

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202490092** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.04.25

(22) Дата подачи заявки
2022.07.08

(51) Int. Cl. *C07C 43/23* (2006.01)
C07C 215/68 (2006.01)
C07C 217/84 (2006.01)
C07C 217/66 (2006.01)
C07K 7/06 (2006.01)
A61K 31/085 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01)
A61K 31/09 (2006.01)
A61K 31/136 (2006.01)
A61K 31/137 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) **63/219,683**

(32) **2021.07.08**

(33) **US**

(86) **PCT/IB2022/056358**

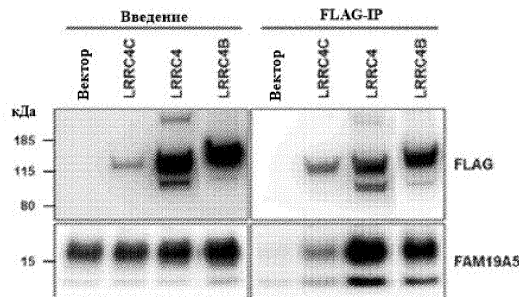
(87) **WO 2023/281476 2023.01.12**

(71) Заявитель:
НЬЮРАКЛ САЙЕНС КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
**Сон Дже Юн, Пён Юнджу, Квак
Хоюн, О Ситэк, Ли Мин-Хёк, Джон
Ёнву, Ха Нуй, Чо Ын-Хо, Ли Сухён,
Ли Сан-Мён, Ли Ерим, Чо Ын Би, Ли
Дже Кын, Ким Хан-Бюль, Квон Сун-
Гу (KR)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены молекулы-миметики, которые способны специфически нацеливаться на белок FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между членами семейства белков LRRC4 и белком FAM19A5. В настоящем изобретении также представлены способы стимулирования удлинения нейритов с помощью введения молекулы-миметика, описанной в данном документе.



A1

202490092

202490092

A1

ИНГИБИТОРЫ И ВАРИАНТЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0001] Настоящая заявка РСТ испрашивает приоритет на основании предварительной заявки США № 63/219683, поданной 8 июля 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПРЕДСТАВЛЕННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ ЧЕРЕЗ EFS-WEB

[0002] Содержимое представленного в электронном виде перечня последовательностей в файле .XML (название: 3763.019PC01_Seqlisting_ST26.xml, размер: 159 077 байт; дата создания: 8 июля 2022 г.), поданного в настоящей заявке, включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] В настоящем изобретении представлены молекулы-имитаторы семейства LRRC4, которые способны специфически ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между членом семейства белков LRRC4 и белком FAM19A5.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] Нейроны млекопитающих постоянно выдвигают нейриты, включая аксоны и дендриты, для образования синапсов с другими нейронами, мышцами и кровеносными сосудами. В то же время нейроны втягивают нейриты для разборки ненужных синапсов (например, тех, которые не использовались в течение длительного периода времени). Этот баланс приобретения и потери синапсов имеет решающее значение для состояния центральной и периферической нервных систем.

[0005] Однако различные факторы (например, старение, цитотоксическое микроокружение, острые повреждения, генетические мутации) могут приводить к аномальной потере синапсов. Такая повышенная потеря синапсов ассоциирована с различными неврологическими расстройствами, включая умственную отсталость, шизофрению, расстройства аутистического спектра, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, боковой амиотрофический склероз, рассеянный склероз, болезнь Хантингтона, прионные заболевания, невропатическую боль, повреждение спинного мозга и инсульт. См., например, Hayashi-Takagi, *Neurosci Res* 114: 3-8 (Jan. 2017); Wang *et al.*, *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 84(Pt B): 398-415 (Jun. 2018); Jha *et al.*, *J Alzheimers Dis* 57(4): 1017-1039 (2017); Mitoma *et al.*, *Int J Mol Sci* 21(14): 4936 (Jul. 2020); и Brose *et al.*, *Biochem Soc Trans* 38(2): 443-4 (Apr. 2010).

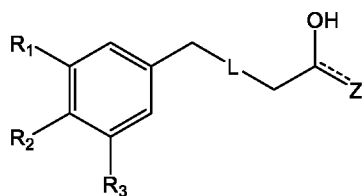
[0006] Поскольку основные причины неврологических расстройств не всегда полностью понятны, многие из существующих вариантов лечения просто направлены на

лечение симптомов, ассоциированных с расстройствами. Если существуют доступные виды лечения, они могут быть ассоциированы с неблагоприятными побочными эффектами и/или ограниченной эффективностью. Таким образом, в настоящее время существует потребность в альтернативных вариантах лечения, которые более эффективны при неврологических расстройствах, например, ассоциированных с аномальной потерей синапсов.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] В данном документе представлена молекула-миметик семейства 4, содержащая богатый лейцином повтор («LRRC4»), которая способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком семейства со сходством последовательностей 19, членом A5 («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 не является антителом или его антигенсвязывающей частью. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 включает пептид. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 включает малую молекулу.

[0008] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (I):



(формула I),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

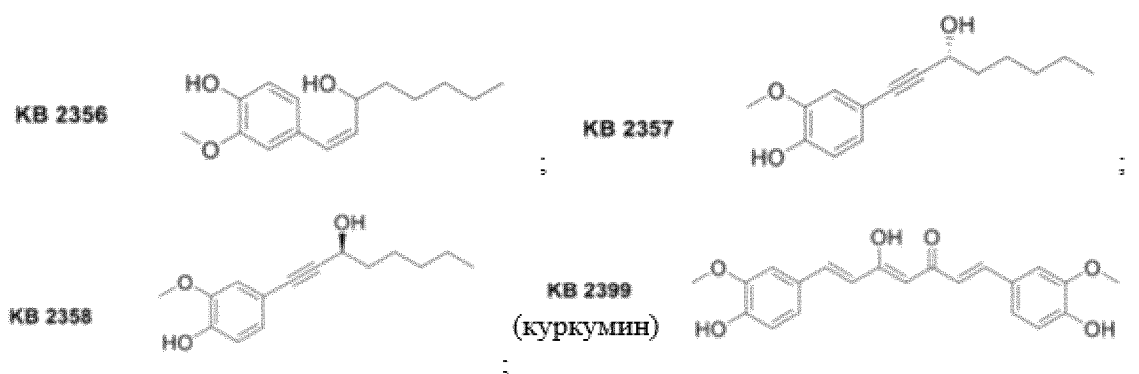
(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила;

(ii) ---- представляет собой одинарную или двойную связь;

(iii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или

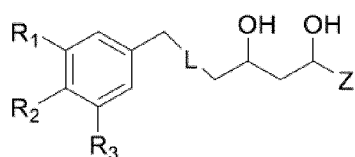
разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH-C(O)-CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидрокси, и

(iv) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и где молекула-миметик семейства LRRC4 не представляет собой малую молекулу, выбранную из:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0009] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (II):



(формула II),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

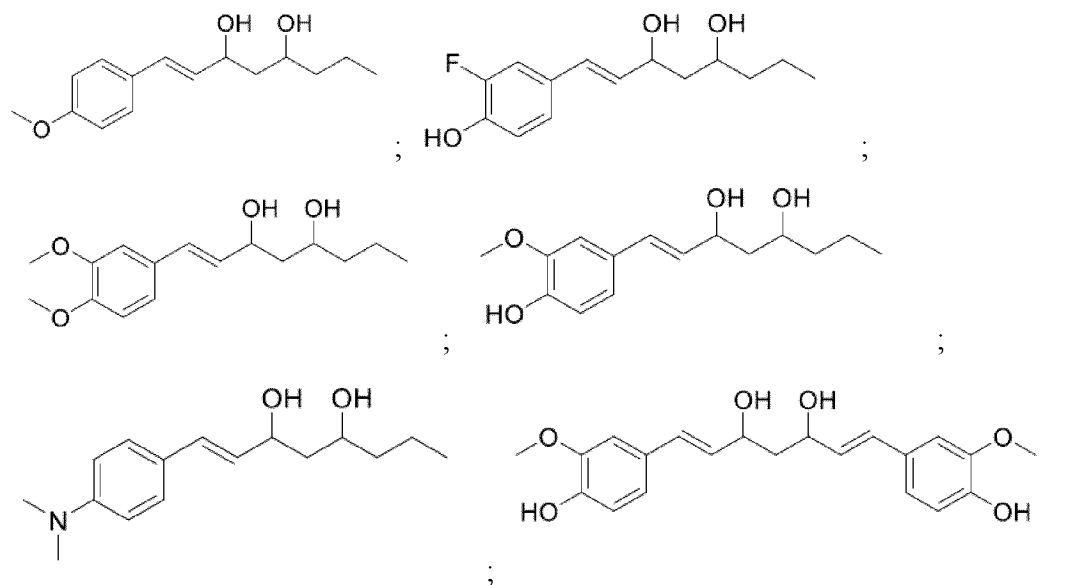
(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопрпилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-

этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, амина, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид, и

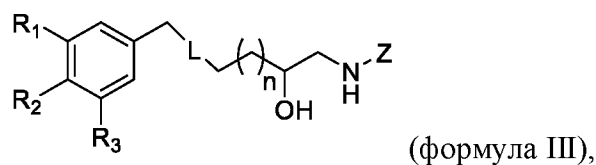
(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь.

[0010] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 выбрана из:



или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0011] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (III):



или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

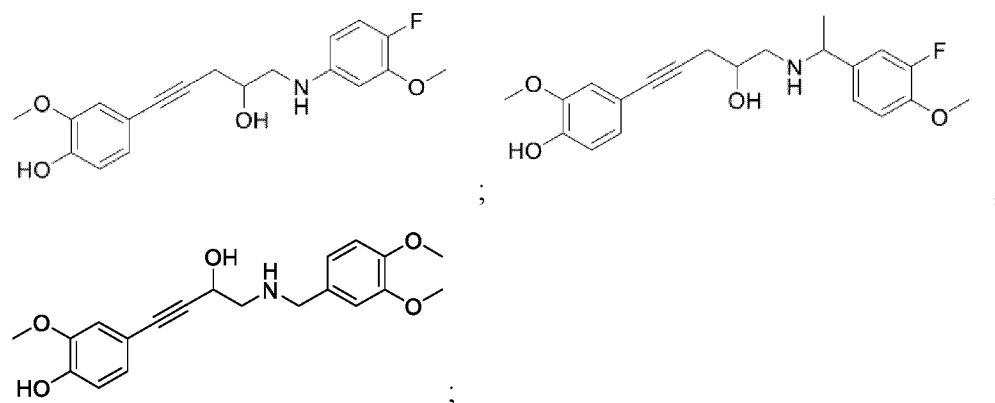
(i) R1, R2 и R3 независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокс, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидрокс, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, -Y-(C₃-C₈)циклоалкила, -Y-(C₅-C₈)циклоалкенила, -Y-(3-8-членного) гетероциклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкенила, -Y-(7-14-членного) гетеробициклоалкила, -Y-(C₆-C₁₀)арила и -Y-(5-10-членного) гетероарила, где Y представляет собой связь или C₁-C₃ прямой или разветвленный алкилен, и где циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкила, галогена, C₁-C₆галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидрокс,

(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и

(iv) n равно 0 или 1.

