

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.08.04

(21) Номер заявки
201892322

(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) **16165106.2**

(32) **2016.04.13**

(33) **EP**

(43) **2019.05.31**

(86) **PCT/EP2017/057720**

(87) **WO 2017/178253 2017.10.19**

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

(72) Изобретатель:
**Велтинг Тим Йоханнес Мария, Карон
Марьольейн 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

WO-A2-2011163398

(57) Настоящее 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 состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или ее аналога, причем аналог представляет собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности согласно формуле 1 (SEQ ID NO: 29) или ее фрагмента, причем фрагмент состоит по меньшей мере из 10 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности согласно формуле 1.

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 в течение лет. 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, триамцинолонацетонид), 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 млн человек, а в Соединенных Штатах поражены примерно 27 млн 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 уравнивается 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 протеогликанов 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 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

окостенения. 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). Также происходят повреждения костного мозга как результат остеоартритных изменений в субхондральной кости. 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 агреканызы (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, полученному из полноразмерного человеческого белка, называемого костным морфогенетическим белком-7 (BMP-7), для применения при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита. Конкретнее, изобретение относится к пептиду для применения при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или ее аналога, причем аналог состоит из аминокислотной последовательности согласно формуле 1 или ее фрагмента, состоящего по меньшей мере из 10 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности согласно формуле 1.

Формула 1

P K P S S X1 **P** X2 X3 **L** X4 X5 **I** X6 **V** X7 X8 X9 **D** X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16

X17 X18 X19 X20 X21 **M V V** X22 X23 **S G S** X24 (SEQ ID NO: 29),

в которой

X1 = A или V,

X2 = T, или D, или E,

X3 = Q, или D, или K, или S,

X4 = N, или D, или E, или H,

X5 = A, или D, или S,

X6 = S, или I, или L, или M, или F, или Y, или E, или H, или K, или Q, или R, или D,

X7 = L, или E, или K, или T, или M, или R,

X8 = Y, или A, или D, или E, или H, или K, или S, или T,

X9 = F, или H, или A, или D, или E, или K, или Q, или R, или Y,

X10 = D, или I, или L, или E, или N, или S, или T,

X11 = S, или D, или E, или N, или R,

X12 = S, или D, или E, или K, или N, или T,

X13 = N, или E, или Q, или R,

X14 = V, или A, или D, или N, или R, или T, или M, или Y, или H,

X15 = I, или A, или D, или E, или K, или N, или Q, или R, или S, или T, или V,

X16 = L, или A, или E, или K, или Q,

X17 = K, или D, или E, или G, или Q, или R, или W,

X18 = K, или A, или D, или E, или H, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или V, или M,

X19 = Y, или D, или E, или H, или K, или Q, или I, или R,

X20 = R, или D, или E, или K, или N, или S,

X21 = N или D,

X22 = R, или E, или S, или D, или K, или Q, или L,

X23 = A, или E, или D, или S,

X24 = H или R.

При этом X [#] обозначает позицию аминокислоты в человеческом белке BMP-7, которая изменяется.

Подробное описание изобретения

Остеоартритные хондроциты показывают типичный фенотип, который характеризуется пониженной экспрессией хондрогенных генов SOX9, COL2A1, ACAN и VAPX1/NKX3.2, повышенной экспрессией генов гипертрофной зоны RUNX2, COL10A1, ALP, повышенной экспрессией генов, кодирующих разрушающие хрящевой матрикс ферменты MMP13, ADAMTS5, и генов системы воспаления COX-2 и IL-6 (фиг. 1). Мы показали, 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 [22, 23], направленные на модифицирующие заболевание свойства BMP-7, показывают, что он снижает экспрессию MMP13 в хондроцитах под воздействием IL-1 β , стимулирует синтез протеогликанов в ОА хондроцитах, противодействует воспалительным цитокинам (например, IL-1 β) и вызывает анаболическую реакцию в здоровых хондроцитах. Внутрисуставное введение BMP-7 защищает от развития ОА и задерживает развитие ОА у крыс. Завершена фаза-1 клинических испытаний на больных ОА, 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 (ОА) хондроцитов (фиг. 1).

Несмотря на такие многообещающие результаты, внутрисуставное применение полноразмерного рекомбинантного человеческого BMP-7 для лечения ОА может быть неподходящим для клинического применения. Препреклиническое 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 систему 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 ОА, 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 ОА авторы изобретения нашли молекулярные миметики для BMP-7, которые более совместимы с жесткой окружающей средой ОА 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 SEQ ID NO: 27, табл. 3). Результаты подтвердили более ранние выводы [20, 21], что ни один из пептидов не имитирует потенциал BMP-7 по "спасению" фенотипа ОА. Подробнее, все пептиды, представленные в табл. 1, проверили на экспрессию генов IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP, VAPX1/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, 32] и BMP-7 [21, 31].

Однако неожиданно оказалось, что, когда авторы изобретения синтезировали перекрывающиеся 20-мерные пептиды из участка, который составляют аминокислоты 93-139 (SEQ ID NO: 1) зрелого человеческого BMP-7, и заменили цистеиновые остатки в этом участке на сериновые остатки (SEQ ID NO: 28, табл. 3), обнаружилось, что пептиды из участка, образованного аминокислотами 100-139, активны как прехондрогенные и противовоспалительные агенты. Отбор пептидов из этого участка ранее идентифицировал их как остеогенные агенты, применимые для индукции образования кости [31]. Этот участок из аминокислот 100-139 человеческого полипептида BMP-7 далее в настоящем описании называется "участком В".

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

Подробнее пептиды, приведенные в табл. 2, проверяли при экспрессии генов IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP, VAPX1/NKX3.2 и RUNX2. Авторы изобретения, к своему большому удивлению, обнаружили, что пептиды с аминокислотной последовательностью, соответствующей аминокислотам 100-139 BMP-7 или ее фрагментам, напоминают искомую активность, имитирующую BMP-7. Это означает, что они вызывают прохондрогенную и провоспалительную реакцию. Это неожиданно, так как до сих пор описаны только проминерализующие и проостеогенные пептиды из BMP-2 [20] и BMP-7 [21].

Таблица 3. Аминокислотная последовательность зрелого BMP-7.
Цистеиновые и сериновые остатки подчеркнуты

Название	Аминокислотная последовательность			SEQ ID NO:
Зрелый BMP-7	STGSKQ R SQN	RSKTPKNQEA	LRMANVAENS	27
	SSDQRQA C KK	HELYVSFRDL	GWQDWI A PE	
	G Y AA Y Y C EGE	C AFPLNSYMN	ATNHAI V QTL	
	VHFINPETVP	K P CC A PTQLN	AISVLYFD D S	
	SNVILKKYRN	M V VR A CG C H		
Зрелый BMP-7 с цистеином, замененным на серин	STGSKQ R SQN	RSKTPKNQEA	LRMANVAENS	28
	SSDQRQA S KK	HELYVSFRDL	GWQDWI A PE	
	G Y AA Y Y S EGE	S AFPLNSYMN	ATNHAI V QTL	
	VHFINPETVP	K P SS A PTQLN	AISVLYFD D S	
	SNVILKKYRN	M V VR A SG S H		

Последовательные и перекрывающиеся пептиды из участка В вызывают значительно пониженную экспрессию IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP и RUNX2 (с примечанием "+" в табл. 2), а также повышенную экспрессию хондрогенного маркера BAPX1/NKX3.2 (с примечанием "+" в табл. 2) в хондроцитах ОА сустава (табл. 2).

