



(19) **UA** <sup>(11)</sup> **46 767** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51)МПК <sup>7</sup> **A 61K 38/17 A, C 07K 14/51 B,  
C 12N 15/12 B, C 12P 21/02 B**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 97115563, 19.04.1996  
(24) Дата начала действия патента: 17.06.2002  
(30) Приоритет: 19.04.1995 JP 7/93664  
17.11.1995 JP 7/322403  
(46) Дата публикации: 15.06.2002  
(86) Заявка РСТ:  
РСТ/JP96/01062, 19960419

(72) Изобретатель:  
Макисима Фусао, JP,  
Такамацу Хироюки, JP,  
Мики Хидео, JP,  
Каваи Синдзи, JP,  
Кимура Митио, JP,  
Мацумото Томоаки, JP,  
Кацуура Миэко, JP,  
Еномото Коити, JP,  
Сатох Есике, JP

(73) Патентовладелец:  
БИОФАРМ ГЕЗЕЛЬШАФТ ЦУР  
БИОТЕХНОЛОГИШЕН ЭНТВИКЛУНГ ФОН  
ФАРМАКА МБХ, DE

(54) БЕЛОК, ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ХРЯЩЕЙ И КОСТЕЙ, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ БЕЛКА, СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГОМОДИМЕРНОГО БЕЛКА, СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ ХРЯЩЕЙ И КОСТЕЙ

(57) Реферат:

Получен белок, содержащий аминокислотную последовательность №1 из перечня последовательностей человеческого белка MP52, и димер этого белка. Гомодимерный белок получают, конструируя плазмиду, ДНК которой кодирует указанную аминокислотную последовательность с остатком метионина на N-конце. Полученной плазмидой трансформируют клетки E. coli. После выращивания клеток солибилизируют тельца включения и из солибализованного раствора очищают

белок-мономер. Гомодимерный белок, описанный выше, применяют в составе фармацевтической композиции для лечения заболеваний хрящевой и костной ткани.

Официальный бюллетень "Промышленная собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

У А 4 6 7 6 7 C 2

У А 4 6 7 6 7 C 2



(19) **UA** <sup>(11)</sup> **46 767** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61K 38/17 A, C 07K 14/51**  
**B, C 12N 15/12 B, C 12P 21/02 B**

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF  
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL  
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 97115563, 19.04.1996  
(24) Effective date for property rights: 17.06.2002  
(30) Priority: 19.04.1995 JP 7/93664  
17.11.1995 JP 7/322403  
(46) Publication date: 15.06.2002  
(86) PCT application:  
PCT/JP96/01062, 19960419

(72) Inventor:  
Maxima Fusao, JP,  
Takamatsu Hirouki, JP,  
Miki Hideo, JP,  
Kawai Sindzi, JP,  
Kimura Mitio, JP,  
Matsumoto Tomoaki, JP,  
Katsuura Mieko, JP,  
Enomoto Koiti, JP,  
Satoh Esike, JP  
(73) Proprietor:  
BIOPHARM GESELLSCHAFT ZUR  
BIOTECHNOLOGISCHEN ENTWICKLUNG VON  
PHARMAKA MBH, DE

(54) **PROTEIN, PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING CARTILAGE AND BONE DISEASES, METHOD FOR PRODUCING PROTEIN, METHOD FOR PRODUCING HOMODIMERIC PROTEIN, METHOD FOR TREATING CARTILAGE AND BONE DISEASES**

(57) Abstract:

A protein having amino acid sequence in SEQ ID No.: I of the Sequence Listing derived from human MP52, and a dimer protein thereof. A homodimer protein described above can be obtained by constructing a plasmid containing DNA coding amino acid sequence in SEQ ID No.:I of the Sequence Listing with a methionine at the N-terminus, introducing the plasmid into E. coli for transformation, solubilizing inclusion bodies obtained by culturing the transformant, purifying the monomer protein from the solubilized

solution, refolding the monomer protein into a dimer protein and purifying the same.

The homodimer protein described above is useful as a pharmaceutical composition for treating cartilage and bone diseases.

Official bulletin "Industrial property". Book 1 "Inventions, utility models, topographies of integrated circuits", 2002, N 6, 15.06.2002. State Department of Intellectual Property of the Ministry of Education and Science of Ukraine.

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2



(19) **UA** <sup>(11)</sup> **46 767** <sup>(13)</sup> **C2**  
(51)МПК <sup>7</sup> **A 61K 38/17 A, C 07K 14/51 B,  
C 12N 15/12 B, C 12P 21/02 B**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВІНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:  
97115563, 19.04.1996

(24) Дата набуття чинності: 17.06.2002

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької  
конвенції : 19.04.1995 JP 7/93664  
17.11.1995 JP 7/322403

(46) Публікація відомостей про видачу патенту  
(декларційного патенту): 15.06.2002

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки  
відповідно до договору РСТ:  
PCT/JP96/01062, 19960419

(72) Винахідник(и):

Макісіма Фусао , JP,  
Такамацу Хіроюкі , JP,  
Мікі Хідео , JP,  
Каваї Сіндзі , JP,  
Кімура Мітіо , JP,  
Мацумото Томоакі , JP,  
Кацуура Мієко , JP,  
Еномото Коїті , JP,  
Сатох Есіке , JP

(73) Власник(и):

БІОФАРМ ГЕЗЕЛЬШАФТ ЦУР  
БІОТЕХНОЛОГШЕН ЕНТВІКЛУНГ ФОН  
ФАРМАКА МБХ, DE

(54) БІЛОК, ФАРМАЦЕВТИЧНА КОМПОЗИЦІЯ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ХРЯЩІВ І КІСТОК, СПОСІБ ОТРИМАННЯ БІЛКА, СПОСІБ ОТРИМАННЯ ГОМОДИМЕРНОГО БІЛКА, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЗАХВОРЮВАНЬ ХРЯЩІВ І КІСТОК

(57) Реферат:

Штучним методом отриманий білок, що є похідною від природнього білка МР 52, який застосовують при лікуванні захворювань хрящів і кісток. Цей білок отримують шляхом культивування клітин E. coli, трансформованих плазмідом, що

включає в себе послідовність ДНК, яка кодує цей білок. Запропонована фармацевтична композиція, що містить терапевтично ефективну кількість запропонованого білка. Наведено спосіб лікування захворювань хрящів і кісток з використанням цієї фармацевтичної композиції.

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2

## Опис винаходу

5 Даний винахід стосується білка, що має амінокислотну послідовність, подану в SEQ ID No 1 Списку послідовностей, зробленому з MP52. Винахід стосується також гомодимерного білка цього білка і фармацевтичної композиції для лікування захворювань хрящів і кісток, що містить димерний білок в якості активного інгредієнта. Даний винахід стосується також способу одержання описаного вище білка у великій кількості і з високою чистотою шляхом культивування *E. coli*, трансформовану плазмідною, що містить послідовність ДНК, здатну експресувати описаний вище білок. Даний винахід стосується також способу лікування захворювань хрящів і кісток, що включає в себе введення людині фармацевтичної композиції, що містить ефективну кількість гомодимерного білка.

10 Фармацевтичні композиції, що містять вітамін D3, кальцитонін, естроген або їх похідні, а також похідні бифосфонатів використовували в клінічній практиці для запобігання і лікування захворювань кісток. Нещодавно повідомлялося, що морфогенетичний білок кісток (далі називаний BMP), суперсімейство генів TGF-(, що містить BMP-2-BMP-9, і родинні білки, мають кісткову морфогенетичну активність.

15 Крім того, повідомлялося про кісткову морфогенетичну активність одного з білків, названих MP52 (WO 93/16099 і WO 95/04819). Вважають, що зрілий район білка MP52 являє собою білок, що складається з 120 амінокислотних залишків, що мають N-кінцевий аланін, і його амінокислотна послідовність описана в цих публікаціях.

20 В *Nature*, vol. 368, p. 639 - 643 (1994) і WO 94/15449 описаний також білок, названий GDF-5.

Проте, ці білки важко одержати в очищеному вигляді в промисловому масштабі.

Лінії клітин ссавців, такі як L-клітини, були випробувані на продукування MP52 із використанням генної інженерії. Проте, було виявлено, що з досліджуваними системами експресії нелегко одержати MP-52 в очищеному вигляді і з високим виходом.

25 Автори даного винаходу намагалися одержати MP52 із використанням *E. coli* у великих масштабах за допомогою генної інженерії. Коротенько, автори даного винаходу намагалися одержати MP52 із використанням *E. coli* шляхом приєднання кодону, що кодує метіонін, кДНК, що кодує зрілий район MP52, який починається з аланіну. Отриманий продукт не був тільки MP52, але являв собою суміш MP52, білка з 121 амінокислотного залишку, що має N-кінцевий метіонін, і білка з 119 амінокислотних залишків, що має віддалений N-кінцевий аланін і починається з проліну. Було надзвичайно важко виділити чистий MP52 принаймні зі зрілим районом із цієї суміші.