[0012] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 выбрана из:



или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0013] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит

полипептид, содержащий, состоящий из или по сути состоящий из домена члена семейства белков LRRC4, где домен способен связываться с белком FAM19A5 («FAM19A5-связывающий домен»), и где полипептид является более коротким, чем соответствующий полноразмерный член семейства белков LRRC4 (например, SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; или SEQ ID NO: 6).

[0014] В некоторых аспектах длина связывающего домена FAM19A5 составляет от около 10 до около 23 аминокислот. В некоторых аспектах длина FAM19A5-связывающего домена составляет около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22 или около 23 аминокислот. В некоторых аспектах длина FAM19A5-связывающего домена составляет около 10 аминокислот.

[0015] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV), где:

(i) A содержит X1-(T/S)-(Y/F)-F-X5; где:

X1 представляет собой тирозин (Y), фенилаланин (F), валин (V), лейцин (L) или изолейцин (I);

(T/S) представляет собой треонин (T) или серин (S);

(Y/F) представляет собой тирозин (Y) или фенилаланин (F); и

X5 представляет собой любую аминокислоту; и

(ii) B содержит (V/I)-T-V-(E/V); где:

(V/I) представляет собой валин (V) или изолейцин (I); и

(E/V) представляет собой глутаминовую кислоту (E) или валин (V).

[0016] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV), где:

(i) A содержит (Y/W/M)-(T/Y)-(Y/W)-(F/Y/W)-(T/Y); где:

(Y/W/M) представляет собой тирозин (Y), триптофан (W) или метионин (M);

(T/Y) представляет собой треонин (T) или тирозин (Y);

(Y/W) представляет собой тирозин (Y) или триптофан (W); и

(F/Y/W) представляет собой фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W); и

(ii) B содержит X7-(T/S/Y)-X9-X10; где:

X7 представляет собой валин (V), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M);

(T/S/Y) представляет собой треонин (T), серин (S) или тирозин (Y);

X9 представляет собой валин (V), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M); и

X10 представляет собой глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), метионин (M) или триптофан (W).

[0017] В данном документе также представлена молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

X1-X2-X3-F-X5-T-X7-T-V-X10 (формула V), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L или I;

X2 представляет собой T или S;

X3 представляет собой Y или F;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X7 представляет собой V или I; и/или

X10 представляет собой E или V, и

где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

[0018] В данном документе также представлена молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу: (от N-конца к C-концу):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (формула VI), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L, I, W или M;

X2 представляет собой T, S или Y;

X3 представляет собой Y, F или W;

X4 представляет собой F, Y или W;

X5 представляет собой любую аминокислоту, например, T, S или Y;

X6 представляет собой T, S или Y;

X7 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M;

X8 представляет собой T, S или Y;

X9 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M; и/или

X10 представляет собой E, D, V, I, Y, F, M или W, и

где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

[0019] В некоторых аспектах X1 представляет собой Y, F, V, L или I. В некоторых аспектах X2 представляет собой T или S. В некоторых аспектах X3 представляет собой Y или F. В некоторых аспектах X4 представляет собой F. В некоторых аспектах X5 представляет собой T или S. В некоторых аспектах X6 представляет собой T. В некоторых аспектах X7 представляет собой V или I. В некоторых аспектах X8 представляет собой T. В некоторых аспектах X9 представляет собой V. В некоторых аспектах X10 представляет собой E или V.

[0020] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE). В некоторых аспектах полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVEETTEISPEDTTRK). В некоторых аспектах полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVEETTEISPEDTTRK). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVEETMEPSQDERTTR). В некоторых аспектах полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVEETMEPSQDERTTR). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE).

[0021] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVEETLETQPGEE). В некоторых аспектах полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18

(GYTYFTTVTVETLETQPGEE). В некоторых аспектах аминокислотные остатки T12 и L13 являются модифицированными (например, замещенными) относительно соответствующих остатков SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 123-142. В некоторых аспектах полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 123-142. В некоторых аспектах один или более аминокислотных остатков находятся в форме D-аминокислоты.

[0022] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD).

[0023] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA). В некоторых аспектах аминокислотные остатки T12 и L13 являются модифицированными (например, замещенными) относительно соответствующих остатков SEQ ID NO: 143. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 123-149. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 123-149.

[0024] В некоторых аспектах аминокислота в положении X2 является фосфорилированной или O-гликозилированной.

[0025] В некоторых аспектах любая молекула-миметик семейства LRRC4, представленная в данном документе, конъюгирована с фрагментом. В некоторых аспектах фрагмент способен усиливать одно или более из следующих свойств полипептида: (1) аффинность связывания с белком FAM19A5, (2) растворимость, (3) устойчивость к расщеплению под действием протеазы и/или пептидазы, (4) пригодность для введения *in*

vivo, (5) способность ингибировать взаимодействие членов семейства белков FAM19A5-LRRC4 или (6) любую комбинацию (1)-(5). В некоторых аспектах фрагмент содержит юкстамембранную последовательность членов семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах юкстамембрана содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK). В некоторых аспектах юкстамембрана состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK).

[0026] В настоящем изобретении дополнительно представлена молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

[0027] В данном документе также представлена молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или около 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4, или SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6 соответственно, и где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

[0028] Для такой молекулы-миметика семейства LRRC4 в некоторых аспектах по меньшей мере одна аминокислотная модификация повышает связывание полипептида с белком FAM19A5. В некоторых аспектах по меньшей мере одна аминокислотная модификация повышает стабильность полипептида. В некоторых аспектах повышение связывания и/или стабильности улучшает способность полипептида ингибировать, снижать или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков

LRRC4. В некоторых аспектах способность полипептида ингибировать, снижать или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с соответствующим полипептидом без по меньшей мере одной аминокислотной модификации.

[0029] В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 453 SEQ ID NO: 5 (например, положении 5 SEQ ID NO: 29) представляет собой T или модифицирован до S или Y. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 454 SEQ ID NO: 5 (например, положении 6 SEQ ID NO: 29) представляет собой T или модифицирован до S или Y. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 449 SEQ ID NO: 5 (например, положении 1 SEQ ID NO: 29) представляет собой Y или модифицирован до F, V, L, I, W или M. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 450 SEQ ID NO: 5 (например, положении 2 SEQ ID NO: 29) представляет собой T или модифицирован до S или Y. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 451 SEQ ID NO: 5 (например, положении 3 SEQ ID NO: 29) представляет собой Y или модифицирован до F или W. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 452 SEQ ID NO: 5 (например, положении 4 SEQ ID NO: 29) представляет собой F или модифицирован до Y или W. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 455 SEQ ID NO: 5 (например, положении 7 SEQ ID NO: 29) представляет собой V или модифицирован до I, Y, F, L, W или M. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 456 SEQ ID NO: 5 (например, положении 8 SEQ ID NO: 29) представляет собой T или модифицирован до S или Y. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 457 SEQ ID NO: 5 (например, положении 9 SEQ ID NO: 29) представляет собой V или модифицирован до I, Y, F, L, W или M. В некоторых аспектах аминокислотный остаток в положении 458 SEQ ID NO: 5 (например, положении 10 SEQ ID NO: 29) представляет собой E или модифицирован до D, V, I, Y, F, M или W.

[0030] В некоторых аспектах один или более аминокислотных остатков вышеуказанных молекул-миметиков семейства LRRC4, находятся в D-форме. В некоторых аспектах аминокислота в D-форме находится на N-конце, C-конце или на обоих.

[0031] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе (например, представленная выше), конъюгирована с фрагментом. В

некоторых аспектах фрагмент способен усиливать одно или более из следующих свойств полипептида: (1) аффинность связывания с белком FAM19A5, (2) растворимость, (3) устойчивость к расщеплению под действием протеазы и/или пептидазы, (4) пригодность для введения *in vivo*, (5) способность ингибировать взаимодействие членов семейства белков FAM19A5-LRRC4 или (6) любую комбинацию (1)-(5). В некоторых аспектах фрагмент содержит юкстамембранную последовательность членов семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах юкстамембрана содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK). В некоторых аспектах юкстамембрана состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK).

[0032] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, не содержит трансмембранный домен и/или внутриклеточный домен члена семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, способна конкурировать с членом семейства белков LRRC4 за связывание с белком FAM19A5.

[0033] В некоторых аспектах член семейства белков LRRC4 включает белок LRRC4, белок LRRC4B, белок LRRC4C или их комбинации.

[0034] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислот на N-конце полипептида, C-конце полипептида или как на N-конце, так и на C-конце полипептида. В некоторых аспектах одна или более дополнительных аминокислот представляют собой гидрофильные аминокислоты. В некоторых аспектах одна или более дополнительных аминокислот представляют собой D-аминокислоты.

[0035] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, содержит полипептид, где N-конец, C-конец или как N-конец, так и C-конец полипептида содержат модификацию, которая повышает стабильность полипептида. В некоторых аспектах модификация включает Fmoc, ПЭГилирование, ацетилирование, метилирование, циклизацию или их комбинации.

[0036] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, включает слитый белок. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, дополнительно содержит продлевающий период полужизни фрагмент. В некоторых аспектах продлевающий период полужизни фрагмент содержит Fc, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C-концевой пептид (CTP) β -субъединицы хорионического

гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (ПЭГ), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропилкрахмал (HES), альбумин-связывающую малую молекулу или их комбинацию.

[0037] В данном документе представлена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая молекулы-миметики семейства LRRC4, описанные в данном документе. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота представляет собой ДНК или РНК. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота представляет собой mRNA. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота содержит аналог нуклеиновой кислоты.

[0038] В данном документе также представлен вектор, содержащий любую из нуклеиновых кислот, описанных в данном документе. В данном документе представлена клетка, содержащая любой из векторов, описанных в данном документе. В данном документе представлен белковый конъюгат, содержащий любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, описанных в данном документе, которая связана со средством.

[0039] В данном документе также представлена композиция, содержащая любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов, описанных в данном документе. В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.

[0040] В данном документе представлен набор, содержащий молекулы-миметики семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты или композиции, описанные в данном документе, а также инструкции по применению.

[0041] В настоящем изобретении также представлен способ получения молекулы, которая способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4, где способ включает синтез любой из малых молекул семейства LRRC4, описанных в данном документе, или культивирование клеток, описанных в данном документе, в подходящих условиях для получения молекулы. В некоторых аспектах способ дополнительно включает выделение полученных молекул.