Так как ранее показано, что 10-мерные пептиды из этого участка являются активными в повышении пролиферации остеобластов и промотировании осаждения кальция в остеобластах [21], можно без риска предположить, что пептиды из этого участка также будут применимы в настоящем изобретении. В другом воплощении изобретения пептиды предпочтительно будут длиннее, например, длиной в 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 или более аминокислот. Также можно использовать более длинные пептиды, такие как пептиды длиной больше 21 аминокислоты, такой как более 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 или более 38, например 39 или 40 аминокислот.

Таким образом, в одном аспекте изобретение относится к пептиду для применения при лечении, ослаблении или предупреждении остеоартрита, причем пептид включает аминокислотную последовательность из по меньшей мере 10 последовательных аминокислот, выбранных из последовательности согласно SEQ ID NO: 18. Это следует из результатов, приведенных в табл. 2.

Эксперименты авторов изобретения показали, что пептид имеет максимальную длину 40 аминокислот или около этого. Пептид для применения согласно изобретению предпочтительно полностью содержится в С-концевых 40 аминокислотах BMP-7 (SEQ ID NO: 18). Каждый пептид, который имел дополнительную N-концевую аминокислоту позиции 100 (N-конец SEQ ID NO: 18), терял свою активность в анализах, используемых в настоящем описании (табл. 2, см. примеры пептидов с аминокислотной последовательностью согласно SEQ ID NO: 2, 3, 4 и 5).

Конечно, настоящее описание не следует интерпретировать как узкое, в котором отсутствуют вариации, допускаемые в пептидах для применения в изобретении, как описано выше. 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" или "аналоги", используемый в настоящем описании, относится к пептидам, которые сохраняют свою активность, но различаются в отношении их аминокислотных последовательностей. Гомологи или аналоги могут быть идентичны с последовательностями согласно SEQ ID NO: 18 или ее фрагментами 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 у последовательностей (т.е. % идентичности = число идентичных позиций, деленное на общее число позиций $\times 100$), исключая пропуски, которые необходимо вводить для оптимального выравнивания двух последовательностей, и вставки. 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_LO C=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 предотвращения 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 ОА хондроцитов.

Вместе с тем мы определили локацию и природу супрессивного действия BMP-7 на фенотип ОА, 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 В при скрининге вызывают схожие кратные различия величины экспрессии генов, в то время как контрольный пептид с аминокислотной последовательностью SFILKKVLYDRVNSANIYS (SEQ ID NO: 49) не вызывает.

BMP-7 обладает уникальным действием подавления фенотипа ОА 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 авторы изобретения предполагают, что BMP-7 включает двойную активность, которая зависит от концентрации BMP-7.

Неожиданно и в отличие от полноразмерного полипептида BMP-7, 20-мерные пептиды согласно SEQ ID NO: 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 и 17 эффективно подавляют фенотип ОА хондроцитов, независимо от испытываемой концентрации (проверяют концентрации 1000, 100, 10 и 1 нМ). При этом авторы изобретения неожиданно идентифицировали участок, включающий благоприятную подавляющую фенотип ОА 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 хондроциты ОА подвергались воздействию отдельных пептидов, подавляющее действие на фенотип ОА пептидов-кандидатов было весьма эффективным, когда пептиды добавляли в культуры хондроцитов ОА через день до дня 10. Удивительно, что в культурах подавляющее действие на фенотип ОА 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 терапевтического применения при ОА.

Кроме действия пептидов для применения по изобретению на ОА, хондроциты 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 хондроцита (ATDC5) четко снижается экспрессия маркеров гипертрофии и минерализации, в то время как экспрессия агрекана (маркер здоровых хондроцитов) и экспрессия VAPX1/NKX3.2 (антигипертрофический фактор) возрастает даже дополнительно при непрерывном воздействии пептидов для применения согласно изобретению.

Все вместе пептиды для применения согласно изобретению уменьшают фенотип хондроцитов ОА по типу воспаления, хотя в то же время поддерживают прохондрогенное действие на хондроциты ОА и здоровые хондроциты. В отличие от полноразмерного зрелого белка BMP-7 пептиды 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 лидерными последовательностями. Это достижимо для специалистов, и требует теперь только обычных методик, которые идентифицируют участок В как активный участок для анаболической активности BMP-7.

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

L-Пептид имеет три аналогичные последовательности, построенные из L- и D-аминокислот: D-энантиомер или инверсо-пептид с одинаковой последовательностью, но состоящие из D-аминокислот и зеркальной конформации; ретро-пептид, состоящий из такой же последовательности L-аминокислот, но в обратном порядке; и ретроинверсо-пептид или пептид D-ретро-энантиомер, состоящий из D-аминокислот в обратной последовательности. В то время как L-пептид и его D-энантиомер являются зер-

кальными структурами друг друга, L-ретро-пептид является зеркальным изображением D-ретроинверсо-пептида. С другой стороны, L-пептид и D-ретроинверсо-пептид 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-ретроинверсо-пептид вероятно имеют схожую аффинность связывания с мишенью L-белком.

Пептиды могут быть более активными, когда они являются петлевыми, 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 линейных 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 ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые 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 ретро-ориентация пептидной цепи в ретроинверсо-варианте. Такие пептиды не являются природными, поэтому природные протеазы не способны 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 существенных аминокислотных остатков.

В заявке на патент US 2006/0058231 раскрываются варианты BMP-7 с улучшенными свойствами. Этот документ включен в настоящее описание в качестве ссылки. В US 2006/0058231 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 отсутствие продомена, повышенная растворимость, повышенная устойчивость, повышенная специфическая биологическая активность, измененная специфичность к рецепторам, измененная аффинность связывания рецепторов, измененная сорцепторная специфичность, измененная сорцепторная аффинность связывания, измененное связывание с ноггинами и уменьшенная иммуногенность.

Что касается аминокислот участка B, то это означает, что аминокислоты в позициях 6, 8, 9, 11, 12, 14, 16 - 18, 20-31, 35, 36 и 40 SEQ ID NO: 18 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: 18, также можно описать так, как показано в формуле 1.

