



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101821283 A

(43) 申请公布日 2010.09.01

(21) 申请号 200880111279.3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2008.09.12

C07K 14/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 9/00 (2006.01)

07018131.8 2007.09.14 EP

C12N 5/00 (2006.01)

08006810.9 2008.04.03 EP

A61P 19/02 (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010.04.12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/007579 2008.09.12

(87) PCT申请的公布数据

W02009/033715 EN 2009.03.19

(71) 申请人 SCIL 技术股份有限公司

地址 德国马丁斯里德

(72) 发明人 A·鲍瑟尔霍夫 T·舒伯特

E·哈斯特尔特

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

权利要求书 2 页 说明书 18 页 序列表 23 页
附图 9 页

(54) 发明名称

SLIT, NEPHRIN, 肝配蛋白或脑信号蛋白用于
治疗软骨疾病的用途

(57) 摘要

本发明涉及忌避因子和 / 或多肽用于制备用于
治疗疾病例如退行性疾病的药物组合物的用
途, 特别地, 涉及 SLIT3 或导蛋白 1 蛋白的用途。
本发明还涉及 SLIT3 的多肽片段, 包含所述多肽
的药物组合物和其用途。

1. 忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途。
2. 根据权利要求 1 的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,其中所述忌避因子选自 Slit、导蛋白、肝配蛋白和脑信号蛋白。
3. 根据权利要求 1 或 2 的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,其中所述忌避因子 a) 与 SLIT3 (SEQ ID NO :1) 或导蛋白 1 (SEQ ID NO :10) 的氨基酸序列具有至少 85% 的同源性, b) 是 SLIT3 或导蛋白 1 的活性片段,或 c) 与 b) 的活性片段的氨基酸序列具有至少 85% 的同源性。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的忌避因子的用途,其中所述忌避因子包含选自 SEQ ID NO :1 至 9 或 21 的氨基酸序列,或与 SEQ ID NO :1 至 9 或 21 的任一氨基酸序列具有至少 85% 的同源性,并且其中所述氨基酸序列短于成熟 SLIT3 蛋白。
5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,其中所述忌避因子是 SLIT3 (SEQ ID NO :1) 的片段。
6. 根据权利要求 1 或 2 的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,其中所述忌避因子是 ROBO 受体, DCC 或 UNC 受体的激动剂或拮抗剂。
7. 根据权利要求 1 至 6 中任一项的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,所述软骨缺损与滑膜成纤维细胞浸润或迁移入关节或非关节软骨有关和 / 或与血管翳形成有关。
8. 根据权利要求 1 至 7 中任一项的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,所述软骨缺损是与细胞对关节或非关节软骨的减少的附着有关的退行性疾病。
9. 根据权利要求 1 或 8 中任一项的忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途,所述软骨缺损是退行性疾病,其中所述疾病选自退行性椎间盘疾病、半月板撕裂、前交叉韧带 (ACL) 损伤、关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型慢性关节炎、肢根假关节炎、类风湿性多关节炎、滑膜炎或绒毛结节性滑膜炎。
10. 根据权利要求 1 至 9 中任一项的忌避因子的用途,其中所述忌避因子至少在第二富亮氨酸重复结构域或同源的富亮氨酸重复结构域中是非糖基化的。
11. 一种分离的多肽,其与 SEQ ID NO :1 至 9 或 21 的任一氨基酸序列具有至少 85% 的氨基酸序列同源性,并且其中所述氨基酸序列比成熟 SLIT3 蛋白短,用于预防和 / 或治疗软骨缺损。
12. 用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物,其包含权利要求 1 至 10 的任一项中定义的忌避因子或权利要求 11 的多肽。
13. 权利要求 12 的药物组合物,其中所述多肽与载体,植入物或递送系统组合。
14. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 10 的任一项中定义的忌避因子或权利要求 11 的多肽,进一步包含至少一种具有血栓形成活性的物质,添加剂或基质。
15. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 至 10 的任一项中定义的忌避因子或权利要求 11 的多肽,进一步包含软骨组织细胞。
16. 权利要求 15 的药物组合物,其中所述软骨组织细胞是软骨细胞。
17. 根据权利要求 1 至 10 中任一项的忌避因子的用途或根据权利要求 12 至 16 中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物是可注射的制剂。

18. 根据权利要求 17 的忌避因子的用途或根据权利要求 17 的药物组合物,其中所述药物组合物是可注射的制剂,其用于关节内施用和 / 或施用到滑液中。

19. 根据权利要求 1 至 10,17 或 18 中任一项的忌避因子的用途或根据权利要求 12 至 16 中任一项的药物组合物,其中所述药物组合物选自水性液体,固体,半固体,糊剂,油灰,脂质体,固形材料,基质,原位安置材料或组织粘着生物材料。

20. 一种分离的多肽,其包含共有序列 : $C(Y)_3CYC(Y)_6C(Y)_{99}C(Y)_{47}CYC(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{13-22}C$,其中 C 表示半胱氨酸并且 Y 表示氨基酸,其用于预防和 / 或治疗软骨缺损。

SLIT, NEPHRIN, 肝配蛋白或脑信号蛋白用于治疗软骨疾病的用途

[0001] 本发明涉及忌避因子 (repellent factor) 和 / 或多肽, 特别是导蛋白 1 (NETRIN1), SLIT3 蛋白或其片段用于制备用于治疗或预防退行性疾病特别是软骨缺损的药物组合物的用途。本发明还涉及 SLIT3 的多肽片段, 包含所述多肽的药物组合物和其用途。

[0002] 创伤和退行性关节疾病的软骨修复和再生仍然是骨科 (orthopaedics) 中的主要挑战。软骨损伤和退行性障碍是引起成人关节功能逐渐丧失和显著疼痛 (伴随残疾和不活动) 的主要原因。由于体内的软骨细胞的低有丝分裂潜力, 软骨固有的修复能力是有限的, 并且在成人中所得到的产生的组织通常不如正常软骨。普遍认为因为软骨 (例如关节软骨) 缺乏血管, 损伤的软骨接收不到足够的刺激以引起修复应答。软骨组织中的软骨细胞通常不暴露于足够量的修复刺激剂例如生长因子和存在于受损的带血管的组织 (vascularised tissue) 中的血纤蛋白凝块。

[0003] 关节的功能完整性依赖于隔室缘 (compartment border) 的严格分离。在炎性和退行性关节疾病 (例如类风湿性关节炎 (RA) 和骨关节炎 (OA)) 中已发现关节隔室边缘的交叉和软骨隔室的破坏。

[0004] 通常, 软骨障碍 (例如类风湿性关节炎) 通过来自周围组织隔室的细胞群的侵袭性和破坏性行为 (例如滑膜组织成纤维细胞 (SF) 从滑膜组织迁移) 来表征或加剧。滑膜成纤维细胞 (SF) 对关节的关节结构 (例如软骨和骨) 的破坏是 RA 和 OA 中的关键事件 (Pap, 2003 ; Pap, 2007 ; Yasuda, 2006 ; Huber 等, 2006)。

[0005] 已经进行了很多抑制破坏性结构变化的进一步发展的策略和逆转疾病的新方法, 并取得不同程度的成功, 所述策略及方法再生治疗患病软骨, 包括发现具有修复被破坏的软骨的潜力的新试剂。这些策略包括髓 - 刺激技术, 自体 and 同种异体移植, 自体软骨细胞移植, 骨膜移植, prdrie 钻孔术, 磨削软骨成形术 (abrasion chondroplasty), 包括微骨折和软骨镶嵌术。然而, 这些方法并不可靠并且限于小的和中等的病灶软骨和骨软骨的缺损。由于需要在供体部位产生缺损, 由于不充分的修复效果以及由于关节原有曲率的表面再建中的技术困难, 软骨镶嵌术受到限制 (Kuroda 等, 2007)。自体软骨细胞移植技术有几个缺陷, 包括缺少足够数目的软骨细胞, 需要产生供体部位缺损, 不良的功效和高治疗费用。

[0006] 已经确定几种生长因子, 如 TGF- β 1、FGF-2、IGF-1、TP-508、OP-1 或其他 BMP (包括 GDF) 或其组合诱导祖细胞增殖和分化成骨和 / 或软骨组织。特别地, 已经表明 TGF- β 1 促进祖细胞的成软骨分化和增强软骨细胞分化。IGF-1 主要以合成代谢方式起作用以增加蛋白聚糖和 II 型胶原的合成。然而, 这些生长因子相当无特异性, 具有产生不期望的副作用的风险。其它的例如 BMP, 具有诱导成骨基因的潜力并且因此诱导不期望的骨形成。应用该生长因子技术的另一个限制是外源生长因子相对短的生物学半衰期, 这使得在其递送后, 其只能产生短暂的生物学作用。

[0007] 促炎细胞因子, 蛋白酶和金属蛋白酶可能是造成存在于 OA 和 RA 患者中的一些体征和症状以及结构性变化的原因。将这些酶的合成 / 活性的抑制作为 OA 和 RA 的治疗已经

是集中研究的焦点。

[0008] 至今,最有希望的策略仍然是使用能够阻断 MMP 活性的小的化学实体。然而, MMP 抑制剂可产生副作用并且还未被证明较大程度上降低疾病的发展。

[0009] 另外,其他的新策略现正处于下文引述的开发中。

[0010] US2003068705 公开了编码 PRO 多肽的 305 个核酸,其中一些(例如与 IL-17 同源或相关的多肽)声称可用于刺激软骨细胞的增殖或分化并且因而可以用于治疗各种骨和/或软骨障碍(例如运动损伤或者关节炎)。

[0011] W020001090357 提供了用于治疗发育缺陷、炎性疾病,或用于调节免疫应答的蛋白。

[0012] US2003044917 涉及用于刺激软骨细胞的增殖和分化的人 PRO 多肽以及其在各种骨和/或软骨疾病(例如关节炎和运动损伤)的治疗中的用途。然而,只有序列 6029 经检验是阳性的。

[0013] 另一类蛋白,例如轴突导向分子(例如导蛋白(Netrin), Slit),已经被提出用于调节炎性细胞运动(W00164837, W005074556, W000055321, W00190357)。W00164837、W003075860、W006019904 和 US2006/0153840 公开了用于促进血管发生,增殖和/或用于促进细胞迁移(以治疗神经病变和癌症)的方法。

[0014] W02002081745 教导了 SLIT3 用于诊断骨质疏松症/骨疾病,促进骨发生和/或预防骨质疏松症/骨疾病的用途。

[0015] W099/23219、JP11164690 和 JP11075846 公开了人 SLIT3 多肽序列。

[0016] W000/55321 公开了脊椎动物 SLIT DNA 序列(即爪蟾属(Xenopus)和人 Slit2),蛋白和其用途。

[0017] 然而,本领域公开的方法和组合物中没有一个显示较大程度降低所治疗的疾病的发展而没有副作用,或导致破坏过程的消除和软骨组织的实际修复和替换。

[0018] 因此,存在对组合物和其用途的需要,其用于改善进行性软骨破坏的治疗和/或预防,特别是在创伤后和慢性疾病例如全层缺损(full-thickness defect)和浅表缺损(superficial defect)和关节炎(例如骨关节炎,类风湿性关节炎),半月板撕裂,前交叉韧带(ACL)-损伤的情况下,并且其克服与现有可用的方法和组合物有关的问题。

[0019] 因此,本发明的目的是提供用于修复或再生软骨缺损和/或抑制软骨疾病或障碍(例如关节炎和运动损伤)的疾病发展的方法。

[0020] 本发明的另一个目的是提供用于抑制滑膜细胞迁移并因此抑制软骨破坏的方法。

[0021] 本发明的另一个目的是提供方法,其适用于治疗软骨疾病,尤其是炎性软骨疾病和牵涉滑膜成纤维细胞侵袭或血管翳形成的疾病。

[0022] 本发明的另一个目的是提供组合物和其用途,其用于来自周围的间充质干细胞的吸引/趋化作用,以用于软骨再生。

[0023] 本发明的另一个目的是提供组合物和其用途,其用于诱导软骨形成和/或刺激软骨细胞的增殖或分化。

[0024] 本发明背后的问题通过利用忌避因子来解决,所述的忌避因子用于制备用于预防和/或治疗软骨缺损的药物组合物。特别地,本发明涉及忌避因子用于制备药物组合物的用途,所述药物组合物用于预防和/或治疗退行性疾病,优选退行性软骨疾病,其 a) 与滑膜

成纤维细胞的浸润或迁移（优选浸润或迁移入关节或非关节软骨）有关，和 / 或与血管翳形成有关，或 b) 与细胞优选成纤维细胞或滑膜成纤维细胞至关节或非关节软骨的减少的附着有关。特别地，忌避因子调节或抑制成纤维细胞样细胞（例如滑膜成纤维细胞）的迁移，滑膜细胞增生的抑制，和 / 或促进用于软骨诱导和 / 或再生的间充质干细胞和 / 或软骨细胞的迁移、增殖和 / 或分化，并从而改变、抑制、预防和 / 或治疗退行性疾病的发展。特别地，忌避因子抑制、改变或预防骨赘形成，优选在患者中。