[0042] В данном документе представлен способ повышения удлинения нейритов и/или образования синапсов в нейронах, включающий приведение нейрона в контакт с любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, нуждающегося в этом. В таких аспектах способ может включать введение молекулы-миметика семейства LRRC4, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки, белкового конъюгата или композиции субъекту перед приведением в контакт. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *ex*

vivo.

[0043] В некоторых аспектах приведение в контакт повышает удлинение нейритов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, удлинением нейритов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт). В некоторых аспектах приведение в контакт повышает образование синапсов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, образованием синапсов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).

[0044] В некоторых аспектах повышение удлинения нейритов и/или образование синапсов уменьшает один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, выбранным из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

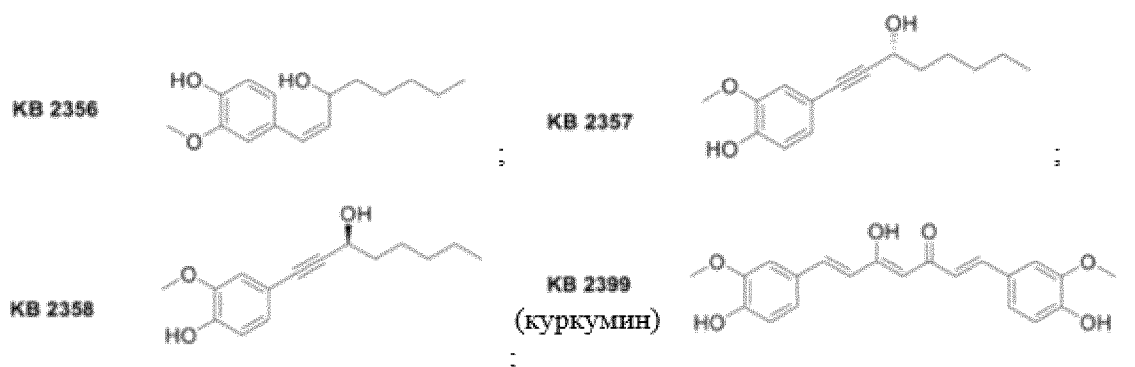
[0045] В настоящем изобретении дополнительно представлен способ ингибирования или уменьшения образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе.

[0046] В некоторых аспектах образование комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% после введения. В некоторых аспектах снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышает активность члена семейства белков LRRC4 у субъекта.

[0047] В данном документе также представлен способ лечения заболевания или

состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе, где заболевание или состояние выбрано из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

[0048] В данном документе представлен способ повышения удлинения нейритов и/или образования синапсов в нейронах, включающий приведение нейрона в контакт с молекулой-миметиком семейства LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком семейства со сходством последовательностей 19, членом A5 («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

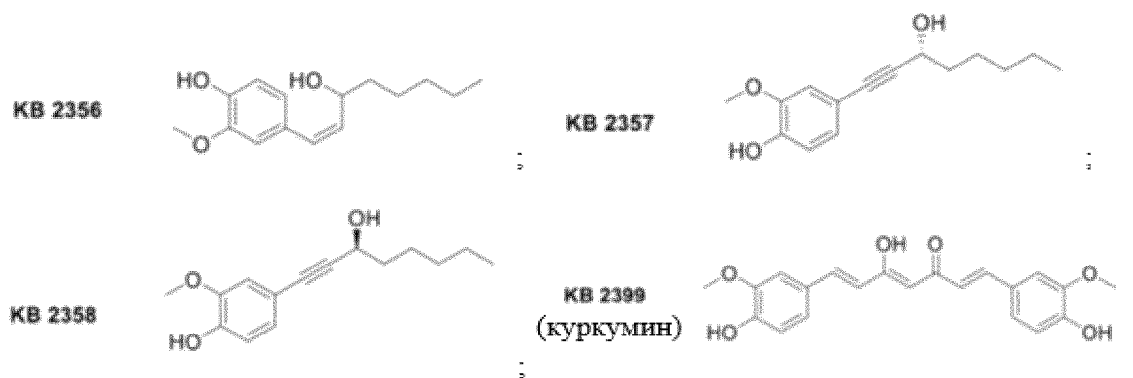
[0049] В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, нуждающегося в этом. В таких аспектах способ может включать введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4 перед приведением в контакт. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *ex vivo*.

[0050] В некоторых аспектах приведение в контакт повышает удлинение нейритов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, удлинением нейритов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт). В некоторых аспектах приведение в контакт повышает образование синапсов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около

4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, образованием синапсов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).

[0051] В некоторых аспектах повышение удлинения нейритов и/или образование синапсов уменьшает один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, выбранным из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

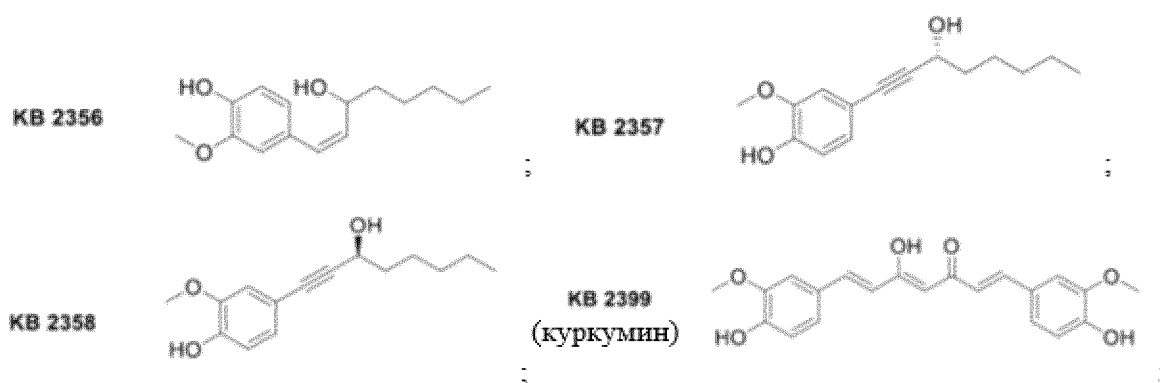
[0052] В настоящем изобретении также представлен способ ингибирования или снижения образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком семейства со сходством последовательностей 19, членом A5 («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0053] В некоторых аспектах образование комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% после введения. В некоторых аспектах снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышает активность члена семейства белков LRRC4 у субъекта.

[0054] В данном документе представлен способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:



или его фармацевтически приемлемую соль, и где заболевание или состояние выбрано из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0055] На **фиг. 1A, 1B, 1C** и **1D** изображена способность различных членов семейства белков LRRC4 (т.е. белков LRRC4C, LRRC4 и LRRC4B) связываться с белком FAM19A5, измеренная с использованием коиммунопреципитации (**фиг. 1A** и **1B**) или иммунофлуоресцентного анализа (**фиг. 1C** и **1D**). На **фиг. 1A** клеточные лизаты (из клеток HEK293, экспрессирующих меченые FLAG белки LRRC4C, LRRC4 или LRRC4B и обработанных рекомбинантным белком FAM19A5) иммунопреципитировали с помощью антитела к FLAG, а иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG (верхний ряд) и антитела к FAM19A5 (3-2) (нижний ряд). На **фиг. 1B** клеточные лизаты (из клеток HEK293, экспрессирующих меченый FLAG белок LRRC4B и обработанных рекомбинантным белком FAM19A5) иммунопреципитировали с помощью либо IgG человека («IgG»), либо антитела к FAM19A5 (1-65) («1-65»). Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG (верхний ряд) и антитела к FAM19A5 (3-2) (нижний ряд). На **фиг. 1C** клетки HEK293, экспрессирующие меченый FLAG белок LRRC4B, обрабатывали рекомбинантным белком FAM19A5 и иммуноокрашивали антителом к FLAG и антителом к FAM19A5 (3-2). На **фиг. 1D** первичные кортикальные нейроны обрабатывали рекомбинантным белком FAM19A5 и

иммуноокрашивали антителом к FAM19A5 (3-2) и антителом к LRRC4B. На **фиг. 1C** и **1D** ядра окрашивали Hoechst33342. Кроме того, изображения, представленные во 2-м (только окрашивание белка FAM19A5), 3-м (только окрашивание белка LRRC4B) и 4-м (наложение окрашивания FAM19A5 и LRRC4B) рядах **фиг. 1C** и **1D** представляют собой виды в увеличенном масштабе прямоугольной области изображения, представленного в первом ряду. Колокализованные сигналы обозначены стрелками. Масштабная полоска = 30 мкм.

[0056] На **фиг. 2A, 2B, 2C** и **2D** изображено связывание белка LRRC4B с изоформой 1 и изоформой 2 белка FAM19A5, измеренное с использованием либо иммунофлуоресценции (**фиг. 2A** и **2B**), либо анализа коиммунопреципитации (**фиг. 2C** и **2D**). На **фиг. 2A** представлены данные иммунофлуоресценции, показывающие взаимодействие между белком LRRC4B и изоформой 1 FAM19A5. На **фиг. 2B** представлены данные иммунофлуоресценции, показывающие взаимодействие между белком LRRC4B и изоформой 2 FAM19A5. На **фиг. 2C** клеточные лизаты из котрансфицированных клеток НЕК293 подвергали иммунопреципитации с помощью антитела к FLAG, а затем иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG (верхний ряд) и антитела к FAM19A5 (3-2) (нижний ряд). На **фиг. 2D** клеточные лизаты котрансфицированных клеток НЕК293 подвергали иммунопреципитации со следующим: (i) антителом к IgG человека («IgG»); (ii) антителом к FAM19A5 (1-65) («1-65»); или (iii) антителом к FAM19A5 (3-2) («3-2»). Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG (верхний ряд) и антитела к FAM19A5 (3-2) (нижний ряд).

[0057] **Фиг. 3A** и **3B** изображено связывание различных делеционных конструкций белка LRRC4B с белком FAM19A5. На **фиг. 3A** схематически представлены различные домены белка LRRC4B и изображены домены, включенные в различные делеционные конструкции. Показанные домены LRRC4B включают: «SP» = сигнальный пептид; «LRR» = богатый лейцином повтор; «IG» = иммуноглобулиноподобный белок типа C2; «Thr» = богатый треонином; «TM» = трансмембранный; и «PB» = PSD95-связывающий. В столбце под названием «связывание» показано, способен ли конкретный белковый фрагмент LRRC4B связываться с белком FAM19A5: «O» = связывание; «X» = связывание отсутствует; и «н.о.» = не определено. На **фиг. 3B** изображено связывание различных делеционных конструкций белка LRRC4B с белком FAM19A5, измеренное с использованием анализа коиммунопреципитации.

