с инфильтрацией или миграцией синовиальных фибробластов внутрь суставного или несуставного хряща или связаны с образованием паннуса.

5. Применение по п.1, где повреждения хряща представляют собой дегенеративные
30 заболевания, связанные с ослабленным прикреплением клеток к суставному или несуставному хрящу.

6. Применение по п.1, где заболевание выбирают из группы, состоящей из дегенеративного заболевания межпозвоночного диска, слез мениска, повреждения передней крестообразной связки (ACL), артрита, остеоартрита, ревматоидного
35 артрита, псориатического артрита, юношеского хронического артрита, псевдоартрита тазобедренного или плечевого сустава, ревматоидного полиартрита, синовита или виллезонодулярного синовита.

7. Применение по п.1, где белок SLIT не гликозилирован, по меньшей мере, во
40 втором обогащенном лейцином повторяющемся домене или гомологичном обогащенном лейцином повторяющемся домене.

8. Применение по п.1, где фармацевтическую композицию вводят инъекцией.

9. Применение по п.8, где фармацевтическую композицию вводят инъекцией для
внутрисуставного введения или для введения в синовию.

10. Применение по любому из пп.1-9, где фармацевтическую композицию выбирают
45 из группы, состоящей из водного раствора, твердого вещества, полутвердого вещества, пасты, пластического материала, липосом, материала, сохраняющего форму, подложки, материала, образующегося in situ, или биоматериала, представляющего собой тканевой клей.

11. Применение по любому из пп.1-9, где фармацевтическая композиция
50 дополнительно включает фармацевтически приемлемый носитель.

12. Применение по любому из пп.1-9, где белок SLIT комбинируют с носителем,

имплантатом или системой доставки.

13. Применение по любому из пп.1-9, где фармацевтическая композиция дополнительно включает, по меньшей мере, одно вещество, добавку или подложку с тромбообразующей активностью.

5

14. Применение по любому из пп.1-9, где фармацевтическая композиция дополнительно включает клетки хряща.

15. Применение по п.14, где клетки хряща представляют собой хондроциты.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Scil Technology GmbH
 <120> Neuroendocrine factors for treatment of degenerative diseases
 <130> 40794P PCT
 <150> 07018131.8
 <151> 2007-09-14
 <150> 08006810.9
 <151> 2008-04-03
 <160> 21
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 1523
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Ala Pro Gly Trp Ala Gly Val Gly Ala Ala Val Arg Ala Arg Leu
 1 5 10 15
 Ala Leu Ala Leu Ala Leu Ala Ser Val Leu Ser Gly Pro Pro Ala Val
 20 25 30
 Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His
 35 40 45
 Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu
 50 55 60
 Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp
 65 70 75 80
 Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln
 85 90 95
 Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu
 100 105 110
 Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu
 115 120 125
 Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln
 130 135 140
 Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys
 145 150 155 160
 Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala
 165 170 175

Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn
 180 185 190
 Ile Ser Arg Ile Leu Val Thr Ser Phe Asn His Met Pro Lys Ile Arg
 195 200 205
 Thr Leu Arg Leu His Ser Asn His Leu Tyr Cys Asp Cys His Leu Ala
 210 215 220
 Trp Leu Ser Asp Trp Leu Arg Gln Arg Arg Thr Val Gly Gln Phe Thr
 225 230 235 240
 Leu Cys Met Ala Pro Val His Leu Arg Gly Phe Asn Val Ala Asp Val
 245 250 255
 Gln Lys Lys Glu Tyr Val Cys Pro Ala Pro His Ser Glu Pro Pro Ser
 260 265 270
 Cys Asn Ala Asn Ser Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn
 275 280 285
 Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn
 290 295 300
 Leu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys
 305 310 315 320
 Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile
 325 330 335
 Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln
 340 345 350
 Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr
 355 360 365
 Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu
 370 375 380
 Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln
 385 390 395 400
 Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln
 405 410 415
 Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu
 420 425 430
 His Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu
 435 440 445

Ala Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys
 450 455 460
 Ser Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser
 465 470 475 480
 Lys Lys Phe Arg Cys Ser Gly Ser Glu Asp Tyr Arg Ser Arg Phe Ser
 485 490 495
 Ser Glu Cys Phe Met Asp Leu Val Cys Pro Glu Lys Cys Arg Cys Glu
 500 505 510
 Gly Thr Ile Val Asp Cys Ser Asn Gln Lys Leu Val Arg Ile Pro Ser
 515 520 525
 His Leu Pro Glu Tyr Val Thr Asp Leu Arg Leu Asn Asp Asn Glu Val
 530 535 540
 Ser Val Leu Glu Ala Thr Gly Ile Phe Lys Lys Leu Pro Asn Leu Arg
 545 550 555 560
 Lys Ile Asn Leu Ser Asn Asn Lys Ile Lys Glu Val Arg Glu Gly Ala
 565 570 575
 Phe Asp Gly Ala Ala Ser Val Gln Glu Leu Met Leu Thr Gly Asn Gln
 580 585 590
 Leu Glu Thr Val His Gly Arg Val Phe Arg Gly Leu Ser Gly Leu Lys
 595 600 605
 Thr Leu Met Leu Arg Ser Asn Leu Ile Gly Cys Val Ser Asn Asp Thr
 610 615 620
 Phe Ala Gly Leu Ser Ser Val Arg Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Arg
 625 630 635 640
 Ile Thr Thr Ile Thr Pro Gly Ala Phe Thr Thr Leu Val Ser Leu Ser
 645 650 655
 Thr Ile Asn Leu Leu Ser Asn Pro Phe Asn Cys Asn Cys His Leu Ala
 660 665 670
 Trp Leu Gly Lys Trp Leu Arg Lys Arg Arg Ile Val Ser Gly Asn Pro
 675 680 685
 Arg Cys Gln Lys Pro Phe Phe Leu Lys Glu Ile Pro Ile Gln Asp Val
 690 695 700
 Ala Ile Gln Asp Phe Thr Cys Asp Gly Asn Glu Glu Ser Ser Cys Gln
 705 710 715 720