30 Автори даного винаходу знайшли, що білок із SEQ ID No 1 Списку послідовностей, що починається з проліну при N-кінці, може бути отриманий селективно з дуже високим виходом шляхом конструювання плазмиди, в якій кодон, що кодує метіонін, з'єднаний із послідовністю ДНК, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID No 1 Списку послідовностей, що складається з 119 амінокислотних залишків з елімінацією N-кінцевого аланіну MP52, і шляхом використання отриманої плазмиди, введеної в *E. coli*, для експресії. Крім того, було підтверджено, що гомодимер білка, описаного в SEQ ID No 1 в Списку послідовностей, має хрящову і кісткову морфогенетичну активність, що дозволило завершити даний винахід.

35 Ціллю даного винаходу є забезпечення білка, що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID No 1 Списку послідовностей. Білок складається з 119 амінокислотних залишків і відповідає білку MP52 людини, який розглядається як зрілий район, що складається з 120 амінокислотних залишків, в якому виключений N-кінцевий аланін. Білок відповідно до даного винаходу розчиняється у воді. Крім того, цей білок сам є низькотоксичним, оскільки він отриманий із білка людини.

40 Іншою ціллю даного винаходу є забезпечення фармацевтичної композиції для лікування захворювань хрящів і/або кісток, що містить в якості активного інгредієнта гомодимер білка, що має амінокислотну послідовність, показану в SEQ ID No 1 Списку послідовностей. Більш конкретно, даний винахід стосується фармацевтичної композиції для запобігання і лікування остеопорозу, остеоартриту, такого як деформівний гонартрит і деформівна хвороба тазостегнового суглоба, або епіфізарного остеоіеліту, ушкодження хрящів, такого як суглобне ушкодження меніска, реконструкції дефектних частин кісток і хряща, обумовлених ушкодженням і онкоектомією, дефекту кісток і хрящів, перелому кісток, уроджених захворювань хрящів і кісток, таких як хондродисплазія, хондрогіпоплазія, ахондрогенез, щілина піднебіння й остеодисплазія, і, крім того, корінцевих і арвекулярних дефектів, оскільки гомодимерний білок відповідно до даного винаходу має хрящову і кісткову морфогенетичну активність. Крім того, цей гомодимерний білок може застосовуватися для опрацювання кісткової трансплантації в косметичній хірургії. Ці способи лікування також включають способи лікування в області ветеринарної хірургії.

55 Подальшою ціллю даного винаходу є забезпечення способу одержання білка, що складається з 119 амінокислотних залишків, виготовленого з білка MP52 людини, показаного в SEQ ID No 1 Списку послідовностей, з використанням *E. coli*.

60 Зокрема, даний винахід стосується конструювання плазмиди, що містить послідовність ДНК, яка кодує амінокислотну послідовність, із додатковим метіоніном на N-кінці. Тільки зрілий район кДНК MP52 людини був ампліфікований полімеразною ланцюговою реакцією (спосіб ПЛР) із використанням в якості матричної ДНК плазмідного вектора, що містить кДНК, описану в WO 93/16099. Спосіб ПЛР, на який посилаються тут, означає ампліфікацію дуже невеликої кількості фрагментів ДНК або РНК відповідно до способу, описаному в U.S. Patent 4683195.

65 Для одержання білка даного винаходу необхідно сконструювати відповідні експресуючі вектори, що містять

ДНК, яка кодує даний білок, які потім вводять в бажані штами-хозяїни *E. coli* за допомогою способів генної інженерії. Для широкомасштабного одержання цього білка використовували два наступні удосконалені способи:

1) Спосіб збільшення виходу цільових білків шляхом збільшення ефективності трансляції, повідомлений M. Nobuhara et al. (Agric. Biol. Chem, 52(6), 1331 - 1338, 1988), а саме, спосіб збільшення вмісту АТ біля кодону АТГ, що ініціює, і

2) Спосіб збільшення середнього числа копій плазмід на клітину, а саме, спосіб заміни району *ori* для точки початку реплікації вектора *pBR* районом *ori* вектора *pUC*. Далі, експресуючий вектор (*pKOT245*) даного винаходу конструювали прямим легуванням промоторного району з послідовністю ДНК, що кодує амінокислотну послідовність SEQ ID No 1 Списку послідовностей, із додатковим метіоном на її N-кінці. *E. coli*, що містить цей вектор, була депонована (Номер доступу BIKOKEN-KIP-14895} в National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, що знаходиться в 1-36 Higashi I-chome, Yatake-cho, Taukuba-shi, Ibaraki-ken, 305 Japan, 14 квітня 1995 року і перенесена на депозит (Номер доступу BIKOKEN-KI BP-5499) 10 квітня 1996 року відповідно до Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms.

Даний винахід стосується способу одержання мономерних білків, який передбачає стадії: конструювання плазмиди, що містить послідовність ДНК, яка кодує амінокислотну послідовність SEQ ID No 1 Списку послідовностей із метіоном на її N-кінці, введення цієї плазмиди в *E. coli* для трансформації, культивування *E. coli* для одержання тіл включення, солюбілізацію й очищення тіл включення для одержання мономерних білків, і

до способу одержання гомодимерних білків білка з SEQ ID No 1 Списку послідовностей за допомогою повторного укладення й очищення мономерних білків, отриманих, як описано вище. Коротенько, білки даного винаходу одержували солюбілізацією тіл включення *E. coli* із наступним нанесенням на колонку SP-Sepharose і колонку Sephacryl S-200 з одержанням очищених сульфонованих мономерів MP52, які піддавали повторному укладанню і ізоелектричної преципітації, потім наносили на колонку RESOURCE RFC BEJX із зверненою фазою з одержанням фракцій очищених димерів цих білків. Фізико-хімічні властивості цих білків аналізували на основі визначення N-кінцевої амінокислотної послідовності й амінокислотного складу і з застосуванням електрофорезу.

Даний винахід стосується також способу культивування клітин *E. coli*, в які були введені експресуючі вектори даного винаходу в умовах культурального середовища при 28 - 34°C, pH 6 - 8 і концентрації кисню 20 - 50%. Далі, даний винахід стосується способу лікування захворювань хрящів і кісток, що включає в себе введення людині фармацевтичної композиції, що містить в якості активного інгредієнта ефективної кількості гомодимерного білка.

Біологічні активності гомодимерного білка визначали аналізом рентгенограм м'якого рентгенографічного аналізу, аналізом забарвлювання тканин і аналізом тимчасового ходу ектопічного утворення хрящів/кісток. Крім того, на підставі результатів дії на внутрішньомембранну осифікацію (окостеніння), дії на регенерацію суглобної хрящової тканини і дії на загоєння перелому і дефекти кісток було показано, що гомодимерний білок даного винаходу є цінним для терапії регенерації хрящової і/або кісткової тканини.

Гомодимерний білок даного винаходу можна вводити системно внутрішньовенною, внутрішньом'язовою або внутрішньочеревною ін'єкцією. У випадку внутрішньовенного введення можна також використовувати краплинне внутрішньовенне вливання, на додаток до звичайних внутрішньовенних ін'єкцій.

Препарати для ін'єкцій можуть бути приготовлені, наприклад, у вигляді порошоків для ін'єкцій. В цьому випадку порошки можуть бути приготовлені шляхом додавання одного або декількох придатних водорозчинних наповнювачів, таких як маніт, сахароза, лактоза, мальтоза, глюкоза, фруктоза і т.п., до активного інгредієнту, розчинення цієї суміші у воді, розподілу і у флакони або ампули з наступною ліофілізацією і герметичним закупорюванням.

У випадку місцевого введення гомодимерний білок може бути нанесений у вигляді покриття на поверхню хряща, кістки або зуба за допомогою колагенової пасти, фібринового клею або інших матеріалів для приклеювання. У випадку імплантації кісток можна використовувати як природну кістку, так і звичайну штучну кістку. Штучна кістка означає кістку, виготовлену з металу, кераміки, скла й іншої природної або штучної неорганічної речовини. Кращою штучною речовиною вважають гідроксиапатит. Наприклад, штучна кістка може бути виготовлена зі сталі в якості щільного матеріалу у внутрішній частині і гідроксиапатиту в якості пористого матеріалу зовнішньої частини. Крім того, вигідно наносити гомодимерний білок на частину, із якої видаляють ракову кісткову тканину, для прискорення відновлення кістки. Він може бути також нанесений на імплантат хряща.

Доза може змінюватися в залежності від різноманітних факторів, що впливають на активність даного білка, таких як вага кістки і хряща, які повинні бути відновлені, ушкоджене місце кістки і хряща і симптоми, вік і стать пацієнтів, тяжкість інфекції, інтервали введення та інші клінічні фактори. Доза може також змінюватися в залежності від типів носіїв, використовуваних для повторної структуризації з димерним білком. Загалом, доза знаходиться в діапазоні  $\approx 10 - 10^6$ нг гомодимерного білка на сиру вагу цільових кістки і хряща при введенні у вигляді композиції, що містить носій. У випадку місцевого і системного введення у вигляді ін'єкції краще вводити 0,1 -  $10^4$ мкг з частотою від одного разу на тиждень до одного разу на день.

Синергічна дія може очікуватися при введенні гомодимерного білка одночасно з відомими факторами росту, наприклад, інсулін-подібним фактором росту-1, для регенерації кісткової і хрящової тканини.

Ніколи не повідомлялося про спосіб одержання білка даного винаходу в промисловому масштабі й в очищеному вигляді, як описано вище, і цей гомодимерний білок може застосовуватися в якості лікарської композиції для лікування захворювань хрящів і кісток, оскільки він має хрящову і кісткову морфогенетичну

активність. Далі, спосіб одержання білка відповідно до даного винаходу може бути застосований для одержання інших білків, членів вищеописаного суперсімейства TGF- $\beta$ , які (всі) дотепер можна було успішно одержувати тільки з використанням ліній клітин ссавців.