Формула 1

P K P S S X1 P X2 X3 L X4 X5 I X6 V X7 X8 X9 D X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16

X17 X18 X19 X20 X21 **M V V X22 X23 S G S X24** (SEQ ID NO: 29),

в которой

X1 = A или V,

X2 = T, или D, или E,

X3 = Q, или D, или K, или S,

X4 = N, или D, или E, или H,

X5 = A или D, или S,

X6 = S, или I, или L, или M, или F, или Y, или E, или H, или K, или Q, или R, или D,

X7 = L, или E, или K, или T, или M, или R,

X8 = Y, или A, или D, или E, или H, или K, или S, или T,

X9 = F, или H, или A, или D, или E, или K, или Q, или R, или Y,

X10 = D, или I, или L, или E, или N, или S, или T,

X11 = S, или D, или E, или N, или R,

X12 = S, или D, или E, или K, или N, или T,

X13 = N, или E, или Q, или R,

X14 = V, или A, или D, или N, или R, или T, или M, или Y, или H,

X15 = I, или A, или D, или E, или K, или N, или Q, или R, или S, или T, или V,

X16 = L, или A, или E, или K, или Q,

X17 = K, или D, или E, или G, или Q, или R, или W,

X18 = K, или A, или D, или E, или H, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или V, или M,

X19 = Y, или D, или E, или H, или K, или Q, или I, или R,

X20 = R, или D, или E, или K, или N, или S,
 X21 = N или D,
 X22 = R, или E, или S, или D, или K, или Q, или L,
 X23 = A, или E, или D, или S,
 X24 = H или R.

Указанные выше пептиды согласно формуле 1 можно рассматривать как эквиваленты или варианты или аналоги пептида согласно SEQ ID NO: 18. В одном воплощении изобретения вариант SEQ ID NO: 18 включает замену 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотные замены, выбранные из группы, включающей замены X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7, X8, X9, X10, X11, X12, X13, X14, X15, X16, X17, X18, X19, X29, X21, X22, X23 и X24.

Аминокислоты в формуле 1, выделенные жирным шрифтом и подчеркнутые, представляют собой аминокислоты в пептидах согласно SEQ ID NO: 18 (последовательность дикого типа), которые предпочтительно не должны изменяться или замещаться. Предпочтительные аминокислоты в позициях X1-X24 подчеркнуты. Они представляют собой аминокислоты дикого типа в соответствующих позициях.

Кроме того, авторы изобретения проверили пептиды участка В согласно SEQ ID NO: 6-17 на их свойства изменения фенотипа ОА хондроцитов и нашли, что они также повышают экспрессию генов SOX9 и COL2A1 и понижают экспрессию COX-2 (табл. 5).

Кроме описанного выше участка В, авторы изобретения также обнаружили, что пептиды из другого участка (аминокислоты 58-85 зрелого белка BMP-7) можно выгодно использовать для имитации благоприятного действия BMP-7 при ОА. Пептиды из этого участка даже синергично улучшают действие пептидов из участка В, описанных выше. Второй участок в настоящем описании описывается как участок А. Пептиды из участка А вследствие этого применимы при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита в комбинации с пептидами из участка В.

Пептиды из участка А можно описать как состоящие из аминокислотной последовательности длиной в 12-28 аминокислот, включающей аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30

YSEGESAFPLNS

или ее вариант согласно формуле 2 (SEQ ID NO: 31), причем аминокислотная последовательность указанного пептида заключается в SEQ ID NO: 32

APEGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHA

или ее варианте согласно формуле 3 (SEQ ID NO: 33).

Формула 3

Z1 Z2 Z3 G Y Z4 A Z5 Y S E G Z6 S Z7 Z8 Z9 L Z10 Z11 Z12 M N A T Z13 H A

(SEQ ID NO: 33),

в которой

Z1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R,
 Z2 = P, или Y, или M,
 Z3 = 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,
 Z4 = A, или E, или Q, или R, или S,
 Z5 = Y, или N, или D,
 Z6 = E, или A, или Q,
 Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,
 Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,
 Z9 = P или M,
 Z10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V,
 Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T,
 Z12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или S, или T, или при этом
 Z13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R.

Указанные выше пептиды согласно формуле 3 можно рассматривать как эквиваленты или варианты пептида согласно SEQ ID NO: 32. В одном воплощении изобретения вариант SEQ ID NO: 32 включает 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную замену, выбранную из группы, включающей замены Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12 и Z13.

Соответственно поэтому варианты участка, соответствующего SEQ ID NO: 30, также можно описать как показано в формуле 2.

Формула 2

Y S E G Z6 S Z7 Z8 Z9 L Z10 Z11 (SEQ ID NO: 31)

в которой

Z6 = E, или A, или Q,
 Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,
 Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,
 Z9 = P или M,
 Z10 = N или, A или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V, или при этом

Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

Примеры подходящих пептидов из участка A приведены в табл. 4.

Предпочтительные варианты могут включать линейные пептиды, линейные ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые пептиды. Технология CLIPS дает возможность обычного получения таких пептидов (<http://www.pepscan.com/therapeutics/clips-platform>). Двухпетлевые пептиды могут содержать два идентичных пептида из участка A или B, или два различных пептида из участка A или B, или их комбинации, описанные в настоящем описании. Особенно предпочтительными являются двухпетлевые пептиды, причем одна петля включает пептид из участка A, описанного в настоящем описании, и другая петля пептид из участка B, описанного в настоящем описании.

Таблица 4. Пептиды из участка A, подходящие для применения при лечении OA в комбинации с пептидами из участка B.

SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность
34	APEGYAAYYSEGESAFPLNS
35	PEGYAAYYSEGESAFPLNSY
36	EGYAAYYSEGESAFPLNSYM
37	GYAAYYSEGESAFPLNSYMN
38	YAAYYSEGESAFPLNSYMNA
39	AAYYSEGESAFPLNSYMNAT
40	AYYSEGESAFPLNSYMNATN
41	YYSEGESAFPLNSYMNATNH
42	YSEGESAFPLNSYMNATNHA
43	YSEGESAFPLNS
44	APEGYAAYYSEGESAFPLNS
45	PEGYAAYYSEGESAFPLNS
46	EGYAAYYSEGESAFPLNS
47	GYAAYYSEGESAFPLNS
48	YAAYYSEGESAFPLNS
50	AAYYSEGESAFPLNS
51	AYYSEGESAFPLNS
52	YYSEGESAFPLNS
53	YSEGESAFPLNS
54	YSEGESAFPLNSY
55	YSEGESAFPLNSYM
56	YSEGESAFPLNSYMN
57	YSEGESAFPLNSYMNA
58	YSEGESAFPLNSYMNAT
59	YSEGESAFPLNSYMNATN
60	YSEGESAFPLNSYMNATNH
61	YSEGESAFPLNSYMNATNHA
62	APEGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHA
63	PEGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHA
64	EGYAAYYSEGESAFPLNSYMNATNHA

