

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992558** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2020.03.04

(51) Int. Cl. *C07K 14/51* (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2018.04.20

(54) **ВАРИАНТЫ БЕЛКА BMP7 ЧЕЛОВЕКА**

(31) **62/490,910**

(32) **2017.04.27**

(33) **US**

(86) **PCT/US2018/028496**

(87) **WO 2018/200322 2018.11.01**

(71) Заявитель:
ЭЛИ ЛИЛЛИ ЭНД КОМПАНИ (US)

(72) Изобретатель:

**Пэнкук Джеймс Дэвид, Роулинсон
Скотт Уильям, Станкато Луи Франк
(US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к новым вариантам белка BMP7 человека. Настоящее изобретение относится к векторам и клеткам-хозяевам для воспроизводства последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих указанные белки, и их получения. Настоящее изобретение также относится к способам лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости.

A1

201992558

201992558

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-559753EA/55

ВАРИАНТЫ БЕЛКА BMP7 ЧЕЛОВЕКА

Настоящее изобретение относится к области медицины, в частности, к области терапевтических белков. В частности, настоящее изобретение относится к вариантам морфогенетического белка кости-7 (BMP7) человека, которые можно использовать для лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани и боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения перелома кости.

Морфогенетические белки кости являются хорошо известным семейством факторов роста, регулирующих пролиферацию, миграцию, дифференцировку и апоптоз клеток в ряде тканей и органов. BMP7 человека является секреторирующейся сигнальной молекулой из суперсемейства TGF-бета, и его исходно идентифицировали по его способности индуцировать образование костной ткани. В настоящее время его считают многофункциональным цитокином, опосредующим рост и дифференцировку множества различных типов клеток.

BMP7 используют для стимуляции образования кости, сращения перелома кости и артродеза позвонков. Несмотря на это, его применение в качестве терапевтического средства ограничено, главным образом, местным введением на поверхность ткани по причине его плохой растворимости/биодоступности и способности вызывать эктопический остеогенез (EBF) или быстрое образование новой костной ткани в мягкой ткани в результате преципитации в участке инъекции.

Варианты белка BMP7 с улучшенными свойствами, такими как повышенный выход экспрессии, повышенная растворимость, повышенная специфическая активность и сниженная иммуногенность, описаны в WO2005/097825. Однако все еще существует потребность в вариантах белка BMP7 человека с улучшенной растворимостью/биодоступностью, повышенной специфической активностью, сниженным связыванием с эндогенными циркулирующими ингибиторами и сниженной активностью EBF, которые можно использовать в качестве терапевтического средства.

Опухолевые стволовоподобные клетки (CSC) в солидных опухолях, вероятно, вносят вклад в развитие злокачественного новообразования и плохой исход лечения. Способность к самообновлению, дифференцировке и резистентности к противоопухолевой терапии является характерным признаком этих редких клеток, и регуляция их детерминации к линии дифференцировки может представлять собой одну из стратегий контроля развития или прогрессирования злокачественного новообразования. Однако, несмотря на известный потенциал этого подхода, все еще сохраняется потребность в эффективной терапии злокачественных новообразований, индуцирующей трансдифференцировку опухолевых клеток и реверсирование CSC в линии, не являющиеся резистентными или являющиеся менее резистентными к уничтожению с помощью общепринятой химиотерапии и лучевой терапии (см., например, Li, R., et al., Oncotarget.2016 Oct 18; 7(42): 68360-68370).

Настоящее изобретение относится к альтернативным вариантам белка BMP7 человека. В частности, настоящее изобретение относится к вариантам белка BMP7 человека с повышенной специфической активностью, улучшенными характеристиками растворимости/биодоступности, сниженным связыванием с эндогенными циркулирующими ингибиторами и/или сниженной активностью EBF по сравнению с соответствующим белком BMP7 дикого типа человека. Кроме того, описан способ лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения перелома кости, включающий введение варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение относится к варианту белка BMP7 человека, где зрелый домен белка BMP7 человека содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSX_{aa33}QRQX_{aa37}CKKHELYVSFRD
LGWQDWIIAPX_{aa60}GYAAX_{aa65}YCEGECAPFLNSYMNATNHAX_{aa86}X_{aa87}QX_{aa89}LX_{aa91}H
X_{aa93}X_{aa94}NPETVPKPCCAPTQLX_{aa110}AISX_{aa114}LYFDDX_{aa120}SNVILKKX_{aa128}RNMX_{aa132}
2VX_{aa134}ACGCH (SEQ ID NO: 3), где

X_{aa33} является D или M; X_{aa37} является A или P; X_{aa60} является E или Q; X_{aa65} является Y, S или G; X_{aa86} является I, V или L; X_{aa87} является V или L; X_{aa89} является T, S или A; X_{aa91} является V или M; X_{aa93} является F или V; X_{aa94} является I, F или M; X_{aa110} является G; X_{aa114} является V или M; X_{aa120} является S или Q; X_{aa128} является Y, F или W; X_{aa132} является V, Q или S; и X_{aa134} является R или K.

Изобретение также относится к варианту BMP7 человека, где зрелый домен белка BMP7 человека содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где: (a) X_{aa33} является D; (b) X_{aa37} является A; (c) X_{aa60} является E; (d) X_{aa65} является Y, S или G; (e) X_{aa86} является I, V или L; (f) X_{aa87} является V; (g) X_{aa89} является T или A; (h) X_{aa91} является V; (i) X_{aa93} является F или V; (j) X_{aa94} является I; (k) X_{aa110} является G; (l) X_{aa114} является V или M; (m) X_{aa120} является S; (n) X_{aa128} является Y, F или W; (o) X_{aa132} является V; и (p) X_{aa134} является R.

Изобретение также относится к варианту белка BMP7 человека, где зрелый домен белка BMP7 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где: (a) X_{aa33} является D; (b) X_{aa37} является A; (c) X_{aa60} является E; (d) X_{aa65} является Y или G; (e) X_{aa86} является I или L; (f) X_{aa87} является V; (g) X_{aa89} является T или A; (h) X_{aa91} является V; (i) X_{aa93} является F или V; (j) X_{aa94} является I; (k) X_{aa110} является G; (l) X_{aa114} является V или M; (m) X_{aa120} является S; (n) X_{aa128} является Y, F или W; (o) X_{aa132} является V; и (p) X_{aa134} является R.

Изобретение также относится к варианту белка BMP7 человека, где зрелый домен BMP7 содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где: (a) X_{aa33} является D; (b) X_{aa37} является A; (c) X_{aa60} является E; (d) X_{aa65} является G; (e) X_{aa86} является L; (f) X_{aa87} является V; (g) X_{aa89} является T или A; (h) X_{aa91} является V; (i) X_{aa93} является V; (j) X_{aa94} является I; (k) X_{aa110} является G; (l) X_{aa114}

является V или M; (m) Хаа₁₂₀ является S; (n) Хаа₁₂₈ является F или W; (o) Хаа₁₃₂ является V; и (p) Хаа₁₃₄ является R.

Предпочтительно, Хаа₁₁₄ является V и Хаа₁₂₈ является W.

Изобретение дополнительно относится к варианту белка BMP7 человека, где зрелый домен белка BMP7 содержит вариант F93V/N110G, приведенный в SEQ ID NO: 4; вариант Y65G/I86L/T89A/N110G, приведенный в SEQ ID NO: 5; вариант Y65G/I86L/N110G/Y128F, приведенный в SEQ ID NO: 6; вариант Y65G/I86L/N110G/Y128W, приведенный в SEQ ID NO: 7; вариант Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W, приведенный в SEQ ID NO: 8; вариант Y65G/T89A/N110G/Y128F, приведенный в SEQ ID NO: 9; вариант Y65G/I86L/N110G, приведенный в SEQ ID NO: 10; или вариант Y65G/V114M, приведенный в SEQ ID NO: 11. Более предпочтительно, варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению содержат вариант Y65G/I86L/N110G/Y128W зрелого белка BMP7 человека, приведенный в SEQ ID NO: 7, или вариант Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W зрелого белка BMP7 человека, приведенный в SEQ ID NO: 8 (далее в настоящем описании обозначаемого как вариант F9 зрелого белка BMP7 человека или вариант F9 зрелого белка BMP7 человека). Даже более предпочтительно, вариант зрелого белка BMP7 человека по настоящему изобретению содержит вариант F9 зрелого белка BMP7 человека, являющийся вариантом Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W зрелого BMP7 человека (см. SEQ ID NO: 8).

Изобретение также относится к варианту белка BMP7 человека, где зрелый домен варианта белка BMP7 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, где:

Хаа₃₃ является D или M; Хаа₃₇ является A или P; Хаа₆₀ является E или Q; Хаа₆₅ является Y, S или G; Хаа₈₆ является I, V или L; Хаа₈₇ является V или L; Хаа₈₉ является T, S или A; Хаа₉₁ является V или M; Хаа₉₃ является F или V; Хаа₉₄ является I, F или M; Хаа₁₁₀ является G; Хаа₁₁₄ является V или M; Хаа₁₂₀ является S или Q; Хаа₁₂₈ является Y, F или W; Хаа₁₃₂ является V, Q или S; и Хаа₁₃₄ является R или K, и где N—конец варианта белка ковалентно слит с C—концом последовательности про-домена BMP7 человека SEQ ID NO: 18.

Изобретение дополнительно относится к варианту про-BMP7 человека, где указанный белок содержит полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

Изобретение дополнительно относится к варианту зрелого белка BMP7 человека, где указанный вариант содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17. Изобретение дополнительно относится к вариантам белка BMP7 человека, имеющим повышенную специфическую активность, улучшенные характеристики растворимости, улучшенную биодоступность, сниженное связывание с эндогенными циркулирующими ингибиторами и/или сниженную активность EBF по сравнению с соответствующим белком BMP7 дикого типа человека.

Другой аспект настоящего изобретения относится к фармацевтической

композиции, содержащей вариант белка BMP7 человека по настоящему изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем, разбавителями или эксципиентом и, необязательно, одним или более другими терапевтическими ингредиентами.

Другой аспект изобретения относится к способам лечения злокачественного новообразования, включающим введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению с эффективным количеством одного или более из химиотерапевтических средств или ионизирующей радиации в одновременной, отдельной или последовательной комбинации. Предпочтительно, способы лечения злокачественного новообразования являются способами лечения рака легких, включая, в качестве неограничивающих примеров, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому или колоректальный рак. Предпочтительно, вариант белка BMP7 человека по настоящему изобретению вводят пациенту до введения одного или более из химиотерапевтических средств и/или ионизирующей радиации.

Один из аспектов изобретения относится к применению варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению в комбинации с полностью транс-ретиноевой кислотой (ATRA) для лечения злокачественных новообразований, при которых, как известно, важны ретиноидные рецепторы RAR альфа и RAR гамма, включая, в качестве неограничивающих примеров, рак легких, злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому, лейкоплакию полости рта, плоскоклеточную карциному полости рта, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак молочной железы, рак яичников, T-клеточную лимфому, саркому мягких тканей, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

Один из аспектов изобретения относится к применению варианта белка BMP7 человека, содержащего полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 или 8, в комбинации с ATRA для лечения злокачественных новообразований, при которых, как известно, важны ретиноидные рецепторы RAR альфа и RAR гамма, включая, в качестве неограничивающих примеров, рак легких, злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому, лейкоплакию полости рта, плоскоклеточную карциному полости рта, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), рак молочной железы, рак яичников, T-клеточную лимфому, саркому мягких тканей, рак поджелудочной железы, колоректальный рак, лимфому Ходжкина или неходжкинскую лимфому.

Варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению можно получать посредством получения соответствующих последовательностей генов, т.е. размещения соответствующих нуклеотидных последовательностей и их экспрессии в подходящей линии клеток. Желаемые нуклеотидные последовательности можно получать с использованием такого способа, как мутагенез кодонов. Такие способы позволяют

достигать любых и всех частот аминокислотных остатков в любых желаемых положениях кодона в олигонуклеотиде.

Изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения перелома кости, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту–человеку терапевтически эффективного количества варианта BMP7 человека по настоящему изобретению. Предпочтительно, изобретение также относится к способу лечения злокачественного новообразования, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту–человеку терапевтически эффективного количества варианта BMP7 человека по настоящему изобретению, где указанное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из рака легких, включая, в качестве неограничивающих примеров, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественного новообразования головного мозга, рака шейки матки, рака кожи, рака головы и шеи, глиобластомы, нейробластомы и колоректального рака.

Изобретение относится к способу лечения злокачественного новообразования, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению в комбинации с полностью транс–ретиноевой кислотой.

Изобретение относится к варианту белка BMP7 человека по настоящему изобретению в комбинации с ATRA для применения в качестве лекарственного средства.

Изобретение относится к варианту белка BMP7 человека в комбинации с ATRA для применения в лечении злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из рака легких, злокачественного новообразования головного мозга, рака шейки матки, рака кожи, рака головы и шеи, глиобластомы, нейробластомы, лейкоплакии полости рта, плоскоклеточной карциномы полости рта, немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака молочной железы, рака яичников, T–клеточной лимфомы, саркомы мягких тканей, рака поджелудочной железы, колоректального рака, лимфомы Ходжкина и неходжкинской лимфомы.

Рецептор ретиноевой кислоты (RAR) представляет собой тип ядерного рецептора, активируемого ATRA и 9–цис–ретиноевой кислотой. Существует три RAR: RAR–альфа, RAR–бета и RAR–гамма. Активация RAR приводит к стимуляции активности щелочной фосфатазы, которую можно измерять, по существу, как описано в примере 3.

Изобретение дополнительно относится к применению варианта белка BMP7 человека в комбинации с ATRA для производства лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования.