Даний винахід ілюструється наступними прикладами. Проте, не варто вважати, що даний винахід обмежений тільки цими характерними прикладами.

Приклади

Приклад 1. Конструювання експресуючого вектора

(1) Виділення зрілого району MP52

кДНК зрілого району MP52 людини ПЛР-ампліфікували з використанням плазмідного вектора (pSK52s), який містить кДНК, описану в WO 93/16099, в якості матричної ДНК.

У відповідності зі способом збільшення виходу цільових білків, повідомленим М. Nobuhara, et al. (Agric. Biol. Chem., 52(6), 1331 - 1338, 1988), частина ДНК гена зрілого району MP52 заміняли для збільшення вмісту АТ біля ініціюючого району АТГ.

Мутагенез був забезпечений ПЛР-способом із використанням сконструйованого праймера ПЛР, що включає в себе мутацію SEQ ID No 2 Списку послідовностей. Для послідовності ДНК праймерів ПЛР використовували ДНК SEQ ID No 2 в якості зворотного (upstream) праймера, а ДНК SEQ ID No 3 Списку послідовностей в якості прямого (downstream) праймера.

ПЛР здійснювали шляхом додавання матричної ДНК (10нг), 50нмоль кожного з праймерів ПЛР в пряму напрямку і в зворотному напрямку, dNTP (0,2ммоль) і MgCl<sub>2</sub> (1,5ммоль) в одній і тій ж тест-пробірці, разом із ДНК-полімеразою Tag (5E).

Виконували тридцять циклів ПЛР; умови кожного циклу були: 94°C протягом 1 хв. для денатурації, 55°C протягом 1 хв. для відпалу праймерів і 72°C протягом 2 хв. для подовження праймерів.

Продукти, отримані з ПЛР, виділяли за допомогою електрофорезу в 1,5% агарозі з низькою точкою плавлення (придбаної з FMS) і виділяли фрагменти  $\approx$ 360п.н. (Фрагмент 1).

(2) Конструювання експресуючого вектора E. coli для білка даного винаходу

Для збільшення числа копій плазміди на бактерії район огі для початку реплікації вектора pBR заміняли районом огі вектора pUC. Експресуючий вектор E. coli pKK223-3, доступний в продажі (придбаний із Pharmacia Biotech), використовували для виділення району промотора tac шляхом розщеплення рестриктазами SspI і EcoRI і також для виділення термінуючого району rrrB 1<sub>t2</sub>, із використанням Sall і SspI. Фрагмент ДНК промоторного району tac, що був оброблений нуклеазою маша (Takara Shuzo Co., Ltd), лігували ДНК-лігазою T4 із Фрагментом 1, отриманим вище. Отриманий фрагмент ДНК розщеплювали Sall і повторно лігували в сайт SmaI вектори pUC18 для конструювання експресуючого вектора {(pKOT245) (Accession No. BIKOKEN-KIP-14895)} (Fig.1) для одержання білка. Довжина ДНК pKOT245 дорівнює 3,7п.н. Нуклеотидну послідовність експресуючого вектора, сконструйовану для цього білка, аналізували за допомогою секвенатора ДНК (PharmaciaAlf).

(3) Трансформація

Трансформацію здійснювали відповідно до способу трансформації з хлоридом рубідію Kushner et al. (Genetic Engineering, p. 17, Elsevier, 1978). Коротенько, pKOT245 використовували для трансформації штаму-хазяїна E. coli W3110M відповідно до описаного вище способу з одержанням трансформантів E. coli для одержання цільового білка.

Приклад 2. Культивування

(1) Культивування

E. coli, що експресує білок даного винаходу, попередньо культивували в модифікованому середовищі SOC (бактотриптон 20г/л, бакто-дріжджовий екстракт 5г/л, NaCl 0,5г/л, MgCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 2,03г/л, глюкоза 3,6г/л). 100мл суспензії бактерій використовували для інокулювання 5л продукційного середовища (бактотриптон 5г/л, лимонна кислота 4,3г/л, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,675г/л, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,275г/л, NaCl 0,865г/л, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 100мг/л, CuSO<sub>4</sub> 5H<sub>2</sub>O 1мг/л, MnSO<sub>4</sub> nH<sub>2</sub>O 0,5мг/л, CaCl<sub>2</sub> 2H<sub>2</sub>O 2мг/л, Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> 10H<sub>2</sub>O 0,225мг/л, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4H<sub>2</sub>O 0,1мг/л, ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2,25мг/л, CoCl<sub>2</sub> 6H<sub>2</sub>O 6мг/л, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 2,2п/л, тіамін-HCl 5,0мг/л, глюкоза 3г/л), яку культивували в 10-літровому ферментері з аерацією-перемішуванням і потім при досягненні ранньої стадії логарифмічної фази росту (OD<sub>550</sub> = 5,0) добавляли ізопропіл- $\beta$ -D-тіоґалактопіранозид при кінцевій концентрації 1м і культивування продовжували до досягнення OD<sub>550</sub> = 150. Під час цього культивування температуру підтримували при 32°C і рівень pH 7,15 додаванням аміаку. Для запобігання зниження концентрації розчиненого кисню перемішування здійснювали зі швидкістю, достатньою для підтримки концентрації розчиненого кисню при 50% від насичення повітря. Культивування продовжували додаванням 50% розчину глюкози до рівня 0,2% для одержання високої щільності клітин, про яку свідчило різке збільшення концентрації розчиненого кисню.

(2) Одержання тіл включення E. coli

Культуральний бульйон, отриманий описаним вище способом, центрифугували для збору клітин, що потім суспендували в 25м Трис-HCl-буфері, що містить 10м етилендіамінтетраоцтову кислоту (pH 7,3). Клітини руйнували пропусканням їх через гомогенізатор (APV Gaulin Inc.) і знову центрифугували для збору осаду, що містить тіла включення.

Приклад 3. Очищення

(1) Солюбілізація тіл включення E. coli

Після промивання 1% тритоном X-100 три рази тіла включення E. coli центрифугували при 3000g протягом 30 хвилин при 4°C і потім отриманий осад солюбілізували обробкою ультразвуком в 20мМ Трис-HCl-буфері, pH 8,3, 8М сечовині, 10мМ ДТТ і 1мМ ЕДТК.

(2) Одержання мономерів

Солюбілізований розчин центрифугували при 20000g протягом 30 хвилин і отриманий супернатант збирали. Отриманий супернатант наносили на колонку SP-Sepharose FF (Pharmacia AB), урівноважену 20мМ Трис-НСІ-буфером, рН 8,3, 6М сечовиною і 1мМ ЕДТК, і потім після промивання тим же самим розчином, колонку елюювали тим же самим розчином, що містить 0,5М NaCl. Білок в елюаті сульфували додаванням Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> і Na<sub>2</sub>S<sub>4</sub>O<sub>6</sub> до кінцевої концентрації, відповідно 111мМ і 13мМ і інкубуванням при 4°C протягом 15 годин. Сульфований розчин піддавали гель-фільтрації на колонці Sephacryl S-200 HR (Pharmacia AB), урівноваженій 20м Трис-НСІ-буфером, рН 8,3, 6М сечовиною, 0,2 NaCl і 1мМ ЕДТК, з одержанням сульфованих мономерів білка даного винаходу.

(3) Повторне укладання

Розчин сульфованих мономерів добавляли в 9-кратний об'єм 50мМ Na-гліцинового буфера, рН 9,8, 0,2М NaCl, 16мМ CHAPS, 5мМ ЕДТК, 2мМ GSH (відновленого глутатіону) і 1мМ GSSG (окисленого глутатіону) і потім інкубували протягом 24 годин при 4°C для окислювання і повторного укладання білка даного винаходу.

(4) Одержання гомодимерів

Розчин для повторного укладання розбавляли таким же об'ємом очищеної води і потім доводили рН приблизно до 7,4 бн НСІ і поміщали для ізоелектричного осадження. Осади, зібрані центрифугуванням при 3000g протягом 20 хвилин, солюбілізували в розчині з 30% ацетонітрилу, що містить 0,1% ТФК. Розчин розбавляли таким же самим об'ємом очищеної води і наносили на колонку RESOURCE RPC (Pharmacia AB) ВЕЖХ із зверненою фазою, урівноваженою 25% ацетонітрилом, що містить 0,05% ТФК, і потім елюювали лінійним градієнтом 25 - 45% ацетонітрилу, що містить 0,05% ТФК. Елюат піддавали моніторингу на поглинання при 280нм. Фракції очищеного гомодимерного білка збирали і ліофілізували за допомогою концентратора SpeedVac (Servant Co.).