[0058] На **фиг. 4A** и **4B** изображено связывание белка FAM19A5 с эктодоменом членов семейства белков LRRC4, измеренное с использованием ELISA. На **фиг. 4A**

представлены данные, показывающие связывание белка FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом LRRC4 (аминокислоты 39-527 SEQ ID NO: 1; т.е. белки SEQ ID NO: 4) («1»), LRRC4B (аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2; т.е. SEQ ID NO: 5) («2»), и LRRC4C (аминокислоты 45-527 SEQ ID NO: 3; т.е. SEQ ID NO: 6) («3»). На **фиг. 4B** представлены данные, показывающие связывание белка FAM19A5 с различными белковыми фрагментами LRRC4B: (a) аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 7); (b) аминокислоты 484-576 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 8); (c) аминокислоты 482-576 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 9); (d) аминокислоты 482-497 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 10); и (e) аминокислоты 498-576 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 11).

[0059] На **фиг. 5A** и **5B** изображено связывание белка FAM19A5 со следующими белковыми фрагментами членов семейства белков LRRC4: (1) LRRC4 (аминокислоты 451-483 SEQ ID NO: 1) (т.е. SEQ ID NO: 12); (2) LRRC4C (аминокислоты 451-484 SEQ ID NO: 3) (т.е. SEQ ID NO: 13); и (3) LRRC4B (аминокислоты 484-522 SEQ ID NO: 2) (т.е. SEQ ID NO: 14). На **фиг. 5A** представлена схема различных доменов, присутствующих в членах семейства белков LRRC4, включая аминокислотные последовательности тестируемых белковых фрагментов. Показанные домены включают: «SP» = сигнальный пептид; «LRR» = богатый лейцином повтор; «IG» = иммуноглобулиноподобный белок типа C2; «Thr» = богатый треонином; «TM» = трансмембранный; и «PB» = PSD95-связывающий. В столбце «связывание» показано, способен ли конкретный белковый фрагмент LRRC4B связываться с белком FAM19A5: «O» = связывание; «X» = связывание отсутствует; и «н.о.» = не определено. На **фиг. 5B** показано взаимодействие между белком FAM19A5 и различными белковыми фрагментами семейства LRRC4. Клеточные лизаты иммунопреципитировали с помощью антитела к FLAG, а иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG (верхние гели) и антитела к FAM19A5 (3-2) (нижние гели).

[0060] На **фиг. 6** показана способность следующих пептидных фрагментов, содержащих последовательность YTYFTTVTVETLE (SEQ ID NO: 15) белка LRRC4B, связываться с белком FAM19A5: (1) «FB-16» = 16 аминокислот в длину (SEQ ID NO: 17); (2) «FB-20» = 20 аминокислот в длину (SEQ ID NO: 18); и (3) «FB-28» = 28 аминокислот в длину (SEQ ID NO: 19).

[0061] На **фиг. 7** изображена способность пептидного фрагмента LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2) (т.е. SEQ ID NO: 7) (нижний ряд) индуцировать диссоциацию взаимодействия между FAM19A5 (изоформа 2) и полноразмерными белками LRRC4B в клетках HEK293, измеренную с использованием иммунофлуоресцентной

микроскопии. В качестве контроля использовали клетки НЕК293, обработанные мутантной формой пептидного фрагмента LRRC4B (содержит замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2) («МТ»). Изображение в прямоугольнике (см. нижний ряд, 4-й прямоугольник слева) было увеличено до изображений, окрашенных только антителом к hIgG (вверху) и как антителом к hIgG, так и антителом к FLAG (внизу). Закрытые стрелки на увеличенном изображении указывают на сигналы FAM19A5, диссоциированные от LRRC4B. Открытые стрелки обозначают LRRC4B(453-576)-hFc, который сохраняется, если присутствует LRRC4B. Масштабная полоска = 30 мкм.

[0062] На **фиг. 8А** и **8В** представлены данные анализа конкурентного ингибирования, сравнивающие способность различных пептидных фрагментов LRRC4B ингибировать связывание белка FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом белка LRRC4B (т.е. аминокислотами 36-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 5). На **фиг. 8А** представлены данные для следующих пептидных фрагментов LRRC4B: (1) LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 7); (2) мутант LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2 с мутацией AA в положениях 488 и 489) (SEQ ID NO: 16); (3) LRRC4B (аминокислоты 484-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 8); (4) LRRC4B (аминокислоты 482-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 9); (5) LRRC4B (аминокислоты 482-497 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 10); и (6) LRRC4B (аминокислоты 498-576 SEQ ID NO: 1) (SEQ ID NO: 11). На **фиг. 8В** представлены данные анализа конкурентного ингибирования, показывающие способность (1) пептидов FB-28, (2) FB-20 и (3) FB-16 (описанных на **фиг. 6**) ингибировать связывание белка FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом белка LRRC4B.

[0063] На **фиг. 9А**, **9В** и **9С** сравнивается способность различных пептидных фрагментов LRRC4B ингибировать связывание белка FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом различных членов семейства белков LRRC4: LRRC4 (аминокислотные остатки 39-572 SEQ ID NO: 1) (т.е. SEQ ID NO: 4), LRRC4B (аминокислотные остатки 36-576 SEQ ID NO: 2) (т.е. SEQ ID NO: 5) и LRRC4C (аминокислотные остатки 45-527 SEQ ID NO: 3) (т.е. SEQ ID NO: 6) соответственно. Показанные различные пептидные фрагменты LRRC4B включают: (1) LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 7); (2) мутант LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2 с мутацией AA в положениях 488 и 489) (т.е. SEQ ID NO: 16); и (3) FB-20 (т.е. пептидный фрагмент длиной 20 аминокислот, содержащий последовательность YTYFTTVTVETLE белка LRRC4B; GYTYFTTVTVETLETQPGEE; SEQ ID NO: 18).

[0064] На **фиг. 10А** и **10В** сравнивается способность пептидных фрагментов FBC4-23 и FBC4C-23 ингибировать связывание белка FAM19A5 либо с полноразмерным

эктодоменом белка LRRC4B (**фиг. 10А**), либо с богатым треонином доменом белка LRRC4B (т.е. аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2, т.е. SEQ ID NO: 7) (**фиг. 10В**). Пептидный фрагмент FBC4-23 содержал FAM19A5-связывающий домен (выделено жирным шрифтом и курсивом) белка LRRC4 и имел следующую последовательность: ***NYSFFT^WTV^TVETTE**ISPEDTTRK* (SEQ ID NO: 20). Пептидный фрагмент FBC4C-23 содержал FAM19A5-связывающий домен (выделено жирным шрифтом и курсивом) белка LRRC4C и имел следующую последовательность: ***NFSYFST^WTV^TVETME**PSQDERTTR* (SEQ ID NO: 21). Пептид FB-20 (см. **фиг. 6**) также использовали в сравнительных целях.

[0065] На **фиг. 11А** и **11В** изображена способность различных вариантов пептидного фрагмента FB-20 ингибировать связывание белка FAM19A5 либо с полноразмерным эктодоменом белка LRRC4B (**фиг. 11А**), либо с белковым фрагментом LRRC4B, содержащим FAM19A5-связывающий домен (т.е., аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 7) (**фиг. 11В**). Показаны следующие варианты FB-20: (1) FB-m11dC, (2) FB-m10dC, (3) FB-m9dC, (4) FB-m8dC, (5) FB-m7dC, (6) FB -m6dC, (7) FB-m10dN, (8) FB-m9dN, (9) FB-m8dN и (10) FB-m7dN. Как описано в примере 6, каждый из вариантов FB-20 содержал одну или более аминокислотных делеций либо на С-конце, либо на N-конце домена белка LRRC4B, способного связываться с белком FAM19A5, *YTYFTT^WTV^TVETLE* (SEQ ID NO: 15). Конкретные аминокислотные последовательности вариантов FB-20 представлены в таблице 9.

[0066] На **фиг. 12А** и **12В** изображена способность различных вариантов пептидного фрагмента FB-20 с заменой аланина (A) или аспарагина (N) ингибировать связывание белка FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом белка LRRC4B (**фиг. 12А**) или белковым фрагментом LRRC4B, содержащим FAM19A5-связывающий домен (т.е. аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7) (**фиг. 12В**). Как описано в примере 7, замены аланина или аспарагина независимо вводили в пептидный фрагмент FB-20 в одном из аминокислотных остатков домена белка LRRC4B, способного связываться с белком FAM19A5, т.е. *YTYFTT^WTV^TVETLE* (SEQ ID NO: 15). Конкретные аминокислотные последовательности вариантов FB-20 представлены в таблице 10. Для каждого из показанных вариантов пептида FB-20 (кроме FB-20[12-L] и FB-20[13-E]) первый столбец соответствует замене аланина, а второй столбец соответствует замене аспарагина. Для вариантов FB-20[12-L] и FB-20[13-E] показана только замена аланина.

[0067] На **фиг. 13А** и **13В** изображены уровни транскриптов членов семейства FAM19A5 (**фиг. 13А**) или генов LRRC4B и PTPRF (**фиг. 13В**) в культурах гиппокампа мыши. Как описано в примере 8, первичные нейроны гиппокампа, полученные из головного

мозга мыши в день 1 постнатального развития, культивировали в течение 15 дней *in vitro*. Уровень транскриптов различных генов измеряли в дни 1, 3, 7, 10 и 15 после первоначального культивирования и количественно определяли с помощью анализа RNA-seq. На **фиг. 13А** для каждого из показанных дней первый, второй и третий столбцы (слева направо) соответствуют FAM19A1, FAM19A2 и FAM19A5 соответственно. Транскрипты FAM19A3 и FAM19A4 не обнаружены. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM для трех повторностей.

[0068] На **фиг. 14А, 14В, 14С** и **14D** изображена способность пептидного фрагмента LRRC4B (аминокислотные остатки 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7) стимулировать удлинение нейритов первичных кортикальных нейронов мыши *in vitro* в различных концентрациях (ось x) (0,006-60 нМ). Как описано в примере 8, первичные кортикальные нейроны мыши (в день один после рождения) обрабатывали белковым фрагментом LRRC4B в день 1 и 2 день после исходного культивирования, а в день 3 количественно оценивали следующее путем иммуноокрашивания антителом к бета-тубулину III: (i) среднее общее удлинение нейритов (**фиг. 14А**), (ii) количество первичных дендритов (**фиг. 14В**), (iii) количество точек ветвления (**фиг. 14С**) и (iv) количество вторичных нейритов (**фиг. 14D**). Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с апостериорными критериями Бонферрони; a, $p < 0,01$ по сравнению с контролем несущей средой.

