(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 037111 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.02.08

(21) Номер заявки
201892320

(22) Дата подачи заявки
2017.03.31

(51) Int. Cl. *A61K 38/10* (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОСТЕОАРТРИТА

(31) **16165093.2**
(32) **2016.04.13**
(33) **EP**
(43) **2019.05.31**
(86) **PCT/EP2017/057718**
(87) **WO 2017/178251 2017.10.19**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЮНИВЕРСИТЕЙТ МААСТРИХТ; АКАДЕМИС ЗИКЕНХЁЙС МААСТРИХТ (NL)

(72) Изобретатель:
Велтинг Тим Йоханнес Мария, Карон Марьолейн Мария Йоханна (NL)

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) HUNTER DAVID J. ET AL.: "Phase 1 safety and tolerability study of BMP-7 in symptomatic knee osteoarthritis", BMC MUSCULOSKELETAL DISORDERS, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 11, no. 1, 10 October 2010 (2010-10-10), page 232, XP021076295, ISSN: 1471-2474, DOI: 10.1186/1471-2474-11-232 abstract pages 3, 5

HAYASHI MASAYA ET AL.: "Weekly intra-articular injections of bone morphogenetic protein-7 inhibits osteoarthritis progression", ARTHRITIS RESEARCH AND THERAPY, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 10, no. 5, 30 September 2008 (2008-09-30), page R118, XP021046821, ISSN: 1478-6354, DOI: 10.1186/AR2521 abstract pages 2, 3, 7, 8

M.M.J. CARON ET AL.: "Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7", OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE., vol. 21, no. 4, 1 April 2013 (2013-04-01), pages 604-613, XP055293553, GB ISSN: 1063-4584, DOI: 10.1016/j.joca.2013.01.009 abstract pages 608, 610

YUPENG CHEN ET AL.: "Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH. PART A, vol. 91A, no. 1, 1 October 2009 (2009-10-01), pages 296-304, XP055293547, HOBOKEN, NY, US ISSN: 1549-3296, DOI: 10.1002/jbm.a.32246 abstract pages 297, 302 - page 303

WO-A1-2009154330

ATSUHIRO SAITO ET AL.: "Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells", JOURNAL OF BIOMEDICAL MATERIALS RESEARCH, vol. 72A, no. 1, 1 January 2004 (2004-01-01), pages 77-82, XP055177958, ISSN: 0021-9304, DOI: 10.1002/jbm.a.30208 the whole document

(57) Изобретение относится к области медицины и предоставляет средства и способы для лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности остеоартрита. Конкретнее, оно относится к пептиду для применения при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, при этом пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или ее вариант согласно формуле 2, причем аминокислотная последовательность указанного пептида содержится в SEQ ID NO: 34 или ее варианте согласно формуле 1.

037111 B1

037111 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к области медицины и предоставляет средства и способы лечения, предупреждения или уменьшения интенсивности остеоартрита.

Предпосылки создания изобретения

Остеоартрит (ОА) представляет собой тип заболевания суставов, которое является результатом разрушения суставного хряща и подлежащей кости в комбинации с общей патологией сустава, включая воспаление синовиальной оболочки и патологию фиброзного слоя и мениска. Наиболее обычными симптомами являются суставная боль и тугоподвижность. Сначала симптомы могут появляться только после физической нагрузки, но со временем могут стать постоянными. Другие симптомы могут включать опухание суставов, уменьшенную амплитуду движений и, когда спина поражена ОА, может присутствовать слабость или онемение рук и ног. Пораженными суставами наиболее обычно являются суставы вблизи кончиков пальцев, в основании большого пальца кисти, шеи, нижней части спины, коленные суставы и тазобедренные суставы. Обычно суставы на одной стороне тела поражены сильнее, чем на другой. Как правило, проблемы появляются с годами. Это может повлиять на работу и обычную повседневную деятельность. В отличие от других типов артрита типично поражаются только суставы.

Причины включают предшествующее повреждение суставов, анормальное развитие суставов или конечностей, анормальное положение суставов и наследственные факторы. Риск выше у тех, у кого лишний вес, у кого одна нога другой длины, и кто имеет работу, которая приводит к высоким уровням напряжения суставов. Полагают, что остеоартрит вызывается механической нагрузкой на сустав и несильными воспалительными процессами. Он развивается, так как теряется хрящевая ткань, причем в итоге поражается подлежащая кость. Также полагают, что в этиологию заболевания критически вовлечена субхондральная кость. Так как боль может сделать затруднительной физическую нагрузку, может иметь место потеря мышечной ткани. Диагноз обычно основывается на признаках и симптомах с помощью медицинской визуализации и других испытаний, иногда используемых или для подтверждения или исключения других проблем. В отличие от ревматоидного артрита, который прежде всего является воспалительным состоянием, суставы обычно не становятся горячими или красными.

Лечение включает физические упражнения, усилия по снижению нагрузки на суставы, группы поддержки, лекарственные средства для смазывания и (местные) обезболивающие. Усилия по снижению нагрузки на суставы включают отдых и использование трости. Снижение массы тела может помочь тем, у кого излишний вес. Обезболивающие средства могут включать парацетамол (ацетаминофен). Если он не действует, можно использовать вводимые перорально NSAID, такие как напроксен, или вводимые местно кортикостероиды (например, триамцинолонацитонид), но такие лекарственные средства ассоциируются с более сильным побочным действием. Опиоиды, если используются, рекомендуются только на короткое время из-за опасности зависимости. Если боль или ограничение подвижности препятствуют нормальной жизни, несмотря на другое лечение, может помочь операция по замене сустава. Однако искусственный сустав сохраняется только ограниченное количество времени, и операция по полной замене сустава ассоциируется с тяжелыми осложнениями, подобными остеомиелиту. После полной замены сустава результаты для большинства людей являются хорошими.

ОА является наиболее обычной формой артрита с заболеванием коленного и тазобедренного сустава, поражающим примерно 3,8% населения по данным в 2010. Из этого числа поражены примерно 10% мужчин и 18% женщин в возрасте свыше 60 лет. Он является причиной того, что примерно 2% живут годами инвалидами. В Австралии поражены примерно 1,9 миллионов человек, а в Соединенных Штатах поражены примерно 27 миллионов человек. В возрасте до 45 лет он чаще встречается у мужчин, в то время как в возрасте после 45 лет он более обычен у женщин. Когда люди становятся старше, он становится обычнее у представителей обоих полов.

В то время как ОА является дегенеративным заболеванием суставов, которое может вызвать макроскопическую утрату хряща и морфологическое повреждение других тканей сустава, менее выраженные биохимические изменения происходят на самых ранних стадиях развития ОА. Содержание воды в здоровом хряще тонко уравновешивается сжимающим усилием вытекающей воды и давлением набухания воды поступающей, поддерживаемое различным осмотическим давлением ткани. Коллагеновые волокна вызывают усилие сжатия, в то время как эффект Гиббса-Доннана и протеогликаны хряща создают осмотическое давление, которое приводит к поступлению воды.

Однако во время начала ОА коллагеновая матрица становится менее организованной, и имеет место снижение содержания протеогликанов в хряще. Разрушение коллагеновых волокон приводит к общему росту содержания воды. Этот рост происходит, поскольку в то же время имеется общая потеря протеогликанов (и таким образом имеется пониженная осмотическая сила тяги), она перевешивается потерей коллагена. В отсутствие защитного действия протеогликанов коллагеновые волокна хряща могут становиться чувствительными к разрушению и поэтому обостряют дегенерацию. Также может происходить воспаление синовиальной оболочки (выстилающей полость сустава) и окружающей капсулы сустава, хотя обычно умеренное (по сравнению с тем, какое происходит при ревматоидном артрите).

Изменения в суставном хряще и хондроцитах сустава, которые характеризуют ОА, схожи с клеточным связанным с развитием процессом, управляющим развитием скелета путем эндохондриального око-

стенения. Аналогия между эндохондриальным окостенением и развитием ОА широко известна. Многие разрушающие хрящ ферменты, которые выделяются гипертрофированными хондроцитами в пластинке роста, также являются главными в развитии и усугубляют состояние ОА. Также обнаружено, что в хондроцитах сустава при ОА активными или разрегулированными также являются хорошо известные пути, регулирующие дифференцировку хондроцитов в пластинке роста (RUNX2, COL10A1, ALP).

Также могут быть поражены другие структуры в суставе. Связки в суставе становятся утолщенными и фиброзными, и мениск может повредиться и истираться. Мениск может полностью отсутствовать к тому времени, когда человеку заменяют сустав. Новые костные наросты, называемые "шпорами" или остеофитами, могут образовываться по краям суставов, возможно в попытке улучшить конгруэнтность поверхностей суставных хрящей в отсутствие мениска. Субхондральная кость увеличивается в объеме и становится менее минерализованной (остеопорозной/остеопенической). Все эти изменения могут вызывать проблемы в функционировании и механической поддержке для вышележащего хрящевого слоя. Боль в суставе при остеоартрозе связана с утолщенной синовиальной оболочкой и повреждениями субхондральной кости.

Биохимически ОА характеризуется синтезом ферментов, разрушающих внеклеточный матрикс (ECM), таких как аггреканазы (дизинтегрин и металлопротеиназа с тромбоспондиновыми мотивами (ADAMTS)) и металлопротеиназы матрикса (MMP), что приводит к активному разрушению матрикса хрящевой ткани. Аналогия между эндохондриальным окостенением и развитием ОА выяснена, и многие разрушающие хрящ и минерализующие ферменты, которые секретируются гипертрофированными хондроцитами в пластинке роста, также критически вовлекаются в ОА.

Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании механизмов заболевания, установленное и экспериментальное лечение ОА является в основном симптоматическим путем облегчения боли и препятствования процессам дегенерации хряща для того, чтобы отложить полную замену сустава.

Сущность изобретения

Изобретение относится к пептиду для применения при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, причем пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 16 или ее вариант согласно формуле 2, причем аминокислотная последовательность указанного пептида заключается в SEQ ID NO: 34 или ее варианте согласно формуле 1.