[0025] 特别地，本发明涉及忌避因子用于制备用于预防和 / 或治疗软骨缺损的药物组合物的用途，其中忌避因子是 SLIT3 (SEQ ID NO :1) 的片段。所述片段优选长度 ≤ 1523 AA，优选 ≤ 1200 AA，更优选 ≤ 1000 AA 和最优选 ≤ 800 AA，并且特别地， ≥ 20 AA，优选 ≥ 50 AA，更优选 ≥ 100 AA。优选地，所述 SLIT3 的片段包括 SEQ ID NO :1 从位置 34 至 917，位置 47 至 863，位置 66 至 857，位置 279 至 863，位置 279 至 857，位置 279 至 724，位置 279 至 504，位置 311 至 432，位置 335 至 432 或位置 312 至 437 的序列。根据本发明已发现，忌避因子，特别是 SLIT3，在软骨隔室缘表达，并在此处保持关节软骨的完整性。进一步地，忌避因子抑制成纤维细胞，神经纤维和血管迁移入关节软骨。因为慢性关节疾病中血管翳组织侵袭入软骨仅在改变忌避因子表达后才可能，该侵袭可以通过忌避因子，特别是通过 SLIT3 来调节，并且因此，可以治疗与此相关的退行性疾病。

[0026] 本发明人已经证明忌避因子的成员和它们的受体在患退行性疾病例如骨关节炎和关节炎的患者的滑膜成纤维细胞中差异表达。这是通过在 Lightcycler 上进行的分离自培养的原代人滑膜成纤维细胞的 cDNA 的基因定量 RT-PCR 分析的。ROBO 和 SLIT 在骨关节炎患者的滑膜成纤维细胞 (OASF) 和类风湿性关节炎患者的滑膜成纤维细胞 (RASf) 中相似地表达（除了 ROBO 3mRNA 表达外，其与在 OASF 中的非常弱的表达相比，在 RASf 中显著增加）。与 SLIT2 或 SLIT3 相比，SLIT1mRNA 水平明显地下降，但 SLIT 在 OASF 中的表达显示通常比在 RASf 中更高。

[0027] ROBO1 和 ROBO2 在分化的和 OA 软骨细胞中都表达，但是与分化的软骨细胞相比，在 OA 软骨细胞中的表达增加 10 倍 (ROBO1) 和甚至 100 倍 (ROBO2)。在两种细胞类型中均没有测量到 ROBO3 的表达。所有三种 SLIT 在分化的和 OA 软骨细胞中都表达，再次发现在 OA 软骨细胞中比在分化的软骨细胞中更高的水平。

[0028] UNC5B 和 UNC5C 在 OA 和 RA 患者的滑膜成纤维细胞中显著上调。

[0029] 此外，已经发现 RASf 中较高代次的滑膜成纤维细胞中的 ROBO3 表达的显著丧失可能是放松对 SLIT3 的排斥活性 (repulsive activity) 中的重要步骤。本发明人呈现的这些发现表明，RA (和 OA) 的滑膜成纤维细胞中 ROBO3 受体的失调与成纤维细胞的侵袭性有关。

[0030] 此外，本发明基于这样的发现，即忌避因子例如导蛋白 1、SLIT3 以及其片段参与调节细胞例如滑膜成纤维细胞的侵袭行为和这些细胞向或进入软骨的迁移，其是退行性疾病例如类风湿性关节炎中的主要问题。不限于具体的分子，本发明基于这样的发现，即忌避因子例如导蛋白 1 和 SLIT3 和其片段，抑制 OASF 和 RASf 细胞的迁移。由于这个惊人的发现，忌避因子可以用于治疗各种疾病，所述疾病经受细胞的迁移和浸润，包括成纤维细胞样细胞例如滑膜成纤维细胞的改变的迁移和 / 或血管翳形成，其随后不能引起组织例如关节或非关节软骨的破坏或功能改变。由于本文公开的惊人的发现，忌避因子可以用作用于预防和 / 或治疗本文描述的各种疾病和疾病病状的药物。各个疾病尤其是退行性的，优选

软骨疾病,例如退行性关节和 / 或椎间盘疾病,包括上文进一步描述的那些。特别地,根据本发明,疾病选自退行性椎间盘疾病、半月板撕裂、前交叉韧带 (ACL) 损伤、关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型慢性关节炎、肢根假关节炎 (rhizomelic pseudoarthritis)、类风湿性多关节炎 (rheumatoid polyarthritis)、滑膜炎或绒毛结节性滑膜炎。

[0031] 根据本发明,可以预防或治疗软骨缺损或软骨疾病。

[0032] 本发明人的另一个发现是忌避因子对人间充质干细胞 (其因能够分化为软骨细胞的能力而众所周知) 的迁移行为的影响。在将因子例如导蛋白 1 加至下层小室后,用 Boyden Chamber 测定观察到迁移的诱导,表明忌避因子可用作间充质干细胞 (例如滑膜或衬细胞) 的化学引诱物 (chemoattractant)。由于这一发现,不仅可以抑制迁移细胞的破坏行为,而且可以吸引用于再生被破坏的组织的细胞。因此,忌避因子进一步改善退行性疾病的治疗。

[0033] 进一步的发现是人间充质干细胞向成软骨细胞系的诱导的分化,表明忌避因子 (例如 SLIT3) 可以诱导软骨形成,并因此可用于软骨疾病的再生和治疗。

[0034] 因此,本发明包括忌避因子用于制备药物组合物的用途,通过施用有效量的调节细胞至软骨的迁移、增殖和 / 或附着的忌避因子,所述的药物组合物用于治疗软骨缺损,特别是患者中由侵袭性成纤维细胞引起的退行性疾病。

[0035] 优选地,施用给患者的忌避因子的有效量为 0.001mg/kg 患者体重至 100mg/kg 患者体重,优选 0.01mg/kg 患者体重至 20mg/kg 患者体重,更优选 0.01 至 10mg/kg 患者体重,最优选 0.1mg/kg 至 1mg/kg 患者体重。

[0036] 为了本发明的目的,术语“忌避因子”指活性剂,其在某些浓度或浓度范围下能够抑制细胞迁移通过组织边缘,例如软骨边缘。这样,例如侵袭性滑膜成纤维细胞迁移入软骨和 / 或骨可以被抑制或改变。其还包括血管翳形成或血管翳侵袭入软骨的抑制或进一步发展。忌避因子可例如通过驱避 (repellent) 或吸引活性,作为轴突导向信号改变神经纤维的出芽 (sprouting)。

[0037] 忌避因子包括许多也称为轴突导向分子的分子,其调节神经系统中的轴突生长。它们包括导蛋白、SLIT、脑信号蛋白 (SEMAPHORIN) 和肝配蛋白 (EPHRIN) 和其受体神经毡蛋白 (NEUROPILIN), ROUNDABOUT (ROBO), 以及 UNC5 和 DCC 家族的成员 (Klagsbrun 和 Eichmann, 2005)。

[0038] 导蛋白为与层粘连蛋白结构域具有同源性的分泌蛋白质的家族。该家族由导蛋白 1、2、3 和 4 组成。它们包含层粘连蛋白 -VI 结构域、EGF 样重复和肝素 - 结合 C 末端结构域。导蛋白受体是结直肠癌缺失 (deleted in colorectal cancer, DCC) 受体家族 (其由 DCC 和 neogenin 组成), 或 uncoordinated-5 (UNC5) 家族 (其包括 UNC5A、5B、5C、5D)。导蛋白牵涉血管发生,和形态发生例如肺分支,乳腺发育和肿瘤发生。已表明导蛋白与 DCC 和 neogenin 的结合导致细胞吸引,而其与 UNC 受体的结合调节排斥。

[0039] 最初 SLIT 在果蝇中鉴定为轴突导向分子。哺乳动物 SLIT1、SLIT2 和 SLIT3 直系同源物是大的分泌蛋白,其具有四个富亮氨酸重复 (LRR) 结构域、九个 EGF 结构域、一个层粘连蛋白 G (LamG) 结构域和 C 末端胱氨酸结。SLIT1mRNA 在脑、间变性少突胶质细胞瘤和 Jurkat T 细胞中表达。SLIT2 和 SLIT3mRNA 在胚胎干细胞 (ES) 中共表达 (伴随拟胚

体形成) (Kato 和 Kato, 2005 ;Vargesson 等, 2001)。Slit3, 而非 Slit2, 定位于线粒体内, 暗示 Slit3 可能具有其他 Slit 蛋白不具有的独特的功能 (Little 等, 2001)。Slit 通过与 Roundabout 受体结合起作用。存在四种人 Robo 跨膜受体 (Robo1, Robo2, Robo3 和 Robo4), 它们都具有纤连蛋白 III 型和免疫球蛋白样结构域 (Ig), 但是在胞质结构域方面不同 (Itoh 等, 1998 ;Howitt 等, 2004 ;Hohenester 等, 2006)。已知 Slit 蛋白主要在胚胎发育期间和通过介导轴突导向 (经由生长锥的吸引或排斥), 参与调节迁移细胞的细胞-细胞相互作用和细胞-基质相互作用。在过去十年, 也已经描述了 Robo-/Slit 系统介导细胞粘附并且诱导肿瘤血管发生。Slit 还参与其他发育过程, 例如果蝇中的肌肉前体细胞迁移, 白细胞运输和肾诱导 (Klagsbrun 和 Eichmann, 2005)。

[0040] 脑信号蛋白 (Semaphorin) 是表面或局部分泌的神经忌避因子, 其经由不同的表面受体 (例如神经毡蛋白 1 和神经毡蛋白 2) 对神经纤维具有特定的驱避作用。III 类脑信号蛋白包括 SEMA A、B、C 和 F。肝配蛋白 (Ephrin) 和其受体 Eph 代表参与各种发育过程包括神经系统发育和血管发生的配体和酪氨酸激酶受体。肝配蛋白 A 配体 (肝配蛋白 A1、A2、A3、A4、A5) 是与 EphA 受体结合的 GPI 锚定分子, 而肝配蛋白 B 蛋白 (肝配蛋白 B1-3) 与 Eph B 受体结合。反之亦然, 肝配蛋白也可以用作受体, 其被作为配体的 Eph 结合。

[0041] 在一些实施方案中, 本发明的忌避因子是 ROUNDABOUT 受体 (例如 ROBO1, 2, 3), 结肠癌缺失 (例如 DCC) 或 UNC (例如 UNC5A-D) 受体的激动剂或拮抗剂。如本文所用的, 激动剂或拮抗剂激活或抑制 ROUNDABOUT 受体, DCC 或 UNC 受体的活性, 其优选是通过受体和配体之间的相互作用转导的信号或由不被配体占据的受体转导的信号抑制。

[0042] 在一些优选的实施方案中, 本发明的激动剂、拮抗剂和 / 或忌避因子选自导蛋白 (例如导蛋白 1, 导蛋白 2, 导蛋白 4, 导蛋白 G1), SLIT (例如 SLIT1, SLIT2, SLIT3), 肝配蛋白 (例如肝配蛋白 A2, A4, A5) 和脑信号蛋白 (例如脑信号蛋白 3A, 3B, 3C 和 3F), 其片段和其氨基酸序列。

[0043] 本文所用的术语 " 治疗或医治 " 指障碍或疾病的减轻或与障碍或疾病相关的症状的减轻, 症状的进一步发展或恶化的停止。

[0044] 术语 " 预防 " 包括疾病或障碍的预防或防止。

[0045] 术语 " 软骨缺损 " 指任何软骨异常, 包括软骨疾病, 例如由创伤或退行性过程引起的软骨变化。

[0046] 术语 " 退行性疾病 " 指伴有受损的软骨结构的疾病或缺损, 例如牵涉或不牵涉骨结构的软骨退化或破坏。优选地, 退行性疾病是退行性软骨疾病。其包括颞下颌关节障碍 (TMD), 髌臼唇障碍, 关节炎, 骨关节炎, 类风湿性关节炎, 银屑病关节炎, 幼年型慢性关节炎, 肢根假关节炎, 类风湿性多关节炎, 退行性椎间盘疾病, 骨软骨缺损, 浅表软骨缺损, 剥脱性骨软骨炎, 全层软骨缺损, 局部厚度 (partial-thickness) 软骨缺损, 半月板撕裂, 前交叉韧带损伤, 滑膜骨软骨瘤病, 强直性脊柱炎, 滑膜炎, 绒毛结节性滑膜炎。