[0069] На **фиг. 15А, 15В** и **15С** изображено влияние пептидного фрагмента LRRC4B (аминокислотные остатки 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7) на экспрессию синаптофизина (SYP; пресинаптический маркер) и PSD95 (постсинаптический маркер) в нейронах гиппокампа мыши. На **фиг. 15А** и **15В** показаны общая интенсивность флуоресценции SYN и PSD-95 соответственно в дендритах/нейритах нейронов гиппокампа с пептидным фрагментом LRRC4B (6 или 60 нМ), измеренная с помощью программного обеспечения IMARIS (IMARIS 9.0 Bitplane, Швейцария). На **фиг. 15С** изображено количество колокализованных вокселей между сигналами SYP и PSD95 в обработанных дендритах/нейритах нейронов гиппокампа. На каждой из **фиг. 15А-15С**, нейроны гиппокампа мыши, обработанные несущей средой («Veh») и мутантным пептидным фрагментом LRRC4B (MT) (60 нМ) (т.е. содержащим замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 16), использовали в качестве контролей. Как описано в других разделах настоящего изобретения, MT LRRC4B не был способен связываться с белком FAM19A5. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Количество нейронов, используемых для количественной оценки интенсивности флуоресценции,

указано в скобках гистограммы. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; а, $P < 0,05$ по сравнению с Veh; b, $P < 0,05$ по сравнению с LRRC4B MT (60 нМ).

[0070] На **фиг. 16А, 16В** и **16С** изображена способность пептидного фрагмента LRRC4B (аминокислотные остатки 453-576 SEQ ID NO: 2; «WT») (т.е. SEQ ID NO: 7) стимулировать образование синапсов в гиппокампе CA1 мышей APP/PS1. Как дополнительно описано в примере 8, мышей APP/PS1 обрабатывали пептидным фрагментом LRRC4B (30 мг/кг; внутривенное введение) в течение четырех последовательных недель, а затем образование синапсов оценивали с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием антител к SYP и PSD95. Контрольные животные не получали обработки («контр.») или мутантного пептидного фрагмента LRRC4B (60 нМ) (т.е. содержащего замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 16). На **фиг. 16А** представлены репрезентативные флуоресцентные микрофотографии. На **фиг. 16В** и **16С** изображены интенсивность SYP и PSD95 соответственно.

[0071] На **фиг. 17А, 17В** и **17С** изображена способность пептидного фрагмента LRRC4B (аминокислотные остатки 453-576 SEQ ID NO: 2; «WT»; SEQ ID NO: 7) для стимулирования образования синапсов в CA3 гиппокампа мышей APP/PS1. Животных обрабатывали и анализировали, как описано на фиг. 16А-16С. На **фиг. 17А** представлены репрезентативные флуоресцентные микрофотографии. На **фиг. 17В** и **17С** изображена интенсивность SYP и PSD95 соответственно.

[0072] На **фиг. 18А, 18В, 18С, 18D** и **18Е** изображено удлинение нейритов в первичных кортикальных нейронах мыши, обработанных *in vitro* пептидами FB-16, FB-20 и FB-28 (описанными на фиг. 6). Первичные кортикальные нейроны обрабатывали в течение двух дней, а затем в день 3 оценивали удлинение нейритов посредством иммуноокрашивания антителом к бета-тубулину III. На **фиг. 18А** представлены репрезентативные микроскопические изображения каждой из групп обработки. На **фиг. 18В, 18С, 18D** и **18Е** изображены (i) средняя длина общего удлинения нейритов, (ii) количество первичных дендритов, (iii) количество точек ветвления и (iv) количество вторичных нейритов соответственно. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; а, $P < 0,01$ по сравнению с контролем (контр.).

[0073] На **фиг. 19А, 19В** и **19С** изображена повышенная экспрессия синаптофизина

(SYP; пресинаптический маркер) и PSD95 (постсинаптический маркер) в первичных нейронах гиппокампа мыши, обработанных *in vitro* пептидами FB-16, FB-20 и FB-28 (описанными на фиг. 6). На **фиг. 19А** и **19В** изображены общая интенсивность флуоресценции SYN и PSD-95 соответственно в дендритах/нейритах нейронов гиппокампа, измеренная с использованием программного обеспечения IMARIS (IMARIS 9.0 Bitplane, Швейцария). На **фиг. 19С** изображено количество колокализованных вокселей между сигналами SYP и PSD95 в обработанных дендритах/нейритах нейронов гиппокампа. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM. Количество нейронов, используемых для количественной оценки интенсивности флуоресценции, указано в скобках гистограммы. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; *, $P < 0,05$ по сравнению с контр.; **, $P < 0,05$ по сравнению с контр.

[0074] На **фиг. 20** показано выравнивание последовательностей доменов, представляющих интерес (т.е. способных связываться с белком FAM19A5) у членов семейства белков LRRC4 различных видов позвоночных.

[0075] На **фиг. 21А** и **21В** представлено влияние различных модификаций аминокислот на аффинность связывания фрагментов LRRC4В, оцененную посредством сканирования остатков *in silico* комплекса семейства FAM19A5-LRRC4 с использованием платформы Шредингера. На **фиг. 21А** представлена прогностическая ценность изменения свободной энергии Гиббса при замене аланина в каждом из аминокислотных остатков фрагмента FB-20 (SEQ ID NO: 18). На **фиг. 21В** представлена прогностическая ценность изменения свободной энергии Гиббса для двадцати наиболее эффективных двойных мутантов FB-20 (содержащих аминокислотные замены в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 18) с повышенной аффинностью к белку FAM19A5. Последовательности показанных двойных мутантов FB-20 представлены в примере 9 (таблица 12).

[0076] На **фиг. 22А, 22В** и **22С** изображена способность различных мутантов пептида FB-21 связываться с белком FAM19A5. На **фиг. 22А** представлено сравнение ингибирующего эффекта следующих пептидных фрагментов FB-21 в отношении взаимодействия между hFc-слитым hLRRC4В и rcFAM19A5, определенного с помощью анализа конкурентного ингибирования: (1) FB-21 дикого типа (SEQ ID NO: 143); (2) FB-21 (P12Y13) (SEQ ID NO: 144), (3) FB-21 (H12F13) (SEQ ID NO: 145), (4) FB-21 (Q12R13) (SEQ ID NO: 146), (5) FB-21 (W12Y13) (SEQ ID NO: 147), (5) FB-21 (M12R13) (SEQ ID NO: 148) и (6) FB-21 (I12F13) (SEQ ID NO: 149). На **фиг. 22В** изображено сравнение ингибирующего эффекта следующих пептидных фрагментов FB-21 в отношении взаимодействия между

HIS0TEV LRRC4B и белком rcFAM19A5, как определено с помощью анализа конкурентного ингибирования: (1) FB-21 (дикий тип) (SEQ ID NO: 143), (2) FB-21 (W12Y13) (SEQ ID NO: 147), (3) FB-21 (D12Y13) (SEQ ID NO: 131), (4) FB-21 (F12F13) (SEQ ID NO: 132), (5) FB-21 (H12Y13) (SEQ ID NO: 133), (6) FB-21 (D12F13) (SEQ ID NO: 135) и (7) FB-21 (D12I13) (SEQ ID NO: 136). На **фиг. 22С** представлены результаты для следующих пептидных фрагментов FB-21, которые содержали аминокислоты D-формы на амино- и карбоксильном конце, с аминокислотами L-формы на всех остальных остатках: (1) пептид FB-21 d-формы с юкстамембранной (JM) последовательностью («dFB-JM-31»), (2) пептид FB-21 d-формы с последовательностью, проникающей через BBB на каждом конце последовательности («dFB-BBB-39»), и (3) мутантный пептид FB-21 d-формы с заменой DY и дополнительной последовательностью JM («dFB-DY-JM31»).

[0077] На **фиг. 22D** представлено выравнивание последовательностей различных членов семейства LRRC4 (т.е. белков LRRC4, LRRC4B и LRRC4C). Следующие домены представлены в прямоугольниках: (1) FAM19A5-связывающий домен («FB»); (2) юкстамембранный домен («JM») и (3) трансмембранный домен («TM»).

[0078] На **фиг. 23А, 23В, 23С** и **23D** изображен эффект различных пептидных фрагментов FB-21, описанных в данном документе, в отношении индуцированной бета-амилоидом потери синапсов в первичных нейронах мышцы. На **фиг. 23А** представлены репрезентативные изображения для PSD95 (верхний ряд), SYP (средний ряд) и слияния (нижний ряд) нейронов гиппокампа, обработанных FB-21, FB-13-JM или FB-BBB-39 (все 6,6 нМ; см. **фиг. 22С** для описания различных тестируемых пептидных фрагментов FB-21). Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst (синий). Масштабная полоска = 50 мкм. На **фиг. 23В** представлено сравнение количества колокализованных вокселей между дендритами/нейритами сигналов SYP и PSD95 нейронов гиппокампа, обработанных FB-21, FB-13-JM или FB-BBB-39 (все 6,6 нМ). Количество колокализованных вокселей рассчитывали с помощью программного обеспечения IMARIS (левая панель, IMARIS 9.0 Bitplane, Швейцария). На **фиг. 23С** и **23D** представлено сравнение общей интенсивности флуоресценции для PSD95 и SYN соответственно в дендритах/нейритах нейронов гиппокампа, обработанных FB-21, FB-13-JM или FB-BBB-39 (все 6,6 нМ), измеренной с использованием IMARIS. Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; *, $P < 0,05$ и **, $P < 0,01$ по сравнению с NT.

[0079] На **фиг. 24А** и **24В** изображено влияние некоторых пептидных фрагментов

FB-21, описанных в данном документе (т.е. dFB-dWY-JM31 и dFB-dY-JM31) в отношении стимулирования удлинения нейритов первичных спинальных мотонейронов мышцы. На **фиг. 24А** представлены репрезентативные объединенные изображения необработанных (NT) или обработанных пептидным фрагментом FB-21 спинальных мотонейронов, которые иммуноокрашены антителом к Тау-5. Нейрональную сому окрашивали и обнаруживали с помощью красителя Hoechst (синий). Масштабная полоска = 100 мкм. На **фиг. 24В** представлено количественное сравнение средней общей длины нейритов первичных спинальных мотонейронов из различных групп обработки. Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; *, $P < 0,01$ по сравнению с NT.

[0080] На **фиг. 25А** и **25В** изображен эффект варианта пептида FB-21, описанного в данном документе (dFB-dWY-JM31), в отношении индуцированной 6-OHDA гибели клеток в клетках LUNMES. На **фиг. 25А** представлено количественное сравнение экспрессии люминесценции после обработки вариантом пептида FB-21 с обработкой 6-OHDA или без нее. На **фиг. 25В** представлено количественное сравнение экспрессии люминесценции после обработки вариантом пептида FB-21 с обработкой 6-OHDA. Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. Статистическую значимость оценивали с использованием однофакторного ANOVA с последующими апостериорными критериями Бонферрони; *, $P < 0,01$ по сравнению с NT.