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

Последовательность пептида	SEQ ID NO:	IL-6	ADAMTS5	COL10A	BAPX1/NKX3.2	ALP	RUNX2
STGSKQRSQNRSKTPKNQEA	19	-	-	-	-	-	-
KTPKNQEALRMANVAENSSSSDQRQACKK	20	-	-	-	-	-	-
SSDQRQACKKHELYVSFRDL	21	-	-	-	-	-	-
DLGWQDWIIAPEGYAAYYCE	22	-	-	-	-	-	-
CEGECAPPLNSYMNATNHAI	23	-	-	-	-	-	-
AIVQTLVHFINPETVPKPCC	24	-	-	-	-	-	-
CCAPTQLNAISVLYFDDSSN	25	-	-	-	-	-	-
SSNVILKKYRNMVVVACGCH	26	-	-	-	-	-	-

[-] обозначает отсутствие существенного действия или существенно пониженной экспрессии маркерных хондрогенных генов BAPX1/NKX3.2 или повышенной экспрессии маркеров фенотипа OA хондроцитов IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP 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 серин, и их свойства изменения фенотипа ОА хондроцитов. Результаты представлены наглядно на фиг. 2-7

Пептидная последовательность	SEQ ID No:	IL-6	ADAMTS5	COL10A	BAPX1 /NKX3.2	ALP	RUNX2
FINPETVPKPSSAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRASGSH	1	-	-	-	-	-	-
FINPETVPKPSSAPTQLNAI	2	-	-	-	-	-	-
NPETVPKPSSAPTQLNAISV	3	-	-	-	-	-	-
ETVPKPSSAPTQLNAISVLY	4	-	-	-	-	-	-
VPKPSSAPTQLNAISVLYFD	5	-	-	-	-	-	+
PKPSSAPTQLNAISVLYFDD	6	+	+	+	+	+	+
KPSSAPTQLNAISVLYFDDS	7	+	+	+	+	+	+
SSAPTQLNAISVLYFDDSSN	8	+	+	+	+	+	+
APTQLNAISVLYFDDSSNVI	9	+	+	-	+	+	+
TQLNAISVLYFDDSSNVILK	10	+	+	-	+	+	+
LNAISVLYFDDSSNVILKKY	11	+	+	+	+	+	+
AISVLYFDDSSNVILKKYRN	12	+	+	+	+	+	+
SVLYFDDSSNVILKKYRNMV	13	+	+	+	+	+	+
LYFDDSSNVILKKYRNMVVR	14	+	+	+	+	+	-
FDDSSNVILKKYRNMVVRAS	15	+	+	+	+	+	-
DSSNVILKKYRNMVVRASGS	16	+	+	+	+	+	-
SSNVILKKYRNMVVRASGSH	17	+	+	+	+	+	+
PKPSSAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRASGSH	18	+	+	+	+	+	+

[+] обозначает существенно повышенную экспрессию маркерного хондрогенного гена BAPX1/NKX3.2 или существенно пониженную экспрессию маркеров ОА фенотипа IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP и RUNX2 в хондроцитах ОА сустава по сравнению с необработанными хондроцитами ОА сустава

[-] обозначает отсутствие существенного действия или существенно пониженной экспрессии маркерных хондрогенных генов BAPX1/NKX3.2 или существенно повышенной экспрессии маркеров ОА фенотипа IL-6, ADAMTS5, COL10A, ALP и RUNX2 в хондроцитах ОА сустава по сравнению с необработанными хондроцитами ОА сустава

Пептид рассматривают как обладающий активностью, подавляющей фенотип ОА хондроцитов, когда по меньшей мере 5 из 6 маркеров являются положительными (+). Эти пептиды выделены жирным шрифтом.

Таблица 5. Полученные из человеческого BMP-7 последовательные 20-мерные пептиды с цистеиновыми остатками, замененными на серин, и их свойства изменения фенотипа ОА хондроцитов

Пептидная последовательность	SEQ ID No:	COX-2	COL2A1	SOX9
PKPSSAPTQLNAISVLYFDD	6	+	+	+
KPSSAPTQLNAISVLYFDDS	7	+	+	+
SSAPTQLNAISVLYFDDSSN	8	+	+	+
APTQLNAISVLYFDDSSNVI	9	+	+	+
TQLNAISVLYFDDSSNVILK	10	+	+	+
LNAISVLYFDDSSNVILKKY	11	+	+	+
AISVLYFDDSSNVILKKYRN	12	+	+	+
SVLYFDDSSNVILKKYRNMV	13	+	+	+
LYFDDSSNVILKKYRNMVVR	14	+	+	+
FDDSSNVILKKYRNMVVRAS	15	+	+	+
SSNVILKKYRNMVVRASGS	16	+	+	+
SNVILKKYRNMVVRASGSH	17	+	+	+

[+] обозначает существенно повышенную экспрессию маркерных хондрогенных генов SOX9 и COL2A1 или существенно пониженную экспрессию фенотипического маркера ОА COX-2 в хонд-

роцитах ОА сустава по сравнению с необработанными хондроцитами ОА сустава

Пояснения к фигурам

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

Остеоартритные хондроциты показывают типичный фенотип, отличающийся пониженной экспрессией SOX9, COL2A1 и VAPX1/NKX3.2 и повышенной экспрессией мРНК COX-2 и IL-6 (см. слева). BMP-7 (1 нМ) способен спасти этот ОА-ассоциированный фенотип хондроцитов путем нормализации экспрессии указанных выше генов (изображение слева).

Функциональная активность фермента ALP в клеточных лизатах и секреция PGE2 в культуральной среде также нормализуются после обработки BMP-7 ОА хондроцитов (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 \pm ср.-кв. ошибка, статистические различия вычисляют при сравнении со здоровым состоянием. *= $p < 0,05$.

Фиг. 2-7. Действия пептидов, полученных из BMP-7, на первичные человеческие хондроциты ОА сустава.

Действие 20-мерных пептидов (10 нМ) SEQ ID NO: 2-17 (пептиды с интервалами в 1 или 2 аминокислоты (перекрываются 18-19 аминокислот)) и случайного пептида с последовательностью согласно SEQ ID NO: 49 на экспрессию указанных генов определяют на проверенном пуле пассажа 2 человеческих хондроцитов ОА 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 28S 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 \pm ср.-кв. ошибка, статистические различия вычисляют (однофакторный ANOVA с поправкой Бонферрони) для контрольного состояния. *= $p < 0,05$, ниже, чем контрольное состояние для ADAMTS5, ALP, COL10A1, RUNX2 и IL-6, и выше, чем контрольное состояние для VAPX1/NKX3.2. Случайный пептид представляет собой пептид согласно SEQ ID NO: 49.

Фиг. 8. Диаграмма, показывающая относительную экспрессию COL2A1, Col10A1, COX-2 и RUNX2 в изолированных хондроцитах пациентов с ОА в присутствии контрольного пептида, BMP-7 и пептида согласно SEQ ID NO: 43.