[0047] 本文所用的术语软骨缺损和退行性疾病, 特别地, 不包括骨质疏松症。

[0048] 术语 " 退行性椎间盘疾病 (DDD) " 是慢性过程, 其特征部分在于一个或多个椎间盘的髓核中蛋白聚糖和水含量的渐进性丧失, 其可以在多种障碍, 例如特发性下腰痛, 椎间盘突出, 椎间盘内破裂或有裂隙的椎间盘, 神经根病, 椎管狭窄, 突出髓核诱导的坐骨神经痛, 坐骨神经痛, 特发性脊柱侧凸和 / 或脊髓病中变得明显。椎间盘退化等级可以通过手术

前的 MRI 分析进行分级。

[0049] 术语“关节软骨”覆盖关节中骨的部分的表面并且在两块骨之间起缓冲作用,以允许关节中的运动。正常健康的软骨被称为透明软骨。关节软骨由包埋入细胞内物质基质的特化细胞(软骨细胞)组成,所述物质富含蛋白聚糖,主要是聚集蛋白聚糖,胶原 II 型纤维,其他蛋白和水。基质由包埋入其内的软骨细胞产生和维持。软骨组织不受神经支配且不具有血管,并且由其下的(underlying)组织提供营养。

[0050] 非关节软骨不覆盖关节表面并且包括纤维软骨(包括关节间纤维软骨,例如半月板和椎间盘的纤维软骨)和弹性软骨。

[0051] 本文所用的术语“滑膜细胞”、“滑膜”或“滑膜成纤维细胞”指生理学上与滑膜相关或存在于滑膜空间的细胞;获自关节的滑膜或滑液的细胞。它还指覆盖滑膜关节的非软骨表面的细胞衬。滑膜由滑膜衬细胞和滑膜 subling(滑膜下层(subsynovium))组成,其与关节囊(jointcapsule)合并。

[0052] 术语“血管翳组织”指滑膜细胞的增殖和/或组织的侵蚀,例如细胞或物质沉积至软骨(例如关节软骨)上,关节软骨(牵涉或不牵涉软骨下(subchondral)区域)的侵袭或破坏。还包括细胞侵袭入软骨下的骨髓。

[0053] 在优选的实施方案中,本发明背后的问题通过利用忌避因子来解决,所述忌避因子用于制备用于预防和/或治疗退行性疾病的药物组合物,所述退行性疾病优选不是骨质疏松症,其中忌避因子选自具有下述序列的多肽,所述序列 a) 与 SLIT3(SEQ ID NO:1) 或导蛋白 1(SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列具有至少 85% 的同源性,优选 90%、95% 的同源性,更优选同一性, b) 是 SLIT3 或导蛋白 1 的活性片段,或 c) 与 b) 的活性片段的氨基酸序列具有至少 85%、90%、95% 的同源性。

[0054] 优选地,术语“活性片段”指多肽和成熟的全长多肽(例如成熟的 SLIT3 多肽)一样与相同的与受体或结合伴侣(binding partner)结合的活性。例如,结合可激活或抑制受体和下游级联。例如,SLIT3 片段的活性可以通过与其 ROBO 受体结合,使用本领域已知的方法例如 Biacore 结合测定(如(Marlot 等,2007)中所述的体外下拉测定),ELISA 蛋白结合测定或免疫沉淀法来确定。片段的活性还可以用本发明的实施例 2、3、4、6、7 或 9 中描述的测定(例如 Boyden Chamber 迁移测定,增殖测定或体内功能测定,例如实施例 6 和 7 中所述的)来确定。

[0055] 为了确定两个氨基酸序列的百分比同源性,对序列进行最佳比较目的的比对(例如可以在一个蛋白或核酸的序列中导入空位,以与另一个蛋白或核酸进行最佳比对)。然后比较对应氨基酸位置上的氨基酸残基。当一个序列中的位置由与另一个序列中的对应位置相同的氨基酸残基占据时,所述分子在该位置是同源的。

[0056] 两个序列之间的百分比同源性是由序列共有的相同位置的数目的函数(即,%同源性=相同位置的数目/位置的总数×100)。

[0057] 除上述方法外,两个序列之间的百分比同源性的确定还可以用数学算法来完成。用于比较两个序列的数学算法的优选的,非限定性实例是 Karlin 和 Altschul 的算法(1990Proc. Natl. Acad. Sci. USA90:5873-5877)。此算法被并入 Altschul 等的 NBLAST 和 XBLAST 程序(1990J. Mol. Biol. 215:403-410)。

[0058] BLAST 蛋白检索可以用 XBLAST 程序(score = 50, wordlength = 3) 进行,以获

得与本发明的 CCSRP 同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的带空位的比对,可以如 Altschul 等人 (1997Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402) 中所述,使用带空位的 BLAST。当使用 BLAST 和带空位的 BLAST 程序时,可以使用各个程序 (例如 XBLAST 和 NBLAST) 的缺省参数。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限定性实例是 Myers 和 Miller 的算法 (CABIOS 1989)。此类算法被并入 ALIGN 程序 (2.0 版) (其为 GCG 序列比对软件包的一部分)。当利用 ALIGN 程序来比较氨基酸序列时,可使用 PAM120 权重残基表,12 的空位长度罚分和 4 的空位罚分,以获得与本发明的 CCSRP 同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的带空位的比对,可如 Altschul 等人 (1997Nucleic Acids Res. 25 :3389-3402) 中所述,利用带空位的 BLAST。当利用 BLAST 和带空位的 BLAST 程序时,可使用各个程序 (例如, XBLAST 和 NBLAST) 的缺省参数。用于比较序列的数学算法的另一个优选的非限定性实例是 Myers 和 Miller 算法 (CABIOS 1989)。此类算法被并入 ALIGN 程序 (版本 2.0) (其是 GCG 序列比对软件包的一部分)。当使用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时,可使用 PAM120 权重残基表,12 的空位长度罚分和 4 的空位罚分。

[0059] 优选地,片段长度小于 1523 或 1522 个氨基酸,优选小于 1491、900、500、400、300、200 个氨基酸,优选至少 20、50、100 个氨基酸并直至 100、200、300、400、500 个氨基酸。在优选的实施方案中,根据本发明的忌避因子包含选自 SEQ ID NO :2、3、4、5、6、7、8 和 9 的氨基酸序列并且优选这样的多肽,其氨基酸序列比成熟 SLIT3 蛋白短。优选地,氨基酸序列长度短于 1523 或 1522 个,优选短于 1491 个或短于 900 个氨基酸,优选长度在 200 和 900 个氨基酸之间,或更优选长度在 220 和 760 个氨基酸之间,在 240 和 520 个氨基酸之间,在 250 和 300 个氨基酸之间。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的忌避因子至少包含 SEQ ID NO :6、7、8 或 9 的氨基酸序列并且氨基酸序列比成熟 SLIT3 蛋白短。

[0060] 术语“成熟 SLIT3 蛋白”指不具有信号肽序列的人 SLIT3 蛋白。优选地,成熟 SLIT3 蛋白从 SEQ ID NO :1 的位置 33 或 34 开始,或从 SEQ ID NO :2 的位置 1 或 2 开始。

[0061] 在一些实施方案中,忌避因子包含选自 SEQ ID NO :1-9 的氨基酸序列或与 SEQ ID NO :1-9 的氨基酸序列具有至少 85% 的同源性,其中优选所述氨基酸序列比成熟 SLIT3 蛋白短。

[0062] 在另一个优选的实施方案中,根据本发明的忌避因子至少包含 SEQ ID NO :1 的位置 34 至 917,位置 47 至 863,位置 66 至 857,位置 279 至 863,位置 279 至 857,位置 279 至 724,位置 279 至 504,位置 311 至 432,位置 335 至 432 或位置 312 至 437 的氨基酸序列。更优选,根据本发明的忌避因子至少包含 SEQ ID NO :1 的位置 308 至 413,位置 308 至 317,位置 331 至 340,位置 344 至 352,位置 357 至 366,位置 380 至 389,位置 394 至 402 或位置 404 至 413 的氨基酸序列或其组合。

[0063] 进一步优选的是这样的忌避因子,其中一个或多个 Cys 被另一种氨基酸取代,特别地,被 Ala 取代。优选忌避因子包含选自 SEQ ID NO :1 至 9,特别地 SEQ ID NO :2 至 9 的序列,其中一个或多个 Cys 被另一种氨基酸取代,特别地,被 Ala 取代。这样的忌避因子的优选的实例为 SEQ ID NO :21,其通过用 Ala 取代位置 85 的 Cys,从 SEQ ID NO :9 衍生。

[0064] 在优选的实施方案中,忌避因子至少在第二富亮氨酸重复结构域或同源的富亮氨酸重复结构域中是非糖基化的。

[0065] 本发明的术语“第二富亮氨酸重复结构域”指存在于 SLIT 蛋白中的保守的富

亮氨酸的氨基酸序列。SLIT3 的富亮氨酸重复 (LRR) 结构域由四个 LRR (LRR1-4) 组成, 其侧翼为氨基和羧基末端保守区域 (LRR-NR 和 LRR-CR) (Itoh 等, 1998 ;Howitt 等, 2004 ; Hohenester 等, 2006)。第二富亮氨酸结构域包含 SEQ ID 1 的位置 248 和 467 之间的氨基酸序列。同源的富亮氨酸重复结构域指具有第二富亮氨酸重复结构域的保守氨基酸替换的氨基酸序列, 其他的 SLIT 家族成员例如 SLIT1 和 SLIT2 的同源区域和 / 或与 SEQ ID 1 的位置 248 和 467 之间的氨基酸序列具有 80%, 85%, 90%, 95% 的同源性的同源区域。

[0066] 在进一步优选的实施方案中, 根据本发明的忌避因子是非糖基化的, 更优选地, 忌避因子是重组大肠杆菌 (*E. coli*) 衍生的蛋白。

[0067] 在进一步优选的实施方案中, 退行性疾病, 优选退行性软骨疾病, 选自退行性椎间盘疾病、半月板撕裂、前交叉韧带 (ACL) 损伤、关节炎、骨关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年型慢性关节炎、肢根假关节炎、类风湿性多关节炎、绒毛结节性滑膜炎或滑膜炎。

[0068] 在另一个优选的实施方案中, 关节软骨是透明关节软骨。

[0069] 在优选的实施方案中, 非关节软骨选自半月板和椎间盘。

[0070] 在一些实施方案中, 本发明的药物组合物和 / 或包含本发明的任何实施方案的分离的多肽的药物组合物是可注射的制剂, 其优选在缺损附近局部地, 或非全身地注射, 或更优选地关节内施用入滑液和 / 或滑液液体。

[0071] 在进一步优选的实施方案中, 本发明的药物组合物和 / 或包含本发明的任何实施方案的分离的多肽的药物组合物是全身施用的 (例如通过静脉内施用) 可注射的制剂。

[0072] 在特定的实施方案中, 药物组合物局部施用到需要治疗的区域。这可以通过例如手术期间局部输注, 局部应用, 通过注射, 借助导管或借助植入物来完成, 所述的植入物是多孔或无孔的。

[0073] 本发明包括的用于施用药物组合物的其他途径是皮内、肌内、腹膜内、皮下、鼻内或口服途径。特别地, 采用的剂量范围将取决于给药途径和待治疗的患者的年龄、重量和状况。

[0074] 施用给患者的多肽的适当的量优选 0.001mg/kg 患者体重至 100mg/kg 患者体重, 优选 0.01mg/kg 患者体重至 20mg/kg 患者体重, 优选 0.01 至 10mg/kg 患者体重, 最优选 0.1mg/kg 至 1mg/kg 患者体重。

[0075] 包含本发明的忌避因子的药物组合物和 / 或包含上下文中任何实施方案的分离的多肽的药物组合物可以在各种制剂例如药学可接受的载体中。适当的药学载体的实例在 "Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, 1990, ISBN#: 0912734027, Mack Pub Co) 中描述。制剂可以快速递送忌避因子或可以是缓释制剂。所述组合物可以包含治疗有效量的忌避因子和适当量的载体以提供适于施用给患者的形式。制剂应当适合施用的方式。不考虑给药途径, 忌避因子配制成可接受的单位剂型, 通过药学领域技术人员已知的常规方法。在优选的实施方案中, 忌避因子根据常规方法配制成用于静脉内施用给人类的药物组合物。一般地, 用于静脉内施用的药物组合物包含增溶剂例如无菌等渗水缓冲液, 其具有或不具有局部麻醉剂例如利多卡因。通常, 成分分别地或混合在一起地在单位剂型中提供, 例如作为密闭容器 (例如安瓿或小袋) 中的干燥的冻干粉末或无水的浓缩物。如果待通过输注施用药物组合物, 其可以分散到包含增溶剂的输液瓶中。

[0076] 在优选的实施方案中,制剂包括水性液体,盐溶液,固体,半固体,液体,糊剂,油灰 (putty) 剂型,分散剂,悬浮液,凝胶,脂质体,基质,固形材料 (shape stable material),原位安置材料 (insitu setting material),组织粘着生物材料 (tissue adhesivebiomaterial),可注射的和最小侵袭性的以及可植入的应用形式。