Leu Ser Pro Arg Cys₇₂₅ Pro Glu Gln Cys Thr₇₃₀ Cys Met Glu Thr Val₇₃₅ Val
 Arg Cys Ser Asn₇₄₀ Lys Gly Leu Arg Ala₇₄₅ Leu Pro Arg Gly Met₇₅₀ Pro Lys
 Asp Val Thr₇₅₅ Glu Leu Tyr Leu Glu₇₆₀ Gly Asn His Leu Thr₇₆₅ Ala Val Pro
 Arg Glu₇₇₀ Leu Ser Ala Leu Arg₇₇₅ His Leu Thr Leu Ile₇₈₀ Asp Leu Ser Asn
 Asn Ser Ile Ser Met Leu₇₉₀ Thr Asn Tyr Thr Phe₇₉₅ Ser Asn Met Ser His₈₀₀
 Leu Ser Thr Leu Ile₈₀₅ Leu Ser Tyr Asn Arg₈₁₀ Leu Arg Cys Ile Pro Val₈₁₅
 His Ala Phe Asn₈₂₀ Gly Leu Arg Ser Leu₈₂₅ Arg Val Leu Thr Leu₈₃₀ His Gly
 Asn Asp Ile₈₃₅ Ser Ser Val Pro Glu₈₄₀ Gly Ser Phe Asn Asp₈₄₅ Leu Thr Ser
 Leu Ser His Leu Ala Leu Gly₈₅₅ Thr Asn Pro Leu His₈₆₀ Cys Asp Cys Ser
 Leu Arg Trp Leu Ser Glu₈₇₀ Trp Val Lys Ala Gly₈₇₅ Tyr Lys Glu Pro Gly₈₈₀
 Ile Ala Arg Cys Ser₈₈₅ Ser Pro Glu Pro Met₈₉₀ Ala Asp Arg Leu Leu₈₉₅ Leu
 Thr Thr Pro Thr₉₀₀ His Arg Phe Gln Cys₉₀₅ Lys Gly Pro Val Asp₉₁₀ Ile Asn
 Ile Val Ala₉₁₅ Lys Cys Asn Ala Cys₉₂₀ Leu Ser Ser Pro Cys₉₂₅ Lys Asn Asn
 Gly Thr Cys Thr Gln Asp Pro₉₃₅ Val Glu Leu Tyr Arg₉₄₀ Cys Ala Cys Pro
 Tyr Ser Tyr Lys Gly Lys₉₅₀ Asp Cys Thr Val Pro₉₅₅ Ile Asn Thr Cys Ile₉₆₀
 Gln Asn Pro Cys Gln₉₆₅ His Gly Gly Thr Cys₉₇₀ His Leu Ser Asp Ser₉₇₅ His
 Lys Asp Gly Phe₉₈₀ Ser Cys Ser Cys Pro₉₈₅ Leu Gly Phe Glu Gly₉₉₀ Gln Arg

Cys Glu Ile Asn Pro Asp Asp Cys Glu Asp Asn Asp Cys Glu Asn Asn
 995 1000 1005
 Ala Thr Cys Val Asp Gly Ile Asn Asn Tyr Val Cys Ile Cys Pro
 1010 1015 1020
 Pro Asn Tyr Thr Gly Glu Leu Cys Asp Glu Val Ile Asp His Cys
 1025 1030 1035
 Val Pro Glu Leu Asn Leu Cys Gln His Glu Ala Lys Cys Ile Pro
 1040 1045 1050
 Leu Asp Lys Gly Phe Ser Cys Glu Cys Val Pro Gly Tyr Ser Gly
 1055 1060 1065
 Lys Leu Cys Glu Thr Asp Asn Asp Asp Cys Val Ala His Lys Cys
 1070 1075 1080
 Arg His Gly Ala Gln Cys Val Asp Thr Ile Asn Gly Tyr Thr Cys
 1085 1090 1095
 Thr Cys Pro Gln Gly Phe Ser Gly Pro Phe Cys Glu His Pro Pro
 1100 1105 1110
 Pro Met Val Leu Leu Gln Thr Ser Pro Cys Asp Gln Tyr Glu Cys
 1115 1120 1125
 Gln Asn Gly Ala Gln Cys Ile Val Val Gln Gln Glu Pro Thr Cys
 1130 1135 1140
 Arg Cys Pro Pro Gly Phe Ala Gly Pro Arg Cys Glu Lys Leu Ile
 1145 1150 1155
 Thr Val Asn Phe Val Gly Lys Asp Ser Tyr Val Glu Leu Ala Ser
 1160 1165 1170
 Ala Lys Val Arg Pro Gln Ala Asn Ile Ser Leu Gln Val Ala Thr
 1175 1180 1185
 Asp Lys Asp Asn Gly Ile Leu Leu Tyr Lys Gly Asp Asn Asp Pro
 1190 1195 1200
 Leu Ala Leu Glu Leu Tyr Gln Gly His Val Arg Leu Val Tyr Asp
 1205 1210 1215
 Ser Leu Ser Ser Pro Pro Thr Thr Val Tyr Ser Val Glu Thr Val
 1220 1225 1230
 Asn Asp Gly Gln Phe His Ser Val Glu Leu Val Thr Leu Asn Gln
 1235 1240 1245

Thr	Leu	Asn	Leu	Val	Val	Asp	Lys	Gly	Thr	Pro	Lys	Ser	Leu	Gly
	1250					1255					1260			
Lys	Leu	Gln	Lys	Gln	Pro	Ala	Val	Gly	Ile	Asn	Ser	Pro	Leu	Tyr
	1265					1270					1275			
Leu	Gly	Gly	Ile	Pro	Thr	Ser	Thr	Gly	Leu	Ser	Ala	Leu	Arg	Gln
	1280					1285					1290			
Gly	Thr	Asp	Arg	Pro	Leu	Gly	Gly	Phe	His	Gly	Cys	Ile	His	Glu
	1295					1300					1305			
Val	Arg	Ile	Asn	Asn	Glu	Leu	Gln	Asp	Phe	Lys	Ala	Leu	Pro	Pro
	1310					1315					1320			
Gln	Ser	Leu	Gly	Val	Ser	Pro	Gly	Cys	Lys	Ser	Cys	Thr	Val	Cys
	1325					1330					1335			
Lys	His	Gly	Leu	Cys	Arg	Ser	Val	Glu	Lys	Asp	Ser	Val	Val	Cys
	1340					1345					1350			
Glu	Cys	Arg	Pro	Gly	Trp	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Asp	Gln	Glu	Ala
	1355					1360					1365			
Arg	Asp	Pro	Cys	Leu	Gly	His	Arg	Cys	His	His	Gly	Lys	Cys	Val
	1370					1375					1380			
Ala	Thr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Met	Cys	Lys	Cys	Ala	Glu	Gly	Tyr	Gly
	1385					1390					1395			
Gly	Asp	Leu	Cys	Asp	Asn	Lys	Asn	Asp	Ser	Ala	Asn	Ala	Cys	Ser
	1400					1405					1410			
Ala	Phe	Lys	Cys	His	His	Gly	Gln	Cys	His	Ile	Ser	Asp	Gln	Gly
	1415					1420					1425			
Glu	Pro	Tyr	Cys	Leu	Cys	Gln	Pro	Gly	Phe	Ser	Gly	Glu	His	Cys
	1430					1435					1440			
Gln	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Gly	Gln	Val	Val	Arg	Glu	Val	Ile
	1445					1450					1455			
Arg	Arg	Gln	Lys	Gly	Tyr	Ala	Ser	Cys	Ala	Thr	Ala	Ser	Lys	Val
	1460					1465					1470			
Pro	Ile	Met	Glu	Cys	Arg	Gly	Gly	Cys	Gly	Pro	Gln	Cys	Cys	Gln
	1475					1480					1485			
Pro	Thr	Arg	Ser	Lys	Arg	Arg	Lys	Tyr	Val	Phe	Gln	Cys	Thr	Asp
	1490					1495					1500			

Gly Ser Ser Phe Val Glu Glu Val Glu Arg His Leu Glu Cys Gly
1505 1510 1515

Cys Leu Ala Cys Ser
1520

<210> 2
<211> 887
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His
1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu
20 25 30

Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp
35 40 45

Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln
50 55 60

Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu
65 70 75 80

Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln
100 105 110

Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys
115 120 125

Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala
130 135 140

Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn
145 150 155 160

Ile Ser Arg Ile Leu Val Thr Ser Phe Asn His Met Pro Lys Ile Arg
165 170 175

Thr Leu Arg Leu His Ser Asn His Leu Tyr Cys Asp Cys His Leu Ala
180 185 190

Trp Leu Ser Asp Trp Leu Arg Gln Arg Arg Thr Val Gly Gln Phe Thr
195 200 205

Leu Cys Met Ala Pro Val His Leu Arg Gly Phe Asn Val Ala Asp Val
 210 215 220
 Gln Lys Lys Glu Tyr Val Cys Pro Ala Pro His Ser Glu Pro Pro Ser
 225 230 235 240
 Cys Asn Ala Asn Ser Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn
 245 250 255
 Asn Ile Val Asp Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn
 260 265 270
 Leu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys
 275 280 285
 Ala Ile Pro Ala Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile
 290 295 300
 Asp Ile Ser Lys Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln
 305 310 315 320
 Gly Leu Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr
 325 330 335
 Glu Ile Ala Lys Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu
 340 345 350
 Leu Leu Asn Ala Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln
 355 360 365
 Asp Leu Gln Asn Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln
 370 375 380
 Thr Ile Ser Lys Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu
 385 390 395 400
 His Leu Ala Gln Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu
 405 410 415
 Ala Asp Tyr Leu Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys
 420 425 430
 Ser Ser Pro Arg Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser
 435 440 445
 Lys Lys Phe Arg Cys Ser Gly Ser Glu Asp Tyr Arg Ser Arg Phe Ser
 450 455 460
 Ser Glu Cys Phe Met Asp Leu Val Cys Pro Glu Lys Cys Arg Cys Glu
 465 470 475 480

Gly Thr Ile Val Asp Cys Ser Asn Gln Lys Leu Val Arg Ile Pro Ser
 485 490 495
 His Leu Pro Glu Tyr Val Thr Asp Leu Arg Leu Asn Asp Asn Glu Val
 500 505 510
 Ser Val Leu Glu Ala Thr Gly Ile Phe Lys Lys Leu Pro Asn Leu Arg
 515 520 525
 Lys Ile Asn Leu Ser Asn Asn Lys Ile Lys Glu Val Arg Glu Gly Ala
 530 535 540
 Phe Asp Gly Ala Ala Ser Val Gln Glu Leu Met Leu Thr Gly Asn Gln
 545 550 555 560
 Leu Glu Thr Val His Gly Arg Val Phe Arg Gly Leu Ser Gly Leu Lys
 565 570 575
 Thr Leu Met Leu Arg Ser Asn Leu Ile Gly Cys Val Ser Asn Asp Thr
 580 585 590
 Phe Ala Gly Leu Ser Ser Val Arg Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Arg
 595 600 605
 Ile Thr Thr Ile Thr Pro Gly Ala Phe Thr Thr Leu Val Ser Leu Ser
 610 615 620
 Thr Ile Asn Leu Leu Ser Asn Pro Phe Asn Cys Asn Cys His Leu Ala
 625 630 635 640
 Trp Leu Gly Lys Trp Leu Arg Lys Arg Arg Ile Val Ser Gly Asn Pro
 645 650 655
 Arg Cys Gln Lys Pro Phe Phe Leu Lys Glu Ile Pro Ile Gln Asp Val
 660 665 670
 Ala Ile Gln Asp Phe Thr Cys Asp Gly Asn Glu Glu Ser Ser Cys Gln
 675 680 685
 Leu Ser Pro Arg Cys Pro Glu Gln Cys Thr Cys Met Glu Thr Val Val
 690 695 700
 Arg Cys Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys
 705 710 715 720
 Asp Val Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro
 725 730 735
 Arg Glu Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn
 740 745 750

Asn Ser Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His
 755 760 765
 Leu Ser Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val
 770 775 780
 His Ala Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly
 785 790 795 800
 Asn Asp Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser
 805 810 815
 Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser
 820 825 830
 Leu Arg Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly
 835 840 845
 Ile Ala Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu
 850 855 860
 Thr Thr Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn
 865 870 875 880
 Ile Val Ala Lys Cys Asn Ala
 885
 <210> 3
 <211> 244
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His
 1 5 10 15
 Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu
 20 25 30
 Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp
 35 40 45
 Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln
 50 55 60
 Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu
 65 70 75 80
 Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu
 85 90 95
 Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln

100 105 110

Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys
115 120 125

Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala
130 135 140

Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn
145 150 155 160

Ile Ser Arg Ile Leu Val Thr Ser Phe Asn His Met Pro Lys Ile Arg
165 170 175

Thr Leu Arg Leu His Ser Asn His Leu Tyr Cys Asp Cys His Leu Ala
180 185 190

Trp Leu Ser Asp Trp Leu Arg Gln Arg Arg Thr Val Gly Gln Phe Thr
195 200 205

Leu Cys Met Ala Pro Val His Leu Arg Gly Phe Asn Val Ala Asp Val
210 215 220

Gln Lys Lys Glu Tyr Val Cys Pro Ala Pro His Ser Glu Pro Pro Ser
225 230 235 240

Cys Asn Ala Asn

<210> 4
<211> 221
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Leu Val Cys Pro Glu Lys Cys Arg Cys Glu Gly Thr Ile Val Asp
1 5 10 15

Cys Ser Asn Gln Lys Leu Val Arg Ile Pro Ser His Leu Pro Glu Tyr
20 25 30

Val Thr Asp Leu Arg Leu Asn Asp Asn Glu Val Ser Val Leu Glu Ala
35 40 45

Thr Gly Ile Phe Lys Lys Leu Pro Asn Leu Arg Lys Ile Asn Leu Ser
50 55 60

Asn Asn Lys Ile Lys Glu Val Arg Glu Gly Ala Phe Asp Gly Ala Ala
65 70 75 80

Ser Val Gln Glu Leu Met Leu Thr Gly Asn Gln Leu Glu Thr Val His
85 90 95

Gly Arg Val Phe Arg Gly Leu Ser Gly Leu Lys Thr Leu Met Leu Arg
100 105 110

Ser Asn Leu Ile Gly Cys Val Ser Asn Asp Thr Phe Ala Gly Leu Ser
115 120 125

Ser Val Arg Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Arg Ile Thr Thr Ile Thr
130 135 140

Pro Gly Ala Phe Thr Thr Leu Val Ser Leu Ser Thr Ile Asn Leu Leu
145 150 155 160

Ser Asn Pro Phe Asn Cys Asn Cys His Leu Ala Trp Leu Gly Lys Trp
165 170 175

Leu Arg Lys Arg Arg Ile Val Ser Gly Asn Pro Arg Cys Gln Lys Pro
180 185 190

Phe Phe Leu Lys Glu Ile Pro Ile Gln Asp Val Ala Ile Gln Asp Phe
195 200 205

Thr Cys Asp Gly Asn Glu Glu Ser Ser Cys Gln Leu Ser
210 215 220

<210> 5
<211> 196
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Pro Arg Cys Pro Glu Gln Cys Thr Cys Met Glu Thr Val Val Arg Cys
1 5 10 15

Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys Asp Val
20 25 30

Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro Arg Glu
35 40 45

Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn Asn Ser
50 55 60

Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His Leu Ser
65 70 75 80

Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val His Ala
85 90 95

Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly Asn Asp
100 105 110

Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser Leu Ser
 115 120 125
 His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser Leu Arg
 130 135 140
 Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly Ile Ala
 145 150 155 160
 Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu Thr Thr
 165 170 175
 Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn Ile Val
 180 185 190
 Ala Lys Cys Asn
 195
 <210> 6
 <211> 225
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6
 Ser Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn Ile Val Asp
 1 5 10 15
 Cys Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu Pro Glu Gly
 20 25 30
 Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala
 35 40 45
 Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys
 50 55 60
 Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser
 65 70 75 80
 Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys
 85 90 95
 Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala
 100 105 110
 Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn
 115 120 125
 Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys
 130 135 140

Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln
145 150 155 160

Asn Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala Asp Tyr Leu
165 170 175

Gln Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser Ser Pro Arg
180 185 190

Arg Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys Lys Phe Arg
195 200 205

Cys Ser Gly Ser Glu Asp Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Ser Glu Cys Phe
210 215 220

Met
225

<210> 7
<211> 886
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

Ala Cys Pro Thr Lys Cys Thr Cys Ser Ala Ala Ser Val Asp Cys His
1 5 10 15

Gly Leu Gly Leu Arg Ala Val Pro Arg Gly Ile Pro Arg Asn Ala Glu
20 25 30

Arg Leu Asp Leu Asp Arg Asn Asn Ile Thr Arg Ile Thr Lys Met Asp
35 40 45

Phe Ala Gly Leu Lys Asn Leu Arg Val Leu His Leu Glu Asp Asn Gln
50 55 60

Val Ser Val Ile Glu Arg Gly Ala Phe Gln Asp Leu Lys Gln Leu Glu
65 70 75 80

Arg Leu Arg Leu Asn Lys Asn Lys Leu Gln Val Leu Pro Glu Leu Leu
85 90 95

Phe Gln Ser Thr Pro Lys Leu Thr Arg Leu Asp Leu Ser Glu Asn Gln
100 105 110

Ile Gln Gly Ile Pro Arg Lys Ala Phe Arg Gly Ile Thr Asp Val Lys
115 120 125

Asn Leu Gln Leu Asp Asn Asn His Ile Ser Cys Ile Glu Asp Gly Ala
130 135 140

Phe Arg Ala Leu Arg Asp Leu Glu Ile Leu Thr Leu Asn Asn Asn Asn

145						150						155						160
Ile	Ser	Arg	Ile	Leu 165	Val	Thr	Ser	Phe	Asn 170	His	Met	Pro	Lys	Ile 175	Arg			
Thr	Leu	Arg	Leu 180	His	Ser	Asn	His	Leu 185	Tyr	Cys	Asp	Cys	His 190	Leu	Ala			
Trp	Leu	Ser 195	Asp	Trp	Leu	Arg	Gln 200	Arg	Arg	Thr	Val	Gly 205	Gln	Phe	Thr			
Leu	Cys 210	Met	Ala	Pro	Val	His 215	Leu	Arg	Gly	Phe	Asn 220	Val	Ala	Asp	Val			
Gln 225	Lys	Lys	Glu	Tyr	Val 230	Cys	Pro	Ala	Pro	His 235	Ser	Glu	Pro	Pro	Ser 240			
Cys	Asn	Ala	Asn	Ser 245	Ile	Ser	Cys	Pro	Ser 250	Pro	Cys	Thr	Cys	Ser 255	Asn			
Asn	Ile	Val	Asp 260	Cys	Arg	Gly	Lys	Gly 265	Leu	Met	Glu	Ile	Pro 270	Ala	Asn			
Leu	Pro	Glu 275	Gly	Ile	Val	Glu	Ile 280	Arg	Leu	Glu	Gln	Asn 285	Ser	Ile	Lys			
Ala	Ile 290	Pro	Ala	Gly	Ala	Phe 295	Thr	Gln	Tyr	Lys	Lys 300	Leu	Lys	Arg	Ile			
Asp 305	Ile	Ser	Lys	Asn	Gln 310	Ile	Ser	Asp	Ile	Ala 315	Pro	Asp	Ala	Phe	Gln 320			
Gly	Leu	Lys	Ser	Leu 325	Thr	Ser	Leu	Val	Leu 330	Tyr	Gly	Asn	Lys	Ile 335	Thr			
Glu	Ile	Ala	Lys 340	Gly	Leu	Phe	Asp	Gly 345	Leu	Val	Ser	Leu	Gln 350	Leu	Leu			
Leu	Leu	Asn 355	Ala	Asn	Lys	Ile	Asn 360	Cys	Leu	Arg	Val	Asn 365	Thr	Phe	Gln			
Asp	Leu 370	Gln	Asn	Leu	Asn	Leu 375	Leu	Ser	Leu	Tyr	Asp 380	Asn	Lys	Leu	Gln			
Thr 385	Ile	Ser	Lys	Gly	Leu 390	Phe	Ala	Pro	Leu	Gln 395	Ser	Ile	Gln	Thr	Leu 400			
His	Leu	Ala	Gln	Asn 405	Pro	Phe	Val	Cys	Asp 410	Cys	His	Leu	Lys	Trp 415	Leu			
Ala	Asp	Tyr	Leu	Gln	Asp	Asn	Pro	Ile	Glu	Thr	Ser	Gly	Ala	Arg	Cys			

420																425																430																													
Ser	Ser	Pro	Arg	Arg	Leu	Ala	Asn	Lys	Arg	Ile	Ser	Gln	Ile	Lys	Ser																																														
		435															440															445																													
Lys	Lys	Phe	Arg	Cys	Ser	Gly	Ser	Glu	Asp	Tyr	Arg	Ser	Arg	Phe	Ser																																														
		450															455															460																													
Ser	Glu	Cys	Phe	Met	Asp	Leu	Val	Cys	Pro	Glu	Lys	Cys	Arg	Cys	Glu																																														
		465															470															475															480														
Gly	Thr	Ile	Val	Asp	Cys	Ser	Asn	Gln	Lys	Leu	Val	Arg	Ile	Pro	Ser																																														
				485															490															495																											
His	Leu	Pro	Glu	Tyr	Val	Thr	Asp	Leu	Arg	Leu	Asn	Asp	Asn	Glu	Val																																														
			500															505															510																												
Ser	Val	Leu	Glu	Ala	Thr	Gly	Ile	Phe	Lys	Lys	Leu	Pro	Asn	Leu	Arg																																														
		515															520															525																													
Lys	Ile	Asn	Leu	Ser	Asn	Asn	Lys	Ile	Lys	Glu	Val	Arg	Glu	Gly	Ala																																														
		530															535															540																													
Phe	Asp	Gly	Ala	Ala	Ser	Val	Gln	Glu	Leu	Met	Leu	Thr	Gly	Asn	Gln																																														
		545															550															555															560														
Leu	Glu	Thr	Val	His	Gly	Arg	Val	Phe	Arg	Gly	Leu	Ser	Gly	Leu	Lys																																														
				565															570															575																											
Thr	Leu	Met	Leu	Arg	Ser	Asn	Leu	Ile	Gly	Cys	Val	Ser	Asn	Asp	Thr																																														
			580															585															590																												
Phe	Ala	Gly	Leu	Ser	Ser	Val	Arg	Leu	Leu	Ser	Leu	Tyr	Asp	Asn	Arg																																														
		595															600															605																													
Ile	Thr	Thr	Ile	Thr	Pro	Gly	Ala	Phe	Thr	Thr	Leu	Val	Ser	Leu	Ser																																														
		610															615															620																													
Thr	Ile	Asn	Leu	Leu	Ser	Asn	Pro	Phe	Asn	Cys	Asn	Cys	His	Leu	Ala																																														
		625															630															635															640														
Trp	Leu	Gly	Lys	Trp	Leu	Arg	Lys	Arg	Arg	Ile	Val	Ser	Gly	Asn	Pro																																														
				645															650															655																											
Arg	Cys	Gln	Lys	Pro	Phe	Phe	Leu	Lys	Glu	Ile	Pro	Ile	Gln	Asp	Val																																														
			660															665															670																												
Ala	Ile	Gln	Asp	Phe	Thr	Cys	Asp	Gly	Asn	Glu	Glu	Ser	Ser	Cys	Gln																																														
		675															680															685																													
Leu	Ser	Pro	Arg	Cys	Pro	Glu	Gln	Cys	Thr	Cys	Met	Glu	Thr	Val	Val																																														