Другой аспект настоящего изобретения относится к вариантам белка BMP7 человека в комбинации с ATRA для применения в качестве лекарственного средства.

Другой аспект изобретения включает вариант белка BMP7 человека в комбинации с ATRA по настоящему изобретению для применения в лечении злокачественного новообразования.

Изобретение относится к вариантам белка BMP7 человека для применения в качестве лекарственного средства. Изобретение относится к варианту белка BMP7 человека для применения в лечении злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения перелома кости.

Изобретение дополнительно относится к применению варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению для производства лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения перелома кости.

Другие варианты осуществления изобретения относятся к полинуклеотидам, кодирующим варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению. Другой вариант осуществления относится к вектору, содержащему указанные полинуклеотиды, и клетке-хозяину, несущей указанный вектор. Другой вариант осуществления относится к способам получения варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению посредством культивирования клеток-хозяев, несущих указанный вектор, содержащий ДНК, кодирующую указанный белок, экспрессии указанного белка из клеток-хозяев и выделения белка из сред для культивирования.

В целях по настоящему изобретению, как представлено в настоящем описании, термины определяют следующим образом:

Термин "приблизительно" означает отклонение до 10% от значения, к которому относится такой термин, в зависимости от количества значимых цифр. Например, "приблизительно 200" включает от 180 до 220, и "приблизительно 1" включает от 0,9 до 1,1.

Термин "введение" относится к осуществлению переноса фармацевтической композиции по настоящему изобретению в организм млекопитающего, предпочтительно человека, нуждающегося в этом.

Введение можно осуществлять любым путем, о котором лечащему врачу известно, что он является эффективным. Парентеральное введение является одной из форм введения, общепринято понимаемой в медицинской литературе как инъекция лекарственной формы в организм с помощью стерильного шприца или некоторого другого механического устройства, такого как инфузионный насос. Парентеральное введение может включать внутривенную инъекцию, подкожную инъекцию, мышечную инъекцию, интраперитонеальную инъекцию, эндотелиальное введение, местное введение, интраназальное введение, внутрилегочное введение и ректальное введение. Введение во время хирургического вмешательства или посредством рентгенографии (флюороскопии) представляет собой дополнительные формы.

Полностью транс-ретиноевая кислота (ATRA) является лигандом рецепторов ретиноевой кислоты (RAR) и ретиноидных рецепторов X (RXR). RAR и RXR функционируют как индуцируемые лигандом факторы транскрипции, регулирующие рост и дифференцировку нормальных и злокачественных клеток (Zhou et al., *Phil Trans. R. Soc.*

В 362: 959–971, 2007).

Термин "сращение кости" и "сращение перелома кости" используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и они предназначены для обозначения регенерации кости, ассоциированной с переломами с замедленной консолидацией и без консолидации бедренной и большеберцовой кости, переломами пальцев ног и плюсневых костей, переломами проксимального отдела плечевой кости, другими переломами костей, дефектами альвеолярного отростка, ассоциированными с зубными имплантатами, дегенерацией межпозвоночных дисков, артродезами позвонков, и регенерации кости, ассоциированной с черепно–челюстно–лицевой хирургией или повышенной остеинтеграцией для стабилизации фиксации имплантатов (винтов, пластин, протезов, зубных имплантатов).

Термин "повреждение и дегенерация хрящевой ткани" относится к повреждению хряща, являющемуся результатом повреждения суставов, ассоциированным с травмой, занятиями спортом, падениями или столкновениями, такого как посттравматическое повреждение хряща коленного сустава при вывихе сустава, разрыв связки, разрыв мениска, посттравматическое повреждение хряща плечевого сустава, посттравматическое повреждение хряща тазобедренного сустава, посттравматическое повреждение хряща локтевого сустава или другое повреждение хрящевой ткани, такое как остеоартрит.

Термин "боль, ассоциированная с остеоартритом" относится к боли, ассоциированной с посттравматическим остеоартритом, боли при остеоартрите коленного сустава, костно–хрящевым дефектом или похожими нарушениями.

Термин "фармацевтически приемлемый эксципиент" относится к фармацевтически приемлемому носителю, раствору или добавке для состава для улучшения характеристик состава. Такие эксципиенты должны быть совместимыми с другими ингредиентами состава и не приносить вред его реципиенту, и они хорошо известны специалистам в этой области, см., например, Remingtons Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, Mack Publishing Company, 1995.

Стабильный состав является составом, в котором белок остается растворимым в течение длительного периода времени в условиях хранения.

Сульфатированные полисахариды являются соединениями, состоящими из двух или более единиц сахаридов, содержащими один или более участков сульфатирования на единицу сахараида. Примеры сульфатированных полисахаридов включают гепарин, гепарин сульфат, декстран сульфат, октасульфат сахарозы, сульфатированный β -циклодекстрин, мио–инозитол гексасульфат, пентозан полисульфат, фукоидан, хондроитин сульфат А, хондроитин сульфат В, хондроитин сульфат С и их производные.

Активность или специфическая активность представляют собой измерение относительной активности вариантов белка BMP7 человека, включая варианты белка по настоящему изобретению, и их можно измерять посредством анализа клеток MFc7, представленного, например, в настоящем описании ниже в примере 5. В целом, относительную активность сравнивают со зрелым BMP7 дикого типа человека для

получения относительной активности варианта белка ВМР7 человека.

Термины "растворимый" или "растворимость" относятся к снижению или относительному отсутствию агрегированного белка, определяемому посредством анализа агрегации, такого как анализ, представленный в настоящем описании в примере 6. Растворимость также является мерой физической стабильности варианта белка ВМР7, которую можно измерять в анализе термического разворачивания, по существу, как описано в примере 7.

Термины "индивидуум" или "пациент" в настоящем описании используют взаимозаменяемо, и все из них относятся к млекопитающему, включая, в качестве неограничивающих примеров, Мышиных, Обезьянообразных, людей, сельскохозяйственных млекопитающих (т.е. овец и т.д.), спортивных млекопитающих (т.е. лошадей) и млекопитающих-питомцев (т.е. собак или кошек), предпочтительно, термин относится к людям. В некоторых вариантах осуществления индивидуум, предпочтительно человек, дополнительно отличается заболеванием, или нарушением, или состоянием, при котором он может получать пользу от лечения с помощью варианта белка ВМР7 человека по настоящему изобретению.

В рамках изобретения с помощью термина "лечение" описывают ведение пациента в целях борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением, и он включает введение фармацевтической композиции по настоящему изобретению для уменьшения симптомов или осложнений, или устранения заболевания, состояния или нарушения.

Фраза "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного средства, необходимому для того, чтобы принести терапевтическую пользу пациенту.

Терапевтически эффективное количество является количеством активного средства, необходимым для принесения терапевтической пользы пациенту. Например, терапевтически эффективное количество, вводимое пациенту-человеку, нуждающемуся в лечении повреждения и дегенерация хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости, является таким количеством, которое индуцирует, улучшает или иным образом вызывает улучшение патологических симптомов, прогрессирования заболевания или физиологических условий, ассоциированных с повреждением и дегенерацией хрящевой ткани, болью, ассоциированной с остеоартритом, или регенерацией/сращением кости. Кроме того, терапевтически эффективное количество варианта белка ВМР7 человека по настоящему изобретению является количеством, вводимым пациенту-человеку, нуждающемуся в лечении злокачественного новообразования, являющимся количеством, которое у млекопитающих, предпочтительно людей, снижает количество злокачественных клеток; уменьшает размер опухоли; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени или прекращает) инфильтрацию злокачественными клетками периферических тканей и органов; ингибирует (т.е. замедляет до некоторой степени или прекращает) метастазирование опухоли; ингибирует до некоторой степени рост опухоли; и/или облегчает до некоторой степени один или более

симптомов, ассоциированных со злокачественными новообразованиями. Эффективное количество варианта белка ВМР7 человека по изобретению можно вводить в однократной дозе или многократных дозах. Кроме того, эффективное количество варианта белка ВМР7 человека по изобретению можно вводить во множестве доз количеств, которые будут меньше эффективного количества, если их вводят неоднократно.

Как известно в области медицины, дозы для любого индивидуума зависят от множества факторов, включая массу тела пациента, площадь поверхности тела, возраст, конкретное соединение, подлежащее введению, пол, время и путь введения, общее состояние здоровья и другие лекарственные средства, вводимые одновременно. Доза может дополнительно варьироваться в зависимости от типа и тяжести заболевания. Типичная доза варианта белка ВМР7 человека по настоящему изобретению может находиться, например, в диапазоне от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг; предпочтительно – от приблизительно 50 мг до приблизительно 500 мг; более предпочтительно – от приблизительно 200 мг до приблизительно 500 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 200 мг до приблизительно 400 мг, даже более предпочтительно – от приблизительно 200 мг до приблизительно 300 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 225 мг до приблизительно 275 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 250 мг до приблизительно 275 мг; однако предусмотрены дозы ниже или выше этих примеров диапазонов, в частности, с учетом указанных выше факторов. Суточный парентеральный режим дозирования может представлять собой от приблизительно 250 мкг/кг до приблизительно 10 мг/кг. С помощью периодической оценки можно осуществлять мониторинг прогрессирования и, таким образом, корректировать дозу.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения для лечения злокачественного новообразования у взрослого пациента однократную дозу белка ВМР7 человека по настоящему изобретению можно вводить внутривенно. Типичная однократная доза для внутривенного введения варианта белка ВМР7 человека по настоящему изобретению может составлять, например, в диапазоне от приблизительно 10 мг до приблизительно 1000 мг; предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 500 мг; более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 500 мг; более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 400 мг; более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 350 мг; более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 300 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 275 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 250 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 200 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 175 мг; даже более предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 150 мг; или наиболее предпочтительно – от приблизительно 10 мг до приблизительно 125 мг; однако предусмотрены дозы ниже или выше этих примеров

диапазонов, в частности, с учетом указанных выше факторов.

Альтернативно, типичная однократная доза для внутривенного введения варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению может составлять, например, от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 15 мг/кг массы тела; более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг; даже более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 7,5 мг/кг; даже более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 5 мг/кг; даже более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 4 мг/кг; даже более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 3 мг/кг; даже более предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 2,5 мг/кг; или наиболее предпочтительно – от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 2 мг/кг. Такие дозы можно вводить внутривенно, например, раз в неделю, раз в две недели, раз в три недели или раз в месяц. Прогрессирование можно подвергать мониторингу посредством периодической оценки и, таким образом, корректировать дозу.

Эти предполагаемые количества варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению в значительной степени являются предметом терапевтического решения. Ключевым фактором при выборе подходящей дозы и схемы является получаемый результат. Рассматриваемые факторы в этом контексте включают конкретное нарушение, подвергаемое лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причина нарушения, участок для доставки белка, конкретный тип формы белка (например, вариант белка про-BMP7 или вариант зрелого белка BMP7), способ введения, схема введения и другие факторы, известные медицинским сотрудникам.

Белок BMP7 человека является секретируемой сигнальной молекулой из суперсемейства TGF-бета, и исходно был идентифицирован по своей способности индуцировать образование костной ткани, но позднее его стали считать многофункциональным цитокином, опосредующим рост и дифференцировку множества разных типов клеток. Белок BMP7 человека экспрессируется в клетках в виде белка-предшественника размером 292 аминокислоты, и зрелый, биологически активный BMP7 образуется посредством протеолитического расщепления сигнального пептида и про-пептида. Аминокислотная последовательность белка BMP7 дикого типа человека, содержащая сигнальный пептид (первые 29 аминокислоты), про-домен и зрелый пептид (подчеркнут), приведена как SEQ ID NO: 1:

MHVRSRLRAAAPHSFVALWAPLFLRLSALADFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREM
 QREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLDLYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFST
 QGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHDKEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAA
 EFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGRESDFLLDSRTLWASEEGWL VFDITATSN
 HWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAGLIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFERSIR
STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDORQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIA
PEGYAAAYCEGECAPPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFD
DSSNVILKKYRNMVVRACGCH (SEQ ID NO: 1). Специалистам в этой области следует

понимать, что сигнальный пептид можно удалять посредством протеолитического расщепления, получая интактный про-домен/зрелый пептид, обозначаемый как про-BMP7.

Зрелый BMP7 дикого типа человека является димером двух гликозилированных гомодимерных белков размером 139 аминокислот, соединенных дисульфидными связями, массой приблизительно 35 кДа. Каждый гомодимерный белок имеет аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2:

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAAYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVVPKPCCAPTQLNAIS
VLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH (SEQ ID NO: 2).

Варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению включают варианты зрелого BMP7 человека SEQ ID NO: 2, при этом конкретные измененные положения аминокислот указаны в консенсусной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 3. Конкретные варианты зрелого белка BMP7 человека по настоящему изобретению имеют повышенную специфическую активность, улучшенные характеристики растворимости, улучшенную биодоступность, сниженное связывание с эндогенными циркулирующими ингибиторами и/или сниженную активность EBF по сравнению со зрелым белком BMP7 дикого типа человека.

Предпочтительные варианты белка BMP7 человека выбраны из группы, состоящей из F93V/N110G, приведенного в SEQ ID NO: 4; Y65G/I86L/T89A/N110G, приведенного в SEQ ID NO: 5; Y65G/I86L/N110G/Y128F, приведенного в SEQ ID NO: 6; Y65G/I86L/N110G/Y128W, приведенного в SEQ ID NO: 7; Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W, приведенного в SEQ ID NO: 8; Y65G/T89A/N110G/Y128F, приведенного в SEQ ID NO: 9; Y65G/I86L/N110G, приведенного в SEQ ID NO: 10, и Y65G/V114M, приведенного в SEQ ID NO: 11. Наиболее предпочтительные варианты BMP7 по настоящему изобретению выбраны из группы, состоящей из Y65G/I86L/N110G/Y128W (SEQ ID NO: 7) и Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W (SEQ ID NO: 8).