[0077] 在其它的实施方案中,本发明的药物组合物选自水性液体,固体,半固体,糊剂,油灰,脂质体,固形材料,基质,原位安置材料,组织粘着生物材料。

[0078] 在优选的实施方案中,药物组合物包含封装在脂质体中的忌避因子和 / 或忌避因子的分离的多肽。脂质体制剂具有优于溶液的有利方面:除了治疗剂的更长的持续时间和在施用部位的更慢的清除以外,保护蛋白质在生物环境内免于降解。

[0079] 脂质体通常包含具有核心的封闭的脂滴,所述的核心通常包含在水性介质中的化合物。在某些实施方案中,化合物与脂质成分化学结合或简单地包含在脂质体的水性内部隔室内。

[0080] 根据本发明提供的药物组合物优选作为干燥的脂质体组合物提供,所述的脂质体组合物可以重构以产生封装忌避因子和 / 或多肽的脂质体,优选脂质体制剂为干燥的重构的囊泡 (DRV),其在重构后在水溶液中形成封装蛋白的脂质体。本文所用的脂质体组合物为,例如干燥颗粒产品,其在加水后分散以形成包含生物学活性组分的多层脂质体制剂。有利地,通过使用干燥的脂质体避免稳定性问题,例如聚集或氧化。

[0081] 单独地或以混合物形式存在的用于制剂的适当的脂质包括中性或带正电的脂质,例如胆固醇,磷脂酰胆碱,氢化磷脂酰胆碱,二硬脂酰磷脂酰胆碱,鞘磷脂,二油酰 (dioleoyl) 磷脂酰胆碱,二油酰磷脂酰甘油,磷脂酰甘油,二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱,二棕榈酰胆碱,神经节苷脂,神经酰胺,磷脂酰肌醇,磷酸,双十六烷基磷酸, dimyristoyl 磷脂酰胆碱,硬脂胺,二棕榈酰磷脂酰甘油及其他类似的脂质。优选脂质混合物带电荷。脂质体制剂一般是至少两种脂质 (例如胆固醇和磷脂酰胆碱),更通常三种或更多脂质的混合物。

[0082] 本发明进一步提供分离的多肽,其与 SEQ ID NO:1 至 9 的氨基酸序列具有至少 85% 的氨基酸序列同源性,优选 90%,更优选 95% 的同源性,并且其中氨基酸序列短于成熟 SLIT3 蛋白,优选地其中分离的多肽长度短于 1523 个,优选短于 1491 个或短于 900 个氨基酸,优选长度在 200 和 900 个氨基酸之间,更优选长度在 200 和 760 个氨基酸之间,在 200 和 520 个氨基酸之间,在 200 和 300 个氨基酸之间。在优选的实施方案中,分离的多肽包含选自 SEQ ID NO:1 至 9 的氨基酸序列,更优选分离的多肽包含 SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、7、8 或 9 的氨基酸,并且其中氨基酸序列比成熟 SLIT3 蛋白短,优选其中分离的多肽长度短于 1523 个,优选短于 1491 个或短于 900 个氨基酸,优选长度在 200 和 900 个氨基酸之间,或更优选长度在 220 和 760 个氨基酸之间,在 240 和 520 个氨基酸之间,在 250 和 300 个氨基酸之间。

[0083] 在优选的实施方案中,本发明进一步提供分离的多肽,其至少包含 SEQ ID NO:1 的位置 34 至 917,位置 47 至 863,位置 66 至 857,位置 279 至 863,位置 279 至 857,位置 279 至 724,位置 279 至 504,位置 311 至 432,位置 335 至 432 或位置 312 至 437 的氨基酸序列。

[0084] 更优选,本发明提供分离的多肽,其至少包含 SEQ ID NO:1 的位置 308 至 413,位置 308 至 317,位置 331 至 340,位置 344 至 352,位置 357 至 366,位置 380 至 389,位置 394 至 402 或位置 404 至 413 的氨基酸序列或其组合。

[0085] 在优选的实施方案中,本发明的分离的多肽和 / 或忌避因子是 PEG 化的。这样修饰的多肽和 / 或忌避因子具有大于未修饰的试剂的生物半衰期,并且因此改善试剂医学治疗退行性障碍的功效。另外,降低了蛋白的聚集倾向。

[0086] PEG 化可以经由蛋白上的氨基或巯基与聚乙二醇 (PEG) 上的化学反应性基团 (碳酸盐 (酯), 酯, 醛或三氟乙基磺酸单甲氧基 (tresylate)) 之间的稳定的共价键实现。所得的结构可以是线性的或分支的。PEG 试剂例如 Roberts 等 (Roberts 等, 2002) 中所描述的。其他的 PEG 化试剂是,但不限于,甲氧基聚 (乙二醇) (mPEG), 甲基 PEO12 马来酰亚胺 PEG, 胺反应性,带甲基帽的含聚氧乙烯 (PEO) 的修饰试剂 (甲基 PEO_n -NHS 酯, $n = 4, 8, 12$)。

[0087] 还可以采用经修饰的和 / 或稳定的肽,例如具有修饰的键以防止肽降解的稳定的肽。

[0088] 本发明进一步提供包含任何上述实施方案的分离的多肽或忌避因子的药物组合物。

[0089] 在另一个优选的实施方案中,本发明提供任何实施方案的药物组合物,其中蛋白与载体,植入物或递送系统组合。

[0090] 用于本发明的载体,植入物或递送装置优选是生物相容的,即其是无毒的并且不引起体内的炎性反应。它们可以包括基质或支架结构并且可以是固体,液体,凝胶,糊状物或其他可注射的形式。优选地,载体,植入物或递送装置包含水凝胶,例如 W02005/113032 中所述的,特别是可注射的水凝胶,硫酸化的透明质酸,高取代的羧甲基纤维素和其盐,藻酸盐,藻酸丙二醇酯,壳聚糖,羟乙基淀粉 (hydroxethylstarch), 胶原,明胶,逆热力学凝胶 (reverse thermalgel) (例如 Pluronic F128), 基于壳聚糖的热敏共聚物 (例如壳聚糖 - **Pluronic®** 水凝胶), 多孔丝支架,多数微球体,脂质体制剂和羟磷灰石纤维网。

[0091] 在优选的实施方案中,根据本发明的载体包含由富含血小板的血浆组成的血纤蛋白凝胶,具有可生物降解的明胶水凝胶的富含血小板的血浆,血纤蛋白 / 透明质酸复合材料,封装因子的明胶水凝胶微球体,包含例如聚合物的可注射的可生物降解的水凝胶复合材料,所述的聚合物例如寡 (聚 (乙二醇) 延胡索酸酯 (盐), 聚交酯 (PLA) / 聚乙醇酸 (PGA) 和聚 ϵ -己内酯 (capronolactone))。

[0092] 优选地,载体包含壳聚糖 - 甘油磷酸或用壳聚糖 - 磷酸甘油溶液稳定的原位血块。

[0093] 在另一个实施方案中,递送系统包括可降解的水凝胶支架例如凝胶微颗粒,基于聚合物的可生物降解的和生物相容的水凝胶,聚合物加固的混合凝块或用于递送本发明的忌避因子和 / 或分离的多肽的其他基于聚合物的可生物降解的和生物相容的植入物或递送系统。

[0094] 本发明优选的聚合物包括胶原,硫酸软骨素,透明质酸,透明质酸盐 (酯), hyaluronic ester, 透明质酸苄酯,寡 (聚) (乙二醇) 延胡索酸盐 (酯), 壳聚糖,壳聚糖甘油磷酸,包括三元共聚物,例如明胶 / 软骨素 -6- 硫酸 / hyaluoran 三元共聚物或其任何组合。

[0095] 在进一步的实施方案中,药物组合物配制成缓释制剂。在另一个实施方案中,药物组合物配制成缓释制剂,所述缓释制剂提供间歇性释放。

[0096] 退行性疾病的治疗可以进一步通过用聚合物稳定在退化组织 (degenerated tissue) 的损伤处形成的血块来改善,所述的聚合物具有血栓形成活性 (thrombogenic

activity) 并且刺激创伤修复过程。因此,在进一步优选的实施方案中,药物组合物进一步包含至少一种具有血栓形成活性的物质,添加剂或基质。

[0097] 在进一步优选的实施方案中,聚合物形成血栓和 / 或刺激血小板聚集和脱粒。

[0098] 在另一个优选的实施方案中,聚合物是止血的,更优选,聚合物是止血的并且刺激创伤组织的血管再形成和 / 或结缔组织修复。

[0099] 在另一个实施方案中,聚合物在生理条件下溶解并且在与全血混合后形成固体植入物。这些植入物与正常凝块相比更利于与组织缺损粘附,并且因此改善软骨再生。

[0100] 在一些实施方案中,本发明的任何实施方案的药物组合物进一步包含软骨组织细胞 (cartilage cell), 优选地,其中软骨组织细胞为软骨细胞 (chondrocyte)。

[0101] 在任一上述实施方案或其组合中,来源于不同组织例如人耳、鼻、肋骨、内半月板细胞 (IMC)、脂肪垫细胞 (FPC)、滑膜细胞 (SMC)、关节软骨细胞或其他软骨细胞组织的人软骨细胞、间充质干细胞 (MSC) 和 / 或骨髓基质细胞的共封装,也是本发明的实施方案。特别地,这些细胞在有或没有生长因子的情况下增殖以增强不同软骨细胞类型的软骨形成,然后在移植后诱导形成软骨组织。

[0102] 根据本发明的间充质干细胞 (MSC) 是作为未定型的间充质祖细胞存在于许多成熟骨骼组织的原始或静息细胞群体。MSC 是可变的并且具有向几种成熟组织类型 (包括软骨、骨、脂肪及其他组织) 分化的能力,取决于环境和提供给这些静息细胞的生物学信号。MSC 可获自许多自体来源,包括骨髓、血液、肌肉组织和脂肪,其可以收获以分离不具有显著的供体部位病态或免疫原性潜力的此类细胞。

[0103] 此外,本发明背后的问题通过利用任何上述实施方案的多肽来解决,所述的多肽用于制备用于预防和 / 或治疗疾病 (例如退行性疾病) 的药物组合物。在优选的实施方案中,退行性疾病是任何上述实施方案中说明的退行性疾病。优选地,退行性疾病是关节炎,例如骨关节炎或类风湿性关节炎,包括慢性或急性类风湿性关节炎。

[0104] 在另一个实施方案中,本发明涉及根据任何上述实施方案的忌避因子用于影响间充质干细胞的迁移行为的用途。

[0105] 此外,本发明包括根据任何上述实施方案的忌避因子用于间充质干细胞的吸引或迁移的诱导的用途。

[0106] 优选地,本发明涉及根据任何上述实施方案的忌避因子用于诱导软骨形成和 / 或用于刺激软骨细胞增殖或分化的用途。

[0107] 本发明进一步包含分离的多肽,所述多肽包含共有序列 $C(Y)_3CYC(Y)_6C(Y)_{99}C(Y)_{47}CYC(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{13-22}C$ 。

[0108] 进一步优选的是分离的多肽,所述分离的多肽包含共有序列 $C(Y)_3CYC(Y)_6C(Y)_{99}C(Y)_{47}CYC(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{20}C(Y)_{13-22}C$, 其中 C 表示半胱氨酸并且 Y 表示任何氨基酸,其中至少一个半胱氨酸由除半胱氨酸外的任何其他氨基酸取代。通过用另一种氨基酸取代至少一个半胱氨酸,可以影响序列的折叠和 / 或二聚物 (dimer) 的形成。

[0109] 本发明进一步提供用于基因治疗 (用于预防和 / 或治疗退行性疾病) 的药物组合物,其包含忌避因子基因的 DNA 或其部分,其编码对退行性疾病 (例如本发明中描述的一种疾病) 具有治疗效果的忌避因子或其活性片段。

[0110] 根据本发明的药物组合物,优选地,忌避因子基因的 DNA 或其部分可以用逆转录

病毒载体,腺病毒载体,腺病毒相关病毒(AAV)载体,单纯疱疹病毒(HSV)载体,鼠白血病病毒(MLV)载体,慢病毒载体或质粒提供,其可以在已经用重组载体转化或转导的人细胞或重组细胞中表达,所述的重组载体包含编码忌避因子或其活性片段的DNA,从而将忌避因子局部(局部施用)、全身或连续施用给受损的组织。

[0111] 术语“DNA忌避因子基因”指编码忌避因子或其活性片段的DNA。其不限于天然分离的DNA,还包括天然核苷酸序列的任何修饰形式,其在翻译后形成本发明的任何实施方案的多肽,或形成保持忌避因子活性的多肽,优选地加至适用于本发明的目的与核酸可操作地连接的用于表达调控的元件(例如诱导型启动子元件和/或增强子元件)。重组载体还可以包含由基因编码的多肽分泌到细胞外所需的信号肽的核苷酸序列。载体可以进一步包含一个或多个选择标记基因或报告基因。