Формула 1:

X1X2X3GYX4AX5YSEGX6SX7X8X9LX1OX11X12MNATX13HA(SEQ ID NO: 47),

в которой

X1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R;

X2 = P, или Y, или M;

X3 = E, или R, или H, или K, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или L, или M, или V;

X4 = A, или E, или Q, или R, или S;

X5 = Y, или N, или D;

X6 = E, или A, или Q;

X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;

X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;

X9 = P или M;

X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V;

X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T;

X12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или S, или T; или при этом

X13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R.

Формула 2:

YSEGX6SX7X8X9LX10X11(SEQ ID NO: 48),

в которой

X6 = E, или A, или Q;

X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;

X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;

X9 = P или M;

X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V; или при этом

X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

Подробное описание изобретения

Остеоартритные хондроциты показывают типичный фенотип, который характеризуется пониженной экспрессией хондрогенных генов SOX9, COL2A1, ACAN и BAPX1/NKX3.2 и повышенной экспрессией генов гипертрофной зоны RUNX2, COL10A1, ALP, генов, кодирующих разрушающие хрящевой матрикс ферменты MMP13, ADAMTS5, и генов системы воспаления COX-2 и IL-6 (фиг. 1). Авторы настоящего изобретения показывают, что белок, называемый костным морфогенетическим белком-7 (BMP-7, также называется OP-1), способен "спасти" фенотип ОА (фиг. 1). Исследования авторов изобретения и более ранние исследования, направленные на модифицирующие заболевание свойства BMP-7, показы-

вают, что он снижает экспрессию MMP13 в хондроцитах под воздействием IL-1β, стимулирует синтез протеогликанов в OA хондроцитах, противодействует воспалительным цитокинам (например, IL-1β) и вызывает анаболическую реакцию в здоровых хондроцитах. Внутрисуставное введение BMP-7 защищает от развития OA и задерживает развитие OA у крыс. Завершена фаза-1 клинических испытаний на больных OA, и не сообщается о тяжелых неблагоприятных событиях после внутрисуставного введения BMP-7. В соответствии с этим, данные, приведенные в настоящем описании, показывают, что активность BMP-7 подавляет гипертрофический фенотип (OA) хондроцитов (фиг. 1).

Несмотря на такие многообещающие результаты внутрисуставное применение полноразмерного рекомбинантного человеческого BMP-7 для лечения OA может представлять опасность при клиническом применении. Преклиническое испытание показало, что для получения релевантного результата необходимы еженедельные внутрисуставные инъекции. Высокая частота внутрисуставных инъекций неприемлема для клинического применения из-за опасности септического артрита и дискомфорта пациента. Хотя решение для предотвращения частых внутрисуставных инъекций может включать инкапсуляцию BMP-7 в системе с внутрисуставным высвобождением для длительного регулируемого высвобождения, сохранение биоактивности BMP-7 будет стоять под большим сомнением из-за условий денатурирования, которые обычно применяют для процесса получения существующих в настоящее время систем для регулируемого высвобождения. Синовиальная жидкость при OA, в которой вероятно должен доставляться BMP-7, является жесткой гидролитической и протеолитической окружающей средой, которая, как ожидается, вызывает быстрое разложение вводимого BMP-7. Наконец, получение BMP-7 по стандарту GMP технологически требует сопровождающих его высоких затрат.

Для безопасного и возможного клинического использования благоприятных характеристик активности BMP-7 для лечения OA авторы изобретения нашли молекулярные миметики для BMP-7, которые более совместимы с жесткой окружающей средой OA синовиальной жидкости и потенциально могут быть включены во внутрисуставные молекулярные высвобождающие системы для длительного высвобождения. По этой причине авторы изобретения собрались получить ряд перекрывающихся 20-мерных пептидов (табл. 1), которые все вместе охватывают весь зрелый полипептид BMP-7 из 139 аминокислот (табл. 4). Результаты подтвердили более ранние выводы [20, 21], что ни один из пептидов не имитирует потенциал BMP-7 по "спасению" OA фенотипа. Подробнее, все пептиды, представленные в табл. 1, проверили на экспрессию генов ALP, MMP13, ADAMTS5, COL10A, COX-2, BAPX1 NKX3.2 и RUNX2 и вспомнили прогипертрофные, проминерализующие, прокатаболические и провоспалительные реакции. Это не было неожиданным, так как описаны проминерализующие/проостеогенные пептиды из BMP-2 [20] и BMP-7 [21, 31].

Таблица 4. Аминокислотные последовательности зрелого BMP-7.
Цистеиновые и сериновые остатки подчеркнуты.

Название	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
Зрелый BMP-7	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQACKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYCEGE CAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPCCAPTQLN AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRACGCH	45
Зрелый BMP-7 с цистеином, замененным серином	STGSKQRSQN RSKTPKNQEA LRMANVAENS SSDQRQASKK HELYVSFRDL GWQDWIIAPE GYAAYYSEGE SAFPLNSYMN ATNHAIVQTL VHFINPETVP KPSSAPTQLN AISVLYFDDS SNVILKKYRN MVVRASGSH	46

Однако неожиданно, что когда в BMP-7 цистеиновые остатки заменили на сериновые остатки, результаты раскрыли присутствие четко очерченного участка в BMP-7, который действительно содержит пептиды с требуемой имитирующей BMP-7 активностью.

Пептиды из этого участка далее в настоящем описании обозначены как "пептиды участка A". Последовательные пептиды из этого участка вызывали существенно сниженную экспрессию фенотипических маркеров OA хондроцитов COL10A1, ALP, RUNX2, ADAMTS5, IL-6, MMP13 и COX-2, а также повышенную экспрессию хондрогенных маркеров SOX9, ACAN, BAPX1/NKX3.2 и COL2A1 в хондроцитах OA сустава.

Следовательно, в одном аспекте изобретение относится к пептиду для применения при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, причем пептид включает аминокислотную последовательность из по меньшей мере 12 последовательных аминокислот согласно SEQ ID NO: 16. Это установлено из результатов, приведенных в табл. 2.

Табл. 2 показывает результаты анализа экспрессии нескольких генов в присутствии нескольких пептидов для применения согласно изобретению. Другие подробности приводятся в разделе "Примеры".

Эксперименты авторов изобретения также показали, что пептид имеет максимальную длину 28 аминокислот или около этого. Это следует из экспериментов, представленных в табл. 2 и 3, в которых показано, что пептид предпочтительно полностью заключается в последовательности APEGYAAY-YSEGESAFPLNSYMNATNHA (SEQ ID NO: 34). Каждый пептид, который продолжается за этой аминокислотной последовательностью или по NH2-концу или по COOH-концу, теряет свою активность в анализах, используемых в настоящем описании. Табл. 3 также показывает некоторые примеры пептидов для применения согласно изобретению.

Конечно, настоящее описание не следует интерпретировать как узкое, в котором отсутствуют вариации, допускаемые в пептиде. Специалист в данной области техники осознает тот факт, что конформация пептида сохраняется, даже когда изменены одна или несколько, например, две, три, четыре или даже пять аминокислот, в частности, когда эти изменения относятся к консервативным аминокислотным заменам. Такие пептиды известны в технике как гомологичные пептиды. Следовательно, термин "гомологи", используемый в настоящем описании, относится к пептидам, которые сохраняют свою активность, но различаются в отношении их аминокислотных последовательностей. Гомологи могут быть идентичны с последовательностями согласно SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 34 на 75% или больше, например, на 77, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%.

При использовании в настоящем описании степень идентичности между двумя или большим числом аминокислотных последовательностей эквивалента функции числа идентичных позиций, разделяемых последовательностями (т.е., % идентичности = число идентичных позиций, деленное на общее число позиций × 100), исключая пропуски, которые необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей, и выступы. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя или большим числом аминокислотных последовательностей можно выполнить с использованием стандартных методов, известных в технике. Например, свободно распространяемым инструментом, обычно используемым для этой цели, является инструмент "Align" в ресурсе NCBI http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq.

В предпочтительном воплощении выравнивание двух последовательностей должно выполняться по всей длине полипептидов.

Используемый в настоящем описании термин "может представлять собой" включает слова "(может) представлять собой" и "могут представлять собой", в зависимости от контекста. Кроме того, присутствие слова "может" предполагается для пояснения опций для осуществления раскрытия на практике или претворения его в жизнь без ограничения.

Мы сделали вывод, что пептиды, происходящие из человеческого BMP-7, описанные в настоящем описании, способны имитировать благоприятные характеристики полноразмерного человеческого белка BMP-7 в отношении фенотипа OA хондроцитов.

Вместе с тем мы определили локацию и природу супрессивного действия BMP-7 на фенотип OA, в то время как пептиды из других участков BMP-7 не показывают активность или проминерализующее/-гипертрофное действие. Биоактивная действенность пептидов-кандидатов оказалась неожиданно высокой. Независимо от проверяемой концентрации (проверяли 1000, 100, 10 и 1 наномолярную (нМ) концентрации) почти все пептиды участка A при скрининге вызывают схожие кратные различия величины экспрессии генов, в то время как контрольный пептид (SEQ ID NO: 49) не вызывает.

BMP-7 обладает уникальным действием подавления фенотипа OA хондроцитов (фиг. 1). Такое действие проявляется более всего, когда используют концентрацию BMP-7 примерно 1 нМ. Концентрации BMP-7 выше 1 нМ (например, 10 нМ или 100 нМ) имеют противоположное и отрицательное действие на фенотип хондроцитов и таким образом вызывают неблагоприятные повышенные уровни гипертрофии, повышенную минерализацию, повышенную экспрессию генов, разрушающих хрящ, и повышенную экспрессию генов системы воспаления. Без желания привязываться к какой-либо теории, мы предполагаем, что BMP-7 включает двойную активность, которая зависит от концентрации BMP-7.