690	695	700
Arg Cys Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys 705 710 715 720		
Asp Val Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro 725 730 735		
Arg Glu Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn 740 745 750		
Asn Ser Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His 755 760 765		
Leu Ser Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val 770 775 780		
His Ala Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly 785 790 795 800		
Asn Asp Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser 805 810 815		
Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser 820 825 830		
Leu Arg Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly 835 840 845		
Ile Ala Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu 850 855 860		
Thr Thr Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn 865 870 875 880		
Ile Val Ala Lys Cys Asn 885		
<210> 8		
<211> 223		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 8		
Ile Ser Cys Pro Ser Pro Cys Thr Cys Ser Asn Asn Ile Val Asp Cys 1 5 10 15		
Arg Gly Lys Gly Leu Met Glu Ile Pro Ala Asn Leu Pro Glu Gly Ile 20 25 30		
Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala Gly 35 40 45		

Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys Asn
50 55 60

Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser Leu
65 70 75 80

Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys Gly
85 90 95

Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala Asn
100 105 110

Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn Leu
115 120 125

Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys Gly
130 135 140

Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln Asn
145 150 155 160

Pro Phe Val Cys Asp Cys His Leu Lys Trp Leu Ala Asp Tyr Leu Gln
165 170 175

Asp Asn Pro Ile Glu Thr Ser Gly Ala Arg Cys Ser Ser Pro Arg Arg
180 185 190

Leu Ala Asn Lys Arg Ile Ser Gln Ile Lys Ser Lys Lys Phe Arg Cys
195 200 205

Ser Gly Ser Glu Asp Tyr Arg Ser Arg Phe Ser Ser Glu Cys Phe
210 215 220

<210> 9
<211> 130
<212> PRT
<213> HOMO sapiens

<400> 9

Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala
1 5 10 15

Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys
20 25 30

Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser
35 40 45

Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys
50 55 60

Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Leu Asn Ala
65 70 75 80

Asn Lys Ile Asn Cys Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn
85 90 95

Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln
115 120 125

Asn Pro
130

<210> 10
<211> 603
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

Met Met Arg Ala Val Trp Glu Ala Leu Ala Ala Leu Ala Ala Val Ala
1 5 10 15

Cys Leu Val Gly Ala Val Arg Gly Gly Pro Gly Leu Ser Met Phe Ala
20 25 30

Gly Gln Ala Ala Gln Pro Asp Pro Cys Ser Asp Glu Asn Gly His Pro
35 40 45

Arg Arg Cys Ile Pro Asp Phe Val Asn Ala Ala Phe Gly Lys Asp Val
50 55 60

Arg Val Ser Ser Thr Cys Gly Arg Pro Pro Ala Arg Tyr Cys Val Val
65 70 75 80

Ser Glu Arg Gly Glu Glu Arg Leu Arg Ser Cys His Leu Cys Asn Ala
85 90 95

Ser Asp Pro Lys Lys Ala His Pro Pro Ala Phe Leu Thr Asp Leu Asn
100 105 110

Asn Pro His Asn Leu Thr Cys Trp Gln Ser Glu Asn Tyr Leu Gln Phe
115 120 125

Pro His Asn Val Thr Leu Thr Leu Ser Leu Gly Lys Lys Phe Glu Val
130 135 140

Thr Tyr Val Ser Leu Gln Phe Cys Ser Pro Arg Pro Glu Ser Met Ala
145 150 155 160

Ile Tyr Lys Ser Met Asp Tyr Gly Arg Thr Trp Val Pro Phe Gln Phe
 165 170 175
 Tyr Ser Thr Gln Cys Arg Lys Met Tyr Asn Arg Pro His Arg Ala Pro
 180 185 190
 Ile Thr Lys Gln Asn Glu Gln Glu Ala Val Cys Thr Asp Ser His Thr
 195 200 205
 Asp Met Arg Pro Leu Ser Gly Gly Leu Ile Ala Phe Ser Thr Leu Asp
 210 215 220
 Gly Arg Pro Ser Ala His Asp Phe Asp Asn Ser Pro Val Leu Gln Asp
 225 230 235 240
 Trp Val Thr Ala Thr Asp Ile Arg Val Ala Phe Ser Arg Leu His Thr
 245 250 255
 Phe Gly Asp Glu Asn Glu Asp Asp Ser Glu Leu Ala Arg Asp Ser Tyr
 260 265 270
 Phe Tyr Ala Val Ser Asp Leu Gln Val Gly Gly Arg Cys Lys Cys Asn
 275 280 285
 Gly His Ala Ala Arg Cys Val Arg Asp Arg Asp Asp Ser Leu Val Cys
 290 295 300
 Asp Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Pro Glu Cys Asp Arg Cys Lys Pro
 305 310 315 320
 Phe His Tyr Asp Arg Pro Trp Gln Arg Ala Thr Ala Arg Glu Ala Asn
 325 330 335
 Glu Cys Val Ala Cys Asn Cys Asn Leu His Ala Arg Arg Cys Arg Phe
 340 345 350
 Asn Met Glu Leu Tyr Lys Leu Ser Gly Arg Lys Ser Gly Gly Val Cys
 355 360 365
 Leu Asn Cys Arg His Asn Thr Ala Gly Arg His Cys His Tyr Cys Lys
 370 375 380
 Glu Gly Tyr Tyr Arg Asp Gly Lys Pro Ile Thr His Arg Lys Ala Cys
 385 390 395 400
 Lys Ala Cys Asp Cys His Pro Val Gly Ala Ala Gly Lys Thr Cys Asn
 405 410 415
 Gln Thr Thr Gly Gln Cys Pro Cys Lys Asp Gly Val Thr Gly Ile Thr
 420 425 430