[0081] На **фиг. 26А** и **26В** изображен эффект определенного варианта пептида FB-21, описанного в данном документе (dFB-dDY-JM31) в крысиной модели хронической компрессии (CCI). На **фиг. 26А** представлено сравнение порога отдергивания лапы в ответ на механическую аллодинию в различные временные точки после индукции CCI у мышей, обработанных контрольной несущей средой (кружок) или вариантом пептида FB-21 (квадрат). Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. На **фиг. 26В** представлено сравнение общей площади под кривой (AUC) для данных, представленных на **фиг. 26А**. Статистический анализ AUC проводили с помощью одностороннего непарного t-критерия. *, $p < 0,05$.

[0082] На **фиг. 27** изображен эффект варианта пептида FB-21, описанного в данном документе (dFB-dDY-JM31), на дисфункцию сетчатки и модуляцию колебаний нейронов. Электроретинограмму (ERG) записывали для измерения электрических сигналов, излучаемых сетчаткой в ответ на вспышки света, с использованием модели мышей с диабетической ретинопатией (db/db). Амплитуды ERG b-волн, измеренные между

группами; гетерогенный дикий тип (WT, db/+, черный), контроль DR (db/db, красный) и обработанный dFB-dDY-JM31 DR (синий). Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. Статистический анализ проводили с помощью однофакторного ANOVA с последующим использованием критерия множественного сравнения Бонферрони. ***, $p < 0,001$, **, $p < 0,01$.

[0083] На **фиг. 28А** и **28В** изображен эффект варианта пептида FB-21, описанного в данном документе (dFB-dWY-JM-31), в мышинной модели черепно-мозговой травмы. На **фиг. 28А** изображено репрезентативное окрашивание красителем Hoechst для каждой группы. На **фиг. 28В** представлено количественное сравнение объема поражения на основе данных, представленных на **фиг. 28А**. Данные представляют собой среднее значение \pm S.E.M. Статистический анализ проводили с использованием двустороннего непарного t-критерия. ***, $p < 0,001$.

[0084] На **фиг. 29А** и **29В** представлены результаты анализа конкурентного ингибирования, показывающие способность различных химических соединений, описанных в данном документе, ингибировать взаимодействие между Fc-конъюгированным фрагментом белка LRRC4В (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7) и белком FAM19А5. На **фиг. 29А** представлены результаты для следующих химических соединений: (1) KB734, (2) KB761, (3) KB763, (4) KB1157, (5) KB1161, (6) KB1542, (7) KB1543, (8) KB2256, (9) KB2258, (10) KB2310, (11) KB2357, (12) KB2718, (13) KB2719, (14) KB3111, (15) KB3112, (16) KB3220, (17) KB3201, (18) KB3250 и (19) KB3251. На **фиг. 29В** изображена способность химических соединений KB734, KB2310 и KB2357 ингибировать взаимодействие LRRC4В-FAM19А5 в различных концентрациях.

[0085] На **фиг. 30А** и **30В** представлены результаты анализа конкурентного ингибирования, показывающие способность различных производных KB2357 ингибировать взаимодействие между Fc-конъюгированным фрагментом белка LRRC4В (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7) и белком FAM19А5. На **фиг. 30А** представлены результаты для следующих производных: (1) KB2304, (2) KB2305, (3) KB2308, (4) KB2309, (5) KB2314, (6) KB2315, (7) KB2324, (8) KB2325, (9) KB2328, (10) KB2329, (11) KB2336, (12) KB2337, (13) KB2350, (14) KB2356, (15) KB2358, (16) KB2359, (17) KB2369, (18) KB2372 и (19) KB2399. На **фиг. 30В** показана способность химических соединений KB2356, KB2358 и KB2399 ингибировать взаимодействие LRRC4В-FAM19А5 в различных концентрациях. Как на **фиг. 30А**, так и на **фиг. 30В** для сравнительных целей также включен KB2357.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0086] В данном документе раскрыта молекула-миметик, которая способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать связывание между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4. В частности, настоящая заявка впервые показывает, что белок FAM19A5 может связываться с членами семейства белков LRRC4 и тем самым ингибировать активность членов семейства белков LRRC4. Раскрытые молекулы-миметики обладают определенными свойствами (например, структурными и/или функциональными), так что они могут нацеливаться на белок FAM19A5. Ингибируя, снижая и/или диссоциируя взаимодействие между FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4, молекулы-миметика, описанные в данном документе, могут восстанавливать активность эндогенных членов семейства белков LRRC4. Дополнительные аспекты настоящего изобретения представлены в настоящей заявке.

[0087] Для облегчения понимания настоящего изобретения в данном документе приведены определения для ряда терминов и выражений. Дополнительные определения приведены в подробном описании.

I. Определения

[0088] По всему тексту настоящего изобретения термины в форме единственного числа включают ссылки на одно или более; например, «молекула» означает одну или более молекул. Следовательно, термины в форме единственного числа, а также выражения «один или более» и «по меньшей мере один» могут использоваться в настоящем документе взаимозаменяемо.

[0089] Кроме того, в данном контексте «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «А и/или В», предназначен для включения фраз «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такой фразы, как «А, В и/или С», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

[0090] Следует понимать, что в тех случаях, когда аспекты описаны в настоящем документе с формулировкой **«содержащий»**, в ином способе также представлены аналогичные аспекты, описанные в терминах **«состоящий из»** и/или **«состоящий по сути из»**.

[0091] Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в словарях Concise

Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области техники представлено общее пояснение многих терминов, использованных в настоящем изобретении.

[0092] Единицы, префиксы и символы обозначаются в форме, принятой в Международной системе единиц (СИ). Числовые диапазоны включают в себя числа, определяющие диапазон. Если не указано иное, аминокислотные последовательности записываются слева направо в ориентации от амино до карбокси. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов настоящего изобретения, которые могут быть осуществлены со ссылкой на описание в целом. Соответственно, термины, определенные ниже, определены в более полном объеме со ссылкой на это описание в целом.

[0093] Термин «около» используется в данном документе для обозначения примерно, приблизительно, около или в области. Если термин «около» используется в сочетании с числовым диапазоном, то он изменяет этот диапазон, расширяя границы выше и ниже указанных числовых значений. В целом, термин «около» может изменить числовое значение выше и ниже указанного значение с отклонением, *например*, 10 процентов, вверх или вниз (выше или ниже).

[0094] Используемый в данном документе термин «алкенил» относится к группе, содержащей водород и углерод и содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную двойную связь.

[0095] Используемый в данном документе термин «алкокси» относится к алкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту посредством атома кислорода.

[0096] Используемый в данном документе термин «алкил» относится к группе, содержащей водород и углерод и не содержащей двойных связей.

[0097] Используемый в данном документе термин «алкинил» относится к группе, содержащей водород и углерод и содержащей по меньшей мере одну углерод-углеродную тройную связь.

[0098] Используемый в данном документе термин «амино» относится к $-NH_2$.

[0099] Используемый в данном документе термин «бициклоалкенил» относится к конденсированной, спироциклической или мостиковой бициклической углеводородной кольцевой системе, содержащей по меньшей мере одну двойную связь.

[0100] Используемый в данном документе термин «**бициклоалкил**» относится к конденсированному, спироциклическому или мостиковому бициклическому циклоалкильному кольцу.

[0101] Используемый в данном документе термин «**циклоалкенил**» относится к ненасыщенной неароматической моноциклической углеводородной кольцевой системе, не имеющей гетероатомов. Репрезентативные примеры циклоалкенильных групп включают без ограничения циклопентенил, циклогексенил, циклогептенил и циклооктенил.

[0102] Используемый в данном документе термин «**циклоалкил**» относится к насыщенной моноциклической углеводородной кольцевой системе, не имеющей гетероатомов. Репрезентативные примеры циклоалкильных групп включают без ограничения циклопропил, циклобутил, циклопентил и циклогексил.

[0103] Используемый в данном документе термин «**формил**» относится к –СНО.

[0104] Используемые в данном документе термины «**гало**» и «**галоген**» относятся к Cl, Br, I или F.

[0105] Используемый в данном документе термин «**галогеналкокси**» относится к галогеналкильной группе, присоединенной к исходному молекулярному фрагменту посредством атома кислорода.

[0106] Используемый в данном документе термин «**галогеналкил**» относится к алкильной группе, замещенной одним, двумя, тремя или четырьмя атомами галогена.

[0107] Используемый в данном документе термин «**гетероарил**» относится к ароматическому кольцу, содержащему один, два или три гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы. Репрезентативные примеры гетероарильных групп включают без ограничения фурил, имидазолил, пиразолил, пиридилил, пирролил, тиазолил и тиенил.

[0108] Используемый в данном документе термин «**гетеробициклоалкил**» относится к неароматической бициклической кольцевой системе, содержащей один, два, три или четыре гетероатома, независимо выбранных из азота, кислорода и серы, и необязательно содержащей одну или более двойных связей. Гетеробициклоалкильные группы по настоящему изобретению могут быть присоединены к исходному молекулярному фрагменту посредством любого атома углерода или атома азота в группе.

[0109] Используемый в данном документе термин «**гетероциклоалкил**» относится к неароматическому кольцу, содержащему один, два, три или четыре гетероатома, независимо выбранному из азота, кислорода и серы, и необязательно содержащему одну или более двойных связей. Гетероциклоалкильные группы по настоящему изобретения

могут быть присоединены к исходному молекулярному фрагменту посредством любого атома углерода или атома азота в группе. Репрезентативные примеры гетероциклоалкильных групп включают без ограничения морфолинил, пиперазинил, пиперидинил, тетрагидрофуранил, тетрагидропиранил и тиоморфолинил.

[0110] Термин «**содержащее богатые лейцином повторы семейство белков 4**» или «**семейство белков LRRC4**» (включая их производные) относится к семейству белков, которые являются основными синаптическими организаторами и, как было описано, играют роль на различных этапах формирования нервной цепи, включая миграцию нейронов, удлинение нейритов, а также образование и функциональную сборку синаптических контактов. См., например, Woo *et al.*, *Mol Cell Neurosci* 42(1): 1-10 (Sep. 2009). Семейство белков LRRC4 включает три члена: (1) LRRC4, (2) LRRC4B и (3) LRRC4C (вместе обозначаемые в данном документе «**член семейства белков LRRC4**» или «**член семейства белков LRRC4**» (или их производные)). Члены семейства белков LRRC4 обычно содержат девять содержащих богатых лейцином повторов доменов (LRR), фланкирующих N-конец и C-конец LRR (см. фиг. 3А). Известно, что эти домены LRR взаимодействуют с доменами фибронектина типа III белков пресинаптического рецептора тирозинфосфатазы (RPTP). См., например, Won *et al.*, *Mol Cells* 41(7): 622-630 (Jul. 2018). За доменами LRR следуют иммуноглобулиноподобные домены C2-типа (IG) и богатые треонином (Thr) домены, которые вместе образуют внеклеточную часть членов семейства белков LRRC4. В отличие от других членов, белок LRRC4B имеет дополнительный богатый глицином (Gly) домен между богатыми IG и Thr доменами. В дополнение к внеклеточной части члены семейства белков LRRC4 дополнительно включают трансмембранный (TM) домен и постсинаптический домен, связывающий плотность (PB), на C-конце белка.