Настоящее изобретение также относится к вариантам пре-BMP7 человека (т.е. SEQ ID NO: 1), а также вариантам про-BMP7 человека (т.е. SEQ ID NO: 21). Предпочтительные варианты про-BMP7 человека по настоящему изобретению, содержащие про-домен, слитый с N-концом варианта зрелого белка BMP7 человека, выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

Варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению можно синтезировать с помощью рекомбинантных организмов, сконструированных способами, хорошо известными в этой области, или альтернативно, с помощью химического синтеза. Таким образом, другие варианты осуществления изобретения относятся к полинуклеотидам, кодирующим варианты белка BMP7 человека. Другим вариантом осуществления является вектор, содержащий указанный полинуклеотид, и клетка-хозяин, несущая указанный

вектор. Другой вариант осуществления относится к способам получения белка посредством культивирования клеток-хозяев, несущих указанный вектор, содержащий ДНК, кодирующую указанный белок, экспрессии указанного белка в клетках-хозяевах и выделения белка из сред для культивирования.

Полинуклеотиды, кодирующие вариант ВМР7 человека по настоящему изобретению, могут включать следующее: только кодирующую последовательность варианта зрелого белка ВМР7 человека, кодирующую последовательность варианта и дополнительную кодирующую последовательность, такую как функциональный белок, или сигнальную или секреторную последовательность или последовательность про-домена; кодирующую последовательность варианта зрелого белка ВМР7 человека и некодирующую последовательность, такую как интроны или 5'- и/или 3'-некодирующая последовательность, относительно кодирующей последовательности для варианта. Таким образом, термин "полинуклеотид, кодирующий вариант" включает полинуклеотид, который может включать не только кодирующую последовательность варианта зрелого белка ВМР7 человека, но также и полинуклеотид, включающий дополнительную кодирующую и/или некодирующую последовательность. В этой области известно, что полинуклеотидную последовательность, оптимизированную для конкретной клетки-хозяина/системы экспрессии, легко можно получать из аминокислотной последовательности желаемого белка. Примерами полинуклеотидов по настоящему изобретению являются SEQ ID NO: 19 и SEQ ID NO: 20, являющиеся последовательностями ДНК, кодирующими формы пре-ВМР7 вариантов зрелых белков ВМР7 человека, приведенные в SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8, соответственно.

Полинуклеотиды по настоящему изобретению экспрессируют в клетке-хозяине, после того как последовательности функционально связывают с последовательностью для контроля экспрессии. Эти экспрессирующие векторы, как правило, могут реплицироваться в организмах-хозяевах в виде эписом или интегральной части хромосомной ДНК организма-хозяина. В основном, экспрессирующие векторы содержат селективные маркеры, например, гены резистентности к тетрациклину и неомицину и/или дигидрофолатредуктаза, для осуществления детекции этих клеток, трансформированных с использованием желаемых последовательностей ДНК. Векторы, содержащие интересующие полинуклеотидные последовательности (например, варианты белка ВМР7 и последовательности контроля экспрессии), переносят в клетку-хозяина хорошо известными способами, варьирующимися в зависимости от типа клетки-хозяина.

Варианты белка ВМР7 человека по настоящему изобретению легко можно получать в клетках млекопитающих, таких как клетки CHO, NS0, HEK293 или COS, в бактериальных клетках, таких как *E. coli* или *Pseudomonas fluorescens*, или в клетках грибов или дрожжевых клетках. Предпочтительно, клетка-хозяин является клеткой млекопитающего. Предпочтительной клеткой млекопитающего является клетка CHO. Клетки-хозяева культивируют способами, хорошо известными в этой области.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к вектору,

содержащему ген пре-ВМР7, ген про-ВМР7 или ген зрелого ВМР7 и экспрессирующему его в организме-хозяине. Ген ВМР7, кодирующий белок пре-ВМР7, белок про-ВМР7 или зрелый белок ВМР7, можно получать из млекопитающего. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор может содержать полинуклеотид, кодирующий вариант пре-ВМР7 человека, вариант про-ВМР7 человека или вариант зрелого белка ВМР7 человека. Полинуклеотид, кодирующий эти варианты белка ВМР7 человека, можно функционально связывать с промотором и, необязательно, энхансером.

В некоторых вариантах осуществления изобретение относится к клетке-хозяину млекопитающего, несущей вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариант белка пре-ВМР7 человека, вариант белка про-ВМР7 человека или вариант зрелого белка ВМР7 человека, где в варианте белка про-ВМР7 deletирован "пре-" или "сигнальный" пептид на N-конце. Предпочтительно, клетка-хозяин млекопитающего несет вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий экспрессию варианта зрелого белка ВМР7 человека, имеющего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 3-11, или его пре- или про-формы. Более предпочтительно, клетка-хозяин млекопитающего несет вектор, содержащий полинуклеотид, кодирующий экспрессию варианта белка про-ВМР7 человека, имеющего аминокислотную последовательность любой из SEQ ID NO: 12-16, или его пре-форму. В некоторых вариантах осуществления последовательность "пре-" или "сигнального" пептида иного происхождения подвергают слиянию с N-концом варианта белка про-ВМР7 человека. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения последовательность "пре-" или "сигнального" пептида, например, может являться сигнальной последовательностью инсулиноподобного фактора роста 1 (IGF-1) или тканевого активатора плазминогена (tPA).

Можно использовать различные способы очистки белка, такие способы известны в этой области и описаны, например, в *Protein Purification: Principals, High Resolution Methods, and Applications*, 2nd Edition, Wiley-VCH Inc. (Germany, 1998).

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению можно получать общепринятыми способами растворения и смешивания. Специалисту в области фармацевтики будет понятно, что порядок добавления медицински полезного белка, осмолита и гидрофобного консерванта, можно варьировать, не мешая эффективности состава. Для дальнейшего улучшения биодоступности фармацевтических композиций по настоящему изобретению, можно использовать стратегии таргетинга для удержания вариантов белка ВМР7 человека в суставной полости. Они включают составление в лактозном буфере или способы инкапсуляции для физического удержания молекул в суставной полости (например, гидрогель, наночастицы, липосомы) или таргетинг к белкам во внеклеточном пространстве, включающим, в качестве неограничивающих примеров, коллагены (типа I и II) или интегрин. Для сращения кости вариант белка ВМР7 человека по настоящему изобретению можно смешивать с носителями, такими как коллаген типа I.

Термин "гидрофобный консервант" относится к гидрофобному соединению, которое можно добавлять в фармацевтический состав для противомикробного действия.

Примерами гидрофобных консервантов, приемлемых для парентеральных составов, являются алкилпарабены, феноловые консерванты, т.е. фенол и крезол, бензиловый спирт, хлорбутанол, бензойная кислота и различные их смеси.

В настоящем описании ссылка на белок BMP7 дикого типа человека или его вариант, включая ссылку на SEQ ID NO или уникальный референсный код (например, "F9"), относится к его гомодимеру. В качестве неограничивающего примера, в рамках изобретения термин "вариант зрелого белка BMP7 человека F9 (SEQ ID NO: 8)" или, взаимозаменяемо, "вариант F9 белка BMP7" или т.п., относится к гомодимеру, где каждая мономерная субъединица имеет последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, и субъединицы соединены дисульфидными связями.

В случае функциональных анализов, представленных в настоящем описании ниже, термин "обработка или введение" конкретного белка про-BMP7 или его варианта относится к обработке или введению гомодимеров конкретного зрелого BMP7 человека, т.е. белка дикого типа или его варианта, как правило, находящегося в нековалентном комплексе с про-доменом дикого типа человека.

Термин "крезол" относится к мета-крезолу, орто-крезолу, пара-крезолу, хлорокрезолу или их смесям. Термин "изотоническое средство" относится к соединению, являющемуся физиологически переносимым и придающим составу подходящую тоничность для предотвращения потока воды через клеточные мембраны. Примерами изотонических средств являются глицерин, соли, например, NaCl, KCl, и сахара, например, декстроза, маннит и сахароза.

Осмолиты являются соединениями, обладающими способностью стабилизировать белки, противодействуя денатурации и агрегации. Примеры осмолитов включают аминокислоты, полиспирты (например, сорбит, маннит, ксилит и глицерин), сахара, сахарные спирты, сахарные кислоты и т.п. Предпочтительные осмолиты включают гистидин, соли гистидина, глицин, соли аспарагиновой кислоты, соли глутаминовой кислоты, соли лизина, соли аргинина, серин, пролин и аланин. Предпочтительным осмолитом является аргинин. Предпочтительно, концентрация аргинина будет составлять приблизительно от 100 мМ до 1 М; более предпочтительно – от приблизительно 125 мМ до приблизительно 800 мМ; еще более предпочтительно – от приблизительно 200 мМ до приблизительно 500 мМ; и наиболее предпочтительно – приблизительно 250 мМ.

Предпочтительный гидрофобный консервант выбран из группы, состоящей из фенола, m-крезола, метилпарабена, пропилпарабена, бензилового спирта, хлорокрезола и их смесей.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению, необязательно, могут содержать другие соединения в дополнение к медицински полезному белку, гидрофобному консерванту и осмолиту. Например, для снижения агрегации в состав, необязательно, можно добавлять фармацевтически приемлемые поверхностно-активные вещества, подобные Tween 20 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонолаурату), Tween 40 (полиоксиэтилен (20) сорбитанмонопальмитату), Tween 80 (полиоксиэтилен (20)

сорбитанмоноолеату), Плюроник F68 (полиоксиэтилен полиоксипропиленгликолю) и PEG (полиэтиленгликолю). Эти добавки являются особенно пригодными, если для введения состава используют насос или пластиковый контейнер. Фармацевтически приемлемое поверхностно-активное вещество может дополнительно снижать агрегацию белка.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать сульфатированный полисахарид. Предпочтительный сульфатированный полисахарид выбран из группы, состоящей из гепарина, гепарин сульфата и декстран сульфата.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать водный буфер. Буферы, подходящие для настоящего изобретения, являются буферами, имеющими рН-буферную способность в диапазоне от приблизительно рН 6 до приблизительно рН 8 и совместимыми с высушенным белком. рН раствора состава составляет от приблизительно 6,5 до приблизительно 7,5. Более предпочтительно – от 6,8 до приблизительно 7,5. Еще более предпочтительно, рН составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 7,4.

Типичные буферные системы для поддержания эффективного контроля рН включают Трис-ацетат, цитрат натрия, цитрат калия, цитрат-глицин и фосфат натрия. Более предпочтительные буферные системы включают цитрат натрия и фосфат натрия. Наиболее предпочтительным буфером является цитрат натрия. Предпочтительная концентрация буферной системы составляет от приблизительно 1 мМ до приблизительно 50 мМ. Более предпочтительная концентрация составляет от приблизительно 5 мМ до приблизительно 30 мМ. Наиболее предпочтительная концентрация составляет приблизительно 10 мМ. Специалистам в этой области понятно, что доступно множество других буферных систем, которые также можно использовать для поддержания рН в предпочтительном диапазоне.

Кроме того, в растворимую, фармацевтическую композицию/состав, необязательно, можно добавлять изотоническое средство, предпочтительно – NaCl или KCl. Наиболее предпочтительно, изотоническим средством является NaCl. Концентрация изотонического средства находится в диапазоне, известном в этой области для парентеральных составов, предпочтительно – от приблизительно 100 мМ до приблизительно 250 мМ, более предпочтительно – от приблизительно 125 мМ до приблизительно 200 мМ, и еще более предпочтительно – приблизительно 150 мМ.

Фармацевтические композиции вариантов белка BMP7 человека по настоящему изобретению можно вводить любыми способами, известными в этой области, с помощью которых, как правило, достигают запланированной цели лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерация хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости.

Предпочтительным путем введения является парентеральный путь, определяемый в настоящем описании со ссылкой на способы введения, включающие, в качестве неограничивающих примеров, внутрисуставную, внутривенную, внутримышечную, интраперитонеальную, подкожную инъекцию и инфузию. Наиболее предпочтительно,

парентеральное введение вариантов белка BMP7 человека по настоящему изобретению осуществляют посредством внутрисуставного введения в суставную полость для регенерации хряща или по причине боли при ОА.

Вводимая доза будет зависеть от возраста, состояния здоровья и массы тела реципиента, типа сопутствующего лечения, если оно есть, частоты лечения и природы желаемого эффекта. Типичные уровни доз можно оптимизировать стандартными клиническими способами, и они будут зависеть от способа введения и состояния пациента.

Таким образом, вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости у нуждающегося в этом индивидуума посредством введения терапевтически эффективного количества варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению. Индивидуум представляет собой млекопитающего, предпочтительно – человека.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения повреждения и дегенерации хрящевой ткани или боли, ассоциированной с остеоартритом, у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение терапевтически эффективного количества варианта BMP7 человека по настоящему изобретению, где указанное млекопитающее выбрано из группы, состоящей из человека, собаки, лошади, кошки или овцы.

Другим вариантом осуществления настоящего изобретения является способ лечения сращения кости у нуждающегося в этом млекопитающего, включающий введение терапевтически эффективного количества варианта BMP7 человека по настоящему изобретению, где указанное млекопитающее выбрано из группы, состоящей из человека, собаки, лошади, кошки или овцы.

Учитывая подробное описание настоящего изобретения, оно будет более понятным из следующих примеров, включенных в настоящее описание исключительно в иллюстративных целях, осуществленных, по существу, как описано, и не предназначенных для ограничения изобретения.