В отличие от полипептида BMP-7, 20-мерные пептиды согласно SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 и 15 эффективно подавляют фенотип OA хондроцитов независимо от испытываемой концентрации (проверяют концентрации 1000, 100, 10 и 1 нМ). При этом авторы изобретения неожиданно идентифицировали участок, включающий благоприятную подавляющую фенотип OA биоактивность BMP-7, в то время как пептиды из других участков в BMP-7 показывают проминерализующее, прогипертрофное, прокатаболическое и провоспалительное действие.

После 24 ч, в течение которых OA хондроциты подвергались воздействию отдельных пептидов, подавляющее действие на OA фенотип пептидов-кандидатов было весьма эффективным, когда пептиды добавляли в культуры OA хондроцитов через день до дня 10. Удивительно, что в культурах подавляющее действие на фенотип OA пептидов, раскрытых в настоящем описании, даже длится до 8 дней после одного начального 48-часового воздействия.

Весьма сильная биоактивность в наномолярном интервале концентраций схожа с полноразмерным зрелым BMP-7 и является терапевтически важной детерминантой, показывающей, что пептиды для применения согласно изобретению действительно являются сильными миметиками BMP-7 для терапевтиче-

ского применения при ОА.

Кроме действия пептидов на хондроциты ОА пептиды-кандидаты показывают биологически схожие действия на модели in vitro дифференцировки хондроцитов. Удивительно, за восемь дней однократного воздействия и даже более определенно при длительном воздействии пептидов на дифференцирующие клетки-предшественники хондроцитоа (ATDC5) четко снижается экспрессия маркеров гипертрофии и минерализации, в то время как экспрессия аггрекана (маркер здоровых хондроцитов) и экспрессия BAPX1/NKX3.2 (антигипертрофический фактор) возрастает даже дополнительно при непрерывном воздействия пептидов для применения согласно изобретения.

Все вместе пептиды для применения согласно изобретению имеют уникальное подавляющее действие на гипертрофический/минерализующий фенотип ОА хондроцитов, подавляют экспрессию разрушающих хрящ ферментов ECM и уменьшают фенотип ОА хондроцитов по типу воспаления, хотя в то же время поддерживают прохондрогенное действие на ОА хондроциты и здоровые хондроциты. В отличие от полноразмерного зрелого белка пептиды BMP-7 можно выгодно использовать в терапии, поскольку они вообще менее чувствительны к конформационной и ферментативной инактивации. Пептиды можно биохимически "отрегулировать" для повышения их устойчивости и активности и функционализировать в отношении носителей; они намного меньше и поэтому подходят для включения в системы, предназначенные для внутрисуставного применения для высвобождения лекарственного средства в течение длительного времени.

Можно синтезировать варианты пептидов, описанных выше, которые более устойчивы к разложению при протеолитическом разложении в синовиальной жидкости. Также можно получить варианты, которые конформационно более ограничены и таким образом более биоактивны по сравнению с их исходными ведущими последовательностями. Все это вполне достижимо для специалистов, и теперь только обычные методы требуются, чтобы идентифицировать участок А как активный участок для анаболической активности BMP-7.

Такие варианты могут включать линейные пептиды, линейные ретроинверсопептиды, ретроинверсопептиды, циклические пептиды, монопетлевидные пептиды и двухпетлевидные пептиды. Технология CLIPS дает возможность обычного получения таких пептидов (http://www.pepscan.com/therapeutics/clips-platform). Двухпетлевидные пептиды могут содержать два идентичных пептида, описанных в настоящем описании, или два различных пептида, описанных в настоящем описании.

Все альфа-аминокислоты, кроме глицина, могут существовать в виде любого из двух энантиомеров или хиральных вариантов, называемых L- или D-аминокислотами, которые являются зеркальными изображениями друг друга. В то время как L-аминокислоты все представляют собой аминокислоты, обнаруженные в белках во время трансляции в рибосоме, D-аминокислоты очень редко обнаруживаются в белках, транслируемых эукариотическими рибосомами. Так как рибосомы являются специфическими для L-аминокислот, D-аминокислоты редко встречаются в организмах в природе и поэтому не являются легко гидролизуемыми или разлагаемыми.

L-Пептид имеет три аналогичные последовательности, построенные из L- и D-аминокислот: D-энантиомер или инверсо-пептид с той же последовательностью, но состоящие из D-аминокислот и аминокислот в зеркальной конформации; ретропептид, состоящий из такой же последовательности L-аминокислот, но в обратном порядке; и ретроинверсопептид или пептид D-ретроэнантиомер, состоящий из D-аминокислот в обратной последовательности. В то время как L-пептид и его D-энантиомер являются зеркальными структурами друг друга, L-ретропептид является зеркальным изображением D-ретроинверсопептида. С другой стороны, L-пептид и D-ретроинверсопептид имеют подобное расположение боковых цепей, хотя их карбоксильные и аминогруппы имеют противоположные направления. Для небольших пептидов, которые не зависят от вторичной структуры в случае связывания, L-пептид и его D-ретроинверсопептид вероятно имеют схожую аффинность связывания с целевым L-белком.

Пептиды могут быть более активными, когда они являются петлевидными, такими как циклические пептиды. Такие пептиды также могут быть более устойчивыми и резистентными к протеолитическому разложению.

Такие пептиды и полипептиды могут быть более устойчивыми в окружающей среде, враждебной для полипептидов, такой как гидролитическая или протеолитическая окружающая среда. В частности, для терапевтических целей может быть выгодно использование более устойчивых пептидов, таких как указанные выше. Следовательно, изобретение также относится к применению пептидов, выбранных из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсопептиды, ретроинверсопептиды, циклические пептиды, монопетлевидные пептиды и двухпетлевидные пептиды.

Пути придания пептидам меньшей чувствительности к разложению известны в технике, как, например, инклюзия одной или нескольких не встречающихся в природе аминокислот, таких как D-энантиомер L-аминокислоты, и ретроориентация пептидной цепи в ретроинверсоварианте. Такие пептиды не являются природными, поэтому природные протеазы не способных их расщеплять.

Средства и способы повышения биоактивности пептидов для применения согласно изобретению также известны в технике. Примерами таких способов являются циклизация и образование петель пептидов, что обеспечивает более стесненное конформационное окружение остатков существенных амино-

кислотных остатков.

В заявке на патент US2006/0058231 раскрываются варианты BMP-7 с улучшенными свойствами. Этот документ включен в настоящее описание в качестве ссылки. В US2006/0058231 раскрывается, что некоторые аминокислоты в BMP-7 можно заменить другими аминокислотами без воздействия на функцию белка BMP-7.

К числу улучшенных свойств BMP-7 в результате указанных выше аминокислотных замен относятся повышенный выход экспрессии, экспрессия в отсутствии продомена, повышенная растворимость, повышенная устойчивость, повышенная специфическая биологическая активность, измененная специфичность к рецепторам, измененная аффинность связывания рецепторов, измененная сорецепторная специфичность, измененная сорецепторная аффинность связывания, измененное связывание с ноггинами и уменьшенная иммуногенность.

Что касается аминокислот участка A, то это означает, что аминокислоты в позициях 1-3, 6, 8, 13, 15 - 17, 19 - 21 и 26 SEQ ID NO: 34 могут быть изменены или заменены без воздействия на активность BMP-7. В некоторых случаях эти исправления (аминокислотные замены) даже улучшают активность BMP-7.

Следовательно, участок, соответствующий SEQ ID NO: 34, также можно описать так, как показано в формуле 1.

Формула 1:

X1X2X3GYX4AX5YSEGX6SX7X8X9LX10X11X12MNATX13HA(SEQ ID NO: 47),

в которой

X1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R;

X2 = P, или Y, или M;

X3 = E, или R, или H, или K, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или L, или M, или V;

X4 = A, или E, или Q, или R, или S;

X5 = Y, или N, или D;

X6 = E, или A, или Q;

X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;

X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;

X9 = P или M;

X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V;

X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T;

X12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или S, или T; или при этом

X13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R.

Указанные выше пептиды согласно формуле 1 можно рассматривать как эквиваленты или варианты пептида согласно SEQ ID NO: 34. В одном воплощении изобретения вариант SEQ ID NO: 34 включает замену 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоты, выбранных из группы, включающей замены X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12 и X13.

Соответственно, поэтому участок, соответствующий SEQ ID NO: 16, также можно описать так, как показано в формуле 2.

Формула 2:

YSEGX6SX7X8X9LX10X11(SEQ ID NO: 48),

в которой

X6 = E, или A, или Q;

X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;

X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;

X9 = P или M;

X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V; или при этом

X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

Указанные выше пептиды согласно формуле 2 можно рассматривать как эквиваленты или варианты пептида согласно SEQ ID NO: 16. В одном воплощении изобретения вариант SEQ ID NO: 16 включает замену 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислоты, выбранную из группы, включающей замены X6, X7, X8, X9, X10 и X11.

Аминокислоты в формулах 1 и 2, выделенные жирным шрифтом, представляют собой аминокислоты в пептидах согласно SEQ ID NO: 16 и SEQ ID NO: 34 (последовательность дикого типа), которые предпочтительно не должны изменяться или замещаться. Предпочтительные аминокислоты в позициях X1-X13 подчеркнуты. Они представляют собой аминокислоты дикого типа в соответствующих позициях.

Таблица 1. Охватывающие человеческий BMP-7 последовательные 20-мерные пептиды с перекрытием между пептидами в 2 аминокислоты и их свойства изменения фенотипа OA хондроцитов

Пептидная последовательность	SEQ ID NO:	ALP	MMP13	ADAMTS5	COL10A	COX-2	BAPX1/NKX3.2	RUNX2
STGSKQRSQNRSKTPKNQEA	37							
EALRMANVAENSSSDQRQAC	38	-	-	-	-	-	-	-
ACKKHELYVSFRDLGWQDWI	39	-	-	-	-	-	-	-
WIIAPEGYAAYYCEGECAFP	40	-	-	-	-	-	-	-
FPLNSYMNATNHAIVQTLVH	41	-	-	-	-	-	-	-
VHFINPETVPKPCCAPTQLN	42	-	-	-	-	-	-	-
LNAISVLYFDDSSNVILKKY	43	-	-	-	-	-	-	-
SSNVILKKYRNMVVRACGCH	44	-	-	-	-	-	-	-

[-] обозначает отсутствие существенного действия или существенно пониженной экспрессии хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 или повышенной экспрессии маркеров фенотипа OA хондроцитов ALP, MMP13, ADAMTS5, COX2, COL10A и RUNX2 в хондроцитах OA сустава по сравнению с необработанными хондроцитами OA сустава.