(5) Визначення фізико-хімічних властивостей очищеного білка даного винаходу

а) Аналіз N-кінцевої амінокислотної послідовності

Аналіз N-кінцевої амінокислотної послідовності для очищених білків виконували за допомогою секвенатора амінокислот Model 476A (Applied Biosystems Inc) для підтвердження амінокислотної послідовності від N- кінця до 30-ої амінокислоти, показаної в SEQ ID No 1 Списку послідовностей

б) Аналіз амінокислотної сполуки

Аналіз амінокислотної сполуки очищених білків, отриманих, як описано вище, виконували за допомогою секвенатора амінокислот (PICO TAG Systems, Waters) Результат показаний в Таблиці 1 Цифра, подана в Таблиці 1, вказує число амінокислотних залишків на мономерний білок

Таблиця 1		
Амінокислота	Фактичне число	Очікуване число
Asx	11,5	12
Glx	10,9	11
Ser	8,4	9
Gly	4,3	4
His	4,0	4
Arg	7,7	7
Thr	5,4	6
Ala	7,3	7
Pro	10,2	10
Tyr	2,9	3
Val	5,7	7
Met	5,1	4
1/2 Cys	2,6	7
Ile	4,9	6
Leu	10,0	10
Phe	4,0	4
Lys	-5,9	6
Typ	-	2
довжина послідовності		119
		:- не визначено

с) Аналіз за допомогою електрофорезу

Було підтверджено, що молекулярна маса очищених білків, отриманих як описано вище, дорівнює ≈28кДа при електрофорезі в ПААГ-ДСН при невідновлюючих умовах.

Із результатів, поданих вище в а), б) і с), видно, що білок даного винаходу містить 119 амінокислотних залишків і починається з N-кінцевого Pro.

Приклад 4. Визначення біологічних активностей

(1) Активність в ектопічному кісткоутворенні у мишей

Приблизно 500мкг гомодимерного білка, отриманого в Прикладі 3, розчиняли і розбавляли в 50мкл 10м соляної кислоти й одержували концентрації розчину 1мкг/10мкл, 10мкг/10мкл і 100мкг/10мкл. Десять мкл кожного розчину змішували з 150мкл розчину колагену типу-1 свинячого сухожилля (Koken, 0,5X, рН 3, 1-AC), нейтралізували, ліофілізували й отриману суміш імплантували в кишені, створені в м'язах стегна 8-тижневих

самців мишей ICR. На 21-й день від імплантації тварин вбивали і стегна вирізували. Після зняття шкіри стривальність кальцифікованих тканин оцінювали м'якою рентгенографією. Як показано в Таблиці 2, імплантація 1мкг або більш димерного білка індукувала кальцифіковану тканину у частині цієї групи мишей, а дози 10мкг і більш індукували кальцифіковану тканину у всіх використаних мишей.

Доза гомодимерного білка	Стривальність кальцифікованої тканини
Контроль (тільки колаген типу-1)	0/4
1мкг/ ділянка	3/4
10мкг/ ділянка	4/4
100мкг/ ділянка	4/4

Фіг.2 показує типові приклади м'яких рентгенограм кальцифікованої тканини, індукованої різноманітними дозами білка MP52. Фіг.2А, 2В і 2С показують приклади м'яких рентгенограм стегон мишей, імплантованих 1мкг/ділянка, 10мкг/ділянка і 100мкг/ділянка гомодимерного білка, відповідно. Ці рентгенограми показують, що гомодимерний білок індукував кальцифіковану тканину в стегні миші і збільшував її кількість в залежності від дози. Для перевірки, чи була утворена кальцифікована тканина хрящовою або кістковою тканиною, зрізи фіксованих стегон мишей, в які був імплантований гомодимерний білок в концентрації 10мкг/ділянка, забарвлювали von Kossa, алціановим синім або гематоксиліном-еозином.

Фіг.3 показує фотографії під світловим мікроскопом зрізів, забарвлених відповідними способами забарвлювання. На фіг.3А (забарвлювання von Kossa) зони, зазначені сt і сs, показують кальцифіковану тканину і кальцифіковані хондроцити, відповідно. На фіг.3В (забарвлювання алціановим синім) зони, зазначені гs, показують хрящову тканину, що залишилася. На фіг.3С (забарвлювання гематоксиліном-еозином) елементи, зазначені ad, bm, lb, ob і wb, являють собою адипоцит, клітини кісткового мозку, ламелярну кісткову тканину, остеобласти і переплетену кісткову тканину, відповідно. Таким чином, очевидно, що імплантація гомодимерного білка з колагеном типу-1 в стегна мишей індукує кальцифіковані хондроцити, остеобласти і клітини кісткового мозку в місцях імплантації.

Таким чином, було показано, що гомодимерний білок має активність в ектопічному утворенні хрящової і кісткової тканини.

#### (2) Аналіз тимчасового ходу ектопічного кісткоутворення у мишей

Димерний білок (3мкг), отриманий в Прикладі 3, змішували з розчином колагену типу-1 і нейтралізували, як описано в Прикладі 4 (1), і ліофілізовані матеріали імплантували в стегна самця миші ICR. На 3-й, 7-й, 10-й, 14-й, 21-й і 28-й дні від імплантації стегна вирізували і фіксували в 10% формаліні і потім зрізи забарвлювали гематоксиліном-еозином або von Kossa. Фіг.4 показує фотографії під світловим мікроскопом забарвлених зрізів.

На 3-й день (фіг.4А, забарвлювання гематоксиліном-еозином) недиференційовані мезенхімальні клітини (мс), в тому числі морфологічно волокнисті сполучнотканинні клітини, з'явилися в просторі між імплантованими волокнами колагену (сo) і м'язовими клітинами (m). Між 7-им і 10-им днями (фіг.4В і 4С, відповідно, забарвлювання гематоксиліном-еозином) цей простір заповнювався недиференційованими мезенхімальними клітинами (мс), і ці клітини були гіпертрофованими і диференціювалися в передхрящову тканину. На 14-й день (фіг.4D, забарвлювання гематоксиліном-еозином і фіг.4Е, забарвлювання von Kossa) спостерігали кальцифіковану хрящову тканину (ос) і кісткову тканину (b). На 21-й день (фіг.4D, забарвлювання гематоксиліном-еозином і фіг.4Е, забарвлювання von Kossa) кальцифіковану хрящову тканину не спостерігали взагалі, і тканина, що спостерігалася на 14-ий день, очевидно, замінялася кісткою (b) із кістковим мозком (bm). На 20-ий день (фіг.4Н, забарвлювання гематоксиліном-еозином) була велика кількість клітин кісткового мозку й утворена кістка, очевидно, знаходилася в стані процесу резорбції.

Таким чином, очевидно, що гомодимерний білок індукує ендохрящову осифікацію (окостеніння) через утворення хрящової тканини в ектопічних ділянках, як повідомлялося з використанням інших BMP.

#### (3) Дія на внутрішньомембранну осифікацію

Гомодимерний білок, отриманий в Прикладі 3, розчиняли в забуференому фосфатом сольовому розчині (рН 3,4), що містить 0,01% людський сироватковий альбумін, і готували концентрації розчинів 0,01мкг/20мкл, 0,1мкг/20мкл і 1мкг/20мкл. Аліквоту 20мкл кожного розчину вводили 12 разів один раз в день на періюсті (окісті) тім'яної кістки новонародженого пацюка за допомогою мікрошприца з 1-го дня після народження. Такий же об'єм носія вводили на протилежній стороні тім'яної кістки кожного пацюка. Той же об'єм носія вводили також на обох сторонах тім'яних кісток контрольних пацюків. На 1-ий день від фінальної ін'єкції пацюків вбивали й обидві сторони тім'яних кісток вирізували і фіксували і потім готували зрізи з віддаленою вапняною речовиною, забарвлені гематоксиліном-еозином, для виміру товщини тім'яних кісток в ін'єкційованих ділянках на фотографіях під світловим мікроскопом. Розраховували відношення товщини тім'яних кісток кожного пацюка в ін'єкційованій гомодимерним білком/ін'єкційованій носієм ділянці. Як показано в Таблиці 3, гомодимерний білок збільшував товщину тім'яної кістки в залежності від дози. Типовий приклад мікрофотографій зрізу при ділянці, ін'єкційованої 0,1мкг гомодимерного білка, показаний на фіг.5В в порівнянні з мікрофотографією протилежної сторони ін'єкційованої носієм ділянки (фіг.5А). Ін'єкція гомодимерного білка індукувала активацію і проліферацію клітин періюсту (p) і в тім'яній кістці і на тім'яній кістці спостерігалися активовані остеобласти (b). Ці результати показують, що гомодимерний білок стимулював внутрішньомембранну осифікацію при місцевому введенні, і що гомодимерний білок є корисним для терапії остеопорозу, перелому кісток і дефектів альвеолярного відростка щелепи і періодонтальних дефектів.