Cys Asn Arg Cys Ala Lys Gly Tyr Gln Gln Ser Arg Ser Pro Ile Ala
435 440 445

Pro Cys Ile Lys Ile Pro Val Ala Pro Pro Thr Thr Ala Ala Ser Ser
450 455 460

Val Glu Glu Pro Glu Asp Cys Asp Ser Tyr Cys Lys Ala Ser Lys Gly
465 470 475 480

Lys Leu Lys Ile Asn Met Lys Lys Tyr Cys Lys Lys Asp Tyr Ala Val
485 490 495

Gln Ile His Ile Leu Lys Ala Asp Lys Ala Gly Asp Trp Trp Lys Phe
500 505 510

Thr Val Asn Ile Ile Ser Val Tyr Lys Gln Gly Thr Ser Arg Ile Arg
515 520 525

Arg Gly Asp Gln Ser Leu Trp Ile Arg Ser Arg Asp Ile Ala Cys Lys
530 535 540

Cys Pro Lys Ile Lys Pro Leu Lys Lys Tyr Leu Leu Leu Gly Asn Ala
545 550 555 560

Glu Asp Ser Pro Asp Gln Ser Gly Ile Val Ala Asp Lys Ser Ser Leu
565 570 575

Val Ile Gln Trp Arg Asp Thr Trp Ala Arg Arg Leu Arg Lys Phe Gln
580 585 590

Gln Arg Glu Lys Lys Gly Lys Cys Lys Lys Ala
595 600

<210> 11
<211> 32
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(32)

<400> 11
gaccatatgg cccctgcccc accaagtgtgta cc

32

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(28)

<400> 12
 gacccccggga ttgcatttgg ccacaatg 28

<210> 13
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)

<400> 13
 gaccatatga tctcctgccc ttcgccctgc 30

<210> 14
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(29)

<400> 14
 gacccccgggg aagcactcgc tgctgaacc 29

<210> 15
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(31)

<400> 15
 gaccatatga tcgtcgaaat acgcctagaa c 31

<210> 16
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(30)

<400> 16
 gacccccgggt gggttttggg ctaagtggag 30

<210> 17
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(30)

<400> 17
gaccatatgg acctcgtgtg ccccgagaag

30

<210> 18
<211> 30
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(30)

<400> 18
gaccccgagg ctcagctggc agctactctc

30

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(39)

<400> 19
ccaacaagat caacgccctg cgggttaaca cgtttcagg

39

<210> 20
<211> 39
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(39)

<400> 20
cctgaaacgt gttaacccgc agggcggtga tcttggttg

39

<210> 21
<211> 130
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21

Ile Val Glu Ile Arg Leu Glu Gln Asn Ser Ile Lys Ala Ile Pro Ala
1 5 10 15

Gly Ala Phe Thr Gln Tyr Lys Lys Leu Lys Arg Ile Asp Ile Ser Lys
20 25 30

Asn Gln Ile Ser Asp Ile Ala Pro Asp Ala Phe Gln Gly Leu Lys Ser
35 40 45

Leu Thr Ser Leu Val Leu Tyr Gly Asn Lys Ile Thr Glu Ile Ala Lys

50

55

60

Gly Leu Phe Asp Gly Leu Val Ser Leu Gln Leu Leu Leu Asn Ala
65 70 75 80

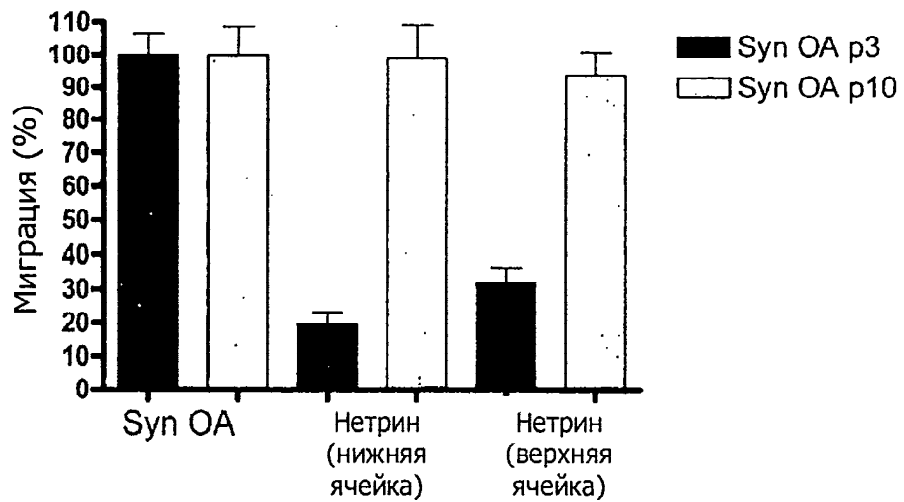
Asn Lys Ile Asn Ala Leu Arg Val Asn Thr Phe Gln Asp Leu Gln Asn
85 90 95

Leu Asn Leu Leu Ser Leu Tyr Asp Asn Lys Leu Gln Thr Ile Ser Lys
100 105 110

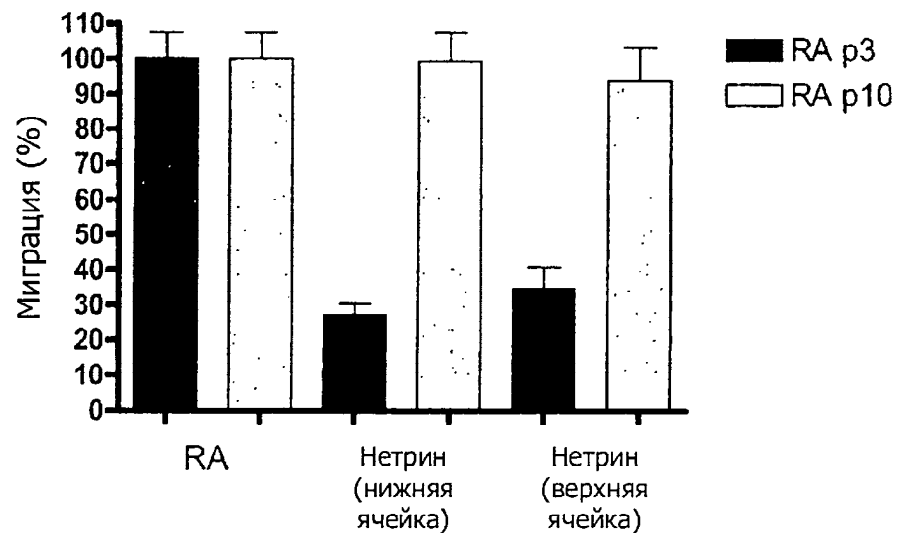
Gly Leu Phe Ala Pro Leu Gln Ser Ile Gln Thr Leu His Leu Ala Gln
115 120 125