Таблица 2. Полученные из человеческого BMP-7 последовательные 20-мерные пептиды с цистеиновыми остатками, замененными на серии, и их свойства изменения фенотипа OA хондроцитов. Результаты представлены наглядно на фиг. 2-8.

Пептидная последовательность	SEQ ID NO:	ALP	MMP13	ADAMTS5	COL10A	COX-2	BAPX1/ NKX3.2	RUNX2
WIIAPEGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHAIV	1							
WIIAPEGYAAYYSEGESAFP	2	-	-	-	-	+	-	-
IIAPEGYAAYYSEGESAFPL	3	-	-	-	-	+	-	-
IAPEGYAAYYSEGESAFPLN	4	-	-	-	-	+	-	-
APEGYAAYYSEGESAFPLNS	5	+	-	+	+	+	+	+
PEGYAAYYSEGESAFPLNSY	6	+	-	+	+	+	+	+
EGYAAYYSEGESAFPLNSYM	7	+	+	+	+	+	+	+
GYAAYYSEGESAFPLNSYMN	8	+	+	+	+	+	+	+
YAAYYSEGESAFPLNSYMNA	9	+	+	+	+	+	+	+
AAYYSEGESAFPLNSYMNAT	10	+	+	+	+	+	+	+
AYYSEGESAFPLNSYMNATN	11	+	+	+	+	+	+	+
YYSEGESAFPLNSYMNATNH	12	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNATNHA	13	+	+	+	+	+	+	+
SEGESAFPLNSYMNATNHAI	14	-	-	-	-	-	-	+
EGESAFPLNSYMNATNHAIV	15	-	-	-	-	-	-	+
YSEGESAFPLNS	16	+	+	+	+	+	+	+

[+] обозначает существенно повышенную экспрессию хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 или пониженную экспрессию фенотипических маркеров OA хондроцитов ALP, MMP13, ADAMTS5, COX2, COL10A и RUNX2 в хондроцитах OA сустава по сравнению с необработанными хондроцитами OA сустава.

[-] обозначает отсутствие существенного действия или существенно пониженной экспрессии хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 или повышенной экспрессии маркеров фенотипа OA хондроцитов ALP, MMP13, ADAMTS5, COX2, COL10A и RUNX2 в хондроцитах OA сустава по сравнению с необработанными хондроцитами OA сустава.

Пептид рассматривают как обладающий активностью, подавляющей фенотип OA хондроцитов, когда по меньшей мере 6 из 7 маркеров являются положительными (+).

Таблица 3. Полученные из человеческого BMP-7 последовательные пептиды, усеченные по N-концу или С-концу, с цистеиновыми остатками, замененными на серии, и их свойства изменения фенотипа хондроцитов OA

Пептидная последовательность	SEQ ID NO:	ALP	MMP13	ADAMTS5	COL10A	COX-2	BAPX1/ NKX3.2	RUNX2
YSEGESAFPLNS	16	+	+	+	+	+	+	+
APEGYAAYYSEGESAFPLNS	17	+	-	+	+	+	+	+
PEGYAAYYSEGESAFPLNS	18	+	-	+	+	+	+	+
EGYAAYYSEGESAFPLNS	19	+	+	+	+	+	+	+
GYAAYYSEGESAFPLNS	20	+	+	+	+	+	+	+
YAAYYSEGESAFPLNS	21	+	+	+	+	+	+	+
AAYYSEGESAFPLNS	22	+	+	+	+	+	+	+
AYYSEGESAFPLNS	23	+	+	+	+	+	+	+
YYSEGESAFPLNS	24	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNS	25	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSY	26	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYM	27	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMN	28	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNA	29	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNAT	30	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNATN	31	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNATNH	32	+	+	+	+	+	+	+
YSEGESAFPLNSYMNATNHA	33	+	+	+	+	+	+	+
	34	+	+	+	+	+	+	+
	35	+	+	+	+	+	+	+
EGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHA	36	+	+	+	+	+	+	+

[+] обозначает существенно повышенную экспрессию хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 или пониженную экспрессию фенотипических маркеров OA хондроцитов ALP, MMP13, ADAMTS5, COX2, COL10A и RUNX2 в хондроцитах OA сустава по сравнению с необработанными хондроцитами OA сустава.

[-] обозначает отсутствие существенного действия или существенно пониженной экспрессии хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 или повышенной экспрессии маркеров фенотипа OA хондроцитов ALP, MMP13, ADAMTS5, COX2, COL10A и RUNX2 в хондроцитах OA сустава по сравнению с необработанными хондроцитами OA сустава BAPX1/NKX3.2.

Пептид рассматривают как обладающий активностью, подавляющей фенотип OA хондроцитов, когда по меньшей мере 6 из 7 маркеров являются положительными (+).

Пояснения к фигурам

Фиг. 1. BMP-7 спасает OA-ассоциированный фенотип хондроцитов.

Остеоартритные хондроциты показывают типичный фенотип, отличающийся пониженной экспрессией SOX9, COL2A1, ACAN и BAPX1/NKX3.2 и повышенной экспрессией мРНК RUNX2, COL10A1, ALP, MMP13, ADAMTS5, COX-2 и IL-6 (см. рисунок слева). BMP-7 (1 нМ) способен спасать этот OA-ассоциированный фенотип хондроцитов путем нормализации экспрессии указанных выше генов (рисунок слева).

Функциональная активность фермента ALP в клеточных лизатах и секреция PGE2 в культуральной среде также нормализуются после обработки BMP-7 OA хондроцитов (рисунок справа).

Экспрессию указанных мРНК определяют колич. ОТ-ПЦР (ОТ-кПЦР (RT-qPCR)) относительно контрольных условий (нормализованных для экспрессии 28S рРНК). На диаграммах величины ошибки представляют среднее ± ср.-кв. ошибка, статистические различия вычисляют при сравнении со здоровым состоянием. *= $p < 0,05$.

Фигуры 2-8. Действия пептидов, полученных из BMP-7, на первичные человеческие хондроциты OA сустава.

Действие 20-мерных пептидов (10 нМ) SEQ ID NO: 2-15 (пептиды с интервалами в 1 аминокислоту (перекрываются 19 аминокислот)) и SEQ ID NO: 49 на экспрессию указанных генов определяют на проверенном пуле пассажа 2 человеческих хондроцитов OA сустава (n=18) и сравнивают с полноразмерным рекомбинантным BMP-7 (1 нМ). Образцы собирают через 24 ч и анализируют на указанные гены ОТ-кПЦР (исправленной для экспрессии 2BS рРНК и относительно контрольных условий (без воздействия пептидов)). На диаграммах числа по оси X представляют отдельные пептиды согласно их SEQ ID NO:, величины ошибки представляют среднее ± ср.-кв. ошибка, статистические различия вычисляют (однофакторный ANOVA с поправкой Бонферрони) для контрольного состояния. *= $p < 0,05$, ниже, чем контрольное состояние для COL10A1, ALP, RUNX2, COX-2, MMP13 и ADAMTS5, и выше, чем контрольное состояние для BAPX1/NKX3.2. Случайный пептид представляет собой пептид согласно SEQ ID NO: 49 с аминокислотной последовательностью SFILKKVLYDRVNDSANIYS.

Фиг. 9. Диаграмма, показывающая относительную экспрессию COL2A1, Col10A1, COX-2 и RUNX2 в изолированных хондроцитах пациентов с OA в присутствии контрольного пептида, BMP-7 и пептида согласно SEQ ID NO: 16.

Фиг. 10. Диаграмма, показывающая относительную экспрессию COL10A1 и MMP13 в эксплантатах хряща пациентов с OA в присутствии контрольного пептида, BMP-7 и пептида согласно SEQ ID NO: 16.

Примеры

Пример 1. Супрессивное действие на фенотип OA хондроцитов пептидов BMP-7 в присутствии OA синовиальной жидкости.

Мы анализировали пептиды-кандидаты из участка A на их супрессивное действие на фенотип OA на первичных хондроцитах OA сустава в присутствии 20% (об./об.) OA синовиальной жидкости (SF). Объединяют данные по трем отдельным изолятам OA хондроцитов (n=3), каждый из которых проверяли трижды. Высеянные OA хондроциты пассажа 2 подвергали воздействию 100 нМ пептида в отсутствие или в присутствии OA синовиальной жидкости, и через 24 часа анализировали на экспрессию мРНК генов COL10A1, ALP, RUNX2, COL2A1, ACAN, SOX9, COX-2, IL-6, PGE, MMP13 и ADAMTS5 (исправленную для экспрессии 28S рРНК и относительно контрольных условий (без воздействия пептидов)).

Секрецию PGE2 в культуральном супернатанте анализировали EIA, и ферментную активность ALP определяли собственным разработанным колориметрическим анализом на активность ALP. Содержание GAG определяли колориметрическим анализом с альциановым синим.

Результаты оценивали как + или -, где + означает, что пептид снижает активность генов COL10A1, ALP, RUNX2, COX-2, IL-6, PGE, MMP13 и ADAMTS5 или повышает активность COL2A1, ACAN и SOX9. Для активности ALP а + обозначает пониженную активность, и для активности GAG а + обозначает повышенную активность.

Пример 2. Супрессивное действие пептидов BMP-7 на гипертрофию во время хондрогенной дифференцировки клеток ATDC5.