Фиг. 9. Диаграмма, показывающая относительную экспрессию COL10A1 и MMP13 в эксплантатах хряща пациентов с ОА в присутствии контрольного пептида, BMP-7 и пептида согласно SEQ ID NO: 43.

Примеры

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

Мы анализировали пептиды-кандидаты из участка В на их супрессивное действие на первичных хондроцитах ОА сустава в присутствии 20% (об./об.) ОА синовиальной жидкости (SF). Объединяют данные по трем отдельным изолятам ОА хондроцитов ($n=3$), каждый из которых проверяли трижды. Высеянные ОА хондроциты пассажа 2 подвергали воздействию 100 нМ пептида в отсутствие или в присутствии ОА синовиальной жидкости, и через 24 ч анализировали на экспрессию мРНК генов IL-6, ADAMTS5, COL10A1, ALP, VAPX1 и RUNX2 (исправленную для экспрессии 28S рРНК и относительно контрольных условий (без воздействия пептидов)).

Результаты оценивали как + или -, как показано в подстрочных примечаниях к таблицам.

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 и 10 нМ пептидов из участка В. 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 ОТ-кПЦР на экспрессию генов (исправленную на экспрессию β -актина и относительно $t=0$).

Пример 3. Оценка супрессивного действия на ОА *ex vivo* на моделях для ОА.

Пептиды для применения согласно изобретению также можно исследовать в испытании *ex vivo*. Биопсии полнослойного хряща (выбитые 3-мм) из мышечелков 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 суток, и среду можно заменять ежедневно свежим пептидом.

BMP-7 в концентрации 1 нМ можно использовать в качестве положительного контроля, и носитель 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 ОА хондроцитов, как описано в настоящем описании.

Локальные относящиеся к ОА изменения в биопсии в результате воздействия пептидов можно анализировать методами (иммуно)гистохимии (окрашивание альциановым синим и иммуноокрашивание для COL2A1, SOX9 и COX-2) для дополнительной поддержки утверждения, что пептиды для применения согласно изобретению подходят для медицинского применения при ОА.

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 В 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 ОА 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 ОА сустав мыши можно инъектировать 10 мкл, в этом объеме в коленный сустав мыши можно инъектировать 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-О; модифицирован Pritzker).

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

Хондроциты, изолированные у пациентов с ОА (n=8), испытывают с BMP-7 (1 нМ) или 12-мерным пептидом согласно SEQ ID NO: 43 (1 нМ) в течение 24 ч. Экспрессию прохондрогенных (фиг. 8A) и гипертрофных (фиг. 8B, 8C и 8D) генов определяют через кОТ-ПЦР и нормализуют для уровней 28S рРНК. Полученные результаты подтверждают предыдущие выводы авторов изобретения, что BMP-7 или 12-мерный пептид 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 А, имитирующую BMP-7.

Пример 6. Обработка хрящевых эксплантатов.

Берут эксплантаты хряща 4 мм² из неповрежденных участков хряща коленного сустава пациентов с ОА (n=5) и произвольно распределяют для различных условий экспериментальной обработки (4 эксплантата на группу обработки). После 24-часового периода уравнивания эксплантаты обрабатывают BMP-7 (1 нМ) или 12-мерным пептидом согласно SEQ ID NO: 43 (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. 9A) и MMP-13 (фиг. 9B). 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 присутствии BMP-7 (1 нМ) или имитирующего BMP-7 пептида

SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

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).

Эксплантаты от обоих пациентов показали повышенную интенсивность сафранина-0 в эксплантатах, обработанных BMP-7 и пептидом

SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

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 мм² из хряща коленного сустава пациентов с ОА (n=6) и обрабатывают BMP-7 (1 нМ) пептидом

SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

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 SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

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 SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

при 10 нМ или случайным иррелевантным контрольным пептидом (10 нМ) в течение 24 ч. Определяют ELISA уровни PGE2.

Образцы менисковой ткани пациентов с OA (n=6) обрабатывают BMP-7 (1 нМ), пептидом SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13)

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

SVLYFDDSSNVILKKYRNMV (SEQ ID NO: 13).

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.

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 unicompartamental 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).

32. Renner, J. et al., *Tissue Engineering*, 18: 2581-2589 (2012).

Перечень последовательностей.

<110> ЮНИВЕРСИТЕЙТ МААСТРИХТ И АКАДЕМИС ЗИКЕНХЕЙС МААСТРИХТ

<120> СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ИЛИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ ОСТЕОАРТРИТА

<130> 338 wo

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 47

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile
20 25 30

Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met Val Val Arg Ala Ser Gly Ser His
35 40 45

<210> 2

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln
1 5 10 15

Leu Asn Ala Ile
20

<210> 3

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

Ala Ile Ser Val
20

<210> 4

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 4

Glu Thr Val Pro Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile

038283

1 5 10 15

Ser Val Leu Tyr
20

<210> 5
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 5

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

Leu Tyr Phe Asp
20

<210> 6
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 6

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

Tyr Phe Asp Asp
20

<210> 7
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 7

Lys Pro Ser Ser Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr
1 5 10 15

Phe Asp Asp Ser
20

<210> 8
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 8

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

Asp Ser Ser Asn
20

<210> 9
<211> 20

<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 9

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

Ser Asn Val Ile
20

<210> 10
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 10

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

Val Ile Leu Lys
20

<210> 11
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 11

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> 12
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

Lys Tyr Arg Asn
20

<210> 13
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

Arg Asn Met Val
20

<210> 14
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

Met Val Val Arg
20

<210> 15
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 15

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

Val Arg Ala Ser
20

<210> 16
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 16

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

Ala Ser Gly Ser
20

<210> 17
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 17

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

Ser Gly Ser His
20

<210> 18
<211> 40
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

038283

<400> 18

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

Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg Asn Met
20 25 30

Val Val Arg Ala Ser Gly Ser His
35 40

<210> 19

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 19

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> 20

<211> 30

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 20

Lys Thr Pro Lys Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu
1 5 10 15

Asn Ser Ser Ser Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys
20 25 30

<210> 21

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 21

Ser Ser Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser
1 5 10 15

Phe Arg Asp Leu
20

<210> 22

<211> 20

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 22

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
1 5 10 15

Tyr Tyr Cys Glu
20

<210> 23
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 23

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

Asn His Ala Ile
20

<210> 24
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 24

Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro Glu Thr Val Pro
1 5 10 15

Lys Pro Cys Cys
20

<210> 25
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 25

Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile Ser Val Leu Tyr Phe Asp
1 5 10 15

Asp Ser Ser Asn
20

<210> 26
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 26

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> 27
<211> 139
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

038283

<400> 27

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> 28
 <211> 139
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 28

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

038283

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> 29
<211> 40
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

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

<220>
<221> прочий_признак
<222> (8)..(9)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