Доза гомодимерного білка (мкг/ ділянка/ день)	Товщина тім'яної кістки (мкм)		Відношення (В/А)
	0 (носій)	128 ± 7	
0,01	134 ± 9	161 ± 30	1,27 ± 0,33
0,1	119 ± 19	190 ± 29	1,60 ± 0,10*
1	13 ± 9	225 ± 25	1,70 ± 0,14**

Розміри являють собою середні ± середнє квадратичне відхилення (SD), \* p < 0,05, \*\* p < 0,01 в порівнянні з відношенням групи, в якій носій вводили в обидві сторони (тест Віл'ямса)

(4) Дія на регенерацію суглобного хряща

Для цього дослідження використовували шість 12-тижневих самців новозеландських білих кроликів. Шкіру і суглобну капсулу правого коліна розрізали і створювали кістково-хрящовий дефект товщиною 5 × 5мм в канавці надколінної чашечки за допомогою стоматологічного бора таким чином, щоб не ушкодити навколишнє її сухожилля. Дефекти заповнювали або тампоном із ліофілізованого колагену типу-1, або таким тампоном, що містить 10мкг гомодимерного білка, отриманого, як описано в Прикладі 4 (1), і потім розріз суглобної капсули і шкіри зашивали. Через 3 тижні після цієї операції кроликів умертвляли і стеговні голівки вирізали і фіксували в 10% формаліні і потім зрізи з віддаленою вапняною речовиною забарвлювали алціановим синім. Типові приклади фотографій під світловим мікроскопом цих зрізів показані на фіг.6. Оброблені димерним білком дефекти (фіг.6С і 6D) показали регенерацію хондроцитів (ch) із екстрацелюлярними матриксами, які забарвлювали інтенсивно алціановим синім, в порівнянні з контрольними дефектами, імплантованими тампоном із колагену типу-1, які були заповнені волокнистою тканиною (f). Хрящова тканина, індукована димерним білком, виявила зональну структуру, що включає в себе спочиваючі хондроцити, хондроцити, що ростуть, і гіпертрофовані хондроцити, подібну структурі нормальної суглобної хрящової тканини. Хондроіндукування білком MP52 спостерігали в дефектах усіх використаних кроликів (n = 3). Ці результати вказують на те, що цей димерний білок ефективний в репарації ушкодженої хрящової тканини у пацієнтів, таких як хворі остеопорозом.

(5) Дія на загоєння перелому і дефекти кісток

Для цього дослідження використовували тридцять пацюків Sprague-Dawley (у віці приблизно 15 тижнів). З застосуванням латерального підходу до стеговної кістки всю м'язову і надкісткову тканину знімали з діафіза. Створювали дефект у вигляді сегмента 5мм в середній частині правої стрижнеподібної структури стеговної кістки за допомогою бора і потім фіксували спеціально виготовлену поліетиленову платівку гвинтами з нержавіючої сталі уздовж кортикального шару стегна. Готували тампони з колагену типу-1, що містять 0, 1, 10 і 100мкг гомодимерного білка, як описано в Прикладі 4 (1), і імплантували їх у сегментні дефекти кістки і потім рану зашивали. Відразу ж після операції і через 12 тижнів після її ці дефекти оцінювали за допомогою м'якої рентгенографії. Як показано на фіг.7, 10мкг/ділянка і 100мкг/ділянка гомодимерного білка стимулювали утворення калюсу (cs) в дефектах і створили кісткові зрощення, але дія при 1мкг/ділянка не була ясною в порівнянні з контрольним, імплантованим колагеном, дефектом, де спостерігали тільки крайове ендостальне кісткоутворення. Через 12 тижнів після операції пацюків умертвляли і стеговну кістку з дефектом вирізали і вимірювали мінеральний вміст кісток (накопичений мінеральний вміст відповідно до трьох (в середньому) скануванням у дефекті) за допомогою абсорбціометрії з використанням рентгенівських променів із подвійною енергією (dual energy X-ray) (Aloka, Model DCS-600) в режимі із шириною сканування 1мм після видалення поліетиленової платівки. Обидва кінці стеговної кістки фіксували смолою, потім вимірювали максимальну межу міцності при крутінні для порушення зрощення зразків за допомогою системи для натягу кісток (Malto, model MZ-500d) при швидкості скручування 180°/хв. (Таблиця 4). Таблиця показує, що гомодимерний білок збільшує як мінеральний вміст кісток, так і міцність кісток при дефекті стеговної кістки пацюка, в якій був імплантований цей білок, і свідчить про ефективність даного білка для загоєння перелому і відновлення кістки даного дефекту.

Доза гомодимерного білка (мкг/ ділянка)	Мінеральний вміст у дефекті стегна пацюка (мг)	Максимальна межа тривкості при крутінні (кгс · см)	Число
Тільки колаген	120,2 ± 4,5	2,92 ± 0,09	6
1	176,9 ± 36,4	6,24 ± 1,00	8
10	277,4 ± 63,9	9,35 ± 3,14	8
100	374,8 ± 67,1*	40,34 ± 7,64*	8

Розміри являють собою середні ±SE (стандартна помилка), \* p < 0,05 в порівнянні з групою з одним колагеном (t - тест Ст'юдента),

З результатів Приклада 4 було виявлено, що гомодимерний білок даного винаходу має хрящову і кісткову морфогенетичну активність.

Білок, що складається з гомодимера білка, що має амінокислотну послідовність SEQ ID No 1 Списку послідовностей, має хрящову і кісткову морфогенетичну активність і застосовний у вигляді фармацевтичної композиції для лікування захворювань хрящів і кісток. Крім того, білок даного винаходу може бути отриманий в промисловому масштабі і в чистому вигляді за допомогою способу генної інженерії шляхом культивування E. coli, трансформованої з більшою кількістю копій експресуючим вектором для даного білка.

Список послідовностей

SEO ID № 1

Довжина послідовності: 119

Тип послідовності: амінокислота

Топологія: лінійна

Тип молекули: пептид

Тип фрагмента: N-кінцевий фрагмент

Вихідне джерело

Організм: Homo sapiens

Назва тканини: плід

Ознаки:

Інша інформація: від 383 до 501 амінокислотна послідовність амінокислотної послідовності MP52

Опис послідовності: SEQ ID № 1:

15 CCA CTG GCC ACT CCG CAG GGC AAG CGA CCC AGC AAG AAC CTT AAG GCT 48

20 Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala

5 10 15

20 CGC TGC AGT CCG AAG GCA CTG CAT GTC AAC TTC AAG GAC ATG GGC TGG 96

25 Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp

20 25 30

30 GAC GAC TGG ATC ATC GCA CCC CTT GAG TAC GAG GCT TTC CAC TGC GAG 144

30 Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu

35 40 45

35 GGG CTG TGC GAG TTC CCA TTG CGC TCC CAC CTG GAG CCC ACG AAT CAT 192

35 Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn His

50 55 60

40 GCA GTC ATC CAG ACC CTG ATG AAC TCC ATG GAC CCC GAG TCC ACA CCA 240

40 Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro

65 70 75 80

45 CCC ACC TGC TGT GTG CCC ACG CGA CTG AGT CCC ATC AGC ATC CTC TTC 288

45 Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe

85 90 95

50 ATT GAC TCT GCC AAC AAC GTG GTG TAT AAG CAG TAT GAG GAC ATG GTC 336

50 Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val

5 100 105 110

55 GTG GAG TCG TGT GGC TGC AGG 357

10 Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg

115

60 SEQ ID № 2

Довжина послідовності: 27

Тип послідовності: нуклеїнова кислота

Кількість ланцюгів: одна

Топологія: лінійна

65 Тип молекули: інша нуклеїнова кислота

Вихідне джерело: немає

U A 4 6 7 6 7 C 2

C 2 4 6 7 6 7 U A

Організм: немає  
Штам: немає  
Ознаки: Зворотний (upstream) праймер ПЛР MP52 зрілого типу  
Опис послідовності: SEQ ID № 2:

5

ATTAATGCCAC TAGCAACTCG TCAGGGC

27

SEO ID № 3

10

Довжина послідовності: 26  
Тип послідовності: нуклеїнова кислота  
Кількість ланцюгів: одна  
Топологія: лінійна

15

Тип молекули: інша нуклеїнова кислота  
Вихідне джерело: немає  
Організм: немає  
Назва тканини: немає  
Ознаки:  
Інша інформація: Прямий (downstream) праймер ПЛР MP52 зрілого типу  
Опис послідовності: SEQ ID № 3:

20

CGTCCACTAC CTGCAGCCAC ACGACT

25

Стисле пояснення мадлюнків

25

Фіг.1 показує плазмідну карту експресуючого вектора (pKOT245) для білка даного винаходу, отриманого згідно з Прикладом 1 (2).

Фіг.2 показує м'яку рентгенограму кальцифікованої тканини, індукованої в стегні у миші в Прикладі 4(1).

Фіг.3 показує фотографію в світловому мікроскопі забарвленої кальцифікованої тканини в стегні у миші в Прикладі 4(1).

30

Фіг.4 показує фотографію в світловому мікроскопі забарвленої кальцифікованої тканини в стегні у миші з часом у Прикладі 4 (2).

Фіг.5 показує фотографію в світловому мікроскопі забарвленої тім'яної кістки пацюка в Прикладі 4 (3).

Фіг.6 показує фотографію в світловому мікроскопі дефектів забарвленого суглобного хряща в голівці стегна кролика в Прикладі 4 (4).

35

Фіг.7 показує м'яку рентгенограму кісткоутворення в кісткових дефектах стегнових кісток пацюків в Прикладі 5 (5).

### Формула винаходу

40

1 Білок, що має амінокислотну послідовність:

Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser Arg 20  
Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu 40  
Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu 60  
Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr Pro 80  
Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser Ala 100  
Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg .

45

50

2 Білок за п 1, який відрізняється тим, що він є гомодимерним.

55

3 Фармацевтична композиція для лікування захворювань хрящів і кісток, яка відрізняється тим, що містить терапевтично ефективну кількість білка за п. 2 і фармацевтичний носій.

4 Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток являє собою остеопороз.

60

5 Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток являє собою остеоартрит або епіфізарний остеомиєліт.