Клетки ATDC5 дифференцируют с использованием стандартных протоколов в течение 8 дней в присутствии или в отсутствие 1 нМ пептидов из участка A. Пептиды добавляют в начале дифференцировки и при каждой замене среды (несколько раз) или только в начале дифференцировки, но не во время каждой замены среды (однократно). В день 8 дифференцировки образцы собирают и анализируют ОК-кПЦР на гены COL10A1, ALP, RUNX2, ACAN и BapX/Nkx3.2 (с исправлением на экспрессию b-актина и

относительно t=0).

Пример 3. Оценка супрессивного действия на OA ex vivo на моделях для OA.

Пептиды для применения согласно изобретению также можно исследовать в испытании ex vivo. Биопсии полнослойного хряща (выбитые 3-мм) из мыщелоков бедренной кости от ТКА (стадия K&L 2-3) можно собрать в свежем состоянии непосредственно после операции, рандомизировать на пациента и поместить в культуру ex vivo, как описано ранее. Биопсии от пациентов можно подвергнуть воздействию выбранных пептидов через двадцать четыре часа в концентрациях 0,1, 1, 10 или 100 нМ в течение 7, 14 или 21 суток, и среду можно заменять ежедневно свежим пептидом.

BMP-7 в концентрации 1 нМ можно использовать в качестве положительного контроля, и носитель или случайный пептид можно использовать в качестве отрицательного контроля. После воздействия можно провести биопсии хряща, обратившись к параметрам, определяющим основные свойства хряща. Можно определить содержание ДНК на сырую массу и содержание GAG. Также можно исследовать активность фермента ALP. Можно анализировать секрецию PGE2 и GAG в культуральной среде. Можно определить экспрессию генов для основных генов-маркеров фенотипа OA хондроцитов, как описано в настоящем описании.

Локальные относящиеся к OA изменения в биопсии в результате воздействия пептидов можно анализировать методами (иммуно)гистохимии (окрашивание альциановым синим и иммуноокрашивание для ALP, COL10A1, RUNX2, COL2A1, SOX9 и COX-2) для дополнительной поддержки утверждения, что пептиды, раскрытые в настоящем описании, подходят для медицинского применения при OA.

Диффузию и локализацию пептидов при биопсиях хряща можно направить в подобную систему, в которой можно использовать биотинилированный вариант пептидов. После культивирования эти материалы биопсии можно обработать для гистохимии. Пептид, который диффундирует в материал биопсии хряща, можно визуализировать флуоресценцией с помощью детекции, опосредуемой стрептавидином-AlexaFluor 488. Такой подход также может способствовать визуализации фенотипической ситуации и локализации пептида методом MALDI-IMS и выделению его из возможных эндогенных фрагментов BMP-7.

Пример 4. Проверка in vivo.

Аминокислотные последовательности участка A человека и мыши гомологичны на 100%. Для того, чтобы также установить активность in vivo пептидов для применения согласно изобретению, можно испытать характерные пептиды на общепринятой модели для посттравматического OA модели DMM. У 12-недельных мышей C57BL/6 можно дестабилизировать медиальный мениск. Через одну неделю после индукции DMM можно вводить пептиды внутрисуставными инъекциями дважды в неделю, как описано ранее. Доза может быть основана на исследованиях с внутрисуставными инъекциями BMP-7, в которых еженедельные инъекции 250 нг BMP-7 в коленный сустав крысы (в 100 мкл) показали благоприятные результаты. Так как в OA сустав мыши можно инъецировать 10 мкл, в этом объеме в коленный сустав мыши можно инъецировать эквивалентное количество пептида 25 нг. В 2 других группах также можно испытать количество пептида 2,5 и 0,25 нг для определения фармакологической эффективности пептида. В качестве контроля можно использовать инъекции физиологического раствора. Объем выборки в этом эксперименте преимущественно составляет 8 мышей на группу. Животных можно умертвить в последующие моменты времени после начала обработки пептидами (2, 4, 8 недель). Коленные суставы можно обработать для (иммуно)гистохимических анализов и оценки OARSI (с сафранином-O; модифицирован Pritzker).

Пример 5. Обработка хондроцитов, изолированных у пациентов с OA.

Хондроциты, выделенные из пациентов с OA (n=8), испытывают с BMP-7 (1 нМ) или 12-мерным пептидом согласно SEQ ID NO: 16 (1 нМ) в течение 24 ч. Экспрессию прохондрогенных (фиг. 9A) и гипертрофных (фиг. 9B, 9C и 9D) генов определяют через кОТ-ПЦР и нормализуют для уровней 28S рРНК. Полученные результаты подтверждают предыдущие наши выводы о том, что BMP-7 или 12-мер вызывают ап-регуляцию прохондрогенных генов, таких как Col2a1 (A), и даун-регуляцию прогипертрофных генов, таких как COL10A1, COX-2 и RUNX2 (B, C, D). Эти результаты показывают биоактивность коровой последовательности пептида из участка A, имитирующую BMP-7.

Пример 6. Обработка хрящевых эксплантатов.

Берут эксплантаты хряща 4 $мм^2$ из неповрежденных участков хряща коленного сустава пациентов с OA (n=5) и произвольно распределяют для различных условий экспериментальной обработки (4 эксплантата на группу обработки). После 24-часового периода уравновешивания эксплантаты обрабатывают BMP-7 (1 нМ) или 12-мерным пептидом согласно SEQ ID NO: 16 (10 нМ) в течение 24 ч. Экспрессию гипертрофных генов определяют через кОТ-ПЦР и нормализуют для уровней 28S рРНК. После обработки BMP-7 или 12-мером авторы изобретения наблюдали даун-регуляцию прогипертрофных генов, таких как Col10a1 (фиг. 10A) и MMP-13 (фиг. 10B). Такие результаты находятся в соответствии с действиями, описанными выше, и показывают биоактивность пептидов согласно изобретению, имитирующую BMP-7.

Пример 7. Окрашивание хрящевых эксплантатов.

Хрящевые эксплантаты, полученные от 2 пациентов, культивируют в течение 14 дней в присутст-

вии BMP-7 (1 нМ) или имитирующего BMP-7 пептида GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8) при 10 нМ. Гликозаминогликаны (GAGs) -важный компонент внеклеточного матрикса (ECM) - окрашивают сафранином-0 (в красный цвет), и другие ткани, напротив, окрашивают быстрым зеленым (в зеленый/синий цвет).

Оба пациента показали повышенную интенсивность сафранина-О в эксплантатах, обработанных BMP-7 и пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8), по сравнению с контролем.

Такие результаты находятся в соответствии с действиями, описанными выше, и показывают биоактивность пептидов согласно изобретению, имитирующую BMP-7.

Пример 8. Обработка хрящевых эксплантатов.

Берут эксплантаты хряща 3 $мм^2$ из хряща коленного сустава пациентов с OA (n=6) и обрабатывают BMP-7 (1 нМ), пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8) при 10 нМ или случайным иррелевантным контрольным пептидом (10 нМ) в течение 14 дней. Определяют ELISA уровни простагландина E2 (PGE2) и прогипертрофический фактор.

Образцы синовиальной ткани пациентов с OA (n=6) обрабатывают BMP-7 (1 нМ), пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8) при 10 нМ или случайным иррелевантным контрольным пептидом (10 нМ) в течение 24 ч. Определяют ELISA уровни PGE2.

Образцы ткани жирового тела Гоффа пациентов с OA (n=6) обрабатывают BMP-7 (1 нМ), пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8) при 10 нМ или случайным иррелевантным контрольным пептидом (10 нМ) в течение 24 час. Определяют ELISA уровни PGE2.

Образцы менисковой ткани пациентов с OA (n=6) обрабатывают BMP-7 (1 нМ), пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8) при 10 нМ или случайным иррелевантным контрольным пептидом (10 нМ) в течение 24 ч. Определяют ELISA уровни PGE2.

Результаты ясно показывают снижение уровней PGE2 в хряще и окружающих тканях после обработки BMP-7 или пептидом GYAAYYSEGESAFPLNSYMN (SEQ ID NO: 8). Обработка случайным пептидом не приводит к снижению уровней PGE2.

Такие результаты находятся в соответствии с действиями, описанными выше, и показывают биоактивность пептидов согласно изобретению, имитирующую BMP-7.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> Universiteit Maastricht and Academisch Ziekenhuis