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

<220>
<221> прочий_признак
<222> (14)..(14)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (16)..(18)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (20)..(31)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (35)..(36)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
<221> прочий_признак
<222> (40)..(40)
<223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<400> 29

Pro Lys Pro Ser Ser Xaa Pro Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Ile Xaa Val Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Asp Xaa Met
20 25 30

Val Val Xaa Xaa Ser Gly Ser Xaa
35 40

<210> 30
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 30

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

<210> 31
<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> 31

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

<210> 32
<211> 28
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 32

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> 33
<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> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (8)..(8)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (13)..(13)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

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

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

<220>
 <221> прочий_признак
 <222> (26)..(26)
 <223> Хаа может быть любой природной аминокислотой

<400> 33

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

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

<210> 34
 <211> 20
 <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
 20

<210> 35
 <211> 20
 <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
 20

<210> 36
 <211> 20
 <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
 20

<210> 37
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 37

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> 38
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 38

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> 39
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 39

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> 40
 <211> 20
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 40

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> 41
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 41

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> 42
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 42

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> 43
<211> 12
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 43

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

<210> 44
<211> 20
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 44

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> 45
<211> 19
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 45

038283

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

Leu Asn Ser

<210> 46
 <211> 18
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 46

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

Asn Ser

<210> 47
 <211> 17
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 47

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

Ser

<210> 48
 <211> 16
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 48

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

<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

<210> 50
 <211> 15
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens

<400> 50

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

<210> 51

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 51

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

<210> 52

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

<210> 53

<211> 12

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 53

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

<210> 54

<211> 13

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

<210> 55

<211> 14

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 55

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

<210> 56

<211> 15

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 56

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

Thr Asn His Ala
20

<210> 62
<211> 28
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 62

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> 63
<211> 27
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 63

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> 64
<211> 26
<212> БЕЛОК
<213> Homo sapiens

<400> 64

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

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение пептида при лечении, облегчении или предупреждении остеоартрита, причем пептид состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или ее аналога, причем аналог представляет собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности согласно формуле 1 (SEQ ID NO: 29) или ее фрагмента, состоящего по меньшей мере из 10 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности согласно формуле 1, где формула 1 представляет собой

P K P S S X1 P X2 X3 L X4 X5 I X6 V X7 X8 X9 D X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16

X17 X18 X19 X20 X21 M V V X22 X23 S G S X24 (SEQ ID NO: 29),

где

X1 = A или V,

X2 = T, или D, или E,

X3 = Q, или D, или K, или S,

X4 = N, или D, или E, или H,

X5 = A, или D, или S,

X6 = S, или I, или L, или M, или F, или Y, или E, или H, или K, или Q, или R, или D,

X7 = L, или E, или K, или T, или M, или R,

X8 = Y, или A, или D, или E, или H, или K, или S, или T,

X9 = F, или H, или A, или D, или E, или K, или Q, или R, или Y,

X10 = D, или I, или L, или E, или N, или S, или T,

X11 = S, или D, или E, или N, или R,

X12 = S, или D, или E, или K, или N, или T,

X13 = N, или E, или Q, или R,

X14 = V, или A, или D, или N, или R, или T, или M, или Y, или H,
 X15 = I, или A, или D, или E, или K, или N, или Q, или R, или S, или T, или V,
 X16 = L, или A, или E, или K, или Q,
 X17 = K, или D, или E, или G, или Q, или R, или W,
 X18 = K, или A, или D, или E, или H, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или V, или M,
 X19 = Y, или D, или E, или H, или K, или Q, или I, или R,
 X20 = R, или D, или E, или K, или N, или S,
 X21 = N или D,
 X22 = R, или E, или S, или D, или K, или Q, или L,
 X23 = A, или E, или D, или S,
 X24 = H или R.

2. Применение по п.1, причем указанный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17.

3. Применение по п.1 или 2, причем пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые пептиды.

4. Применение по любому из пп.1-3, причем лечение включает введение по меньшей мере одного второго пептида, причем указанный второй пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30 или ее вариант согласно формуле 2 (SEQ ID NO: 31), причем аминокислотная последовательность указанного второго пептида содержится в SEQ ID NO: 32 или ее варианте согласно формуле 3 (SEQ ID NO: 33).

5. Применение по п.4, причем вариант согласно SEQ ID NO: 32 включает 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислоты, выбранных из группы, включающей замены Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12 и Z13, где

Z1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R,
 Z2 = P, или Y, или M,
 Z3 = 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,
 Z4 = A, или E, или Q, или R, или S,
 Z5 = Y, или N, или D,
 Z6 = E, или A, или Q,
 Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,
 Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,
 Z9 = P или M,
 Z10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V,
 Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T,
 Z12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или R, или Y, или S, или T, или при этом
 Z13 = N, или F, или W, или Y, или H, или K, или R.

6. Применение по п.4 или 5, причем вариант согласно SEQ ID NO: 31 включает 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислоты, выбранных из группы, включающей замены Z6, Z7, Z8, Z9, Z10 и Z11, где

Z6 = E, или A, или Q,
 Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,
 Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,
 Z9 = P или M,
 Z10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V, или где
 Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

7. Применение по любому из пп.4-6, причем второй пептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30.

8. Применение по любому из пп.4-7, причем аминокислотная последовательность второго пептида полностью содержится в SEQ ID NO: 32.

9. Применение по любому из пп.4-8, причем второй пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые пептиды.

10. Применение по любому из пп.4-9, причем второй пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 34-48 и SEQ ID NO: 50-64.

11. Способ для лечения, облегчения или предупреждения остеоартрита (АО), причем указанный способ включает введение пептида, где указанный пептид состоит из аминокислотной последовательности согласно SEQ ID NO: 18 или ее аналога, причем аналог представляет собой пептид, состоящий из аминокислотной последовательности согласно формуле 1 (SEQ ID NO: 29) или ее фрагмента, состоящего по меньшей мере из 10 последовательных аминокислот SEQ ID NO: 18 или аминокислотной последовательности согласно формуле 1, где формула 1 представляет собой

P K P S S X1 P X2 X3 L X4 X5 I X6 V X7 X8 X9 D X10 X11 X12 X13 X14 X15 X16

X17 X18 X19 X20 X21 M V V X22 X23 S G S X24 (SEQ ID NO: 29),

где

X1 = A или V,

X2 = T, или D, или E,

X3 = Q, или D, или K, или S,

X4 = N, или D, или E, или H,

X5 = A, или D, или S,

X6 = S, или I, или L, или M, или F, или Y, или E, или H, или K, или Q, или R, или D,

X7 = L, или E, или K, или T, или M, или R,

X8 = Y, или A, или D, или E, или H, или K, или S, или T,

X9 = F, или H, или A, или D, или E, или K, или Q, или R, или Y,

X10 = D, или I, или L, или E, или N, или S, или T,

X11 = S, или D, или E, или N, или R,

X12 = S, или D, или E, или K, или N, или T,

X13 = N, или E, или Q, или R,

X14 = V, или A, или D, или N, или R, или T, или M, или Y, или H,

X15 = I, или A, или D, или E, или K, или N, или Q, или R, или S, или T, или V,

X16 = L, или A, или E, или K, или Q,

X17 = K, или D, или E, или G, или Q, или R, или W,

X18 = K, или A, или D, или E, или H, или N, или P, или Q, или S, или T, или I, или V, или M,

X19 = Y, или D, или E, или H, или K, или Q, или I, или R,

X20 = R, или D, или E, или K, или N, или S,

X21 = N или D,

X22 = R, или E, или S, или D, или K, или Q, или L,

X23 = A, или E, или D, или S,

X24 = H или R.