[0111] У человека ген, кодирующий белок LRRC4, расположен на хромосоме 7 (нуклеотиды 128027071-128032107, номер доступа GenBank NC_000007.14; ориентация минус-цепи). Синонимы белка LRRC4 известны, и примеры включают: «белок гена 14, ассоциированный с карциномой носоглотки», «белок BAG, ассоциированный с опухолью головного мозга», «нетрин-лиганд -G2», «NAG14», «NGL-2» и «BAG». Аминокислотная последовательность белка LRRC4 имеет длину 653 аминокислоты и представлена в таблице 1 (ниже). Полноразмерный эктодомен белка LRRC4 соответствует аминокислотным остаткам 39-527 SEQ ID NO: 1 (т.е. SEQ ID NO: 4). Если не указано иное, термин «**белок LRRC4**» (включая его синонимы) включает любые варианты или изоформы белка LRRC4, которые естественным образом экспрессируются клетками.

Таблица 1. Последовательность белка LRRC4

<p>Белок LRRC4 человека (UniProt: Q9HBW1) (сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)</p>	<p>MKLLWQVTVHHHTWNAILLPFVYLTAQVWILCA AIAAAAASAGPQNCPSVCSCSNQFSKVVCTRRGLSEVP QGIPSNTRYLNL MENNIQMIQADTFRHLHHLEVLQLG RNSIRQIEVGAFNGLASLNTLELFDNWLTVIPSGAFEY LSKLRELWLRNNPIESIPSYAFNRVPSLMRLDLGELKK LEYISEGAFEGFLNLYNLGMCNIKDMPNLTPLVGL EELEMSGNHFP EIRPGSFHGLSSLKKLWVMNSQVSLI ERNAFDGLASLVELNLAHNNLSSLPHDLFTPLRYLVE LHLHHNPWNCDCDILWLAWWLREYIPTNSTCCGRG HAPMHMRGRYLVEVDQASFQCSAPFIMDAPRDLNIS EGRMAELKCRTPPMSSVKWLLPNGTVLSHASRHPRI S VLNDGTLNFSHVLLSDTG VYTCMVTNVAGNSNAS AYLNVSTAELNTSNYSFFTTVTVETTEISPEDTTRKYK PVPTTSTGYQPAYTTSTTVLIQTTRV PKQVAVPATDTT DKMQTSLDEVMKTTKIIIGCFVAVTLAAAMLIVFYK LRKRHQQRSTVTAARTVEIQVDEDIPAATSAAATAA PSGVS GEGAVVLP TIHDHINYNTYKPAHGAHW TENS LGNSLHPTVTTISEPYIIQTHTKDKVQETQI (SEQ ID NO: 1)</p>
<p>Белок эктодомена LRRC4 человека (т.е. аминокислоты 39-527 SEQ ID NO: 1)</p>	<p>ASAGPQNCPSVCSCSNQFSKVVCTRRGLSEVPQGIPS NTRYLNL MENNIQMIQADTFRHLHHLEVLQLGRNSIR QIEVGAFNGLASLNTLELFDNWLTVIPSGAFEYLSKL RELWLRNNPIESIPSYAFNRVPSLMRLDLGELKKLEYI SEGAFEGFLNLYNLGMCNIKDMPNLTPLVGL EELE MSGNHFP EIRPGSFHGLSSLKKLWVMNSQVSLIERNA FDGLASLVELNLAHNNLSSLPHDLFTPLRYLVELHLH HNPWNCDCDILWLAWWLREYIPTNSTCCGRCHAPM HMRGRYLVEVDQASFQCSAPFIMDAPRDLNISEGRM AELKCRTPPMSSVKWLLPNGTVLSHASRHPRI SVLND GTLNFSHVLLSDTG VYTCMVTNVAGNSNASAYLNV STAELNTSNYSFFTTVTVETTEISPEDTTRKYKPVPTT STGYQPAYTTSTTVLIQTTRV PKQVAVPATDTT DKMQ TSLDEVMKTTK (SEQ ID NO: 4)</p>

[0112] У человека ген, кодирующий белок LRRC4B, расположен на хромосоме 19 (нуклеотиды 50516892-50568435, номер доступа GenBank NC_000019.10; ориентация минус-цепи). Синонимы белка LRRC4B известны, и неограничивающие примеры включают: «нетрин-лиганд G3», «LRIG4», «NGL-3», «HSM» и «DKFZp761A179». Аминокислотная последовательность белка LRRC4B имеет длину 713 аминокислоты и представлена в таблице 2 (ниже). Полноразмерный эктодомен белка LRRC4B соответствует аминокислотным остаткам 36-576 SEQ ID NO: 2 (т.е. SEQ ID NO: 5). Если не указано иное, термин «**белок LRRC4B**» (включая его синонимы) включает любые варианты или изоформы белка LRRC4B, которые естественным образом экспрессируются клетками.

Таблица 2. Последовательность белка LRRC4B

<p>Белок LRRС4В человека (UniProt: Q9NT99) (сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)</p>	<p>MARARGSPCPPLPPGRMSWPHGALLFLWLFSPPL GAGGGGVA VTSAAGGGSPPATSCPVACSCSNQASRV ICTRRDLAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTDTFKH LRHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLELFDNRL TTVPTQAFEYLSKLRELWLRNNPIESIPSYAFNRVPSL RRLDLGELKRLEYISEAAFEGLVNLRYLNLGMCNLK DIPNLTALVRLEEELELSGNRLDLIRPGSFQGLTSLRKL WLMHAQVATIERNAFDDLKSLEELNLSHNNLMSLPH DLFTPLHRLERVHLNHNPWHCNCDVLWLSWWLKET VPSNTTCCARCHAPAGLKGRYIGELDQSHFTCYAPVI VEPPTDLNVTEGMAAELKCRGTGTSMTSVNWLTPNGT LMTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDTGQYTCMV TNSAGNTTASATLNVSAVDPVAAGGTGSGGGGPGGS GGVGGS GGYYTYFTTVTVETLETQPGEEALQPRGTE KEPPGPTTDGVWGGGRPGDAAGPASSSTTAPAPRSSR PTEKAFTVPITDVTENALKDLDDVMKTTKIIIGCFVAI TFMAAVMLVAFYKLRKQHQLHKHHGPTRTVEIINVE DELPAASAVSVA AAAAVASGGGVGGD SHLALPALER DHLNHHHYVAAAFKAHYSSNPSGGGCGGKGPPLN SIHEPLLFKSGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 2)</p>
<p>Белок LRRС4В человека (т.е. аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2)</p>	<p>эктодомена AGGGGVAVTSAAGGGSPPATSCPVACSCSNQASRVI CTRRD LAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTDTFKHL RHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLELFDNRLT TVPTQAFEYLSKLRELWLRNNPIESIPSYAFNRVPSLR RLDL GELKRLEYISEAAFEGLVNLRYLNLGMCNLKDI PNLTALVRLEEELELSGNRLDLIRPGSFQGLTSLRKLWL MHAQVATIERNAFDDLKSLEELNLSHNNLMSLPHDL FTPLHRLERVHLNHNPWHCNCDVLWLSWWLKETVP SNTTCCARCHAPAGLKGRYIGELDQSHFTCYAPVIVE PPTDLNVTEGMAAELKCRGTGTSMTSVNWLTPNGTL MTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDTGQYTCMVT NSAGNTTASATLNVSAVDPVAAGGTGSGGGGPGGS GVGGS GGYYTYFTTVTVETLETQPGEEALQPRGTEK EPPGPTTDGVWGGGRPGDAAGPASSSTTAPAPRSSRP TEKAFTVPITDVTENALKDLDDVMKTTK (SEQ ID NO: 5)</p>

[0113] У человека ген, кодирующий белок LRRС4С, расположен на хромосоме 11 (нуклеотиды 40107066-41460419, номер доступа GenBank NC_000011.10; ориентация минус-цепи). Синонимы белка LRRС4С известны, и примеры включают: «NGL-1», «нетрин-лиганд G1» и «KIAA1580». Аминокислотная последовательность белка LRRС4С имеет длину 640 аминокислоты и представлена в таблице 3 (ниже). Полноразмерный эктодомен белка LRRС4С соответствует аминокислотным остаткам 45-527 SEQ ID NO: 3 (т.е. SEQ ID NO: 6). Если не указано иное, термин «**белок LRRС4С**» (включая его синонимы) включает любые варианты или изоформы белка LRRС4С, которые естественным образом экспрессируются клетками.

Таблица 3. Последовательность белка LRRC4C

<p>Белок LRRC4C человека (UniProt: Q9HCJ2) (сигнальный пептид выделен жирным шрифтом)</p>	<p>MLNKMTLHPQQIMIGPRFNALFDPLLVVLLALQ LLVAGLVRAQTCPSCVCSQFSKVICVRKNLREV PDGISTNTRLLNLHENQIQIIVNSFKHLRHLEILQLSR NHIRTIEIGAFNGLANLNTLELFDNRLTTIPNGAFVYL SKLKELWLRNNPIESIPSYAFNRIPSLRRLDLGELKRLS YISEGAFEGLSNLRYLNLAMCNLREIPNLTPLIKLDEL DLSGNHLSAIRPGSFQGLMHLQKLWMIQSQIQVIERN AFDNLQSLVEINLAHNNLTLLPHDLFTPLHHLERIHHL HNPWNCNCDILWLSWWIKDMAPSNTACCARCNTPP NLKGRYIGELDQNYFTCYAPVIVEPPADLNVTEGMA AELKCRASTSLTSVSWITPNGTVMTHGAYKVRIAVLS DGTLNFTNVTVQDTGMYTCMVNSVGNNTASATLN VTAATTPFSYFSTVTVETMEPSQDEARTTDNNVGPT PVVDWETTNTTSLTPQSTRSTEKFTTIPVTDINSGIPG IDEVMKTTKIIIGCFVAITLMAAVMLVIFYKMRKQHH RQNHAPTRTVEIINVDDEITGDTPMESHLPMPAIEHE HLNHNSYKSPFNHTTTVNTINSIHSSVHEPLLIRMNS KDNVQETQI (SEQ ID NO: 3)</p>
<p>Белок эктодомена LRRC4C человека (т.е. аминокислоты 45-527 SEQ ID NO: 3)</p>	<p>QTCPSCVCSQFSKVICVRKNLREVPDGISTNTRLLNLHENQIQIIVNSFKHLRHLEILQLSRNHIRTIEIGAFNGLANLNTLELFDNRLTTIPNGAFVYLSKLELWLRNNPIESIPSYAFNRIPSLRRLDLGELKRLSYISEGAFEGLSNLRYLNLAMCNLREIPNLTPLIKLDEL DLSGNHLSAIRPGSFQGLMHLQKLWMIQSQIQVIERN AFDNLQSLVEINLAHNNLTLLPHDLFTPLHHLERIHHLHNPWNCNCDILWLSWWIKDMAPSNTACCARCNTPPNLKGRYIGELDQNYFTCYAPVIVEPPADLNVTEGMAAELKCRASTSLTSVSWITPNGTVMTHGAYKVRIAVLSDGTLNFTNVTVQDTGMYTCMVNSVGNNTASATLNVTAAATTPFSYFSTVTVETMEPSQDEARTTDNNVGPTPVVDWETTNTTSLTPQSTRSTEKFTTIPVTDINSGIPGIDEVMKTTK (SEQ ID NO: 6)</p>

[0114] Используемый в данном документе термин «**FAM19A5-связывающий домен**» относится к сегменту/фрагменту члена семейства белков LRRC4, который способен связываться с белком FAM19A5.