Сокращения (неисчерпывающий список):

АТРА: Полностью транс–ретиноевая кислота

BMP7: Морфогенетический белок кости 7

DMSO: Диметилсульфоксид

EGF: Эпидермальный фактор роста

PBS: Фосфатно–солевой буфер

PNPP: p–нитро–фенил фосфат, динатриевая соль

VEGF: Фактор роста эндотелия сосудов

WT: дикий тип

Пример 1

Способы экспрессии

Белки BMP7 человека и варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению можно получать посредством культивирования клетки-хозяина, трансформированной с использованием экспрессирующего вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, кодирующую белок BMP7 человека или его вариант, в соответствующих условиях для индуцирования экспрессии белка BMP7 человека или его варианта. Можно использовать способы транзиторной или стабильной трансфекции. Условия, подходящие для экспрессии белков BMP7 или их вариантов, можно варьировать в отношении выбора экспрессирующего вектора и клетки-хозяина, и специалист в этой области может определять их посредством рутинного экспериментирования.

Пример 2

Стимуляция RAR альфа и RAR гамма с помощью BMP7

Фибробласты 3T3-L1 и миофибробласты почки мыши MFc7 можно поддерживать в условиях рутинного культивирования клеток в среде DMEM/10% телячьей сыворотке или среде OPTI-MEM/10%FBS, соответственно. Клетки можно высевать на планшеты для культивирования тканей 10 см при плотности посева 500000 клеток/планшет. Через 48 часов клетки можно промывать PBS перед добавлением среды DMEM/2% диализованной FBS или OPTI-MEM/2% диализованной FBS, содержащей 1 мкг/мл белка BMP7 человека или 1 мкг/мл варианта белка BMP7 человека. Клетки можно инкубировать в течение 48 часов, а затем промывать ледяным PBS, а затем лизировать реагентом для экстракции белка. Затем лизаты можно центрифугировать при 14000×g в течение 15 минут. Для определения концентрации белка в каждом лизате можно осуществлять анализ Бредфорда. Равные количества белка (например, 25 мкг) можно разрешать посредством электрофореза в ПААГ в присутствии SDS, а затем переносить на нитроцеллюлозные мембраны для анализа вестерн-блоттинга. Мембраны можно анализировать с использованием антитела против RAR альфа и/или антитела против RAR гамма.

В экспериментах, осуществляемых, по существу, как описано выше в этом примере 2, интенсивность вестерн-блоттинга свидетельствовала о том, что при использовании линий клеток MFc7 и 3T3-L1 белок BMP7 человека и варианты белка BMP7 человека, включая вариант белка BMP7 человека F9, стимулировали экспрессию белка RAR альфа и RAR гамма (данные не представлены). Таким образом, RAR-альфа и RAR-гамма, по-видимому, вовлечены в основной путь передачи сигнала BMP7.

Пример 3

Комбинированная обработка белками BMP7 человека и ATRA клеток 3T3-L1 и MFc7

Фибробласты 3T3-L1 и миофибробласты почки мыши MFc7 можно выращивать, по существу, как описано в примере 2 выше. Через 48 часов клетки можно промывать PBS перед добавлением среды DMEM/2% диализованной FBS или OPTI-MEM/2% диализованной FBS, содержащей контрольный носитель, и можно добавлять 1 мкг/мл белка про-BMP7 человека, 1 мкМ ATRA или комбинации белка BMP7 человека (1 мкг/мл) и ATRA (1 мкМ) на 48 часов. После обработки клетки можно промывать PBS и

держат при -80°C в течение приблизительно 20 минут. Клетки можно размораживать при 37°C в течение 30 минут и в каждую лунку можно добавлять 100 мкл PNPP. Планшет можно инкубировать при 37°C в течение 1 часа. Можно определять поглощение при 405 нм с помощью спектрофотометра для чтения планшетов.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 3, комбинированная обработка белком про-BMP7 дикого типа человека и ATRA приводила к синергической стимуляции щелочной фосфатазы. Данные, представленные в таблице 1, представляют собой кратное изменение стимуляции щелочной фосфатазы относительно клеток, обработанных контрольным носителем.

Таблица 1

Обработка	3T3-L1	MFc7
Контроль	1,0	1
Про-BMP7 дикого типа человека	1,2	21
ATRA	2,9	8
Комбинация	12,4	103

Пример 4

Экспрессия SOX2 и Ki67 в клетках GBM, обработанных вариантом белка BMP7 человека в комбинации с ATRA

SOX2 является фактором транскрипции, экспрессируемым нервными стволовыми клетками. Его экспрессия утрачивается при дифференцировке клеток. Таким образом, SOX2 считают маркером терминальной дифференцировки мультипотентных опухолевых клеток головного мозга.

Ki67 является ядерным белком, экспрессирующимся в пролиферирующих клетках. Он преимущественно экспрессируется в поздней G1-, S-, G2- и M-фазах клеточного цикла, и клетки в G0 или покоящиеся клетки являются отрицательными по этому белку. Быстрорастущие линии клеток имеют высокую процентную долю Ki67-положительных клеток. Экспрессия Ki67 снижается или утрачивается с дифференцировкой клеток, что является показателем того, что рост замедляется, т.к. популяция клеток становится терминально дифференцированной.

Получение культуры стволовых клеток глиобластомы:

Стволовые клетки мультиформной глиобластомы (GBM) можно получать из пациентов с примитивными опухолями головного мозга, подвергаемыми полной или частичной хирургической резекции. Эти клетки можно поддерживать в виде нейросфер в определенных средах с 3,34 г/л DMEM и 2,66 г/л F12, восстановленных в стерильной дистиллированной воде и содержащих 1% глюкозу, 0,12% бикарбоната натрия, 5 мМ NEPES, 2 мМ L-глутамин, 4 мг/л гепарина, 10 нг/мл bFGF, 20 нг/мл EGF, 0,4% BSA, 100 мкг/мл апотрансферрина, 25 мкг/мл инсулина, 60 мкМ путресцина, 30 нМ селенита натрия и 20 нМ прогестерона. Клетки можно культивировать при 37°C в 5% CO_2 . Клетки можно высевать, ферментативно разъединяя сферы на отдельные клетки с использованием 2–5–

минутной инкубации при 37°C с ферментом для диссоциации клеток TrypLE™ Express. Фермент можно гасить фосфатно-солевым буфером Дульбекко (DPBS), содержащим Ca⁺ и Mg⁺. Затем клетки можно центрифугировать для удаления TrypLE и DPBS, ресуспендировать в виде отдельных клеток в определенных средах и подсчитывать с помощью устройства Coulter Z2 Cell and Particle counter.

Эксперимент:

Отдельные клетки GBM можно высевать в определенные среды в количестве 2×10^6 клеток/15 мл/флакон T75 для одновременного многопараметрического анализа или 5×10^5 клеток/2 мл/лунку в 6-луночных планшетах для световой микроскопии. Клетки можно обрабатывать 0,01% DMSO, 1 мкг/мл ATRA, 100 нг/мл варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению (например, варианта F9 белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8)) или комбинацией 1 мкг/мл ATRA и 100 нг/мл варианта белка BMP7 человека по настоящему изобретению. Для световой микроскопии для визуализации эффекта контрольных BMP (BMP2 и BMP4) клетки можно высевать, как указано выше, в 6-луночные планшеты и обрабатывать 0,01% DMSO, 1 мкг/мл ATRA, 100 нг/мл BMP2, 50 нг/мл BMP4 или комбинацией BMP в тех же концентрациях с 1 мкг/мл ATRA. Примеры изображений можно получать через 3, 7 и 30 дней после обработки, например, с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIRM с использованием объектива 20X. В случае выращивания в течение более чем 7 дней среды и обработку можно менять приблизительно каждые 10 дней, начиная со дня 10.

После сбора среды, содержащей свободно плавающие нейросферы, для каждой условий сферы можно осаждать и инкубировать с TrypLE для диспергирования на отдельные клетки, как описано в Получении 2, в то время как прикрепленные клетки для каждой условий можно откреплять с использованием TrypLE, а затем добавлять обратно к диспергированным нейросферам. Клетки можно высевать на покрытые поли-D-лизинном 96-луночные планшеты при плотности 5000–10000 клеток/лунку в 100 мкл определенных сред. Клетки снова можно обрабатывать 0,01% DMSO, ATRA, белком BMP7 человека или комбинацией двух из указанных выше и инкубировать еще в течение 48 часов при 37°C в 5% CO₂. Клетки можно фиксировать 3,7% формальдегидом в течение приблизительно 20 минут. Все разведения и промывки можно осуществлять с использованием PBS. Клетки можно пермеабелизовать с помощью 0,1% Triton X-100 (октилфенилового простого эфира полиэтиленгликоля) в течение приблизительно 10 минут при 25°C, а затем промывать. Клетки можно блокировать в течение 1 часа в 1% бычьим сывороточном альбумине (BSA), а затем инкубировать в течение ночи с 2 мкг/мл моноклонального антитела мыши против SOX-2 в 1% BSA или моноклональным антителом кролика против Ki67, разведенным 1:500 в 1% BSA. Клетки можно дополнительно промывать (например, дважды), а затем инкубировать в течение приблизительно одного часа с IgG козы против мыши с Alexa-488 или IgG козы против кролика с Alexa-488 и 200 нг/мл Hexst 33342, разведенного в 1%-ном растворе BSA. Клетки снова можно промывать (например, дважды) и получать изображения клеток с использованием ArrayScan Vti (Cellomics,

Pittsburgh, Pennsylvania) с объективом 10X. Двухканальный анализ можно осуществлять с использованием анализа Target Activation Bioapplication.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 4, клетки GBM (1000–2000 клеток на условие) обрабатывали контрольным носителем, вариантом белка про-BMP7 человека в отдельности, ATRA в отдельности или комбинацией варианта белка про-BMP7 человека и ATRA. Значения нормализовали по контрольному носителю, и они отражали процент ответа в популяции клеток. Данные, приведенные в таблице 2, соответствуют обработке двух разных клонов клеток GBM, CL-61 и CL-1. В кратком изложении, в день 3 наблюдали четкое синергическое действие в CL-61 при использовании комбинированной обработки вариантом F9 белка про-BMP7 человека и ATRA маркеров SOX2 и Ki67, что свидетельствует о том, что стволовые клетки GBM находятся в терминально дифференцированном, доброкачественном состоянии. Схожее синергическое действие наблюдали при использовании маркера SOX2 на CL-1, но при считывании в день 25 вместо дня 3, как в случае С61. Эти данные иллюстрируют вариабельность роста и дифференциальный ответ на средства дифференцировки стволовых клеток GBM, но что более важно, они демонстрируют неожиданное синергическое действие комбинированной обработки вариантом белка BMP7 человека F9 и ATRA в отношении биомаркеров терминальной дифференцировки мультипотентных опухолевых клеток головного мозга.

Таблица 2

		CL-61 День 3	CL-1 День 3	CL-1 День 25
SOX2	Контрольный носитель	100	100	100
	АТРА (1 мкг/мл)	89	97	97
	Вариант F9 про-BMP7 (100 нг/мл)	84	100	72
	Комбинация	19	94	38
Ki67	Контрольный носитель	100	100	100
	АТРА (1 мкг/мл)	83	99	101
	Вариант F9 про-BMP7 (100 нг/мл)	69	88	78
	Комбинация	39	66	76

Неожиданно, комбинация варианта белка про-BMP7 человека (т.е. F9) с АТРА приводила к значительному синергическому действию с учетом утраты SOX2, как указано в отношении обработки стволовых клеток глиобластомы.

Пример 5

Характеризация вариантов белка BMP7 с использованием биологического анализа MFc7

Миофибробласты почки мыши MFc7 (линию фибробластов почки мыши) можно поддерживать в условиях рутинного культивирования клеток в среде OPTI-MEM/10%

FBS. Клетки можно высевать в планшеты для культивирования тканей 10 см при плотности посева 500000 клетки/планшет. Через приблизительно 48 часов клетки можно промывать фосфатно-солевым буфером (PBS) перед добавлением среды OPTI-MEM/2% диализованной эмбриональной телячьей сыворотки (FBS), содержащей 1 мкг/мл белка BMP7 или 1 мкг/мл варианта белка BMP7, и инкубировать в течение 48 часов. После обработки клетки можно промывать PBS и держать при -80°C в течение 20 минут. После размораживания клеток при 37°C в течение 30 минут можно добавлять 100 мкл пара-нитрофенилфосфата (PNPP). Планшет можно инкубировать при 37°C в течение 1 часа. Поглощение при 405 нм можно считывать с использованием спектрофотометра для чтения планшетов. С помощью таких считываний можно вычислять среднюю относительную активность (EC_{50} белка BMP7 дикого типа/ EC_{50} варианта белка BMP7) некоторых вариантов белка BMP7 человека по настоящему изобретению.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 5, различные варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению имеют повышенную среднюю относительную активность или специфическую активность относительно соответствующего белка BMP7 дикого типа человека. Более конкретно, повышение средней относительной активности или специфической активности относительно BMP7 дикого типа человека для различных вариантов белка BMP7 человека с множеством изменений положений аминокислот приведено в таблице 3, в то время как в таблице 4 приведена активность различных вариантов белка BMP7 человека с одиночными изменениями положений аминокислот. Эти данные свидетельствуют о том, что некоторые варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению имеют повышенную среднюю относительную активность или специфическую активность относительно соответствующего белка BMP7 дикого типа человека.