12. Способ по п.11, причем указанный пептид содержит аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6-17.

13. Способ по п.11 или 12, причем пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые пептиды.

14. Способ по любому из пп.11-13, причем лечение включает введение по меньшей мере одного второго пептида, причем указанный второй пептид имеет от 12 до 28 аминокислот в длину и включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30 или ее вариант согласно формуле 2 (SEQ ID NO: 31), причем аминокислотная последовательность указанного второго пептида содержится в SEQ ID NO: 32 или ее варианте согласно формуле 3 (SEQ ID NO: 33).

15. Способ по п.14, причем вариант согласно SEQ ID NO: 32 включает 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислоты, выбранных из группы, включающей замены Z1, Z2, Z3, Z4, Z5, Z6, Z7, Z8, Z9, Z10, Z11, Z12 и Z13, где

Z1 = A, или I, или L, или M, или Y, или V, или E, или H, или K, или Q, или R,

Z2 = P, или Y, или M,

Z3 = 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,

Z4 = A, или E, или Q, или R, или S,

Z5 = Y, или N, или D,

Z6 = E, или A, или Q,

Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,

Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,

Z9 = P или M,

Z10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V,

Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T,

Z12 = Y, или H, или D, или G, или H, или N, или P, или S, или T, или при этом

Z13 = N, или F, или Y, или W, или H, или K, или R.

16. Способ по п.14 или 15, причем вариант согласно SEQ ID NO: 31 включает 5, 4, 3, 2 или 1 замен аминокислоты, выбранных из группы, включающей замены Z6, Z7, Z8, Z9, Z10 и Z11, где

Z6 = E, или A, или Q,

Z7 = A, или D, или E, или H, или K, или S,

Z8 = F, или A, или D, или E, или H, или Q, или R, или S,

Z9 = P или M,

Z10 = N, или A, или D, или S, или T, или E, или Q, или R, или I, или V, или где

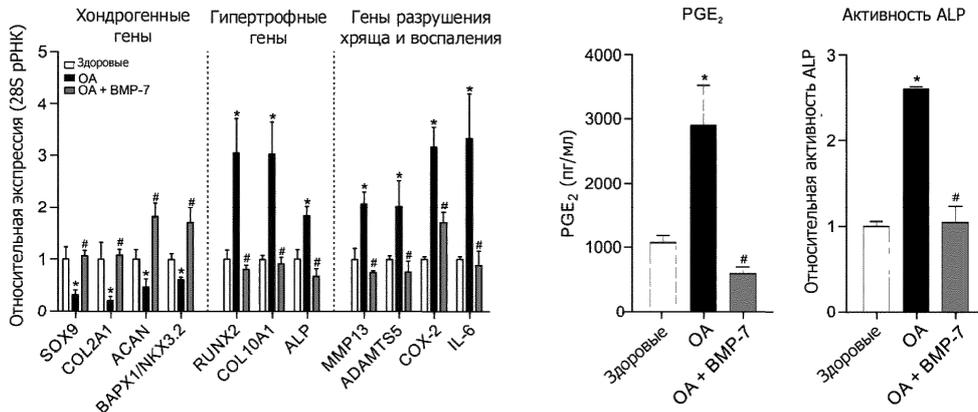
Z11 = S, или A, или D, или E, или H, или K, или N, или P, или Q, или T.

17. Способ по любому из пп.14-16, причем второй пептид включает аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 30.

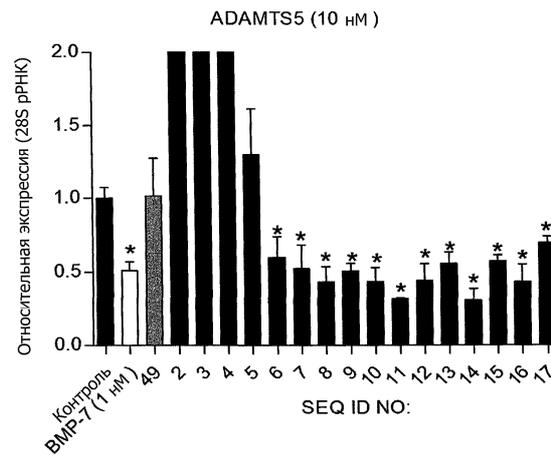
18. Способ по любому из пп.14-17, причем аминокислотная последовательность второго пептида полностью содержится в SEQ ID NO: 32.

19. Способ по любому из пп.14-18, причем второй пептид выбирают из группы, включающей линейные пептиды, линейные ретроинверсо-пептиды, ретроинверсо-пептиды, циклические пептиды, однопетлевые пептиды и двухпетлевые пептиды.

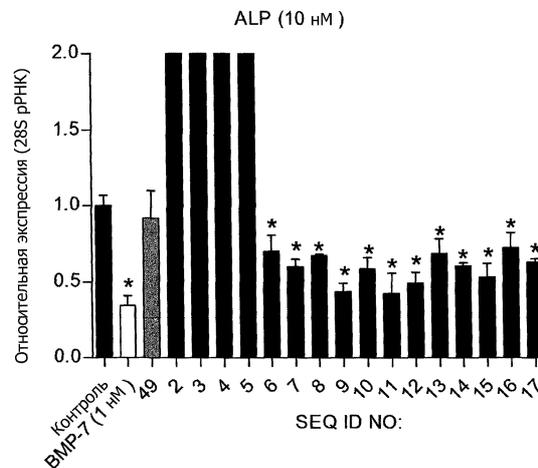
20. Способ по любому из пп.14-19, причем второй пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 34-48 и SEQ ID NO: 50-64.