6 Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток являють собою перелом кістки або дефект кістки.

7 Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток являють собою корінцеві та/або альвеолярні дефекти.

65

8 Спосіб отримання білка за п. 1, що включає в себе культивування клітин E. coli, трансформованих плазмідною, що містить ДНК, що кодує білок:

Met Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser 20  
Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro 40  
Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu 60

Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr 80  
Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser 100

Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg .

9. Спосіб отримання гомодимерного білка за п. 2, що передбачає стадії: конструювання плазміди, що містить ДНК, що кодує амінокислотну послідовність:

Met Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys Ala Arg Cys Ser 20

Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro 40

Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu 60

Glu Pro Thr Asn His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr 80

Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu Phe Ile Asp Ser 100

Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg .

введення цієї плазміди в E. coli шляхом трансформації, солюбілізації тіл включення, отриманих шляхом культивування цієї E. coli очищення мономерного білка з солюбілізованого розчину, повторного укладання мономерного білка в димерний білок і його очищення.

10. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток, що передбачає введення людині фармацевтичної композиції, що містить як активний інгредієнт ефективну кількість гомодимерного білка за п. 2.

11. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток за п. 10, який відрізняється тим, що захворювання являє собою остеопороз.

12. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток за п. 10, який відрізняється тим, що захворювання являє собою остеоартрит або епіфізарний остеомієліт.

13. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток за п. 10, який відрізняється тим, що захворювання являють собою перелом кістки або дефект кістки.

14. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток за п. 10, який відрізняється тим, що захворювання являють собою корінцеві та/або альвеолярні дефекти.

15. Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток є дефектами і ушкодженнями хряща, такими як, ушкодження суглобового меніска.

16. Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що захворювання хрящів і кісток є уродженими захворюваннями, такими як хондродисплазія, хондрогіпоплазія, ахондрогенез, щілина піднебіння і остеодисплазія.

17. Фармацевтична композиція за п. 3, яка відрізняється тим, що використовується для системного або місцевого введення.

18. Фармацевтична композиція за п. 17, яка відрізняється тим, що введення здійснюють в формі ін'єкційного препарату.

19. Спосіб лікування захворювань хрящів і кісток за п. 10, який відрізняється тим, що трансплантація кістки або трансплантація хряща, або індукція нового хряща чи кістки є бажаним.

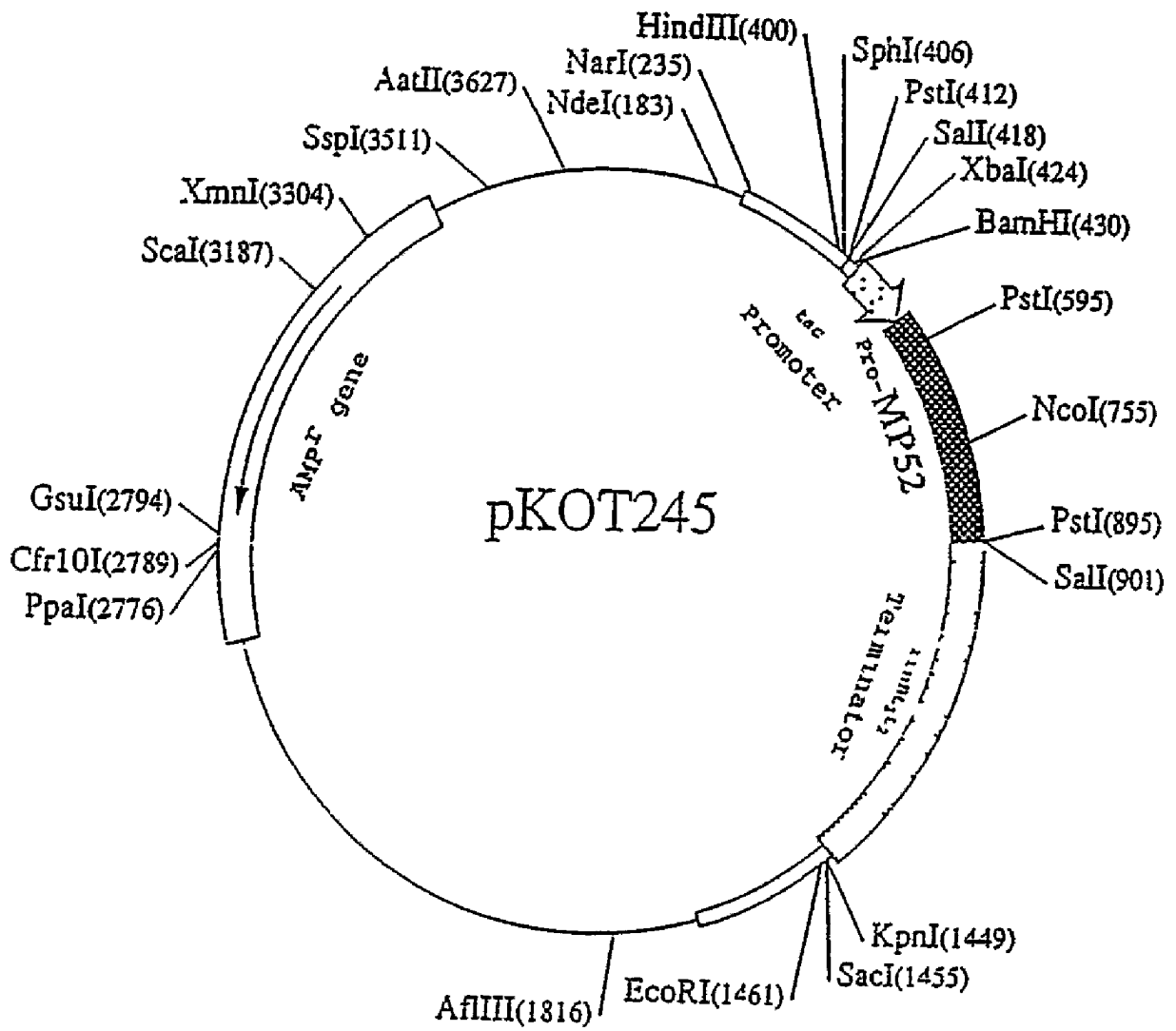


Fig. 1

U A 4 6 7 6 7 C 2

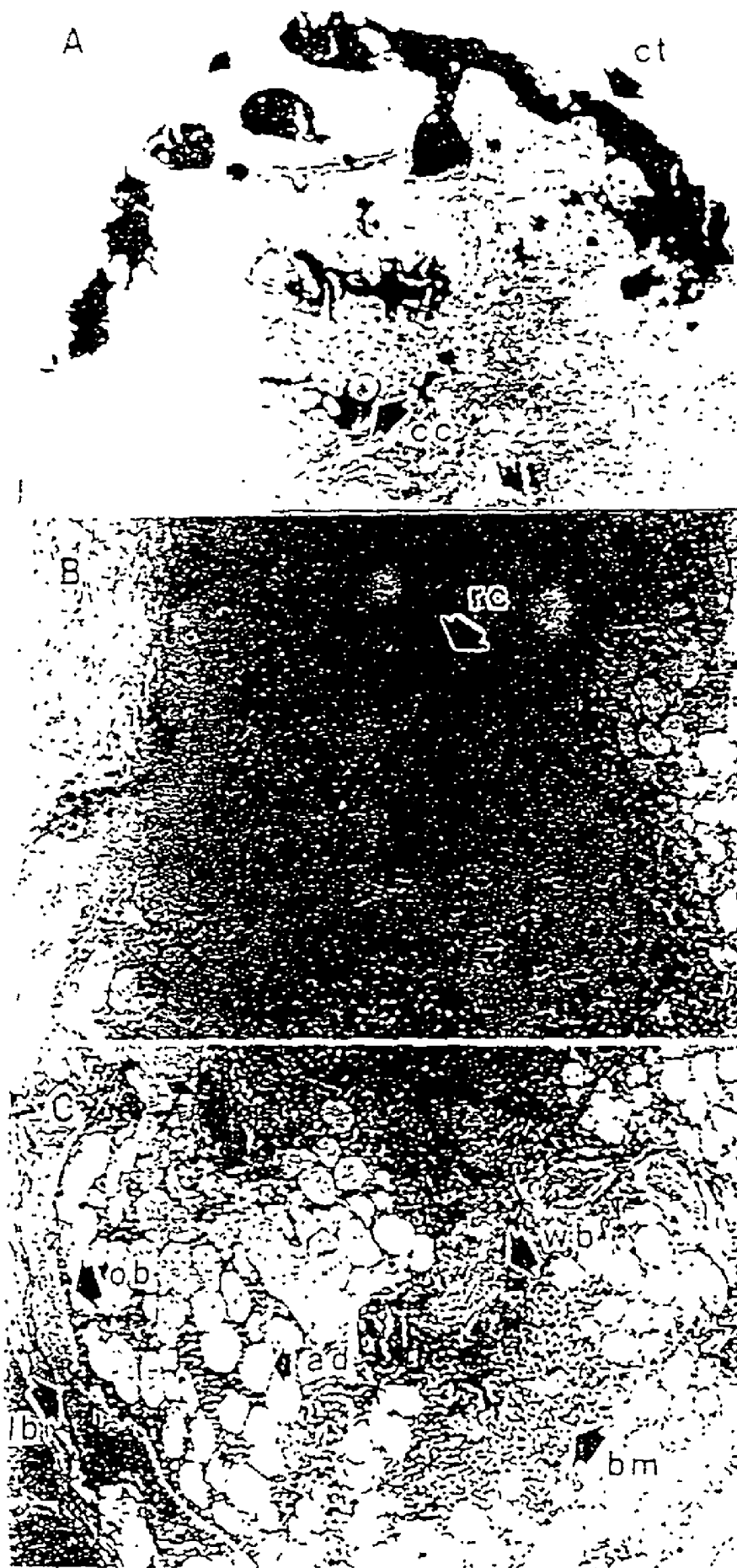
U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2