Таблица 3

Вариант белка BMP7 человека	SEQ ID NO:	Название варианта белка BMP7 человека	Средняя относительная активность
F93V/N110G	SEQ ID NO: 4		9
Y65G/I86L/T89A/N110G	SEQ ID NO: 5		10
Y65G/I86L/N110G/Y128F	SEQ ID NO: 6		7
Y65G/I86L/N110G/Y128W	SEQ ID NO: 7		16
Y65G/I86L/F93V/N110G/Y128W	SEQ ID NO: 8	F9	69
Y65G/T89A/N110G/Y128F	SEQ ID NO: 9		6,2
Y65G/I86L/N110G	SEQ ID NO: 10		8,7
Y65G/V114M	SEQ ID NO: 11		5,0

Таблица 4

Вариант белка BMP7 человека	Средняя относительная
-----------------------------	-----------------------

(SEQ ID NO: 2, содержащая мутации отдельных аминокислот, приведенные здесь)	активность
D33M	3,3
A37P	7,5
E60Q	5,5
Y65G	1,3
I86L	5,9
I86V	17,4
T89A	3
V91M	3,3
F93V	16
I94F	7,5
N110G	1,7
V114M	9,4

Пример 6

Анализ растворимости белка BMP7 человека и вариантов белка BMP7 человека

Растворимость/физическую стабильность белка BMP7 человека и вариантов белка BMP7 человека можно измерять в анализе вызываемой перемешиванием агрегации. Белки разводили до 40 мкг/мл буфером для анализа (50 мМ фосфата натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4) до общего объема 2 мл. Этот раствор можно помещать в стеклянный флакон объемом 7 мл, содержащий магнитную мешалку с одним стержнем, и перемешивать при 400 об./мин. при комнатной температуре. Через определенные промежутки времени (как правило, 0, 30, 60, 90, 120 и 150 минут) можно отбирать аликвоты 150 мкл и центрифугировать их в течение 2 минут при 16000×g в пробирке объемом 1,5 мл. Супернатант (120 мкл) можно переносить в емкость для ВЭЖХ и можно определять количество оставшегося белка посредством обращенно-фазовой ВЭЖХ в следующих условиях: колонка Zorbax C8 SB-300® (3,5 мкм, 4,6×50 мм), подвижная фаза: буфер А=0,1% TFA (об./об.) в воде, буфер В=0,085% TFA (об./об.) в ацетонитриле; скорость потока 1 мл/минуту; нагрев колонки до 60°C; охлаждение автосемплера до 10°C, детекция УФ при 214 нм, инъецируемый объем 80 мкл и время прогона 20 минут с использованием линейного градиента, указанного ниже. Используя хроматограммы ВЭЖХ (не представлены), интегрировали пик или пики белка (например, зрелый и про-домены), и можно вычислять процент изменения относительно исходной площади пика.

Как показано в таблице 5 ниже, зрелый BMP7 дикого типа человека является нерастворимым с момента начала анализа. В отличие от него, вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (т.е. SEQ ID NO: 8) является значимо более растворимым, даже в момент

времени 150 минут. Таким образом, вариант F9 белка BMP7 (т.е. SEQ ID NO: 8) имеет значимо улучшенную растворимость относительно зрелого BMP7 дикого типа.

Таблица 5: Анализ агрегации: Процент преципитировавшего материала

Время (минуты)	Про-BMP7 дикого типа человека	Вариант F9 про-BMP7 человека	Зрелый BMP7 WT человека (SEQ ID NO: 2)	Вариант зрелого BMP7 человека (SEQ ID NO: 8)
0	0	0	100	0
30	8	9	100	7
60	42	23	100	23
90	51	36	100	24
120	65	43	100	37
150	72	55	100	39

Пример 7

Анализ термического разворачивания

Эффект температуры в отношении конформационной стабильности вариантов белка BMP7 человека можно анализировать по круговому дихроизму (CD) с помощью устройства Jasco J-810, оборудованного термоэлектрической кюветой. В кратком изложении, 0,2–1,0 мг/мл про-BMP7 можно составлять в буфере для хранения (10 mM цитрата, 300 mM NaCl, pH 7,4) и помещать в кювету CD с длиной пути 0,02 см. Образец можно нагревать до температуры от 20 до 80°C с линейной скоростью 1°C/минуту и можно регистрировать получаемый сигнал CD при 208 нм каждые 0,2°C с использованием времени реакции 1 секунда. Нелинейную аппроксимацию к уравнению 1 можно осуществлять с помощью программы JMP (SAS Institute Inc, Cary, NC) для получения средней точки термического разворачивания (Tm).

Уравнение 1:

$$\frac{(Y_u + M_u * T) * \text{Exp}[-(H_m - T * S) / (1,987 * T)] + Y_f + M_f * T}{1 + \text{Exp}[-(H_m - T * S) / (1,987 * T)]}$$

где Y_u и Y_f представляют собой аппроксимацию и соответствуют Y -интерцепту для исходного уровня до и после перехода, соответственно. M_u и M_f представляют собой аппроксимацию и соответствуют углу наклона для исходного уровня до и после перехода, соответственно. H_m и S представляют собой аппроксимацию и соответствуют энтальпии и энтропии, соответственно. T является измеряемой температурой в градусах Кельвина.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 7, значения T_m для про-BMP7 дикого типа человека и варианта V114M белка про-BMP7 человека составляют 61°C и 64,5°C, соответственно, что свидетельствует о том, что вариант про-BMP7 человека по настоящему изобретению имеет повышенную стабильность при термическом разворачивании, т.е. является более стабильным, чем про-

ВМР7 дикого типа человека.

Пример 8

Модель эктопического остеогенеза

Эктопический остеогенез (EBF) можно измерять у самок мышей CB17SC–M SCID после подкожного введения некоторых вариантов белка ВМР7 человека по настоящему изобретению по сравнению со зрелым ВМР7 дикого типа человека.

В кратком изложении, мышей можно анестезировать с помощью 3% изофлурана и инъектировать им 3 мкг/100 мкл варианта белка ВМР7 человека, зрелого белка ВМР7 дикого типа человека или контрольный носитель в заднюю часть левого бока. Заднюю часть правого бока каждой мыши можно использовать в качестве контроля (без инъекции). Носитель (рН 4,5): 0,5% сахарозы, 2,5% глицина, 5 мМ L–глутаминовой кислоты, 5 мМ NaCl, 0,01% полисорбата 80 и 0,1% BSA.

EBF можно измерять посредством КТ–сканирования в день 13 после инъекции варианта белка ВМР7 человека или зрелого белка ВМР7 дикого типа человека.

Данные, полученные в экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 8, позволяют предполагать, что, несмотря на повышенную активность некоторых вариантов белка ВМР7 человека по настоящему изобретению, они проявляют меньшую способность к EBF (см. таблицу 6).

Таблица 6

Группа	Объем эктопического остеогенеза (мм ³)
Зрелый ВМР7 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2)	78
Вариант зрелого ВМР7 человека (SEQ ID NO: 7)	11
Вариант F9 зрелого ВМР7 человека (SEQ ID NO: 8)	7

Пример 9

Модель МΙΑ–индуцированной боли при остеоартрите на крысах

Эффект зрелого варианта белка ВМР7 человека F9 (SEQ ID NO: 8) можно оценивать в модели индуцируемой моноиодацетатом натрия (MIA) боли при ОА на крысах (Bove, et. al., Osteoarthritis and Cartilage, 2003, 11: 821–830).

В кратком изложении, для этого исследования можно использовать самцов крыс линии Lewis возрастом 7–8 недель на момент инъекции MIA. Для индуцирования остеоартрита крыс можно анестезировать изофлураном и делать им одну внутрисуставную инъекцию 0,3 мг/50 мкл MIA через поднадколенную связку правого колена. В противоположное контрольное левое колено можно инъектировать 50 мкл стерильного физиологического раствора. Животным вводили зрелый белок ВМР7 дикого типа человека в дозе 1,0 мкг/колени и вариант F9 зрелого белка ВМР7 человека (SEQ ID NO: 8) в дозе 0,175 мкг и 0,7 мкг/колени посредством внутрисуставных инъекций в день 9 и 14 после введения MIA.

Измерения боли можно осуществлять посредством тестирования инкапситации в

дни 17, 24, 31, 38, 45, 52, 58 и 66 после инъекции МІА с использованием устройства для тестирования инкапситуации (Columbus Instruments International, Columbus, OH). Изменения распределения веса на задней конечности между пораженной остеоартритом (правой) и противоположной контрольной (левой) конечностью можно использовать в качестве индикатора дискомфорта в суставе (меры боли) в колене, пораженном остеоартритом. Результаты можно представлять в виде различия весовой нагрузки между противоположной контрольной (левой) и пораженной остеоартритом (правой) конечностями.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 9, введение варианта F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) в дозе 0,175 мкг/колени приводило к значительному снижению боли, начиная со дня 38 и далее, за исключением дня 45, до дня 66 после введения МІА по сравнению с контролями, которым вводили носитель. С другой стороны, зрелый BMP7 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2) в дозе только 1 мкг вызывал значительное снижение боли, начиная со дня 58. Данные свидетельствуют о том, что вариант зрелого белка BMP7 человека F9 (SEQ ID NO: 8) является более активным в снижении боли по сравнению со зрелым BMP7 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2) (см. таблицу 7).

Таблица 7

Группа	День 17	День 24	День 31	День 38	День 45	День 52	День 58	День 66
Носитель	23,28±3,6 0 ^a	23,30±2, 01	23,15±2, 24	22,48±0,8 1	22,19±1, 07	22,75±0,4 9	21,72±1,6 9	22,14±1,8 3
BMP7 дикого типа 1,0 мкг	27,52±2,8 1	26,05±2, 81	23,46±1, 23	22,68±0,6 1	20,95±0, 87	20,37±0,7 1	17,66±1,7 9 ^b	17,59±2,6 8 ^b
SEQ ID NO: 8 0,175 мкг	23,29±1,3 1	24,32±2, 97	21,87±2, 14	20,82±1,0 3 ^b	19,44±0, 80	19,35±0,7 7 ^b	17,42±3,1 6 ^b	15,00±1,8 4 ^b
SEQ ID NO: 8 0,7мкг	36,75±6,4 5 ^b	29,78±8, 39	26,62±6, 07	23,63±0,9 0	21,75±4, 34	20,51±3,0 3	16,72±0,7 9 ^b	13,06±1,7 8 ^b

Значения представляют собой среднее ± SD, n=6 на группу;

^aРазличия весовой нагрузки между задними конечностями (г)

^bP<0,008 относительно носителя при использовании анализа повторных измерений и сравнения обработки по временным точкам

Пример 10

Модель разрыва мениска на крысах для оценки дегенерации хряща

Эффект варианта зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) можно оценивать с

использованием боли при остеоартрите (ОА) в модели разрыва мениска (МТ) на крысах для оценки дегенерации хряща. Для такого исследования можно использовать самцов крыс Lewis (возрастом приблизительно 25 недель). В кратком изложении, перед хирургическим вмешательством крыс можно анестезировать с использованием 3% изофлурана. Правое колено можно согнуть и осуществить поперечный медиальный разрез вдоль проксимального антеро–медиальной поверхности большеберцовой кости, обнажая медиальную контралатеральную связку. Контралатеральную связку и капсулу сустава можно иссекать, одновременно освобождая большеберцовые связки медиального мениска. Приблизительно 3 мм мениска можно освобождать от связок до края плато большеберцовой кости и рассекать мениск для имитации полного разрыва. Разрез можно закрывать с помощью хирургического клея.

Животным можно вводить зрелый BMP7 дикого типа человека в дозе 350 нг/колено или вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) в двух дозах 49 нг или 245 нг/колено в 50 мкл фосфатно–солевого буфера (PBS), pH 7,4. Введение можно начинать через 3 недели после хирургического вмешательства МТ и продолжать в течение приблизительно 8 недель. Животных можно подвергать еженедельным внутрисуставным инъекциям зрелого BMP7 дикого типа человека, или варианта F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8), или носителя в различных дозах в прооперированное колено в течение 5 недель. Измерения боли можно осуществлять посредством теста инкапситации в дни 18 (исходный уровень), 25, 31, 42 и 53 после хирургического вмешательства МТ с использованием устройства для тестирования инкапситации (Columbus Instruments International, Columbus, OH). Изменения распределения веса в задних конечностях между пораженной остеоартритом (правой) и противоположной контрольной (левой) конечностями можно использовать в качестве индикатора дискомфорта в суставе (меры боле) в колене, пораженном остеоартритом. Результаты можно представлять в виде различия весовой нагрузки между противоположной контрольной (левой) и пораженной остеоартритом (правой) конечностями.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 10, хирургическое вмешательство МТ на правом колене приводит к повышению дискомфорта в суставе, определяемого по изменению распределения веса в задних конечностях (меры боли) (см. таблицу 8). Вариант зрелого белка BMP7 человека F9 (SEQ ID NO: 8) в дозе 245 нг/колено или дозе 49 нг/колено вызывал значительное снижение боли по сравнению с контролями, которым вводили носитель, начиная со дня 31 и до дня 53. Введение зрелого BMP7 дикого типа человека в дозе 350 нг/колено вызывало снижение боли только через 42 дней после хирургического вмешательства МТ по сравнению с контролями, которым вводили носитель. Данные свидетельствуют о том, что введение варианта зрелого белка BMP7 человека F9 (SEQ ID NO: 8) является более эффективным в снижении боли по сравнению со зрелым BMP7 дикого типа человека в модели МТ–индуцированной боли при ОА на крысах.