[0112] DNA可以来源于人、小鼠、大鼠或其他脊椎动物忌避因子。编码这些蛋白的核苷酸序列对于技术人员来说是易于获得的。优选地,DNA来源于人忌避因子。例如,序列可见于GenBank、SwissProt及其他数据库。它们可以是cDNA或基因组DNA,并且包含核酸序列的克隆可以来源于保藏机构例如ATCC或可以通过PCR方法克隆或可以化学合成。可以进一步就密码子使用优化DNA序列。忌避因子的DNA序列的实例为GI4507060(Slit1)、GI4759145(Slit2)、GI11321570(Slit3)、GI:148613883(导蛋白1)或其核酸片段。

[0113] 优选地,重组细胞是滑膜、皮肤、骨髓来源的自体成纤维细胞、淋巴细胞或树突细胞。最优选地,重组细胞是滑膜、皮肤的自体成纤维细胞或树突细胞。

[0114] 本发明的一个实施方案提供药物组合物和其用于局部递送编码忌避因子或其活性片段的核酸分子至受影响的组织例如关节炎关节,特别地至类风湿性滑膜的用途。特别地,所述药物组合物和其用途使得能够以治疗有效量将编码忌避因子的核酸分子有效地转染或转导入组织细胞例如滑膜细胞中,并且在足够的一段时间内,优选在靶细胞中高表达治疗蛋白。

[0115] 优选地,载体或质粒不整合入经转导的细胞的基因组中,例如以染色体外的方式表达蛋白。

[0116] 优选地,载体或质粒稳定地整合入经转导的细胞的基因组中,并且优选地提供治疗蛋白的长期和/或持续释放。

[0117] 优选地,药物组合物局部施用到受影响的组织例如关节炎关节指体内或离体施用到关节炎滑膜。核酸的离体递送包括用病毒载体转导自体的或非自体的滑膜细胞或用包含编码忌避因子或其部分的核酸的质粒转染,选择经转导的细胞并且将转导的细胞施用到受试者的类风湿性关节,通过例如将细胞再植入,注射或再输注入受试者的关节中。体内施用指将包含编码忌避因子或其部分的核酸的载体或质粒直接施用到受试者的关节,例如通过关节内注射。局部施用的优势在于需要较少的基因产物,从而较少的载体以治疗单独的关节。

[0118] 对于全身递送,优选将载体导入关节外的位置,通过例如肌内、皮下或静脉内注射,通过单次或重复注射或输注。

[0119] 优选地,上述实施方案的药物组合物进一步包含额外的药学可接受的赋形剂,例如但不限于,生理学液体,水,生理盐水,缓冲剂,乳化剂,稳定剂,冻干试剂等。

[0120] 可选地,用于基因治疗(用于预防和/或治疗退行性疾病)的药物组合物包含忌

避因子基因的DNA或其部分(其编码忌避因子或其活性片段),所述药物组合物被导入脂质体并且直接注射入关节区域,其中所述脂质体与滑膜细胞融合,导致任何上述实施方案的忌避因子的体内表达。

[0121] 优选地,任何上述实施方案的药物组合物以裸DNA形式注射。

[0122] 本发明进一步通过附图和实施例来说明,其仅为举例说明性的并且不构成对本发明的范围的限定。

[0123] 图1显示导蛋白1对滑膜成纤维细胞的迁移的抑制作用。导蛋白1对第3代和第10代的OA(A)和RA(B)滑膜成纤维细胞的作用在BoydenChamber测定中测量。将导蛋白1分别应用至上层或下层小室。

[0124] 图2显示添加Slit3后在Boyden Chamber Migration测定中分析的OASF和RASf的迁移。

[0125] 与对照相比,Slit3温育(0.1 μ g/ml)在早期代次中(P3和P4)减少OASF的迁移至约60%(Slit3在上层小室中,与OASF一起)和约40%(Slit3在下层小室中)。在RASf(P3/P4)中,Slit3分别减少迁移至约45%(Slit3在上层小室中)和50%(Slit3在下层小室中)。

[0126] 图3显示Slit3对骨关节炎(OASF)患者和类风湿性关节炎(RASf)患者的滑膜成纤维细胞的增殖的影响。Slit3(0.1 μ g/ml)与OASF和RASf一起温育略微减少OASF和RASf的生长。

[0127] 图4显示添加Slit3后人间充质干细胞(HMSC)的分化。

[0128] A处理7天后,Slit3增加了聚集蛋白聚糖的表达。

[0129] BSlit3处理进一步增强TGF β 诱导的HMSC向软骨细胞的分化(分析MIA表达)。

[0130] 图5显示SDS PAGE上的用RTS 500系统(Roche MolecularBiochemicals)表达的LRR2构建体的表达。

[0131] 泳道1:作为对照的RTS 500重组蛋白(无His-标签)10 μ l

[0132] 泳道2:重组SLIT3片段LRR210 μ l

[0133] 泳道3:重组SLIT3片段LRR21 μ l

[0134] 泳道4:重组小鼠Slit3(250ng;R&D Systems)

[0135] 图6显示使用Slit3(R&D Systems),LRR2,LRR2dNC的SLIT3介导的对MeI Im(R&D Systems)和A 375细胞的迁移的抑制。

[0136] 图7和8显示用Slit 3(R&D Systems,图7,图8泳道2,LRR2(图7,图8泳道3),LRR2dNC(图7,图8泳道4),LRR 2dNCmut(图8泳道5)和LRR3(图8泳道6)处理后,在早期代次中,在BoydenChamber Migration测定(根据实施例2和5)中减少的OASF和RASf的迁移。泳道1:对照。

[0137] 图9显示与不同的忌避蛋白共培养后,测量为OA滑膜成纤维细胞的上清液中的GAG蛋白水平的软骨破坏的抑制。

[0138] 泳道1:软骨对照(无OA滑膜成纤维细胞)

[0139] 泳道2:OA滑膜成纤维细胞

[0140] 泳道3:OA滑膜成纤维细胞+导蛋白1

[0141] 泳道4:OA滑膜成纤维细胞+mSlit3

[0142] 泳道 5 :OA 滑膜成纤维细胞 +LRR2dNCmut

[0143] 实施例 1 :原代人滑膜成纤维细胞的分离

[0144] 经知情同意和当地道德标准委员会批准后,从四个患有 RA 的患者和四个患有 OA 的患者 (Clinic of Orthopedic Surgery, SchulthessClinics, Zuerich, Switzerland) 经滑膜切除术和关节成形术获得滑膜组织样品。根据临床和放射学标准,进行 OA 的诊断。所有 RA 患者满足关于 RA 诊断的 American College of Rheumatology 1987 标准。在 OA 患者中,从表现出终末期关节间隙狭窄的髋关节和膝关节获得滑膜组织,而在 RA 患者中,材料取样自腕关节或近端指节间关节 (关节表现出充分显现的 (florid) 滑膜炎和 / 或关节炎破坏)。机械切碎滑膜组织,在无菌磷酸盐缓冲盐溶液 (PBS) 中彻底清洗并且在 37℃ 在连续搅动下,用 150mg/ml 分散酶 II (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) 消化 1h。将所得到的细胞悬浮液接种到组织培养皿中并且在包含 10% 胎牛血清和 100U/ml 青霉素每 100 μ g/ml 链霉素的 Dulbecco' s modified Eagle' s 培养基 (DMEM ;Gibco LifeTechnologies, Basel, Switzerland) 中,在增湿气氛中在 37℃ 和加入 5% CO₂ 下培养。在第 3 次,第 5 次和第 10 次传代时,对贴壁的成纤维细胞进行清洗、胰蛋白酶处理,然后将其用于 RNA 分离或用于测定中。作为对照,使用真皮成纤维细胞。

[0145] 实施例 2 :来自 RA 和 OA 患者的原代人滑膜成纤维细胞的迁移的抑制

[0146] 在迁移测定中分析忌避因子对来自骨关节炎和类风湿性关节炎患者的滑膜成纤维细胞的迁移的抑制潜力。

[0147] 用 Boyden Chamber 测定分析忌避因子对细胞迁移的作用,所述测定包含具有 8 μ m 孔径的聚碳酸酯过滤器 (Costar, Bodenheim, Germany),基本上如之前所描述的 (Jacob 等,1995)。用明胶包被过滤器。用成纤维细胞 - 条件培养基充满下层隔室,用作化学引诱物。通过胰蛋白酶处理 2 分钟收获细胞,将其以 2×10^5 个细胞 /ml 的浓度重悬浮于无 FCS 的 DMEM 中并且置于小室的上层隔室中。在 37℃ 温育 4 小时后,收集过滤器并且对粘着至下表面的细胞进行固定,染色和计数。忌避因子,例如重组导蛋白 1 (来源于 HEK293 细胞的人重组导蛋白 1 蛋白,氨基酸 28-604, N- 末端 Flag 标签, Alexis Biochemicals), Slit3 (重组小鼠 Slit3 蛋白, Ser27-His901, R&D Systems), 以 0.1 μ g/ml 的浓度加入至系统的上层或下层小室。

[0148] 已知在体外培养期间,滑膜成纤维细胞发生表型变化,并且当在体外生长时,这些细胞逐渐丧失它们的侵袭性表型 (Zimmermann 等,2001)。因此,本发明人希望获得新鲜分离的滑膜成纤维细胞 (其具有尽可能接近体内观察到的构型的表型特征),并且使用早期和晚期代次的细胞分析忌避因子对迁移的作用。

[0149] 这些实验清楚地证明了这些因子对新鲜分离的滑膜成纤维细胞的迁移的抑制,所述成纤维细胞来自患有 RA 和 OA 的患者的人滑膜组织。

[0150] 在图 1 和 2 中描述该结果。

[0151] 如图 1(A) 和图 1(B) 中所示,在早期代次 (第 3 代) 中存在对 RA 和 OA 滑膜成纤维细胞的迁移的强抑制,而来源于健康供体的或高代次的成纤维细胞不受影响。在将重组导蛋白 1 添加到上层和下层小室后,分别观察到所述作用,表明并非趋化作用而是迁移的分子过程受到导蛋白 1 的影响。

[0152] 本文呈现的这些发现表明导蛋白可能通过排斥细胞,降低细胞的迁移能力。

[0153] 如图 2 中所示,分析 OASF 和 RASF 的迁移和导向因子 Slit3 对细胞的影响。在早期代次中 (P3 和 P4),确定了 Slit3 对 OASF 和 RASF ($n = 2$) 的强抑制作用 (与未经处理的细胞相比)。这些作用不仅在上层小室中存在 Slit3 (与 SF 一起) 的情况下是明显的,而且在下层小室中 Slit3 与成纤维细胞-条件培养基 (作为化学引诱物) 组合的情况下也是明显的。

[0154] 实施例 3:重组 Slit3 和导蛋白 1 对 OASF 和 RASF 的增殖的影响

[0155] 根据供应商的说明书,利用 Cell Proliferation Kit II (Roche),测量增殖。其基于细胞增殖的比色 (XTT) 测量的非放射性定量 (进行 4 天)。以 $0.1 \mu\text{g/ml}$ 的浓度添加重组 Slit3 或导蛋白 1。细胞增殖测定显示 OASF 的计算的倍增时间为约 4.5 天 (d) 而 RASF 为 3.5 天。Slit3 处理导致对增殖的弱的抑制,Slit3 处理后, OASF 和 RASF 的细胞生长减速约 1 天 (图 3)。在导蛋白 1 处理后,也观察到对细胞生长的弱的抑制;然而该作用不显著。

[0156] 实施例 4:人间充质干细胞 (HMSC) 的分化

[0157] 为了评估 Slit3 对分化的作用,HMSC 在团块培养物 (pellet culture) 中培养并且分别用 Slit3、TGF β 或 Slit3/TGF β 处理。处理 7 天后, Slit3 增加了聚集蛋白聚糖的表达,而处理 21 天后, Slit3 增加了 MIA 的表达 (未通过 TGF β 诱导) (图 4)。分析 MIA 的表达, Slit3 处理略微增强了 TGF β 诱导的 HMSC 向软骨细胞的分化 (图 4B)。