Maastricht

<120> СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОСТЕОАРТРИТА

<130> 331 WO

<160> 49

<170> Версия PatentIn 3.5

<210> 1

<211> 33

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 1

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu

1 5 10 15

Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile

20 25 30

Val

<210> 2

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 2

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu

1 5 10 15

Ser Ala Phe Pro

20

<210> 3

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 3

Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser

1 5 10 15

Ala Phe Pro Leu

20

<210> 4

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 4

Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala

1 5 10 15

Phe Pro Leu Asn

20

<210> 5

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe

1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser

20

<210> 6

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 6

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro

1 5 10 15

Leu Asn Ser Tyr

20

<210> 7

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 7

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu

1 5 10 15

Asn Ser Tyr Met

20

<210> 8

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 8

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn

1 5 10 15

Ser Tyr Met Asn

20

<210> 9

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 9

Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10 15

Tyr Met Asn Ala

20

<210> 10

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 10

Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr

1 5 10 15

Met Asn Ala Thr

20

<210> 11

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 11

Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met

1 5 10 15

Asn Ala Thr Asn

20

<210> 12

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 12

Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

Ala Thr Asn His

20

<210> 13

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 13

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

Thr Asn His Ala

20

<210> 14

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 14

Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr

1 5 10 15

Asn His Ala Ile

20

<210> 15

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 15

Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn

1 5 10 15

His Ala Ile Val

20

<210> 16

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 16

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10

<210> 17

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe

1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser

20

<210> 18

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 18

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro

1 5 10 15

Leu Asn Ser

<210> 19

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 19

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu

1 5 10 15

Asn Ser

<210> 20

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 20

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn

1 5 10 15

Ser

<210> 21

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 21

Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10 15

<210> 22

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 22

Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10 15

<210> 23

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 23

Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10

<210> 24

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 24

Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 25

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 26

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr

1 5 10

<210> 27

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 27

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met

1 5 10

<210> 28

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 28

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn

1 5 10 15

<210> 29

<211> 16

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 29

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

<210> 30

<211> 17

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 30

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

Thr

<210> 31

<211> 18

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 31

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

Thr Asn

<210> 32

<211> 19

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 32

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

Thr Asn His

<210> 33

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 33

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala

1 5 10 15

Thr Asn His Ala

20

<210> 34

<211> 28

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 34

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe

1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala

20 25

<210> 35

<211> 27

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 35

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro

1 5 10 15

Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala

20 25

<210> 36

<211> 26

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 36

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu

1 5 10 15

Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala

20 25

<210> 37

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 37

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala

20

<210> 38

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 38

Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln

1 5 10 15

Arg Gln Ala Cys

20

<210> 39

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 39

Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp

1 5 10 15

Gln Asp Trp Ile

20

<210> 40

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 40

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu

1 5 10 15

Cys Ala Phe Pro

20

<210> 41

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 41

Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln

1 5 10 15

Thr Leu Val His

20

<210> 42

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 42

Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro

1 5 10 15

Thr Gln Leu Asn

20

<210> 43

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 43

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile

1 5 10 15

Leu Lys Lys Tyr

20

<210> 44

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 44

Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala

1 5 10 15

Cys Gly Cys His

20

<210> 45

<211> 139

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 45

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45
Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60
Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95
Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
100 105 110
Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125
Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135
<210> 46
<211> 139
<212> БЕЛОК
<213> homo sapiens
<400> 46
Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15
Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30
Asp Gln Arg Gln Ala Ser Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45
Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60
Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80
Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95
Glu Thr Val Pro Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr

115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Ser Gly Ser His

130 135

<210> 47

<211> 28

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<220>

<221> признак ошибки (misc)

<222> (1)..(3)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (6)..(6)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (8)..(8)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (13)..(13)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (15)..(17)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (19)..(21)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (26)..(26)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Ala Xaa Tyr Ser Glu Gly Xaa Ser Xaa Xaa

1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Met Asn Ala Thr Xaa His Ala

20 25

<210> 48

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<220>

<221> признак ошибки

<222> (5)..(5)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (7)..(9)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<220>

<221> признак ошибки

<222> (11)..(12)

<223> Xaa может представлять собой любую встречающуюся в природе аминокислоту

<400> 48

Tyr Ser Glu Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa

1 5 10

<210> 49

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> homo sapiens

<400> 49

Ser Phe Ile Leu Lys Lys Val Leu Tyr Asp Arg Val Asn Asp Ser Ala

1 5 10 15

Asn Ile Tyr Ser

20

Ссылки

1. Glyn-Jones, S; Palmer, AJ; Agricola, R; Price, AJ; Vincent, TL; Weinans, H; Carr, AJ (3 March 2015). "Osteoarthritis.". Lancet, 386: 376–87. doi:10.1016/S0140-6736(14)60802-3. PMID 25748615.

2. Berenbaum F. (2013). "Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!)". Osteoarthritis and Cartilage, 21 (1): 16–21. doi:10.1016/j.joca.2012.11.012. PMID 23194896.

3. March, L; Smith, EU; Hoy, DG; Cross, MJ; Sanchez-Riera, L; Blyth, F; Buchbinder, R; Vos, T; Woolf, AD (June 2014). "Burden of disability due to musculoskeletal (MSK) disorders.". Best practice & research. Clinical rheumatology, 28 (3): 353–66. doi:10.1016/j.berh.2014.08.002. PMID 25481420.

4. Maroudas AI (April 1976). "Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage". Nature, 260 (5554): 808–9. doi:10.1038/260808a0. PMID 1264261.

5. Bollet AJ, Nance JL (July 1966). "Biochemical Findings in Normal and Osteoarthritic Articular Cartilage. II. Chondroitin Sulfate Concentration and Chain Length, Water, and Ash Content". J. Clin. Invest., 45 (7): 1170–7. doi:10.1172/JCI105423. PMC 292789. PMID 16695915.

6. Brocklehurst R, Bayliss MT, Maroudas A, Coysh HL, Freeman MA, Revell PA, Ali SY (January 1984). "The composition of normal and osteoarthritic articular cartilage from human knee joints. With special reference to unicompartmental replacement and osteotomy of the knee". J. Bone Joint Surg. Am., 66 (1): 95–106. PMID 6690447.

7. Chou MC, Tsai PH, Huang GS, Lee HS, Lee CH, Lin MH, Lin CY, Chung HW (April 2009). "Correlation between the MR T2 value at 4.7 T and relative water content in articular cartilage in experimental osteoarthritis induced by ACL transection". Osteoarthr. Cartil., 17 (4): 441–7. doi:10.1016/j.joca.2008.09.009. PMID 18990590.

8. Grushko G, Schneiderman R, Maroudas A (1989). "Some biochemical and biophysical parameters for the study of the pathogenesis of osteoarthritis: a comparison between the processes of ageing and degeneration in human hip cartilage". Connect. Tissue Res., 19 (2–4): 149–76. doi:10.3109/03008208909043895. PMID 2805680.

9. Mankin HJ, Thrasher AZ (January 1975). "Water content and binding in normal and osteoarthritic human cartilage". J. Bone Joint Surg. Am., 57 (1): 76–80. PMID 1123375.

10. Venn M, Maroudas A (April 1977). "Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition". Ann. Rheum. Dis., 36 (2): 121–9. doi:10.1136/ard.36.2.121. PMC 1006646. PMID 856064.

11. Madry H, Luyten FP, Facchini A (2012). "Biological aspects of early osteoarthritis". Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc., 20 (3): 407–22. doi:10.1007/s00167-011-1705-8. PMID 22009557.

12. Englund M, Roemer FW, Hayashi D, Crema MD, Guermazi A (2012). "Meniscus pathology, osteoarthritis and the treatment controversy". Nat. Rev. Rheumatol., 8 (7): 412–9. doi:10.1038/nrrheum.2012.69. PMID 22614907.

13. Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, Zheng MH (2013). "Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes". Arthritis Research & Therapy, 15 (6): 223. doi:10.1186/ar4405. PMID 24321104.

14. Hill CL, Gale DG, Chaisson CE, Skinner K, Kazis L, Gale ME, Felson DT (2001). "Knee effusions, popliteal cysts, and synovial thickening: association with knee pain in osteoarthritis". J. Rheumatol., 28 (6): 1330–7. PMID 11409127.

15. Felson DT, Chaisson CE, Hill CL, Totterman SM, Gale ME, Skinner KM, Kazis L, Gale DR (3 Apr 2001). "The association of bone marrow lesions with pain in knee osteoarthritis". Ann Intern Med 134 (7): 541–9. doi:10.7326/0003-4819-134-7-200104030-00007. PMID 11281736

16. Sofat, N., Int. J. Exp. Pathol., 90, 463-479, (2009).

17. Dreier, R., Arthritis Res. Ther., 12, 216, (2010).

18. Tchetina, E. V., Arthritis, 2011, 683970, (2011).

19. van der Kraan, P. M. et.al., Osteoarthritis and cartilage, 20, 223-232, (2012).

20. Saito, A., Suzuki, Y., Ogata, S., Ohtsuki, C. & Tanihara, M., Accelerated bone repair with the use of a synthetic BMP-2-derived peptide and bone-marrow stromal cells. J. Biomed. Mater Res., A 72, 77-82, doi:10.1002/jbm.a.30208 (2005).

21. Chen, Y. & Webster, T. J., Increased osteoblast functions in the presence of BMP-7 short peptides for nanostructured biomaterial applications. J. Biomed. Mater Res., A 91, 296-304, doi:10.1002/jbm.a.32246 (2009).

22. Caron, M. M. et al., Hypertrophic differentiation during chondrogenic differentiation of progenitor cells is stimulated by BMP-2 but suppressed by BMP-7. Osteoarthritis Cartilage 21, 604-613, doi:10.1016/j.joca.2013.01.009 (2013).

23. Caron, M. M. J. et al., BAPX1/NKX3.2 ACTS AS A CHONDROCYTE HYPERTROPHY MOLECULAR SWITCH IN OSTEOARTHRITIS. Arthritis & Rheumatology, 67 (2015).

24. Gentilucci, L., De Marco, R. & Cerisoli, L., Chemical modifications designed to improve peptide stability: incorporation of non-natural amino acids, pseudo-peptide bonds, and cyclization. Curr. Pharm. Des., 16, 3185-3203 (2010).

25. Blaney Davidson, E. N. et al., Osteoarthritis Cartilage, 23, 478-486 (2015).

26. Glasson, S. S. et al., Nature, 434, 644-648 (2005).

27. Takayama, K. et al., Arthritis Res. Ther., 16, 482 (2014).

28. Hayashi, et al., Arthritis Res. Ther., 10, R118 (2008).

29. Sekiya, I. et al., J. Orthop. Res., 27, 1088-1092 (2009).

30. Pritzker, K. P. et al., Osteoarthritis Cartilage, 14, 13-29 (2006).

31. Kirkwood, et al., J. Oral Implant., 24: 57-65 (2003)

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> ЮНИВЕРСИТЕЙТ МААСТРИХТ; АКАДЕМИС ЗИКЕНХЁЙС МААСТРИХТ

<120> СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОСТЕОАРТРИТА
ОПИСАНИЕ

<130> 331 WO

<160> 49

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 33
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 1

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu
1 5 10 15

Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile
20 25 30

Val

<210> 2
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 2

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu
1 5 10 15

Ser Ala Phe Pro
20

<210> 3
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 3

Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser
1 5 10 15

Ala Phe Pro Leu
20

<210> 4
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 4

Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala
1 5 10 15

Phe Pro Leu Asn
20

<210> 5
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 5

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe
1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser
20