Таблица 8

	Исходный уровень	День 25	День 31	День 42	День 53
A	51,62±3,08 ^a	51,35±1,34	53,42±2,10	52,5±1,34	49,57±2,35
B	52,33±2,45	50,76±1,09	49,97±1,10	46,81±1,34 ^b	47,77±1,78
C	52,48±2,11	49,96±0,66	49,52±1,10 ^b	44,8±3,04 ^b	45,70±2,77
D	52,02±2,19	49,77±1,00	49,54±2,77 ^b	42,37±1,28 ^b	38,68±1,68 ^b

Группа A: Носитель

Группа B: Зрелый BMP7 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2); 350 нг

Группа C: Вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8); 49 нг

Группа D: Вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO:8); 245 нг

Значения представляют собой среднее ± SD, n=6 на группу

^aРазличия весовой нагрузки в задних конечностях (г)

^bP<0,05 относительно носителя при использовании анализа повторных измерений и сравнения обработки по временным точкам

Пример 11

Синтез протеогликанов в суставных хондроцитах человека при остеоартрите

Синтез протеогликанов в суставных хондроцитах человека при остеоартрите (OA) представляет собой модель *in vitro* активности хондроцитов. Эффект вариантов зрелого белка BMP7 человека также можно оценивать в отношении синтеза протеогликанов в суставных хондроцитах человека при OA *in vitro* и сравнивать со зрелым про-BMP7 дикого типа человека. Синтез протеогликанов можно измерять по включению метки ³⁵S. Коленных хрящ человека с артритом получают от доноров при хирургическом вмешательстве. Фрагменты хряща можно тщательно измельчать и выделять хондроциты из ассоциированного матрикса посредством ферментативного расщепления. Хрящ сначала можно расщеплять 1 мг/мл проназы в средах DMEM/PRF (без фенолового красного) в 5% дополненной Fe телячьей сыворотки (FCS) и 2% пенициллина–стрептомицина–противогрибкового средства в течение 60 минут с последующим расщеплением в течение ночи с помощью 1 мг/мл коллагеназы II в средах DMEM/PRF с 5% FCS и 2% пенициллина–стрептомицина–противогрибкового средства при 37°C. Клетки можно промывать средами DMEM/F-12, а затем ресуспендировать в DMEM/F-12 с 5% FCS и подсчитывать с помощью цитометра Coulter. Клетки можно высевать при плотности 30000 клеток/лунку в 96-луночном покрытом коллагеном планшете CytoStar T в средах для выращивания, содержащих DMEM, 5% FCS, ITS (инсулин, трансферрин, серин) и 1% пенициллина–стрептомицина–противогрибкового средства. Через 24 часа среды можно заменять 100 мкл сред для выращивания, содержащих 10 мКи/мл (1 мКи/лунку) ³⁵S, и обрабатывать про-BMP7 дикого типа человека или вариантами белка про-BMP7 человека в различных дозах. Затем клетки можно инкубировать в течение приблизительно 7 дней при 37°C с 5% CO₂. В конце периода обработки среды можно удалять, заменять фосфатно-солевым буфером и подсчитывать включение ³⁵S с использованием

жидкостного сцинтилляционного счетчика и люцинометра Wallac 1450 MicroBeta TriLux.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 11, клетки, обработанные вариантом белка про-BMP7 человека (SEQ ID NO: 16), демонстрировали значимое повышение синтеза протеогликанов в дозах в диапазоне от 1,2 до 300 нг /мл (см. таблицу 9). В отличие от этого, про-BMP7 дикого типа человека демонстрировал значимое повышение только в дозе 300 нг/мл. Таким образом, вариант белка про-BMP7 человека (SEQ ID NO: 16) является более активным в стимуляции синтеза протеогликанов по сравнению с про-BMP7 дикого типа человека в первичных суставных хондроцитах человека с ОА.

Таблица 9

Синтез протеогликанов*(СРМ)			
Группа (нг)	Контроль	Про-BMP7 дикого типа человека	SEQ ID NO: 16
0	580±84	NT	NT
0,1	NT	679±120	654±93
0,4	NT	724±120	729±133
1,2	NT	679±120	1197±98a
3,7	NT	666±130	1991±224a
11	NT	723± 72	3822±263a
33	NT	799± 65	4191±355a
100	NT	1500±309	4235±202a
300	NT	3325±237a	4219±75a

Значения представляют собой среднее ± SD; n=3/группу

*Синтез протеогликанов измеряют по включению ³⁵S

^aP<0,05 относительно необработанного контроля

СРМ – число импульсов в минуту

NT – не тестировали

Пример 12

Анализ хондрогенеза

Эффект зрелого BMP7 дикого типа человека и его вариантов можно оценивать по дифференцировке хондроцитов в модели *in vitro* с использованием первичных суставных хондроцитов крысы (RPAC). Для получения RPAC можно получать суставной хрящ из крыс возрастом 2–3 дней. Хрящ можно расщеплять 0,4% коллагеназой в течение 2 часов, а затем полученные клетки можно промывать фосфатно-солевым буфером и культивировать в средах, содержащих DMEM, 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина в увлажненном воздухе с 5% CO₂ при 37°C.

Для анализа хондрогенной дифференцировки можно использовать систему культивирования на гранулированных средах. Приблизительно 2×10⁵ клеток из пассажей 2–3 можно помещать в пробирки объемом 1,5 мл и центрифугировать при 500×g в течение

10 минут. Гранулы можно культивировать при 37°C с 5% CO₂ в 500 мкл среды. Эффект зрелого BMP7 дикого типа человека или вариантов зрелого белка BMP7 человека можно тестировать при различных концентрациях, таких как 0,02, 0,2 и/или 2 мкМ. Среды можно заменять дважды в неделю в течение 2 недель. Через 2 недели культивирования гранулы можно собирать и осуществлять макроскопический анализ стереомикроскопическими способами. Можно анализировать изображения и вычислять размер гранул на двухмерном изображении.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 12, гранулы, обработанные вариантом зрелого белка BMP7 человека F9 (SEQ ID NO: 8) были значимо больше гранул, обработанных зрелым BMP7 дикого типа человека, или необработанных контролей (см. таблицу 10). Наблюдали дозозависимое увеличение размеров гранул, но наиболее выраженным оно было при концентрациях 0,14 и 1,4 нМ. Данные свидетельствуют о том, что вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) является более активным в отношении увеличения размеров гранул по сравнению со зрелым BMP7 дикого типа человека в первичных суставных хондроцитах крысы (см. таблицу 10). Т.к. размеры клеточных гранул свидетельствуют о повышенной пролиферации клеток, вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8), по-видимому, является гораздо более активным в отношении повышения пролиферации первичных суставных хондроцитов крысы по сравнению со зрелым BMP7 дикого типа человека.

Таблица 10

Группа (нМ)	Контроль	Размер гранул (мм ²)	
		Зрелый BMP7 WT человека	Вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8)
0	0,51±0,05	NT	NT
0,014	NT	NT	0,67±0,16
0,14	NT	NT	1,56±0,46 ^a
1,4	NT	NT	2,61±0,18 ^a
0,02	NT	0,64±0,15	NT
0,2	NT	0,70±0,03	NT
2	NT	0,83±0,13	NT

Значения представляют собой среднее ± SD; n=3/группу

^aP<0,05 относительно необработанного контроля

NT – Не тестировали

Пример 13

Модель сращения кости

Эффект зрелого BMP7 дикого типа человека и его вариантов можно оценивать в отношении регенерации или сращения кости в модели хирургического перелома на

крысах. Животных можно подвергать овариэктомии в возрасте 6 месяцев и наблюдать у них потерю костной ткани в течение двух месяцев перед хирургическим вмешательством. Хирургическую операцию для получения кортикального дефекта можно осуществлять, по существу, как описано ранее (Komatsu, et al., *Endocrinology*, 150:1570–1579, 2009). В кратком изложении, способ включает иссечение кожи над латеральным отделом бедренной кости и тупое отделение четырехглавой мышцы для доступа к дистальному отделу диафиза бедренной кости. Затем можно создавать кортикальные дефекты в кортикальном слое передней и задней стороны с использованием бормашины (Robert Bosch Tool Corp, Gerlingen, Germany), оборудованной ортопедическим сверлом 2 мм (Zimmer Inc, Warsaw, IN). Затем мышцы можно подвергать репозиции и закрывать кожу тканевым клеем. Группам животных можно вводить различные количества зрелого BMP7 дикого типа человека или его вариантов, подготовленных в буфере цитрата натрия, pH 3,0, и адсорбированных на коллагеновые губки Helistat типа 1 в объеме 50 мкл. Средства можно вводить местно в участок дефекта во время хирургического вмешательства и в течение 35 дней. Контрольной группе можно вводить носитель, содержащей те же компоненты в коллагеновой губке без терапевтических белков. Сращение перелома *in vivo* и содержание минеральных веществ в костной ткани (BMC) можно оценивать посредством количественной компьютерной томографии (QCT) с использованием сканнера GE Locus Ultra CT (GE Healthcare, London, Ontario, Canada), как описано ранее (Komatsu et al., 2008).

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 13, введение 16,5 мкг варианта F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) приводило к значительному повышению BMC и площади кортикального слоя благодаря образованию нового кортикального слоя ко дню 35 после вмешательства (см. таблицу 11). С другой стороны, введение 16,5 мкг зрелого BMP7 дикого типа человека не приводило к значимому изменению BMC ко дню 35. Данные свидетельствуют о том, что вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8) является активным в отношении повышения BMC и площади кортикального слоя по сравнению со зрелым BMP7 дикого типа человека в модели сращения кости при кортикальном дефекте на крысах.

Таблица 11

Группа	BMC (мг)	% повышения относительно контрольного носителя
A	14,11±1,50	100
B	16,25±1,60	115
C	16,19±1,09	114
D	18,13±2,29 ^a	128

Группа A: Носитель

Группа B: Зрелый BMP7 дикого типа человека (SEQ ID NO: 2); 16,5 мкг

Группа C: Вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8); 2,0 мкг

Группа D: Вариант F9 зрелого белка BMP7 человека (SEQ ID NO: 8); 16,5 мкг

Значения представляют собой среднее \pm SEM; n=6–8/группу

^aP<0,05 относительно необработанного контроля

Пример 14

Анализ развившихся эндотелиальных тяжей

Анализ образования эндотелиального тяжа *in vitro* в качестве имитации ангиогенеза можно использовать для исследования роли белков BMP7 человека в отношении полученных с помощью различных факторов роста тяжей, включая в качестве неограничивающих примеров, тяжи, полученные с помощью VEGF, основного FGF и EGF. Образующие тяжи эндотелиальные клетки (ECFC; пассаж 4–10, подходящие для образования тяжа) можно культивировать в средах EGM–2 MV (Lonza), содержащих конечную концентрацию 10% FBS, и пересевать во флаконы, покрытые коллагеном типа I (фибрилярным), перед посевом для анализа образования тяжей *in vitro*. Полученные из адипоцитов стволовые клетки (Zen–Bio, клетки, замороженные при пассаже 4; клетки пассажа 5 или более не анализировали) можно культивировать в средах EGM–2 MV (Lonza) перед высеиванием при плотности 50000 клеток на лунку (в 96–луночные черные, покрытые поли–D–лизином планшеты) в среды для сокультивирования [например, среды MCDB–131 (Invitrogen), дополненные 30 мкг/мл 2–фосфата L–аскорбиновой кислотой, 1 мкМ дексаметазона, 50 мкг/мл тобрамицина, 10 мкг/мл инсулина (все от Sigma–Aldrich) и 10 мкг/мл γ –трансферрина AF CellPrime (Millipore, Billerica, MA)] в течение 24 часов. Можно удалять среды для полученных из адипоцитов стволовых клеток (ADSC) и можно пересевать 5000 ECFC (Lonza) на лунку. Приблизительно через 4 часа после посева ECFC тяжи можно обрабатывать 10 нг/мл VEGF, 10 нг/мл bFGF или 10 нг/мл EGF (все от Biosource International) и можно продолжать воздействие факторами роста в течение приблизительно 120 часов. Затем можно добавлять PBS–контроли, белки BMP7 человека, включая варианты белка BMP7 человека по настоящему изобретению (100 нг/мл), или сунитиниб и инкубировать в течение 96 часов. Всю инкубацию культур клеток можно осуществлять при 37°C, 5% CO₂. Затем клетки можно фиксировать в течение 10 минут 3,7% формальдегидом (Sigma Aldrich), а затем ледяным 70% этанолом в течение 20 минут при 25°C. Клетки можно однократно промывать PBS, блокировать в течение 30 минут 1% BSA и подвергать иммуноокрашиванию в течение 1 часа с использованием антисыворотки против CD31 (R&D Systems, Minneapolis, MN), разведенной до 1 мкг/мл в 1% BSA. Затем клетки 3 раза можно промывать PBS и инкубировать в течение 1 часа с 5 мкг/мл антителом осли против козы с Alexa–488 (Invitrogen), конъюгатом антитела против актина гладких мышц с Cy3 (1:200, Sigma–Aldrich) и 200 нг/мл Hexст 33342 (Invitrogen) в 1% BSA. Затем клетки можно промывать PBS, визуализировать с использованием алгоритмов для образования тяжей с помощью Cellomics ArrayScan VTI при 5–кратном увеличении (Thermo Fisher Scientific, Pittsburgh, PA).

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 14, сунитиниб (100 нМ), средство с антиангиогенным механизмом действия, использовали в качестве положительного контроля. Определяли, что про–BMP7–F9 человека (100, 50,

25 и 12,5 нг/мл) снижал площадь соединенной трубки развившегося тяжа (% PBS–контроля) для эндотелиальных тяжей, которым позволяли образовываться в течение 120 часов в присутствии указанных факторов роста перед обработкой соединения (факторы роста оставляли на все время эксперимента).

Вариант F9 про–BMP7 человека снижал VEGF–регулируемое образование тяжей

Совместные культуры ADSC/ECFC не стимулировали (базовый уровень) или стимулировали 10 нг/мл VEGF и обрабатывали одновременно PBS или 100 нг/мл варианта F9 про–BMP7 человека или 100 нМ сунитиниба в течение 96 часов перед иммуногистохимией с использованием CD31 (зеленый), антитела против актина гладких мышц (красный) и Хехст 33342 для окрашивания всех ядер (синий). Получаемые CD31–положительные эндотелиальные тяжи визуализировали и количественно анализировали с использованием одновременного многопараметрического анализа. Результаты представлены в таблице 12. Значения представляют собой % PBS–контроля, среднее \pm SD; n=8/исследуемую группу, n=16 в группах PBS–контроля.