Fig. 2

U A 4 6 7 6 7 C 2



Фиг. 3

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2

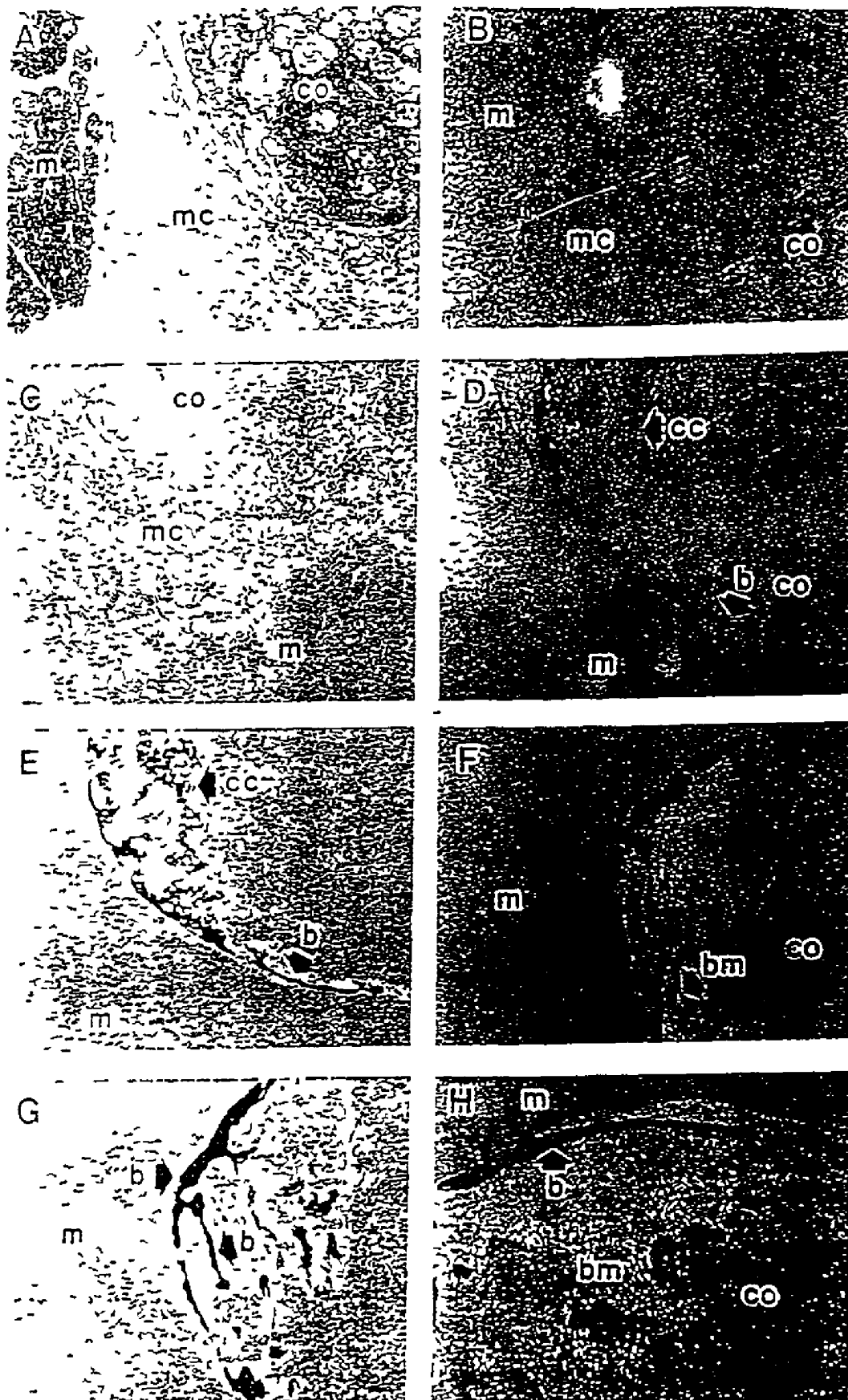
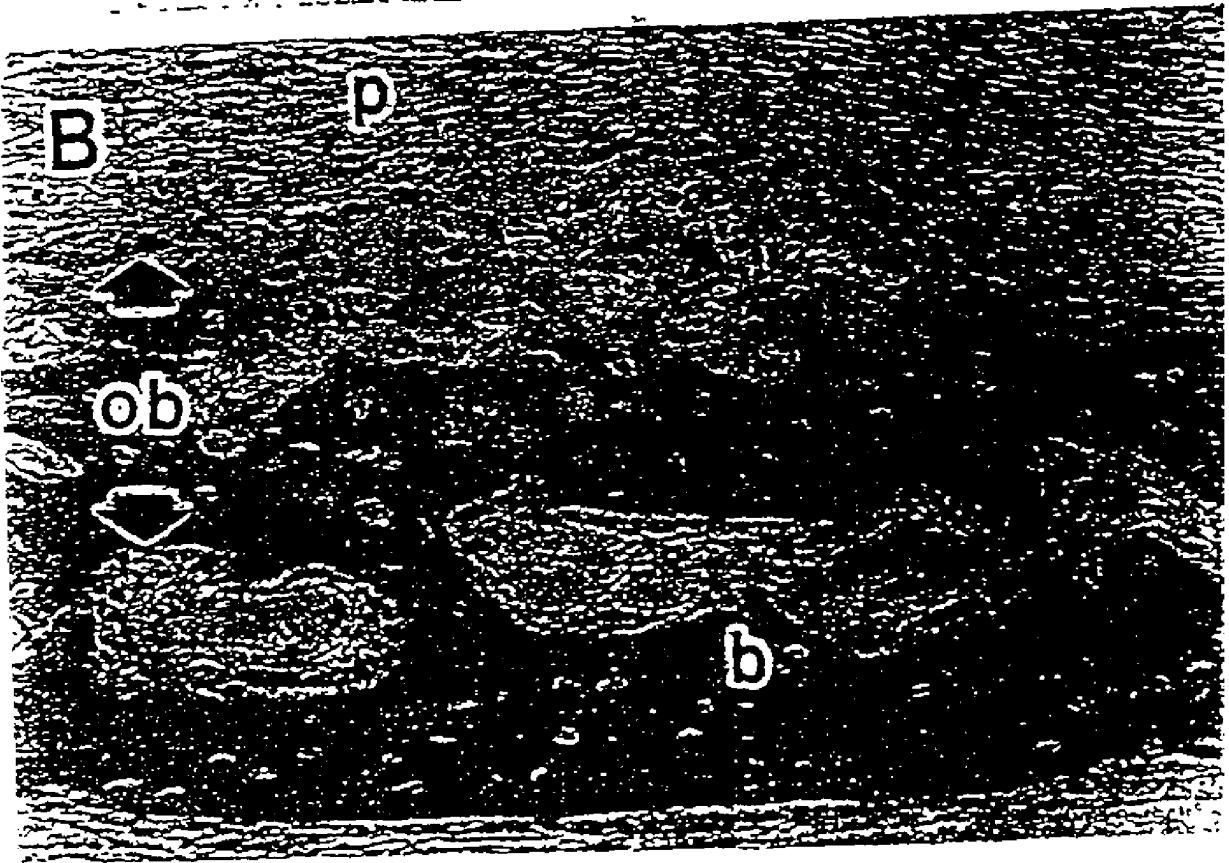
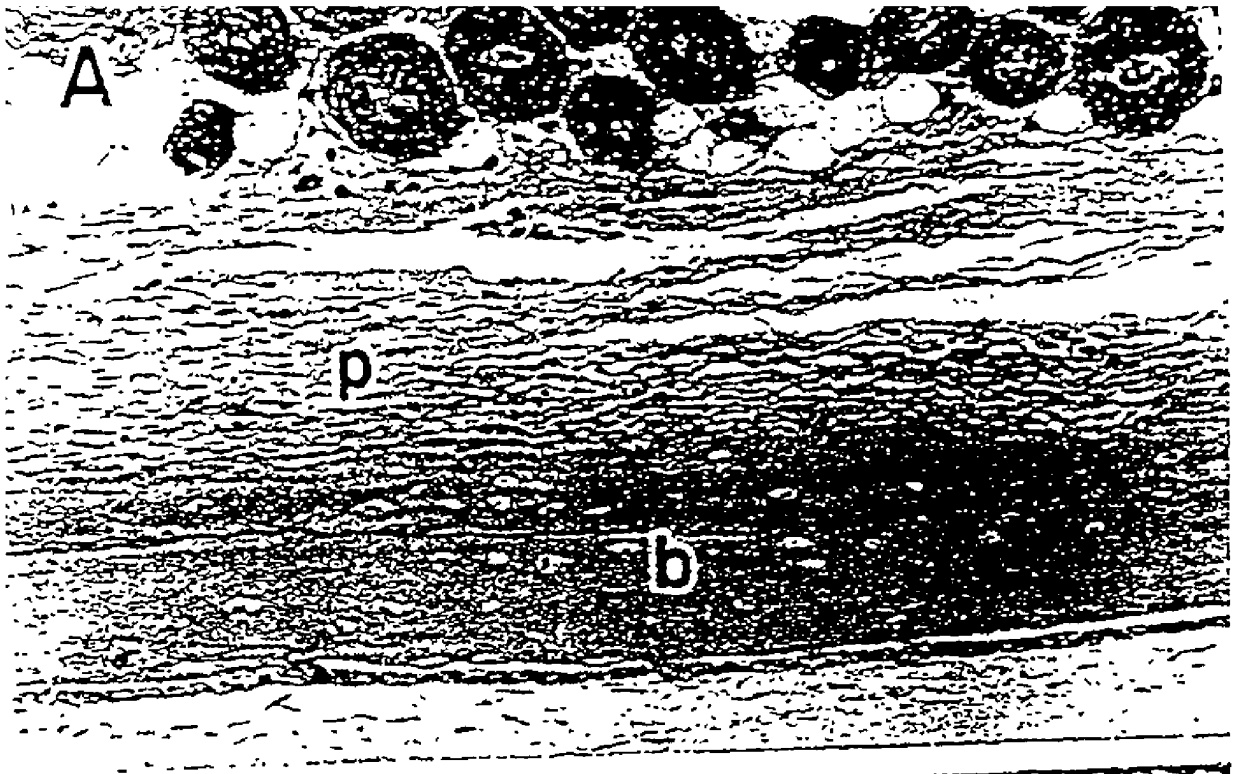