[0158] 实施例 5:RTS 系统中 SLIT3 构建体的表达

[0159] 为了分析 SLIT3 的片段是否也能够用作药物有效成分以用于制备用于治疗 RA 的药物,产生不同的人 SLIT3 构建体并且在根据实施例 1 至 4 的功能测定中测试,使用 MeI Im 细胞, A375 细胞, 原代人 RASF 和 OASF 细胞和 HMSC 和实施例 9。通过 PCR 扩增 cDNA 制备所有构建体,所述 cDNA 来源于分离自人软骨细胞或滑液成纤维细胞 (来自多个供体) 的 RNA。用引物 5' GAC CAT ATG GCC CCT GCC CCA CCA AGT GTACC 3' 和 5' GAC CCC GGG ATT GCA TTT GGC CAC AAT G 3' 扩增构建体 LRR1-4 (SEQ ID NO:7),用引物 5' GAC CAT ATG ATC TCC TGC CCT TCGCCC TGC 3' 和 5' GAC CCC GGG GAA GCA CTC GCT GCT GAA CC 3' 扩增 LRR2 (SEQ ID NO:8),用引物 5' GAC CAT ATG ATC GTC GAA ATA CGCCTA GAA C 3' 和 5' GAC CCC GGG TGG GTT TTG GGC TAA GTG GAG 3' 扩增 LRR2dNC (SEQ ID NO:9),并且用引物 5' GAC CAT ATG GAC CTCGTG TGC CCC GAG AAG 3' 和 5' GAC CCC GGG GCT CAG CTG GCA GCT ACTCTC 3' 扩增 LRR3。LRR2dNCmut (SEQ ID NO:21),其中剩下的 Cys 用 Ala 替换 (Cys 85Ala),使用 QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Amsterdam, Netherlands) 和引物 5' CCA ACA AGATCA ACG CCC TGC GGG TTA ACA CGT TTC AGG 3' 和 5' CCT GAA ACG TGTTAA CCC GCA GGG CGT TGA TCT TGT TGG 3' 通过定点诱变来克隆。将片段克隆入表达载体 pIVEX2.3-MS2 的 NdeI 和 SmaI 位点中并且通过测序验证该插入序列。在 RTS 500 系统 (Roche Molecular Biochemicals) 中表达带 C-末端 HIS 标签的 SLIT3 蛋白。按照厂商的说明书进行体外转录和翻译。通过 Western 印迹分析 (SDS PAGE) 分析蛋白表达,使用不同量 ($1 \mu\text{l}$, $10 \mu\text{l}$) 的用 RTS 500 表达系统产生的蛋白 (图 5)。在迁移测定中分析用 RTS 500 系统产生的蛋白片段的活性,使用 a) MeI Im (由 Jacob 等人, 1995 描述), b) A375 (CRL1619, ATCC) 细胞和 c) 实施例 2 的 OASF 和 RASF 细胞,使用实施例 2 中描述的 Boyden Chamber 测定,除了将 RTS 500 系统产生的 $1 \mu\text{l}$ 蛋白添加到系统的上层或

下层小室以外。如图 6A 和 B, 图 7 和图 8 所示, 使用 Slit3, LRR2, LRR2dNC 和 LRR2dNCmut, 存在对所有细胞系的迁移的抑制。令人惊讶地, 缺失 SLIT3 蛋白序列的 N- 和 C- 末端稳定部分的 LRR2dNC 蛋白以及 LRR2dNCmut (Cys85Ala 变体) 也抑制滑膜成纤维细胞的迁移, 表明包含二级结构部分的蛋白的最小结合结构域对抑制作用来说是足够的。

[0160] 实施例 6 : 用于类风湿性关节炎 (RA) 的治疗的动物模型

[0161] 可以在不同的动物模型中分析滑膜成纤维细胞的迁移和破坏行为以及本发明的忌避因子的影响。用于分析用于治疗类风湿性关节炎 (RA) 的新的生物制剂的良好建立的模型是啮齿动物, 例如大鼠或小鼠中的胶原诱导的关节炎 (CIA) 模型 (Bendele 等, 2000)。通过皮内 / 皮下注射弗氏不完全佐剂中的牛 II 型胶原, 在雌性大鼠中诱导 RA。当大鼠发展疾病时, 用例如脂质体的持续递送系统或生理盐水 (PBS) 媒介物皮下或者腹膜内施用忌避因子。可以通过测定踝关节肿胀和测量炎症以及通过脱钙后关节的组织病理学评分来分析治疗。

[0162] 可选择的模型是严重联合免疫缺陷小鼠 (SCID) 共移植模型。人 RASF 和新鲜的人软骨与惰性海绵 (例如胶原海绵) 一起共移植入 SCID 小鼠的肾包膜 (kidney capsule) 下并且维持 60 天 (Huber 等, 2006)。RASF 细胞侵袭并且破坏人关节软骨。

[0163] 所用的第三个模型是抗体诱导的关节炎模型, 其中腹膜内注射 LPS/PBS 中的抗 II 型胶原单克隆抗体的混合物, 在小鼠例如 Balb/c 小鼠中诱导 RA (Terato 等, 1992)。

[0164] 第四个模型是兔的慢性 OVA 诱导的或抗原诱导的关节炎模型 (Podolin 等, 2002)。通过皮下注射 2ml CFA 中的 10mg OVA 来敏化动物并且以 3 至 4 周的间隔, 通过肩胛骨内 (intrascapula) 施用 IFA 中的 OVA 进行加强。将 PBS 中的 OVA 施用入阳性皮肤测试的动物的膝关节。给兔 p.o. 施用忌避因子例如 SLIT3 片段或媒介物。为了测量化合物的作用, 对滑液进行总细胞计数, 分化细胞分析, eicosanoid/ 细胞因子测量, 并用测径器确定膝直径。在施用化合物之前和之后获取血样。

[0165] 当就化合物参与滑膜成纤维细胞迁移的变化和关节炎的治疗选择测试化合物时, 可以将所述化合物添加到系统中, 任选地在盐溶液中或作为药物制剂例如脂质体制剂。

[0166] 实施例 7 : 用于骨关节炎 (OA) 的治疗的动物模型

[0167] 用于骨关节炎的治疗的动物模型是兔前交叉韧带切断模型。在全身麻醉和无菌条件下, 经由内侧髌骨旁切开术 (在内侧副韧带和髌韧带之间) 接近兔的膝关节。将髌骨侧移并且移动和缩回髌骨下脂肪垫以暴露整个前交叉韧带。

[0168] 手术和注射方案如下: 每组 6 只动物 (假对照 (sham), 媒介物和忌避因子)。对动物进行 1 次或多次 (例如 5 次) 注射, 优选每 10 天。在最后一次注射后 10 天处死动物并且获得 X 光片。

[0169] 然后, 制备样品以在用番红 O- 固绿和苏木精伊红染色后进行组织学检查 (例如用 10% 中性缓冲的福尔马林固定, 在 EDTA 中脱钙并且石蜡包埋)。

[0170] 实施例 8 : 体内基因递送

[0171] 基因治疗载体可以用分子生物学的常规方法构建。滑膜成纤维细胞的非病毒和病毒的转导例如在 Meinecke 等, 2007 (通过引用并入本文) 中描述。可以在类风湿性关节炎和骨关节炎的不同动物模型 (例如但不限于实施例 6 和 7 中描述的那些) 中分析局部的关节内基因治疗。

[0172] 本文中引用的各个专利申请和专利以及本文中引用的各个文件或参考文献通过引用明确地并入本文并且可以用于本发明的实践(“本文引用的参考文献”)。各个引用的文件或参考文献以及专利申请和专利和引用的参考文献中引用的专利通过引用明确地并入本文。

[0173] 虽然已阐明和描述了优选实施方案,但应当理解,可根据本领域的普通技术进行改变而不背离权利要求所定义的更广方面的本发明。

[0174] 实施例 9 :GAG 释放的抑制

[0175] 在有或没有 OA 滑膜成纤维细胞(50,000 个细胞)的情况下温育人软骨的样品(立方体边长 5mm,4 个立方体/处理(50mg))。另外,分别用导蛋白 1, mSlit3 或 LRR2dNCmut 处理具有 OASF 的样品。共培养 6 天后获取上清液并且 GAG 浓度用商业可获得的 GAG-ELISA(Euro-Diagnostica, Malmo, Sweden ;Wieslab sGAG quantitativeKit) 测量。结果示于图 9 中。

[0176] 参考文献

[0177] 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 1 in animal models of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum 43(12) :2648-2659.

[0178] Hohenester E, Hussain S and Howitt JA(2006)Interaction of the guidance molecule Slit with cellular receptors. Biochem Soc Trans 34 :418-421.

[0179] Howitt JA, Clout NJ and Hohenester E(2004)Binding site for Roboreceptors revealed by dissection of the leucine-rich repeat region of Slit. Embo J 23 :4406-4412.

[0180] 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.

[0181] Itoh A, Mlyabayashi 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.

[0182] 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.

[0183] Katoh Y and Katoh M(2005)Comparative genomics on SLIT1, SLIT2, and SLIT3 orthologs. Oncol Rep 14(5) :1351-1355.

[0184] Klagsbrun M and Elchmann A(2005)A role for axon guidance receptors and ligands in blood vessel development and tumor angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev 16 :535-548.

- [0185] 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.
- [0186] 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.
- [0187] Meinecke, L., Rutkauskaitė, E., Cinski, A., Müller-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.
- [0188] 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.
- [0189] Pap T(2003) New insights into integrin signalling: implications for rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Res Ther* 5 :154-155.
- [0190] Pap T(2007) [Regulation of apoptosis in aggressive fibroblasts.]. *Z Rheumatol* 66 :239-242.
- [0191] 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.
- [0192] Roberts MJ, Bentley MD and Harris JM(2002) Chemistry for peptide and protein PEGylation. *Adv Drug Deliv Rev* 54 :459-476.
- [0193] Terato K, Hastey 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.
- [0194] Vargesson N, Luria V, Messina L, Erskine L and Laufer E(2001) Expression patterns of Slit and Robo family members during vertebrate limb development. *Mech Dev* 106 :175-180.
- [0195] Yasuda T(2006) Cartilage destruction by matrix degradation products. *Mod Rheumatol* 16 :197-205.
- [0196] 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.

序列表

<110>Scil Technology GmbH

<120>SLIT, NEPHRIN, 肝配蛋白或脑信号蛋白用于治疗软骨疾病的用途

<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> 智人 (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
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
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
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
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
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
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
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
Leu Ser Pro Arg Cys Pro Glu Gln Cys Thr Cys Met Glu Thr Val Val		
725	730	735

Arg Cys Ser Asn Lys Gly Leu Arg Ala Leu Pro Arg Gly Met Pro Lys			
740	745	750	
Asp Val Thr Glu Leu Tyr Leu Glu Gly Asn His Leu Thr Ala Val Pro			
755	760	765	
Arg Glu Leu Ser Ala Leu Arg His Leu Thr Leu Ile Asp Leu Ser Asn			
770	775	780	
Asn Ser Ile Ser Met Leu Thr Asn Tyr Thr Phe Ser Asn Met Ser His			
785	790	795	800
Leu Ser Thr Leu Ile Leu Ser Tyr Asn Arg Leu Arg Cys Ile Pro Val			
805	810	815	
His Ala Phe Asn Gly Leu Arg Ser Leu Arg Val Leu Thr Leu His Gly			
820	825	830	
Asn Asp Ile Ser Ser Val Pro Glu Gly Ser Phe Asn Asp Leu Thr Ser			
835	840	845	
Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Thr Asn Pro Leu His Cys Asp Cys Ser			
850	855	860	
Leu Arg Trp Leu Ser Glu Trp Val Lys Ala Gly Tyr Lys Glu Pro Gly			
865	870	875	880
Ile Ala Arg Cys Ser Ser Pro Glu Pro Met Ala Asp Arg Leu Leu Leu			
885	890	895	
Thr Thr Pro Thr His Arg Phe Gln Cys Lys Gly Pro Val Asp Ile Asn			
900	905	910	
Ile Val Ala Lys Cys Asn Ala Cys Leu Ser Ser Pro Cys Lys Asn Asn			
915	920	925	
Gly Thr Cys Thr Gln Asp Pro Val Glu Leu Tyr Arg Cys Ala Cys Pro			
930	935	940	
Tyr Ser Tyr Lys Gly Lys Asp Cys Thr Val Pro Ile Asn Thr Cys Ile			
945	950	955	960
Gln Asn Pro Cys Gln His Gly Gly Thr Cys His Leu Ser Asp Ser His			
965	970	975	
Lys Asp Gly Phe Ser Cys Ser Cys Pro Leu Gly Phe Glu Gly Gln Arg			
980	985	990	
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

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
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
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
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
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

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> 智人

<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> 智人

<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

33

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 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> 智人

<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 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
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
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
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															

 $\langle 210 \rangle_8$ $\langle 211 \rangle 223$

<212>PRT

〈213〉 智人

 $\langle 400 \rangle_8$

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	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> 智人

<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> 智人

<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
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
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
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
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> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (32)

<400>11

gaccatatgg cccctgcccc accaagtgtgta cc 32

<210>12

<211>28

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (28)

<400>12

gaccccgggga ttgcatttgg ccacaatg 28

<210>13

<211>30

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (30)

<400>13

gaccatatga tctcctgccc ttgcacctgc 30

<210>14

<211>29

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (29)