Таблица 12

	Площадь соединенной трубки – VEGF (% PBS)
PBS	100,0 \pm 14,90%
F9 BMP7 100 нг/мл	18,66 \pm 3,72%
100 нМ сунитиниба	26,14 \pm 9,88%

Вариант F9 про–BMP7 человека снижал FGF–регулируемое образование тяжей

Совместные культуры ADSC/ECFC не стимулировали (базовый уровень) или стимулировали 10 нг/мл bFGF и обрабатывали одновременно PBS или 100 нг/мл варианта F9 про–BMP7 человека или 100 нМ сунитиниба в течение 96 часов перед иммуногистохимией с использованием CD31 (зеленый), антитела против актина гладких мышц (красный) и Хехст 33342 для окрашивания всех ядер (синий). Получаемые CD31–положительные эндотелиальные тяжи визуализировали и количественно анализировали с использованием одновременного многопараметрического анализа. Результаты представлены в таблице 13. Значения представляют собой % PBS–контроля, среднее \pm SD; n=8/исследуемую группу, n=16 в группах PBS–контроля.

Таблица 13

	Площадь соединенной трубки – FGF (% PBS)
PBS	100,0 \pm 18,67%
F9 BMP7 100 нг/мл	4,39 \pm 2,80%
100 нМ сунитиниба	43,01 \pm 18,28%

Вариант F9 про–BMP7 человека снижал EGF–регулируемое образование тяжей

Совместные культуры ADSC/ECFC не стимулировали (базовый уровень) или стимулировали 10 нг/мл EGF и обрабатывали одновременно PBS или 100 нг/мл варианта F9 про-BMP7 человека или 100 нМ сунитиниба в течение 96 часов перед иммуногистохимией с использованием CD31 (зеленый), антитела против актина гладких мышц (красный) и Хехст 33342 для окрашивания всех ядер (синий). Получаемые CD31-положительные эндотелиальные тяжи визуализировали и количественно анализировали с использованием одновременного многопараметрического анализа. Результаты представлены в таблице 14. Значения представляют собой % PBS-контроля, среднее \pm SD; n=8/исследуемую группу, n=16 в группах PBS-контроля.

Таблица 14

	Площадь соединенной трубки – EGF (% PBS)
PBS	100,0 \pm 22,16%
F9 BMP7 100 нг/мл	13,21 \pm 2,59%
100 нМ сунитиниба	9,89 \pm 8,059%

Эти результаты свидетельствуют о том, что вариант F9 белка про-BMP7 человека уменьшал существующие, развившиеся, индуцированные факторами роста эндотелиальные тяжи в анализе имитации ангиогенеза *in vitro*.

Пример 15

Ингибирование вариантом белка BMP7 роста опухоли в моделях ксенотрансплантатов рака толстого кишечника на мышах

Модели ксенотрансплантатов на животных можно использовать для оценки эффективности вариантов белка BMP7 человека по настоящему изобретению (по сравнению с соответствующим белком BMP7 дикого типа человека) в отношении конкретных типов злокачественных новообразований. Более конкретно, можно тестировать соединения в отношении роста стадированных опухолей, пересаженных посредством подкожной или ортотопической инокуляции в модели на иммунокомпрометированных мышах или крысах. Исследования ксенотрансплантатов могут быть очень сложными, начиная с выбора подходящей модели на животных, выбора опухолевой линии клеток, способа введения, схемы введения, дозы, анализа скорости роста опухоли и анализа опухоли (гистологии, уровней экспрессии мРНК и белка).

Эффект различных вариантов белка BMP7 в моделях ксенотрансплантатов в отношении конкретных типов злокачественных новообразований тестировали, как описано ниже.

Самки "голых" безтимусных мышей возрастом 6–7 недель доступны в коммерческих источниках, включая Harlan Laboratories (Indianapolis, IN). Мышам позволяли акклиматизироваться в течение одной недели и кормили их вволю с использованием нормального питания с низким содержанием жира (4,5%), которое можно использовать в течение всего исследования. Опухолевые клетки можно приобретать в ATCC и культивировать в средах для культивирования клеток, таких как RPMI 1640 (Life

Technologies) с L-глутамином, 25 мМ HEPES, дополненных 10% FBS и 1 мМ пирувата натрия. Клетки можно откреплять, промывать бессывороточной средой, а затем ресуспендировать в конечной концентрации 50×10^6 клеток/мл в бессывороточной RPMI 1640. Опухолевые клетки в количестве приблизительно 5×10^6 можно подкожно инъецировать в заднюю часть бока исследуемых мышей в смеси 1:1 бессывороточной среды для выращивания и матригеля (Becton Dickinson, Bedford, MA). Измерения массы опухоли и тела можно осуществлять дважды в неделю. Перед лечением мышей можно рандомизировать с учетом размера опухоли с использованием алгоритма рандомизации. Лечение можно начинать, когда средний объем опухоли достигнет 100 мм^3 . Рандомизированных мышей разделяли по разным группам и вводили им соединения посредством инъекции в хвостовую вену один раз в неделю.

Все тестируемые или контрольные белки перед введением дозы подготавливали в фосфатно-солевом буфере (PBS). Размер опухоли можно определять с помощью измерений калипером. Объем опухоли (мм^3) можно оценивать по формуле $A^2 \times B \times 0,536$, где А является меньшим, а В большим из перпендикулярных диаметров. Данные об объеме опухоли можно преобразовывать в логарифмической шкале для выравнивания дисперсии по времени и исследуемой группе. Данные об объеме в логарифмической шкале можно анализировать посредством двустороннего ANOVA повторных измерений по времени и лечению с использованием программного обеспечения SAS PROC MIXED (SAS Institutes Inc, Cary, NC). Исследуемые группы сравнивают с определенной контрольной группой в каждый момент времени.

Мышей с иммунодефицитом, несущих ксенотрансплантаты опухоли DLD1 C5 (модель регулируемого Wnt/TCF-1 рака толстого кишечника), можно получать, как описано выше в этом примере 15, и можно вводить им контрольный носитель, вариант F9 зрелого BMP7 человека, иринотекан или комбинацию варианта F9 зрелого BMP7 человека и иринотекана три раза в неделю (вариант F9 BMP7) или дважды в неделю (иринотекан) в течение приблизительно 3–6 последовательных недель.

В модели ксенотрансплантата опухоли DLD1 C5 на мышах, осуществленной, по существу, как описано выше в этом примере 15, наблюдали регрессирование опухоли в модели ксенотрансплантата DLD1 C5 на мышах, когда им заранее вводили вариант F9 зрелого BMP7 человека в течение трех недель с последующими 3 неделями терапии иринотеканом. В частности, введение варианта F9 зрелого BMP7 человека в течение 3 недель с последующими 3 неделями терапии иринотеканом (вводимым IP в дозе 0,04 мг/кг MWF и 20 мг/кг, M и Th, соответственно) индуцировало чувствительность опухоли DLD1 C5 к химиотерапевтическому средству иринотекану (промежуточное регрессирование опухоли) относительно животных, которым вводили физиологический раствор и которым вводили иринотекан (что приводило к росту опухоли).

Пример 16

Активность эндогенных ингибиторов BMP7 в отношении вариантов белка BMP7

Эндогенные антагонисты BMP, такие как ноггин, Sost, фоллистатин, белок гастрюляции Twisted (TSG), хордин и члены семейств белков гремлинов, Cerberus и Dan, например, действуют на белки семейства BMP *in vivo*, модулируя активность BMP, включая активность, связанную с ростом, дифференцировкой и активностью широкого спектра клеток. Что касается самих BMP, экспрессия различных антагонистов находится под жестким пространственно–временным контролем. (см., Bone Proteins кости and Their Antagonists, Vitamins and Hormones (2015), volume 99, pages 63–90; Editor Gerald Litwack). Эффект различных антагонистов BMP в отношении белков BMP7 человека и их вариантов можно тестировать в анализе *in vitro*, как описано ниже в этом примере 16.

В кратком изложении, клетки Her3B2, стабильно трансфицированные с использованием конструкции с промотором гепсидина и люциферазой (далее в настоящем описании обозначаемые как клетки Her3B2_HerPro_luc), использовали для экспериментов с ингибиторами BMP. Клетки Her3B2_HerPro_luc можно высевать в количестве 30000 клеток на лунку 96–луночном планшете для культивирования тканей в DMEM (Hyclone) с 5% FBS (Gibco), дополненной заменимыми аминокислотами (Hyclone) и 200 мкг/мл генетицина (Hyclone) в течение 24 часов. Затем клетки подвергали голоданию в OMEM+0,2% BSA в течение 5 часов. Клетки обрабатывали смесью белков BMP7 человека и его вариантов в OMEM (Gibco) + 0,2% BSA (Gibco) в течение 18 часов, а затем анализировали на активность люциферазы с использованием набора для анализа репортерного гена люциферазы (Roche). Белки BMP7 добавляли в концентрациях в линейном диапазоне анализа 1 нМ и 100 пМ. Ингибиторы добавляли в различных концентрациях при молярном избытке относительно конкретного тестируемого белка BMP7. Все ингибиторы BMP, за исключением фоллистатина, приобретали в R&D Systems. Фоллистатин, белки BMP7 и их варианты получали в Eli Lilly and Company.

В экспериментах, осуществленных, по существу, как описано выше в этом примере 16, белки BMP7 дикого типа были значимо более восприимчивыми к ингибированию некоторыми антагонистами по сравнению с соответствующей формой (т.е. про–формой или зрелой формой) варианта F9 BMP7 по настоящему изобретению (см. таблицу 15).

Таблица 15

Молярный избыток ингибитора	% ингибирования					Ингибитор BMP
	100X	10X	1X	0,1X	0,01X	
Про–BMP7–F9	22,5*	11,7	–4,3	–2,6		Фоллистатин
Про–BMP7 WT	79,8	29,5	5,9	–10,4		
Зрелый BMP7–F9		23,8	10,0	10,6	3,9	
Зрелый BMP7 WT	54,7	21,1	–11,9	–16,6		
Про–BMP7–F9	24,9*	8,8*	2,4*	3,5*		Хордин–подобный

Про–BMP7 WT	88,2	87,5	55,9	8,9		белок 2
Зрелый BMP7–F9		9,0	–1,0	–3,2	–1,5	
Зрелый BMP7 WT	71,9	69,5	49,0	–13,7		
Про–BMP7–F9	–28,1*	–23,6*	–18,3	–15,2		Ноггин
Про–BMP7 WT	87,3	84,8	24,8	–5,3		
Зрелый BMP7–F9		–1,2	–6,9	–7,2	–2,6	
Зрелый BMP7 WT	73,7	72,8	36,7	–12,2		
Про–BMP7–F9	–17,7*	–1,3	–5,3	–5,9		Хордин
Про–BMP7 WT	76,5	18,9	–2,2	–15,1		
Зрелый BMP7–F9		5,6	5,2	6,8	3,7	
Зрелый BMP7 WT	70,9	21,3	–9,2	–13,1		
Про–BMP7–F9	75,4 [#]	7,0	–27,5	–35,4		Сосо
Про–BMP7 WT	81,6	17,4	4,0	–10,2		
Зрелый BMP7–F9		28,5	7,3	7,0	2,3	
Зрелый BMP7 WT	77,4	37,6	–25,9	–23,6		

*указано, что ингибирование формы варианта F9 BMP7 человека было значимо ниже ингибирования соответствующей формы белка BMP7 дикого типа человека

#указано, что форма варианта F9 BMP7 человека и форма BMP7 WT человека ингибированы приблизительно в равной степени.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1

MHVRSRLRAAAPHSFVALWAPLFLRLSALADFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREMQ
REILSILGLPHRPRPHLQKGKNSAPMFMLDLNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQ
GPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHDKEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEF
RIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGRESDFLLDSRTLWASEEGWLVDITATSNH
WVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAGLIGRHGPQNKQPFMVAFFKATEVHFRSIRST
GSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPE
GYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 2

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQ
DWIIAPEGYAAYYCEGECAPLNSYMNATNHAIVQTLVHFINPETVPKPCCAPTQLNAIS
VLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 3

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSX_{aa33}QRQX_{aa37}CKKHELYVSFRD

LGWQDWIIPXaa₆₀GYAAXaa₆₅YCEGECAPFLNSYMNATNHAXaa₈₆Xaa₈₇QXaa₈₉LXaa₉₁H
Xaa₉₃Xaa₉₄NPETVPKPCCAPTQLXaa₁₁₀AISXaa₁₁₄LYFDDXaa₁₂₀SNVILKKXaa₁₂₈RNMXaa₁₃₂
VXaa₁₃₄ACGCH

SEQ ID NO: 12

Про-домен дикого типа+вариант зрелого BMP7 (402 аминокислот) F93V/N110G

DFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREMQREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLDLSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIRSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS
SSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAYYCEGECAPFLNSYMNATNHAIVQ
TLVHVINPETVPKPCCAPTQLGAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 13

Про-домен дикого типа+вариант зрелого BMP7 (402 аминокислот)
Y65G/I86L/T89A/N110G

DFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREMQREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLDLSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIRSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS
SSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAAGYCEGECAPFLNSYMNATNHALVQ
ALVHFINPETVPKPCCAPTQLGAISVLYFDDSSNVILKKYRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 14

Про-домен дикого типа+вариант зрелого BMP7 (402 аминокислот)
Y65G/I86L/Y128F/N110G

DFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREMQREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLDLSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIRSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS
SSDQRQACKKHELYVSFRDLGWQDWIIAPEGYAAAGYCEGECAPFLNSYMNATNHALVQ
TLVHFINPETVPKPCCAPTQLGAISVLYFDDSSNVILKKFRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 15

Про-домен дикого типа+вариант зрелого BMP7 (402 аминокислот)
Y65G/I86L/Y128W/N110G

DFSLDNEVHSSFIHRRLRSQERREMQREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLDLSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIRSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS

SSDQRQACKKHELYVSRDLGWQDWIIAPEGYAAGYCEGECAPFLNSYMNATNHALVQ
TLVHFINPETVPKPCCAPTQLGAISVLYFDDSSNVILKKWRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 16

Про-домен дикого типа+вариант зрелого BMP7 (402 аминокислот)
Y65G/I86L/F93V//N110G/Y128W

DFSLDNEVHSSFIHRRRLRSQERREMQRREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLLDSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIRSTGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENS
SSDQRQACKKHELYVSRDLGWQDWIIAPEGYAAGYCEGECAPFLNSYMNATNHALVQ
TLVHVINPETVPKPCCAPTQLGAISVLYFDDSSNVILKKWRNMVVRACGCH

SEQ ID NO: 17

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSX_{aa33}QRQX_{aa37}CKKHELYVSRD
LGWQDWIIAPX_{aa60}GYAAX_{aa65}YCEGECAPFLNSYMNATNHAX_{aa86}VQX_{aa89}LX_{aa91}HX_{aa93}
X_{aa94}NPETVPKPCCAPTQLX_{aa110}AISX_{aa114}LYFDDSSNVILKKX_{aa128}RNMVVRACGCH

где по меньшей мере одна замена аминокислоты представляет собой:

X_{aa33} является D или M; X_{aa37} является A или P; X_{aa60} является E или Q; X_{aa65}
является Y, S или G; X_{aa86} является I, V или L; X_{aa89} является T, S или A; X_{aa91} является V
или M; X_{aa93} является F или V; X_{aa94} является I, F или M; X_{aa110} является N, A, S или G;
X_{aa114} является V или M; и X_{aa128} является Y, F или W.