Asn Pro
130

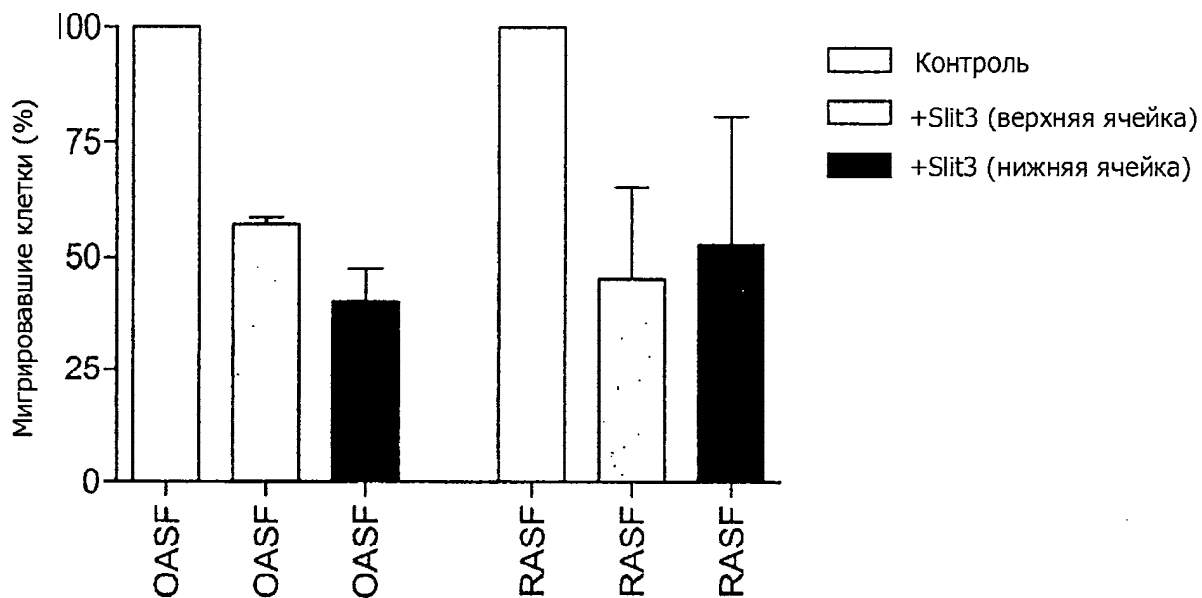
A



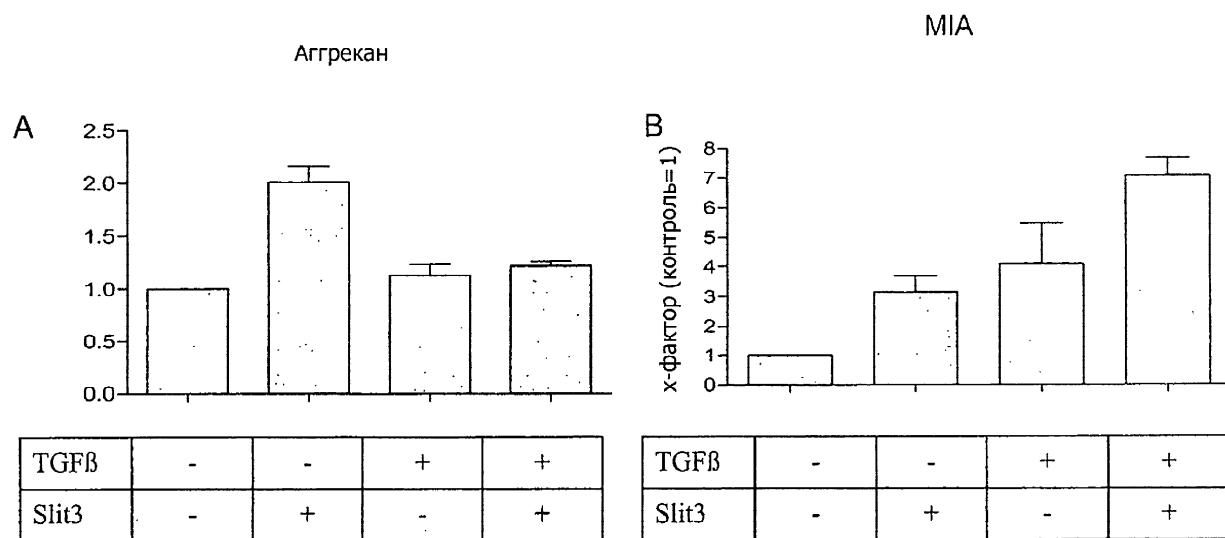
B



Фиг. 1

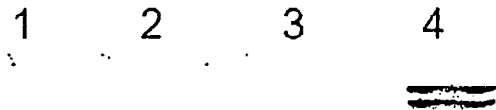


Фиг. 2



Фиг. 4

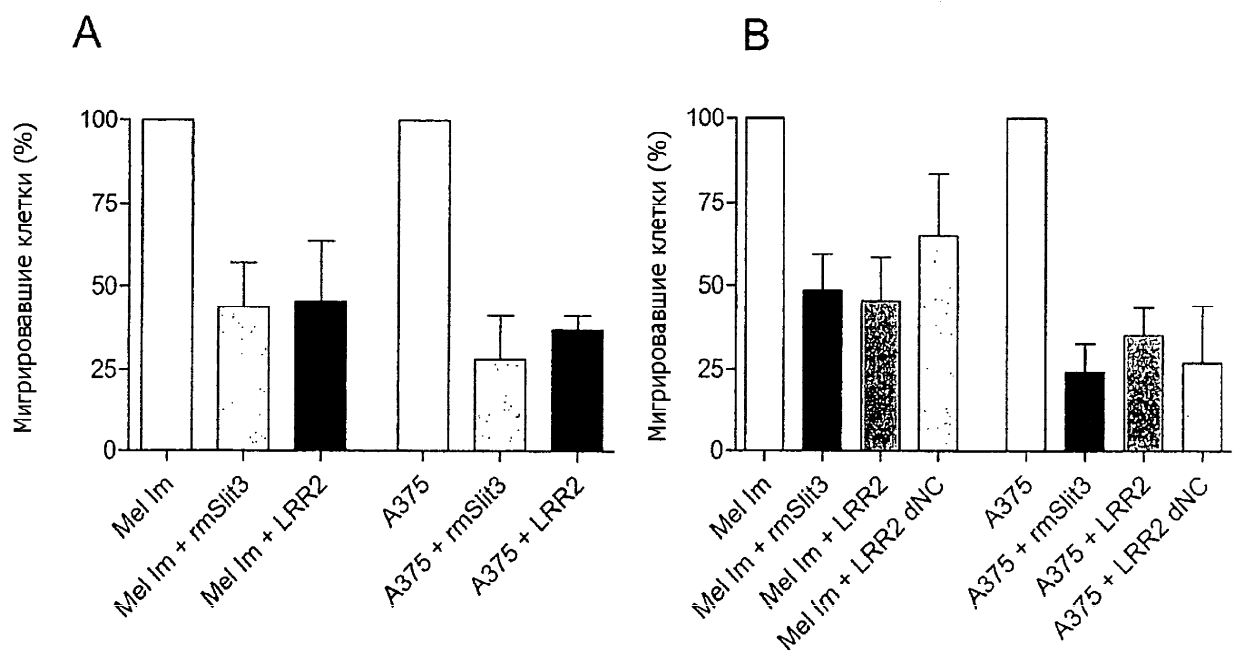