Fig. 4



U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2

Fig. 5

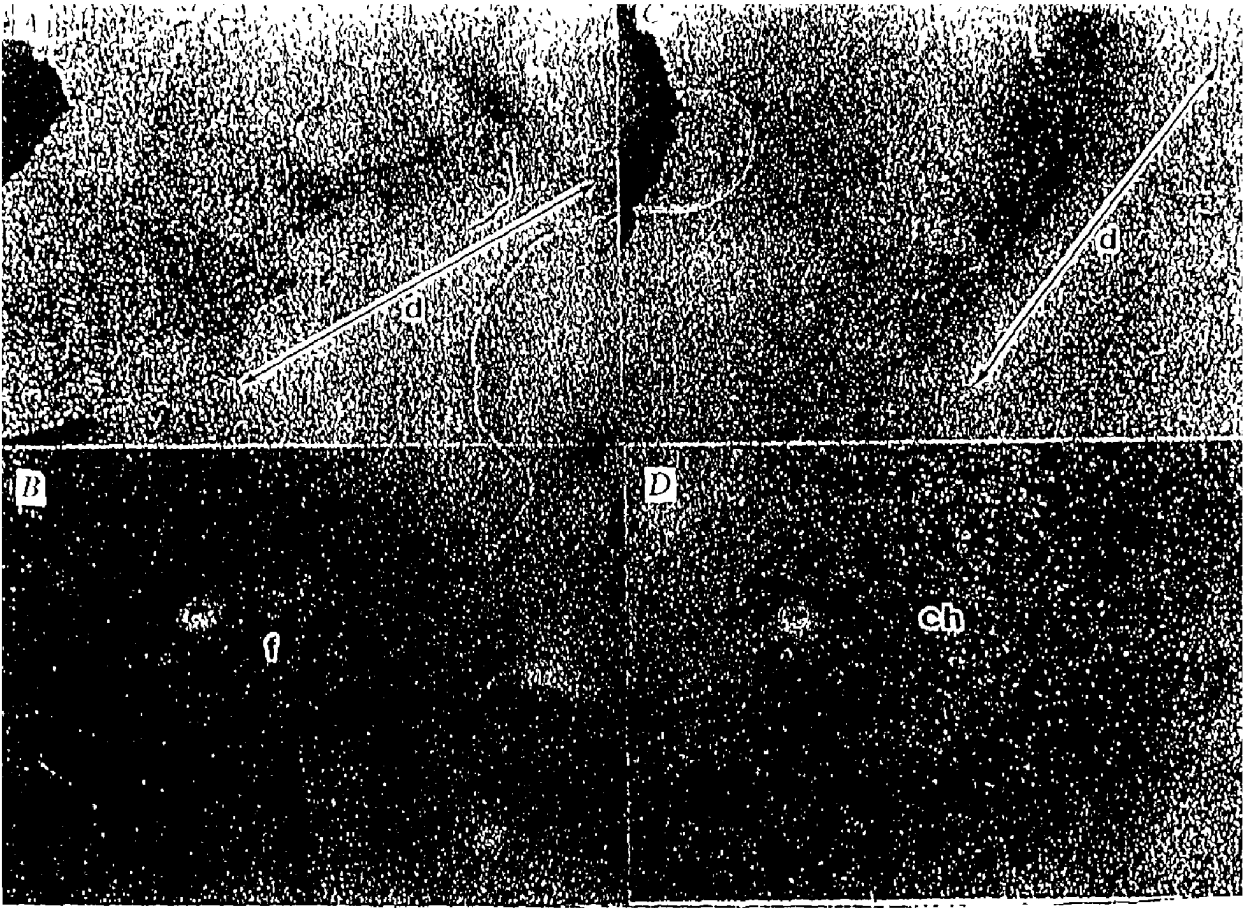
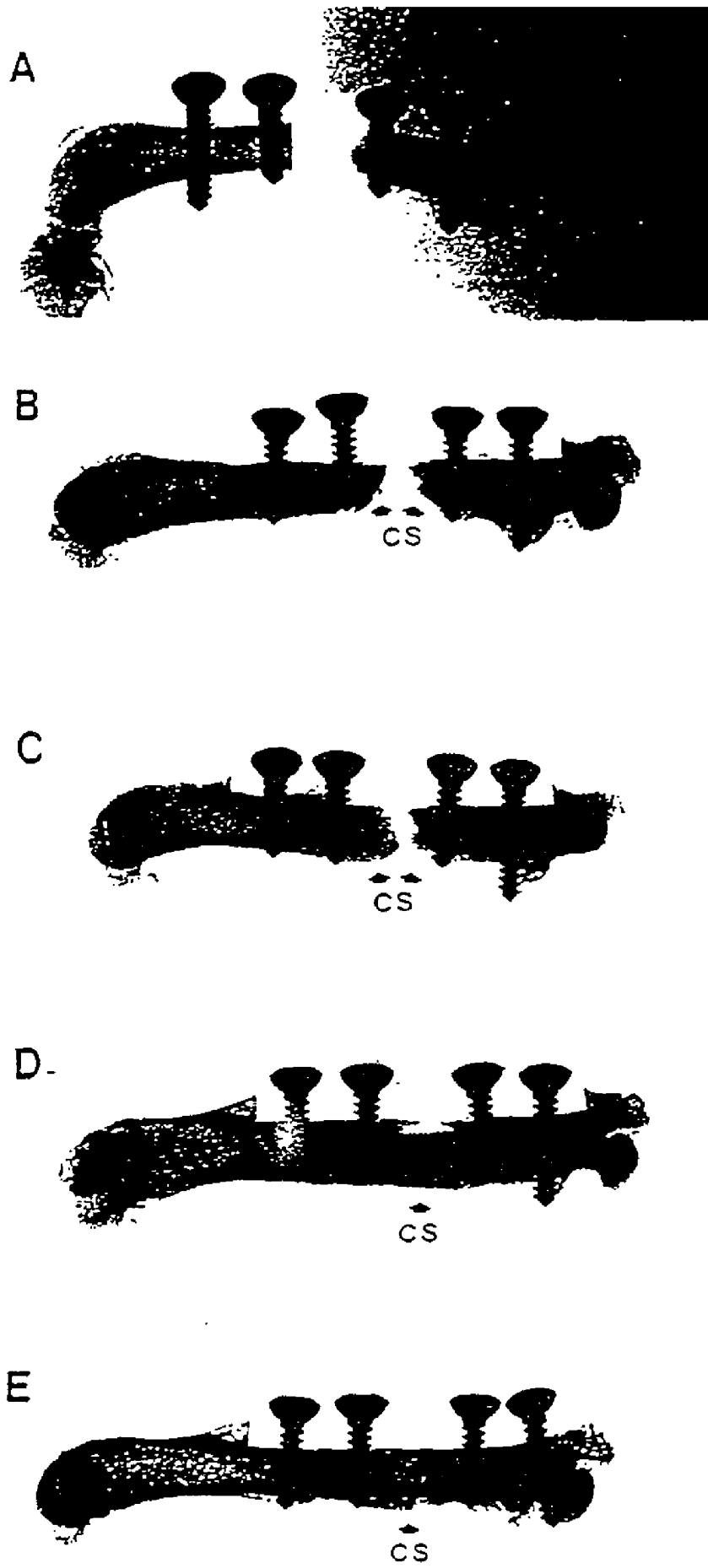


Fig. 6

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2



U A 4 6 7 6 7 C 2

Fig. 7

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2002, N 6, 15.06.2002. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.

U A 4 6 7 6 7 C 2

U A 4 6 7 6 7 C 2