<210> 6
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 6

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro
1 5 10 15

Leu Asn Ser Tyr
20

<210> 7
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 7

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu
1 5 10 15

Asn Ser Tyr Met
20

<210> 8
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 8

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn
1 5 10 15

Ser Tyr Met Asn
20

<210> 9
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 9

Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10 15

Tyr Met Asn Ala
20

<210> 10
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 10

Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr
1 5 10 15

Met Asn Ala Thr
20

<210> 11
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 11

Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met
1 5 10 15

Asn Ala Thr Asn
20

<210> 12
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 12

Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

Ala Thr Asn His
20

<210> 13
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 13

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

Thr Asn His Ala
20

<210> 14
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 14

Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr
1 5 10 15

Asn His Ala Ile
20

<210> 15
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 15

Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn
1 5 10 15

His Ala Ile Val
20

<210> 16
<211> 12
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 16

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10

<210> 17
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 17

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe
1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser
20

<210> 18
<211> 19
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 18

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro
1 5 10 15

Leu Asn Ser

<210> 19
<211> 18
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 19

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu
1 5 10 15

Asn Ser

<210> 20
<211> 17
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 20

Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn
1 5 10 15

Ser

<210> 21
<211> 16
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 21

Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10 15

<210> 22
<211> 15
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 22

Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10 15

<210> 23
<211> 14
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 23

Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 13
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 24

Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 25

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser
1 5 10

<210> 26
<211> 13
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 26

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr
1 5 10

<210> 27
<211> 14
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 27

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met
1 5 10

<210> 28
<211> 15
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 28

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 29
<211> 16
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 29

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

<210> 30

<211> 17
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 30

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

Thr

<210> 31
<211> 18
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 31

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

Thr Asn

<210> 32
<211> 19
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 32

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

Thr Asn His

<210> 33
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 33

Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala
1 5 10 15

Thr Asn His Ala
20

<210> 34
<211> 28
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 34

Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe
1 5 10 15

Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala
20 25

<210> 35
<211> 27
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 35

Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro
1 5 10 15

Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala
20 25

<210> 36
<211> 26
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 36

Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu
1 5 10 15

Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala
20 25

<210> 37
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 37

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala
20

<210> 38
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 38

Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser Asp Gln
1 5 10 15

Arg Gln Ala Cys
20

<210> 39
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 39

Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp Leu Gly Trp
1 5 10 15

Gln Asp Trp Ile
20

<210> 40
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 40

Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu
1 5 10 15

Cys Ala Phe Pro
20

<210> 41
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 41

Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln
1 5 10 15

Thr Leu Val His
20

<210> 42
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 42

Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro
1 5 10 15

Thr Gln Leu Asn
20

<210> 43
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 43

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
1 5 10 15

Leu Lys Lys Tyr
20

<210> 44
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 44

Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala
1 5 10 15

Cys Gly Cys His
20

<210> 45
<211> 139
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 45

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
130 135

<210> 46
<211> 139
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 46

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser
20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Ser Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
50 55 60

Tyr Tyr Ser Glu Gly Glu Ser Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Ser Gly Ser His
130 135

<210> 47
<211> 28
<212> белок
<213> homo sapiens

<220>
<221> прочий_признак
<222> (1)..(3)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой
<220>
<221> прочий_признак
<222> (6)..(6)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (8)..(8)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой
<220>
<221> прочий_признак
<222> (13)..(13)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой
<220>
<221> прочий_признак
<222> (15)..(17)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (19)..(21)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак

<222> (26)..(26)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<400> 47

Xaa Xaa Xaa Gly Tyr Xaa Ala Xaa Tyr Ser Glu Gly Xaa Ser Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Met Asn Ala Thr Xaa His Ala
20 25

<210> 48
<211> 12
<212> белок
<213> homo sapiens

<220>
<221> прочий_признак
<222> (5)..(5)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (7)..(9)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (11)..(12)
<223> Xaa может быть любой природной аминокислотой

<400> 48

Tyr Ser Glu Gly Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Leu Xaa Xaa
1 5 10

<210> 49
<211> 20
<212> белок
<213> homo sapiens

<400> 49

Ser Phe Ile Leu Lys Lys Val Leu Tyr Asp Arg Val Asn Asp Ser Ala
1 5 10 15

Asn Ile Tyr Ser
20

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, где указанный пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16 или ее вариант согласно формуле 2, причем аминокислотная последовательность указанного пептида содержится в SEQ ID NO: 34 или ее варианте согласно формуле 1, где формула 1 представляет собой

X1X2X3GYX4AX5YSEGX6SX7X8X9LX10X11X12MNATX13HA(SEQ ID NO: 47),

где

X1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R;
X2 = P, или Y, или M;
X3 = E, или R, или H, или K, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или L, или M, или V;
X4 = A, или E, или Q, или R, или S;
X5 = Y, или N, или D;
X6 = E, или A, или Q;
X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;

X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;
X9 = P или M;
X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V;
X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T;
X12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или S, или T; или при этом
X13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R;
и где формула 2 представляет собой

YSEGX6SX7X8X9LX10X11(SEQ ID NO: 48),

в которой
X6 = E, или A, или Q;
X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;
X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;
X9 = P или M,
X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V; или при этом
X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

2. Применение по п.1, причем указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-13.

3. Применение по п.1 или 2, причем указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10.

4. Применение по любому из пп. 1-3, причем указанный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ IDNO: 16.

5. Применение по любому из пп. 1-4, причем аминокислотная последовательность пептида полностью содержится в SEQ ID NO: 34.

6. Применение по любому из пп. 1-5, причем пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсопептиды, ретроинверсопептиды, циклические пептиды, монопетлевидные пептиды и двухпетлевидные пептиды.

7. Способ для лечения, облегчения или предупреждения остеоартрита (АО), где указанный способ включает введение пациенту с АО пептида, где указанный пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 16 или ее вариант согласно формуле 2, причем аминокислотная последовательность указанного пептида содержится в SEQ ID NO: 34 или ее варианте согласно формуле 1, где формула 1 представляет собой

X1X2X3GYX4AX5YSEGX6SX7X8X9LX10X11X12MNATX13HA(SEQ ID NO: 47),

где
X1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R;
X2 = P, или Y, или M;
X3 = E, или R, или H, или K, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или L, или M, или V;
X4 = A, или E, или Q, или R, или S;
X5 = Y, или N, или D;
X6 = E, или A, или Q;
X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;
X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;
X9 = P или M;
X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V;
X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T;
X12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или S, или T; или при этом
X13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R;
и где формула 2 представляет собой

YSEGX6SX7X8X9LX10X11(SEQ ID NO: 48),

в которой
X6 = E, или A, или Q;
X7 = A, или D, или E, или H, или K, или S;
X8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S;
X9 = P или M,
X10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V; или при этом
X11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

8. Способ по п.7, причем указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5-13.

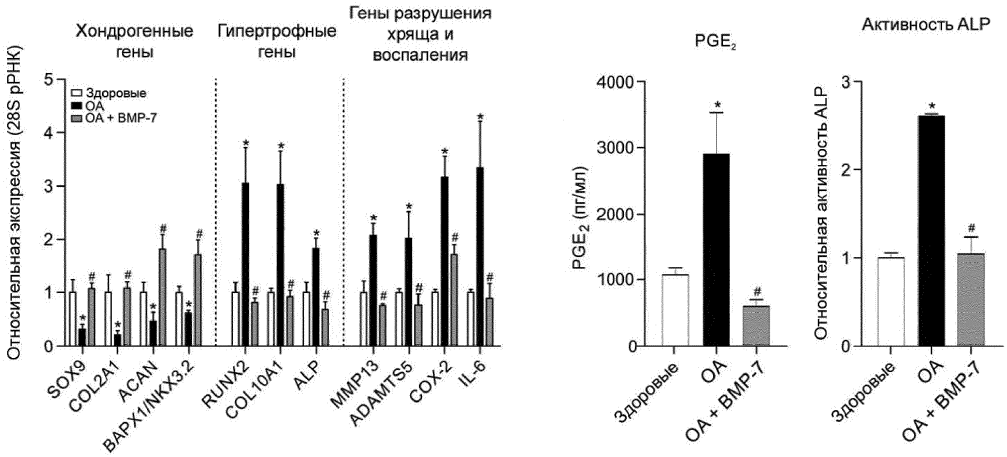
9. Способ по п.7 или 8, причем указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности в соответствии с SEQ ID NO: 10.

10. Способ по любому из пп.7-9, причем указанный пептид включает аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

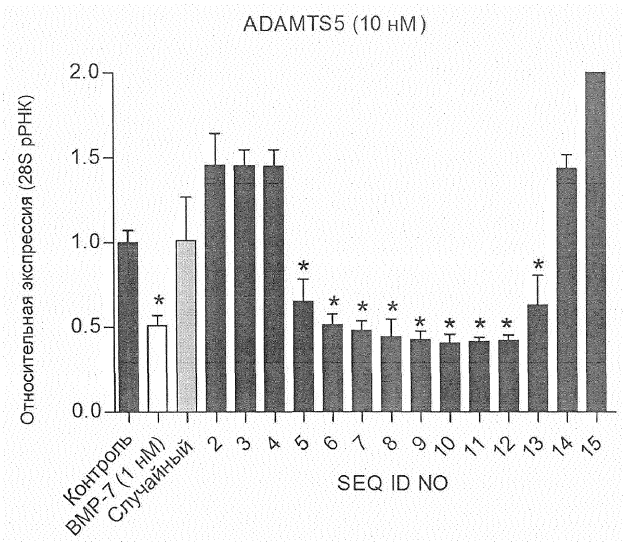
11. Способ по любому из пп.7-10, причем аминокислотная последовательность пептида полностью

содержится в SEQ ID NO: 34.