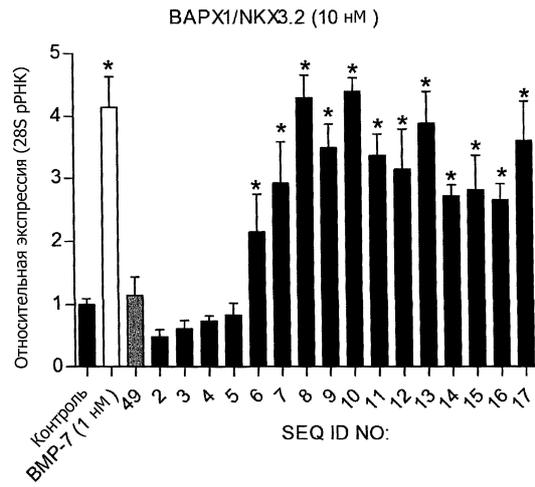
Фиг. 1



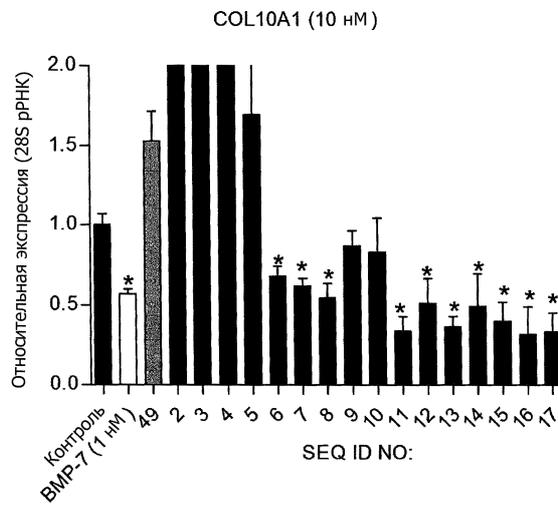
Фиг. 2



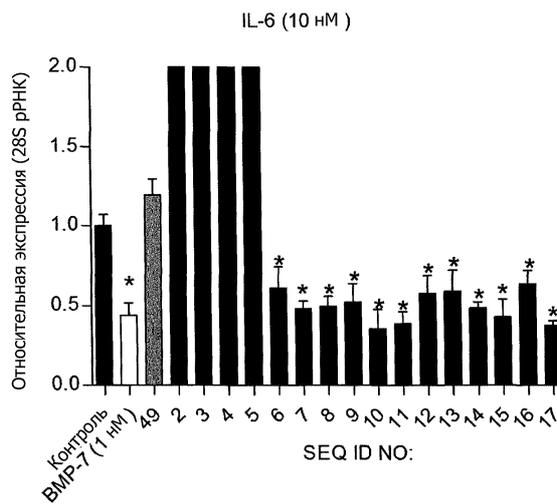
Фиг. 3



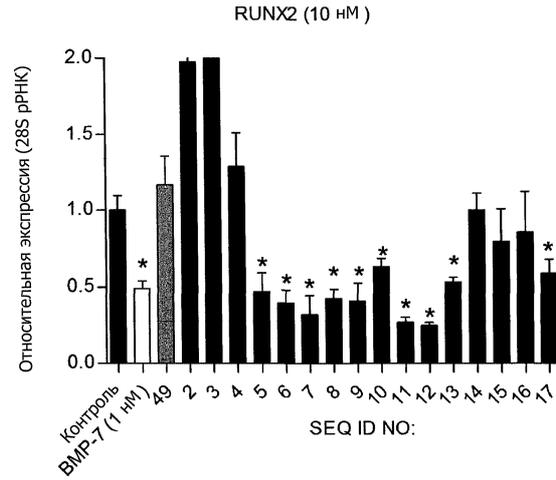
Фиг. 4



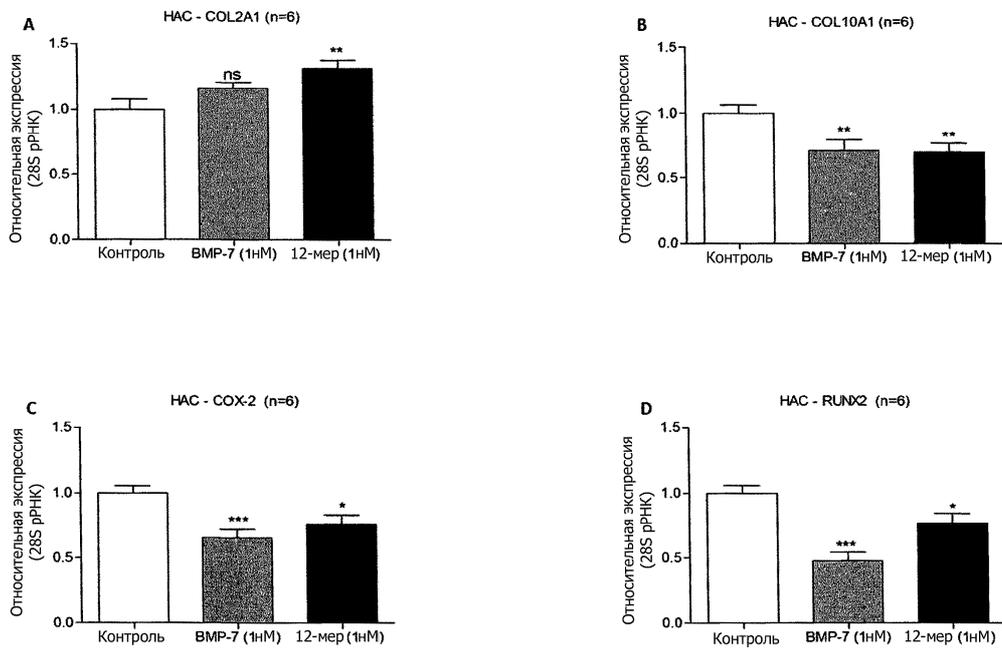
Фиг. 5



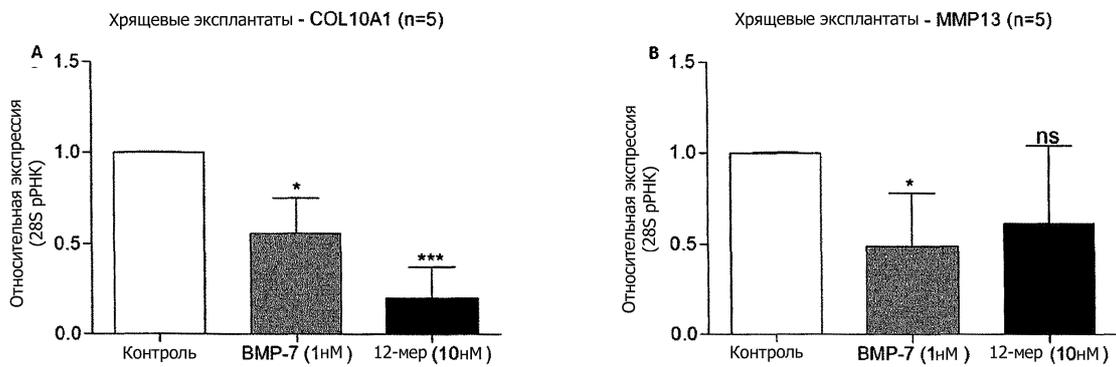
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9