1 2 3 4



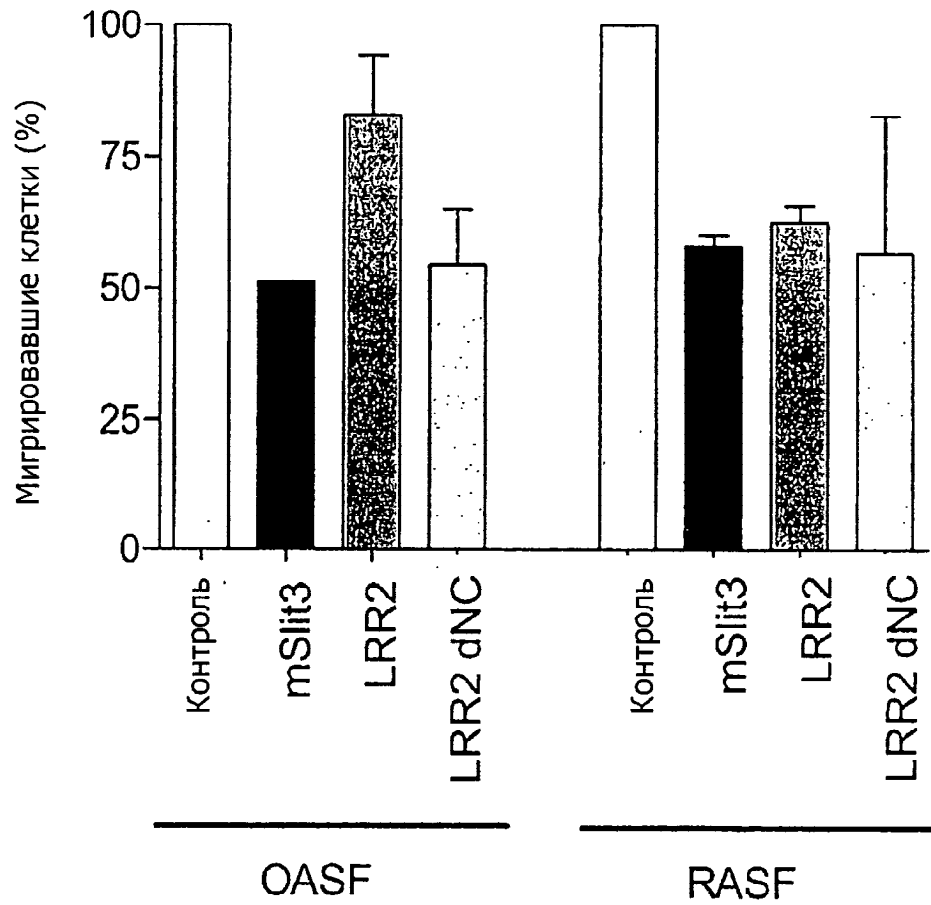
Неспецифический →



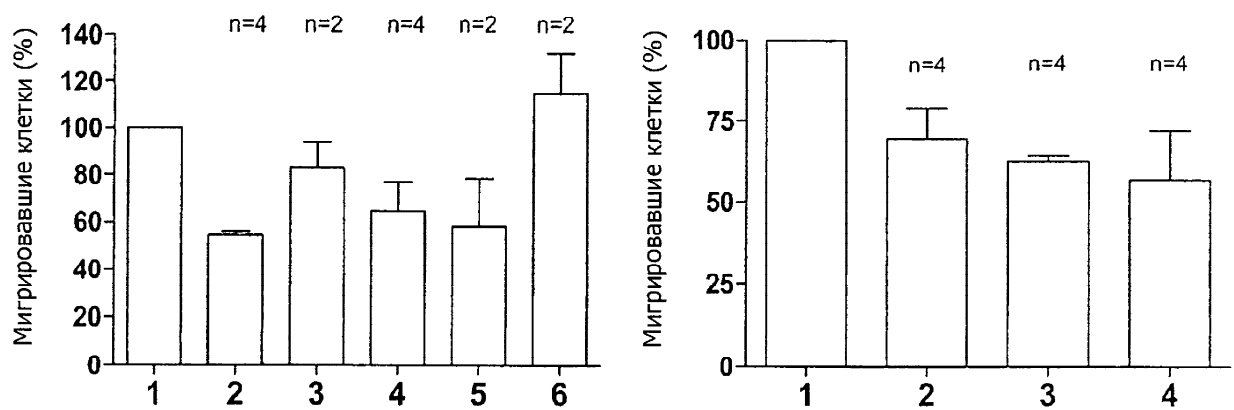
Фиг. 5



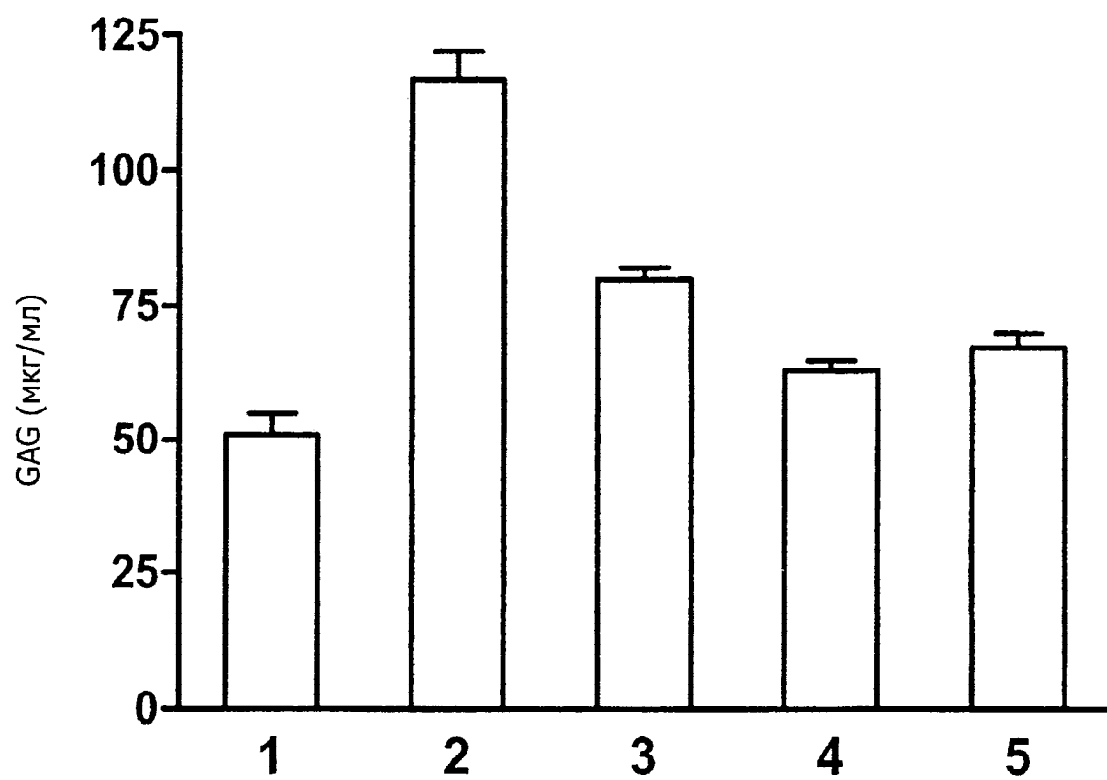
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9