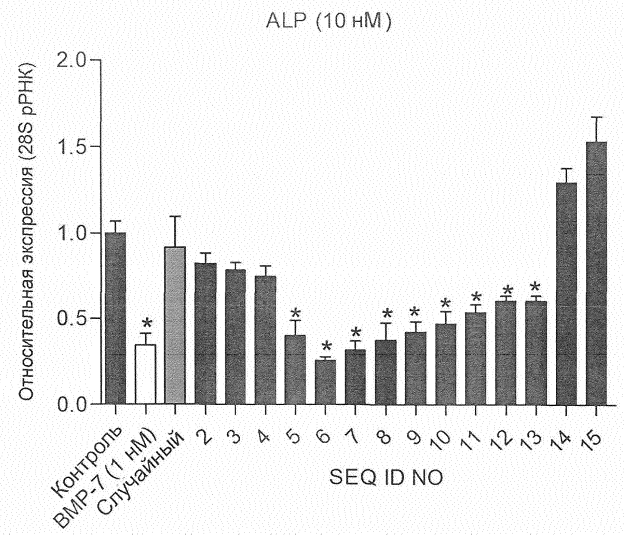
12. Способ по любому из пп.7-11, причем пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсопептиды, ретроинверсопептиды, циклические пептиды, монопетлевидные пептиды и двухпетлевидные пептиды.



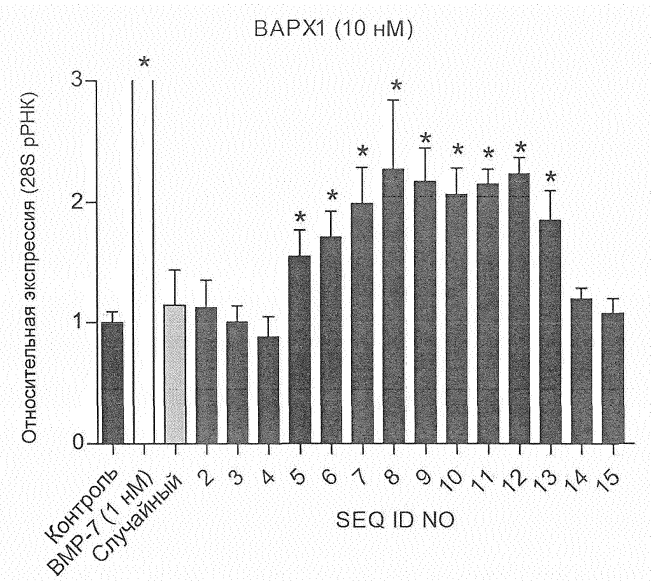
Фиг. 1



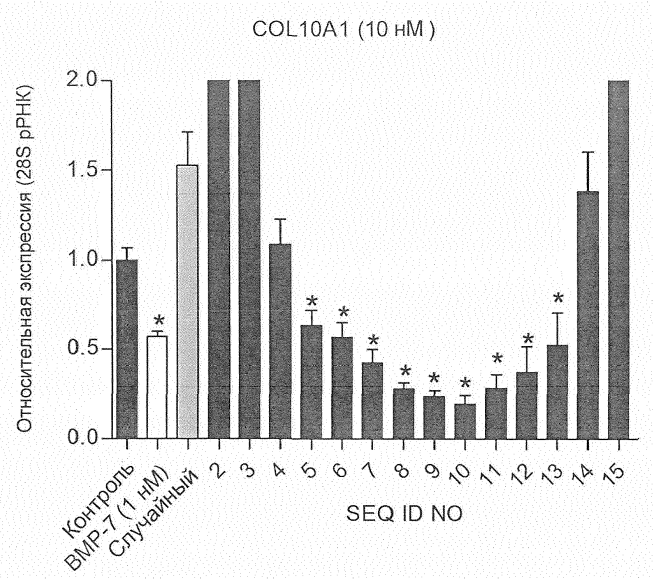
Фиг. 2



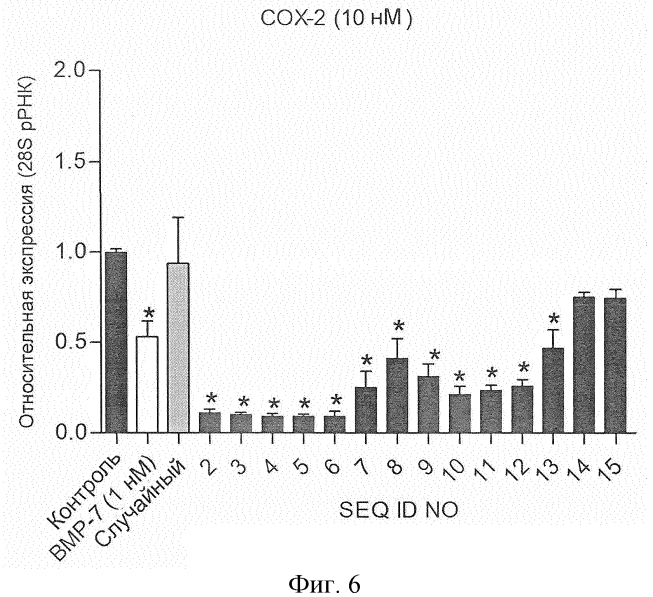
Фиг. 3



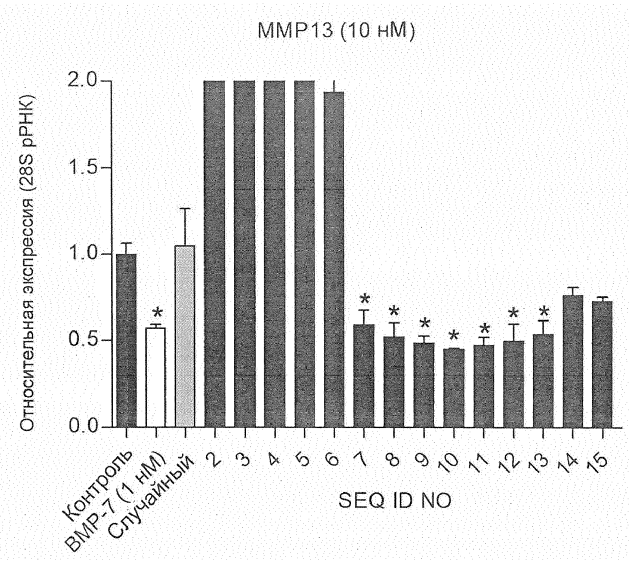
Фиг. 4



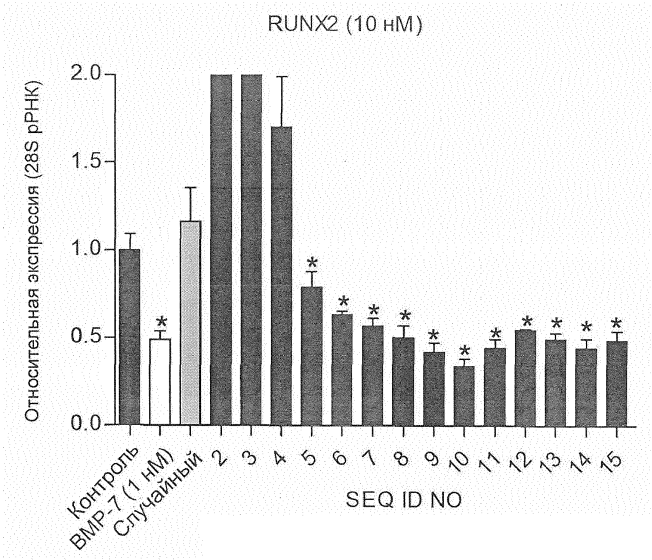
Фиг. 5



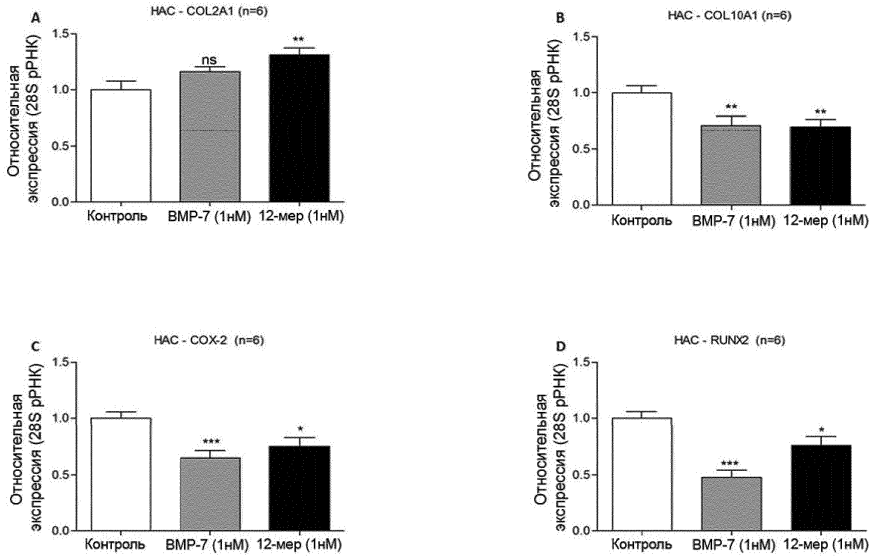
Фиг. 6



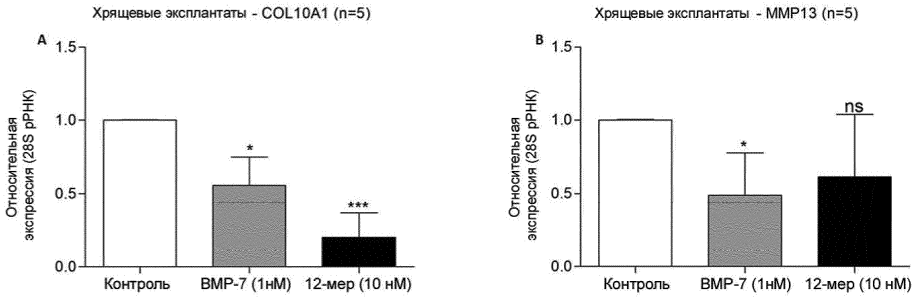
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9


Хрящевые эксплантаты - COL10A1 (n=5)
A
Относительная экспрессия (28S рРНК)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
***
Контроль
BMP-7 (1нМ)
12-мер (10 нМ)
Хрящевые эксплантаты - MMP13 (n=5)
B
Относительная экспрессия (28S рРНК)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
ns
Контроль
BMP-7 (1нМ)
12-мер (10 нМ)

Фиг. 10