SEQ ID NO: 18

DFSLDNEVHSSFIHRRRLRSQERREMQRREILSILGLPHRPRPHLQGKHNSAPMFMLD
LYNAMAVEEGGGPGGQGFSPYKAVFSTQGPPLASLQDSHFLTDADMVMSFVNLVEHD
KEFFHPRYHHREFRFDLSKIPEGEAVTAAEFRIYKDYIRERFDNETFRISVYQVLQEHLGR
ESDLFLLDSRTLWASEEGWLVDITATSNHWVVNPRHNLGLQLSVETLDGQSINPKLAG
LIGRHGPQNKQPFMVAFKATEVHFRSIR

SEQ ID NO: 19 (последовательность ДНК, соответствующая SEQ ID NO:7)

ATGCACGTGCGCAGCCTGCGCGCCGCCGCCCCACAGCTTCGTGGCCCTGTG
GGCCCCCTGTTCTGCTGCGCAGCGCCCTGGCCGACTTCAGCCTGGACAACGAGGT
GCACAGCAGCTTCATCCACCGCCGCTGCGCAGCCAGGAGCGCCGCGAGATGCAGC
GCGAGATCCTGAGCATCCTGGGCCTGCCCCACCGCCCCCGCCCCACCTGCAGGGCA
AGCACAACAGCGCCCCCATGTTTCATGCTGGACCTGTACAACGCCATGGCCGTGGAGG
AGGGCGGCGGCCCCGGCGGCCAGGGCTTCAGCTACCCCTACAAGGCCGTGTTTCAGC
ACCCAGGGCCCCCCCCCTGGCCAGCCTGCAGGACAGCCACTTCCTGACCGACGCCGAC
ATGGTGATGAGCTTCGTGAACCTGGTGGAGCACGACAAGGAGTTCTTCCACCCCCGC
TACCACCACCGCGAGTTCCGCTTCGACCTGAGCAAGATCCCCGAGGGGCGAGGCCGTG
ACCGCCGCGAGTTCCGCATCTACAAGGACTACATCCGCGAGCGCTTCGACAACGAG
ACCTTCCGCATCAGCGTGTACCAGGTGCTGCAGGAGCACCTGGGCCGCGAGAGCGA
CCTGTTCTGCTGGACAGCCGCACCCTGTGGGCCAGCGAGGAGGGCTGGCTGGTGT

CGACATCACCGCCACCAGCAACCACTGGGTGGTGAACCCCCGCCACAACCTGGGCCT
GCAGCTGAGCGTGGAGACCCTGGACGGCCAGAGCATCAACCCCAAGCTGGCCGGCC
TGATCGGCCGCCACGGCCCCCAGAACAAGCAGCCCTTCATGGTGGCCTTCTTCAAGG
CCACCGAGGTGCACTTCCGCAGCATCCGCAGCACCGGCAGCAAGCAGCGCAGCCAG
AACCGCAGCAAGACCCCCAAGAACCAGGAGGCCCTGCGCATGGCCAACGTGGCCGA
GAACAGCAGCAGCGACCAGCGCCAGGCCTGCAAGAAGCACGAGCTGTACGTGAGCT
TCCGCGACCTGGGCTGGCAGGACTGGATCATCGCCCCTGAGGGCTACGCCGCCGGCT
ACTGCGAGGGCGAGTGCGCCTTCCCCCTGAACAGCTACATGAACGCCACCAACCACG
CCCTGGTGCAGACCCTGGTGCACCTTCATCAACCCCGAGACCGTGCCCAAGCCCTGCT
GCGCCCCACCCAGCTGGGCGCCATCAGCGTGCTGTACTTCGACGACAGCAGCAACG
TGATCCTGAAGAAGTGCGCAACATGGTGGTGC GCGCCTGCGGCTGCCAC

SEQ ID NO: 20 (последовательность ДНК, соответствующая SEQ ID NO: 8)

ATGCACGTGCGCAGCCTGCGCGCCGCCGCCCCCACAGCTTCGTGGCCCTGTG
GGCCCCCTGTTCTGCTGCGCAGCGCCCTGGCCGACTTCAGCCTGGACAACGAGGT
GCACAGCAGCTTCATCCACCGCCGCCTGCGCAGCCAGGAGCGCCGCGAGATGCAGC
GCGAGATCCTGAGCATCCTGGGCCTGCCCCACCGCCCCCGCCCCACCTGCAGGGCA
AGCACAACAGCGCCCCCATGTTTCATGCTGGACCTGTACAACGCCATGGCCGTGGAGG
AGGGCGGCGGCCCCGGCGGCCAGGGCTTCAGCTACCCCTACAAGGCCGTGTTTCAGC
ACCCAGGGCCCCCCCCCTGGCCAGCCTGCAGGACAGCCACTTCCTGACCGACGCCGAC
ATGGTGATGAGCTTCGTGAACCTGGTGGAGCACGACAAGGAGTTCTTCCACCCCCGC
TACCACCACCGCGAGTTCCGCTTCGACCTGAGCAAGATCCCCGAGGGGCGAGGCCGTG
ACCGCCGCGAGTTCCGCATCTACAAGGACTACATCCGCGAGCGCTTCGACAACGAG
ACCTTCCGCATCAGCGTGTACCAGGTGCTGCAGGAGCACCTGGGCCGCGAGAGCGA
CCTGTTCTGCTGGACAGCCGCACCCTGTGGGCCAGCGAGGAGGGCTGGCTGGTGT
CGACATCACCGCCACCAGCAACCACTGGGTGGTGAACCCCCGCCACAACCTGGGCCT
GCAGCTGAGCGTGGAGACCCTGGACGGCCAGAGCATCAACCCCAAGCTGGCCGGCC
TGATCGGCCGCCACGGCCCCCAGAACAAGCAGCCCTTCATGGTGGCCTTCTTCAAGG
CCACCGAGGTGCACTTCCGCAGCATCCGCAGCACCGGCAGCAAGCAGCGCAGCCAG
AACCGCAGCAAGACCCCCAAGAACCAGGAGGCCCTGCGCATGGCCAACGTGGCCGA
GAACAGCAGCAGCGACCAGCGCCAGGCCTGCAAGAAGCACGAGCTGTACGTGAGCT
TCCGCGACCTGGGCTGGCAGGACTGGATCATCGCCCCTGAGGGCTACGCCGCCGGCT
ACTGCGAGGGCGAGTGCGCCTTCCCCCTGAACAGCTACATGAACGCCACCAACCACG
CCCTGGTGCAGACCCTGGTGCACGTGATCAACCCCGAGACCGTGCCCAAGCCCTGCT
GCGCCCCACCCAGCTGGGCGCCATCAGCGTGCTGTACTTCGACGACAGCAGCAACG
TGATCCTGAAGAAGTGCGCAACATGGTGGTGC GCGCCTGCGGCTGCCAC

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Белок, содержащий полипептид, содержащий аминокислотную последовательность:

STGSKQRSQNRSKTPKNQEALRMANVAENSSSX_{aa33}QRQX_{aa37}CKKHELYVSFRD
 LGWQDWIIAPX_{aa60}GYAAX_{aa65}YCEGECAPFLNSYMNATNHAX_{aa86}X_{aa87}QX_{aa89}LX_{aa91}H
 X_{aa93}X_{aa94}NPETVPKPCCAPTQLX_{aa110}AISX_{aa114}LYFDDX_{aa120}SNVILKKX_{aa128}RNMX_{aa132}
 VX_{aa134}ACGCH (SEQ ID NO: 3),

где:

X_{aa33} является D или M; X_{aa37} является A или P; X_{aa60} является E или Q; X_{aa65} является Y, S или G; X_{aa86} является I, V или L; X_{aa87} является V или L; X_{aa89} является T, S или A; X_{aa91} является V или M; X_{aa93} является F или V; X_{aa94} является I, F или M; X_{aa110} является G; X_{aa114} является V или M; X_{aa120} является S или Q; X_{aa128} является Y, F или W; X_{aa132} является V, Q или S; и X_{aa134} является R или K.

2. Белок по п.1, где X_{aa33} является D; X_{aa37} является A; X_{aa60} является E; X_{aa87} является V; X_{aa89} является T или A; X_{aa91} является V; X_{aa94} является I; X_{aa120} является S; X_{aa132} является V; и X_{aa134} является R.

3. Белок по п.2, где X_{aa65} является Y или G; X_{aa86} является I или L.

4. Белок по п.3, где X_{aa65} является G; X_{aa86} является L; X_{aa89} является T; X_{aa93} является V; и X_{aa128} является F или W.

5. Белок по п.4, где X_{aa114} является V.

6. Белок по п.5, где аминокислотная последовательность полипептида представляет собой SEQ ID NO: 8.

7. Белок по п.1, где аминокислотная последовательность полипептида выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

8. Белок по любому из пп.1–7, где N–конец полипептида подвергают ковалентному слиянию с C–концом полипептида про–домена BMP7 человека, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

9. Белок по любому из пп.1–7, где аминокислотная последовательность полипептида выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1–7 и один или более фармацевтически приемлемых эксципиентов, разбавителей или носителей.

11. Фармацевтическая композиция по п.10, где белок является гомодимером, соединенным дисульфидными связями.

12. Фармацевтическая композиция по п.11, где композиция дополнительно содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

13. Способ лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту–человеку эффективного

количества фармацевтической композиции по любому из пп.11–12.

14. Способ по п.13, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому или колоректальный рак.

15. Белок по любому из пп.1–7 для применения в терапии.

16. Белок по любому из пп.1–7 для применения в лечении злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости.

17. Белок для применения по п.16, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому или колоректальный рак.

18. Белок для применения по любому из пп.15–17, где антитело вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с ионизирующей радиацией.

19. Белок для применения по любому из пп.15–17, где антитело вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами.

20. Способ лечения злокачественного новообразования, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту эффективного количества белка по любому из пп.1–7 в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с эффективным количеством одного или более химиотерапевтических средств или ионизирующей радиацией.

21. Способ по п.20, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластому, нейробластому или колоректальный рак.

22. Набор для лечения злокачественного новообразования, содержащий первую фармацевтическую композицию, содержащую белок по любому из пп.1–7 и приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент, и вторую фармацевтическую композицию, содержащую одно или более химиотерапевтических средств и приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

23. Набор по п.22, где первая фармацевтическая композиция дополнительно содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

24. Комбинированное лекарственное средство, содержащее белок по любому из пп.1–7 и одно или более химиотерапевтических средств для одновременного, отдельного или последовательного применения в лечении злокачественного новообразования.

25. Комбинированное лекарственное средство для применения по п.24, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак

легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.

26. Комбинированное лекарственное средство для применения по любому из пп.24–25, где белок вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с ионизирующей радиацией.

27. Комбинированное лекарственное средство для применения по любому из пп.24–26, где белок вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами.

28. Применение белка по любому из пп.1–7 для производства лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, повреждения и дегенерации хрящевой ткани, боли, ассоциированной с остеоартритом, или сращения кости.

29. Белок для применения по п.28, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.

30. Белок для применения по любому из пп.28–29, где белок вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с ионизирующей радиацией.

31. Белок для применения по любому из пп.28–30, где белок вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами.

32. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1–7 для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с фармацевтической композицией, содержащей химиотерапевтическое средство, в лечении злокачественного новообразования.

33. Фармацевтическая композиция для применения по п.32, где любую из фармацевтических композиций вводят в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с ионизирующей радиацией.

34. Фармацевтическая композиция, содержащая белок по любому из пп.1–7 для применения в одновременной, отдельной или последовательной комбинации с ионизирующей радиацией в лечении злокачественного новообразования.

35. Фармацевтическая композиция для применения по любому из пп.32–34, где злокачественное новообразование представляет собой рак легких, немелкоклеточный рак легких (NSCLC), злокачественное новообразование головного мозга, рак шейки матки, рак кожи, рак головы и шеи, глиобластома, нейробластома или колоректальный рак.