<400>14

gaccccgggg aagcactcgc tgctgaacc 29

<210>15

<211>31

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (31)

<400>15

gaccatatga tcgtcgaaat acgcctagaa c 31

<210>16

<211>30

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (30)

<400>16

gaccccgggt gggtttttggg ctaagtggag 30

<210>17

<211>30

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (30)

<400>17

gaccatatgg acctcgtgtg ccccgagaag 30

<210>18

<211>30

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (30)

<400>18

gaccccgggg ctcagctggc agctactctc 30

<210>19

<211>39

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1).. (39)

<400>19

ccaacaagat caacgccctg cgggttaaca cgtttcagg 39

<210>20

<211>39

<212>DNA

<213> 智人

<220>

<221>misc_feature

<222>(1)..(39)

<400>20

cctgaaacgt gttaaccgc agggcggtga tcttggtgg 39

<210>21

<211>130

<212>PRT

<213> 智人

<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	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															

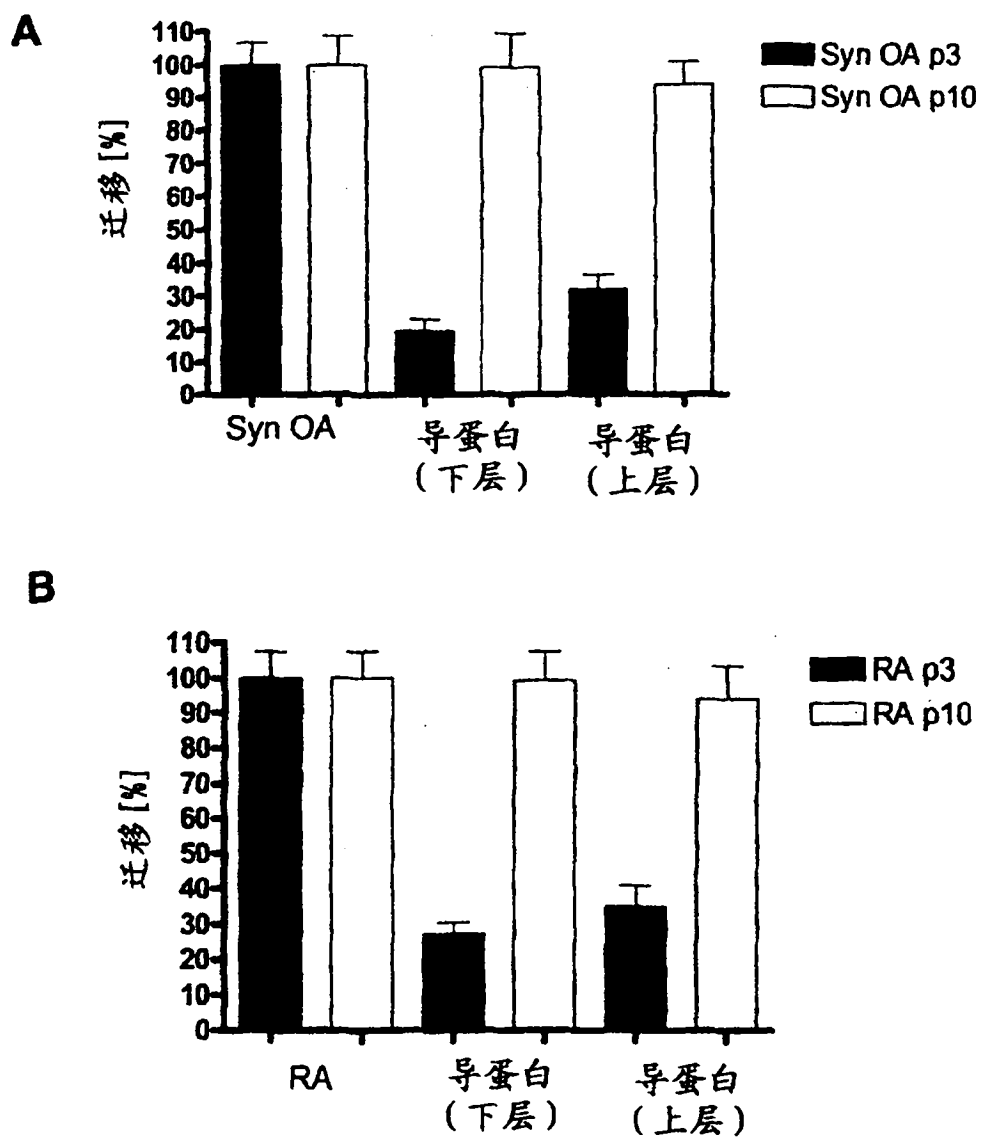


图 1/9

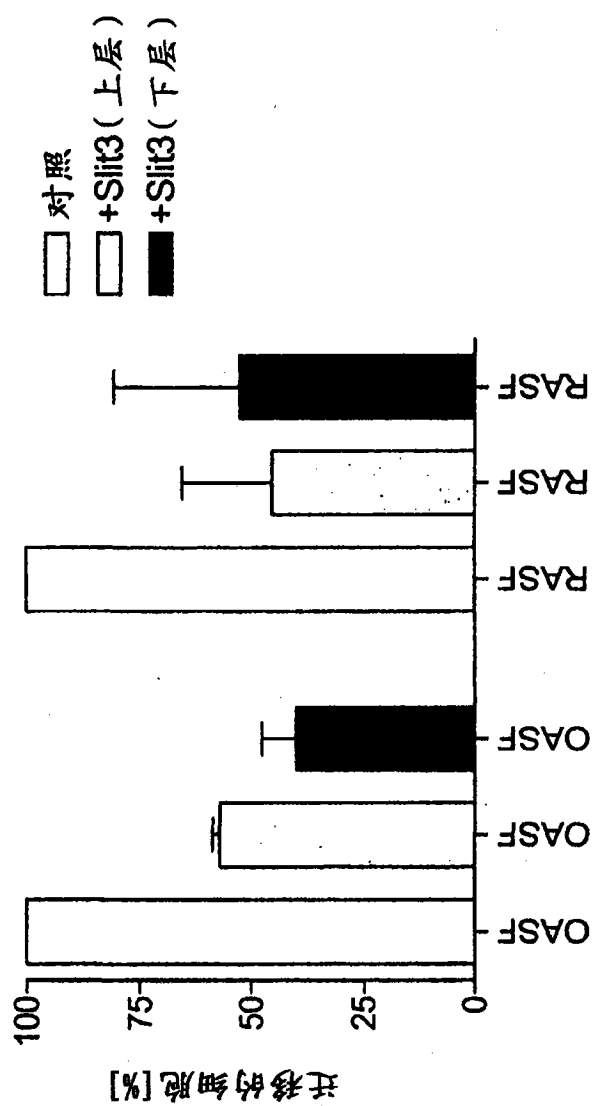


图 2/9

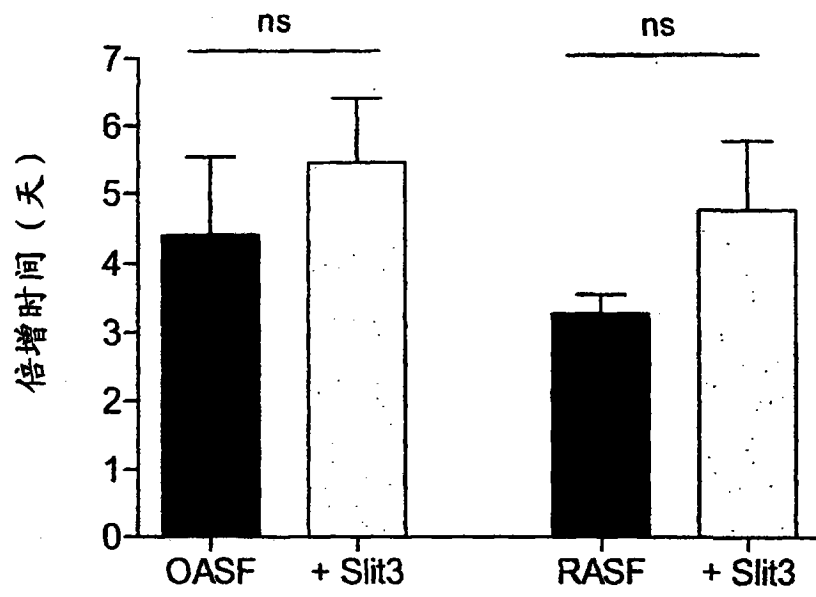


图 3/9

MIA

聚集蛋白聚糖

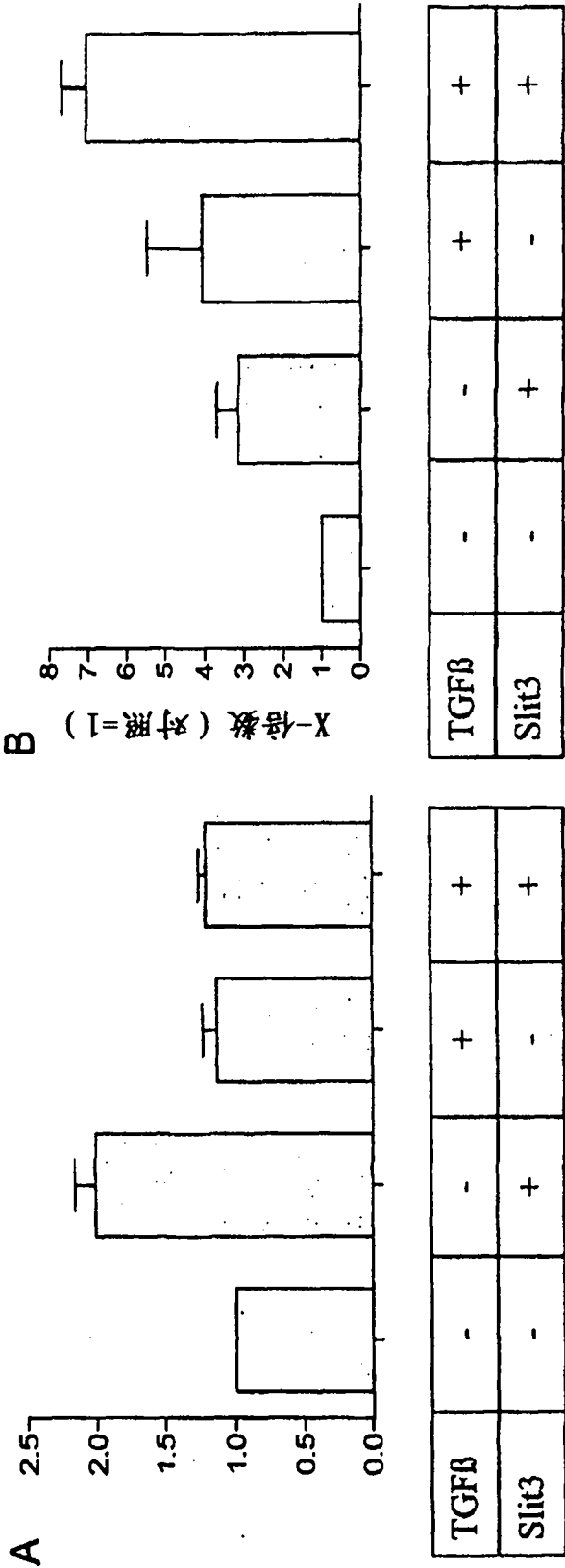


图 4/9

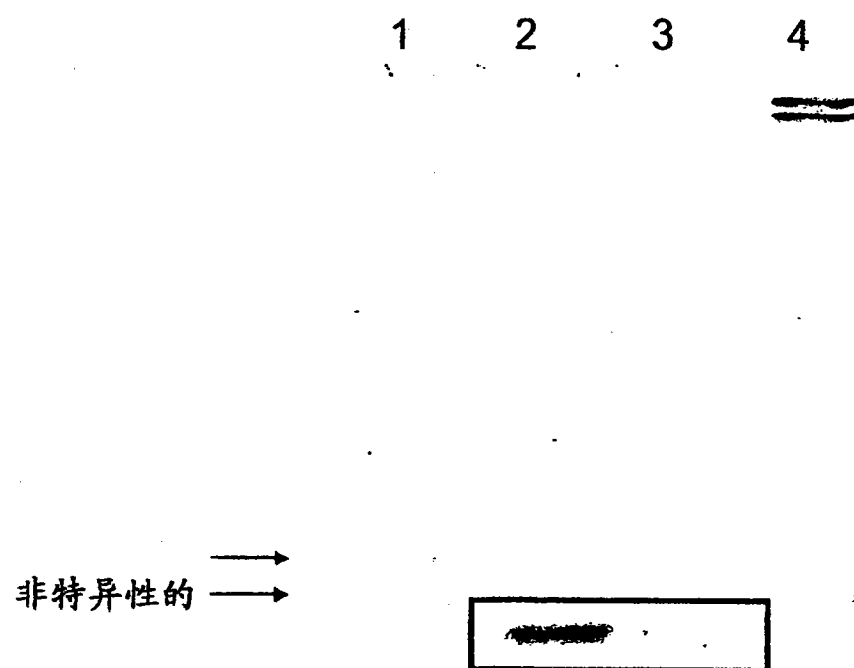


图 5/9

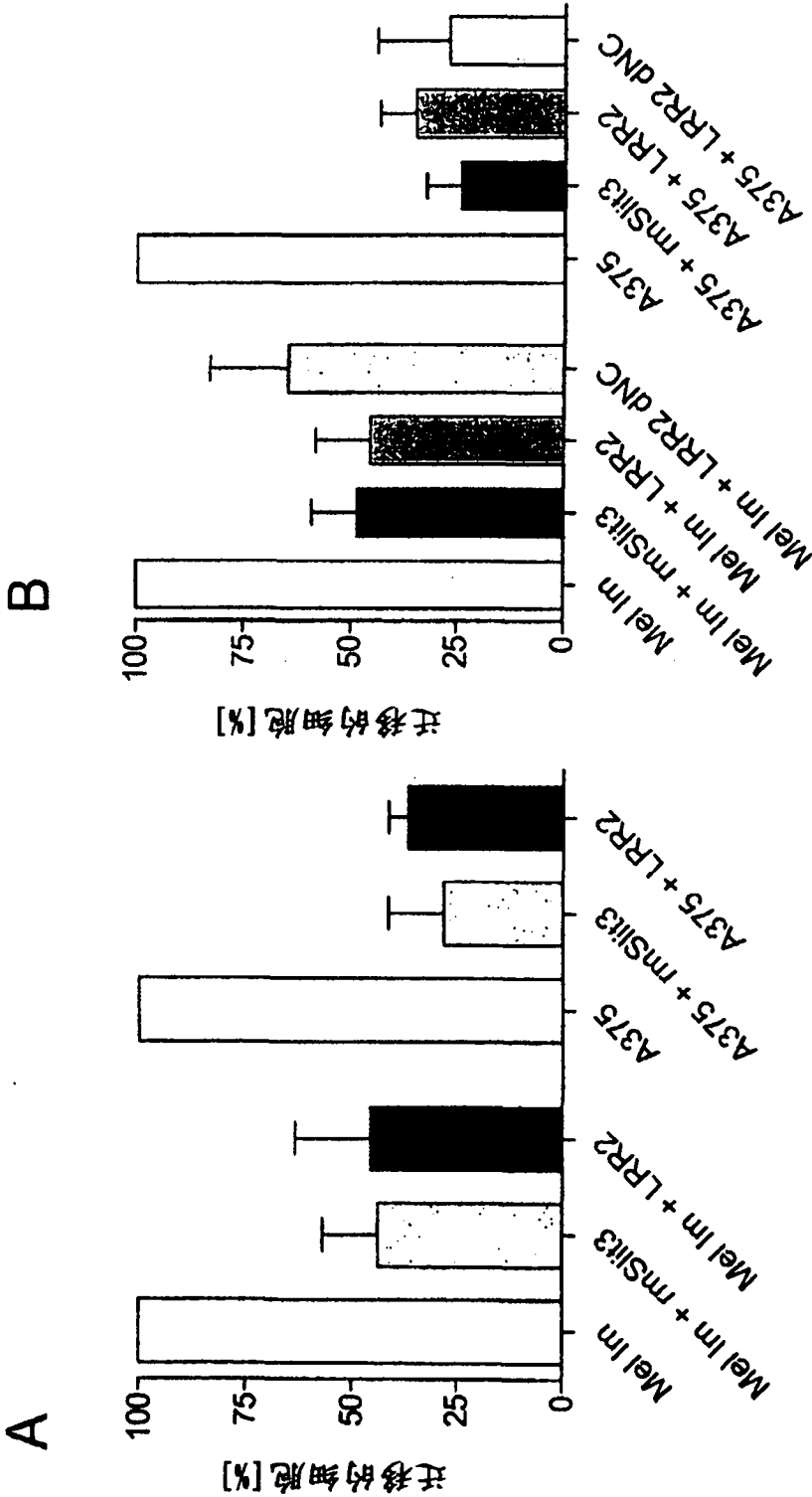


图 6/9

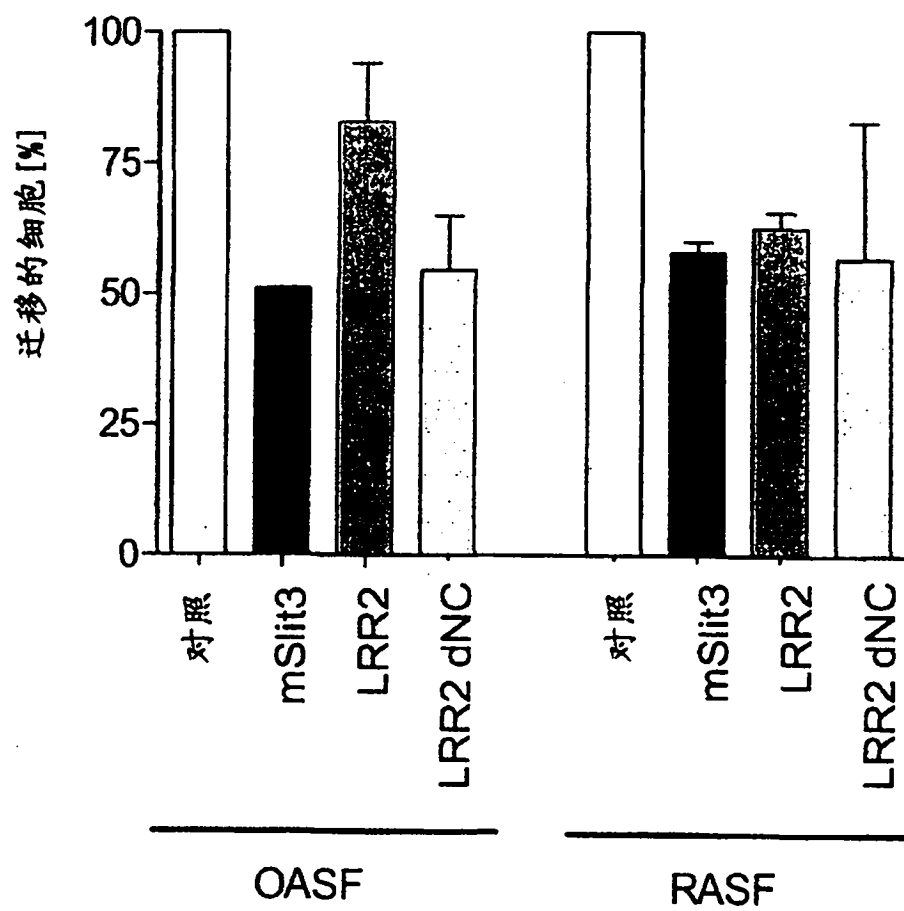


图 7/9

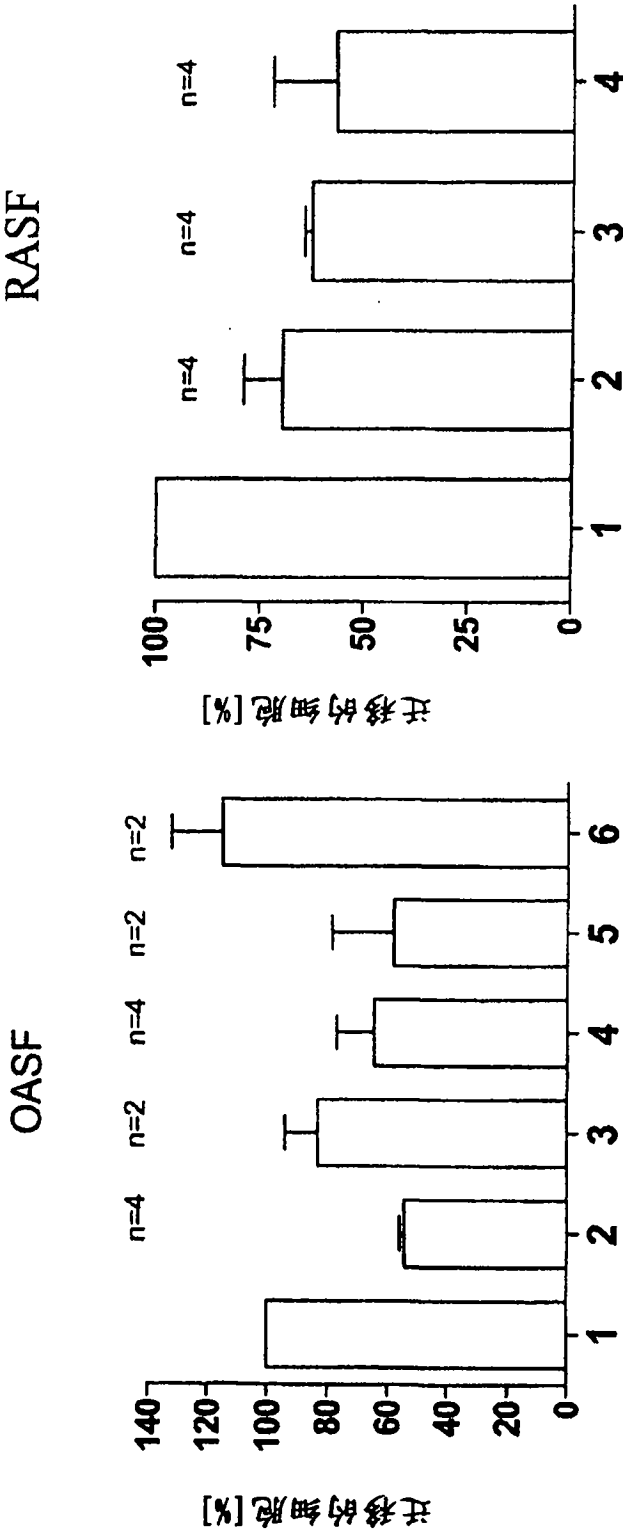


图 8/9

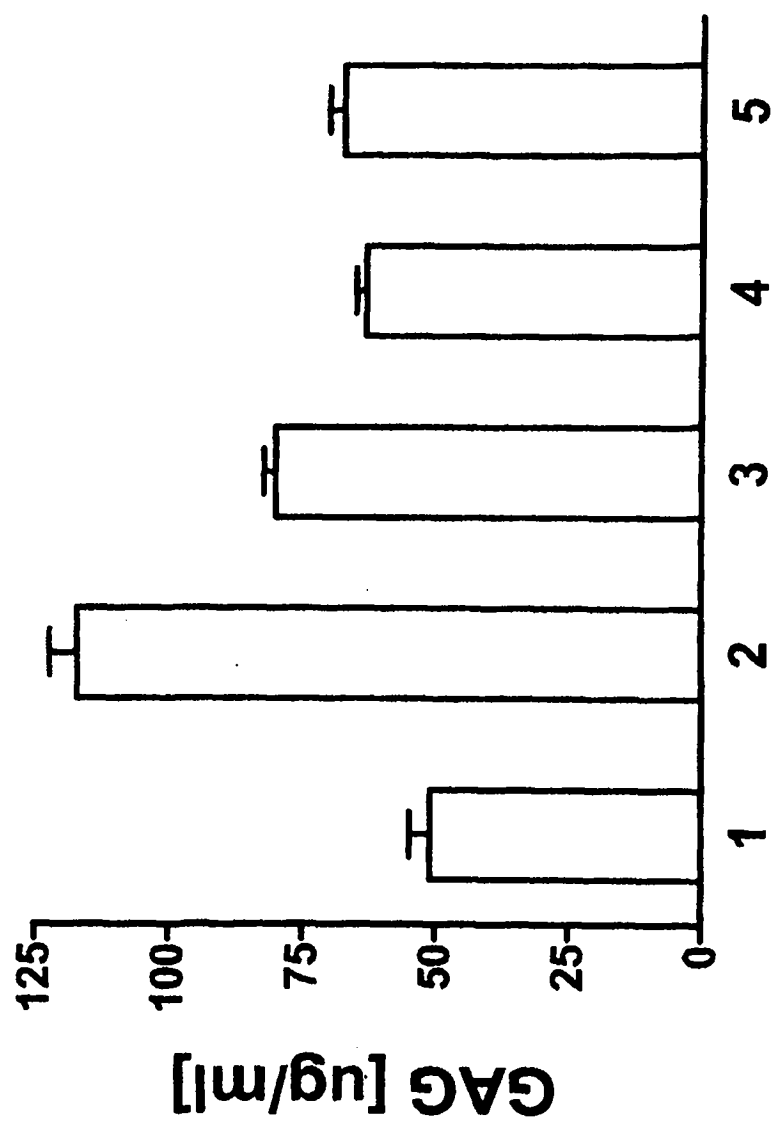


图 9/9