[0115] Термин «**семейство со сходством последовательностей 19, член A5**» или «**FAM19A5**» относится к белку, который принадлежит к семейству TAFА (также известному как семейство FAM19) из пяти высокогомологических белков и преимущественно экспрессируется в головном и спинном мозге. FAM19A5 также известен как «TAFА5» или «хемокиноподобный белок TAFА-5».

[0116] У человека ген, кодирующий FAM19A5, расположен на хромосоме 22. Существует несколько изоформ FAM19A5 человека (UniProt: Q7Z5A7), которые, как полагают, получают с помощью альтернативного сплайсинга: изоформа 1 (UniProt:

Q7Z5A7-1), которая состоит из 132 аминокислот, изоформа 2 (UniProt: Q7Z5A7-2), которая состоит из 125 аминокислот, и изоформа 3 (UniProt: Q7Z5A7-3), которая состоит из 53 аминокислот. Считается, что белок FAM19A5 человека существует как в мембраносвязанной, так и в растворимой (секретируемой) форме. Считается, что изоформа 1 представляет собой мембранный белок с одной трансмембранной областью. Изоформа 2, о которой сообщалось в Tang T. Y. *et al.*, *Genomics* 83(4):727-34 (2004), как секретируемый белок (растворимый), содержит сигнальный пептид в положениях аминокислот 1-25. Считается, что изоформа 1 является мембранным белком и прогнозируется на основе данных EST. В таблице 4 (ниже) представлены аминокислотные последовательности трех известных изоформ FAM19A5 человека. Если не указано иное, термин «**FAM19A5**» включает любые варианты или изоформы белка FAM19A5, которые естественным образом экспрессируются клетками. Соответственно, в некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен члена семейства белков LRRC4), может ингибировать связывание изоформы 1, изоформы 2 и/или изоформы 3 FAM19A5 с членами семейства белков LRRC4.

Таблица 4. Последовательности белка FAM19A5

<p>Белок FAM19A5 (изоформа 1) (UniProt: Q7Z5A7-1, трансмембранный белок): данная изоформа была выбрана в качестве канонической последовательности.</p>	<p>MAPSPRTGSRQDATALPSMSSTFWAFMILASLLIAYC SQLAAGTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCA CRKGGQ IAGTTRARPACVDARIИКТКQWCDMLPCLEGE GCDLL INRSGWTCTQPGGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 22)</p>
<p>Белок FAM19A5 (изоформа 2) (UniProt: Q7Z5A7-2, растворимый белок)</p>	<p>MQLLKALWALAGAALCCFLVLVIHAQFLKEGQLAA GTCEIVTLDRDSSQPRRTIARQTARCA CRKGGQ IAGTTRARPACVDARIИКТКQWCDMLPCLEGE GCDLL INRSG WTCTQPGGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 23)</p>
<p>Белок FAM19A5 (изоформа 3) (UniProt: Q7Z5A7-3)</p>	<p>MYHHREWPARIИКТКQWCDMLPCLEGE GCDLL INRSG WTCTQPGGRIKTTTVS (SEQ ID NO: 24)</p>

[0117] Термин «эндогенный», используемый для описания членов семейства

белков LRRC4, относится к белкам семейства LRRC4, которые естественным образом существуют у субъекта. Описанные в данном документе молекулы-миметики по настоящему изобретению отличаются (структурно и/или функционально) от эндогенных членов семейства белков LRRC4.

[0118] «Аффинность связывания» обычно относится к силе суммы нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, молекулы-миметика LRRC4) и ее партнером по связыванию (например, белком FAM19A5). Если не указано иное, используемый в данном документе термин «аффинность связывания» относится к внутренней аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания. Аффинность молекулы X (например, молекул-миметиков, описанных в данном документе, которые содержат FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4) в отношении ее партнера Y (например, FAM19A5) обычно может быть представлено константой диссоциации (K_D). Аффинность может быть измерена и/или выражена рядом способов, известных в данной области техники, включая без ограничения константу равновесной диссоциации (K_D) и константу равновесной ассоциации (K_A). K_D рассчитывается как соотношение k_{off}/k_{on} и выражается в виде молярной концентрации (M), тогда как K_A рассчитывается как соотношение k_{on}/k_{off} . k_{on} относится к константе скорости ассоциации, *например*, антитела с антигеном, а k_{off} к диссоциации, *например*, антитела к антигену. k_{on} и k_{off} могут быть определены методами, известными специалисту в данной области, такими как иммуноанализами (*например*, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA)), BIACORE® или анализами кинетического исключения (KinExA).

[0119] Используемые в данном документе термины «специфически связывает», «специфически распознает», «специфическое связывание», «избирательное связывание» и «избирательно связывает» являются аналогичными терминами в контексте антител и относятся к молекулам (например, молекулам-миметикам семейства LRRC4), которые связываются с антигеном (например, белком FAM19A5), поскольку такое связывание подразумевается специалистом в данной области техники. Например, молекула, которая специфически связывается с антигеном, может связываться с другими пептидами или полипептидами, как правило, с более низкой аффинностью, как определено, например, с помощью иммуноанализов, BIACORE®, прибора KinExA 3000 (Sapidyne Instruments, Бойсе, Айдахо) или других анализов, известных в данной области техники. В некоторых аспектах молекулы, которые специфически связываются с антигеном, связываются с антигеном с K_A , которая составляет по меньшей мере около 2 log, по меньшей мере около

2,5 log, по меньшей мере около 3 log, по меньшей мере около 4 log или больше, чем K_d , когда молекулы связываются с другим антигеном.

[0120] Используемый в данном документе термин «**антиген**» относится к любому природному или синтетическому иммуногенному веществу, такому как белок, пептид или гаптен. Как очевидно из настоящего изобретения, антиген может представлять собой белок FAM19A5 или его фрагмент.

[0121] Молекулы (например, молекулы-миметики семейства LRRC4), которые «**конкурируют с другим белком за связывание с мишенью**», относятся к молекулам, которые ингибируют (частично или полностью) связывание другого белка (например, естественно существующих членов семейства белков LRRC4) с мишенью. Конкурируют ли два соединения друг с другом за связывание с мишенью, т.е. ингибирует ли и в какой степени молекула-миметик семейства LRRC4, описанную в данном документе, связывание естественно существующих членов семейства белков LRRC4 с белком FAM19A5, можно определить, используя известные конкурентные эксперименты. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, конкурирует и ингибирует связывание естественно существующих членов семейства белков LRRC4 с белком FAM19A5 на по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или по меньшей мере около 100%. Конкурентные анализы можно проводить, как описано в данном документе, или, например, в Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi: 10.1101 / pdb.prot4277 или в главе 11 "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999.

[0122] Другие анализы конкурентного связывания, которые можно использовать с настоящим изобретением, включают: прямой или непрямой твердофазный радиоиммунологический анализ (RIA), прямой или непрямой твердофазный радиоиммунологический анализ (EIA), конкурентный «сэндвич»-анализ (см. Stahl *et al.*, *Methods in Enzymology* 9:242 (1983)); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (см. Kirkland *et al.*, *J. Immunol.* 137:3614 (1986)); прямой твердофазный анализ с мечением, прямой твердофазный «сэндвич»-анализ с мечением (см. Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press (1988)); прямой твердофазный RIA с использованием метки 1-125 (см. Morel *et al.*, *Mol. Immunol.* 25(1):7 (1988)); прямой твердофазный биотин-авидиновый EIA (Cheung *et al.*, *Virology* 176:546 (1990)); и прямой

RIA с мечением. (Moldenhauer *et al.*, *Scand. J. Immunol.* 32:77 (1990)).

[0123] Термин **«встречающийся в природе»** или **«существующий в природе»**, используемый в данном документе, относится к тому факту, что объект (например, белок) можно найти в природе. Например, полипептид или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории, является встречающейся в природе. Как дополнительно описано в других разделах настоящего изобретения, молекулы-миметики семейства LRRC4, применимые для настоящего изобретения, являются не встречающимися в природе.

[0124] **«Молекула-миметик»** относится к молекуле, которая по структуре и/или функциям напоминает другую молекулу (**«эталонную молекулу»**). Например, в некоторых аспектах молекула-миметик может обладать общей частичной структурой или последовательностью с эталонной молекулой, так что молекула-миметик может проявлять одно или более свойств эталонной молекулы. Однако, как очевидно из настоящего изобретения, структурное сходство или сходство последовательностей не всегда требуется. В некоторых аспектах молекула-миметик может отличаться по структуре, но вести себя аналогично эталонной молекуле. Как описано в данном документе, в некоторых аспектах молекула-миметик представляет собой малую молекулу. В некоторых аспектах молекула-миметик включает пептид. В некоторых аспектах молекула-миметик не является антителом или его антигенсвязывающей частью.

[0125] **«Полипептид»** относится к цепи, содержащей по меньшей мере два последовательно связанных аминокислотных остатка без верхнего предела длины цепи. Один или более аминокислотных остатков в белке могут содержать модификацию, такую как без ограничения гликозилирование, фосфорилирование, или образование дисульфидной связи. **«Белок»** может включать один или более полипептидов.

[0126] Термин **«нуклеиновая кислота»** или **«молекула нуклеиновой кислоты»** предназначен для включения как молекул ДНК, так и молекул РНК. Молекула нуклеиновой кислоты может быть одноцепочечной или двухцепочечной и может представлять собой сДНК.

[0127] Используемый в данном документе термин **«вектор»** предназначен для обозначения молекулы нуклеиновой кислоты, способной переносить другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой **«плазмиду»**, которая относится к петле двухцепочечной кольцевой ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор,

причем дополнительные сегменты ДНК могут быть лигированы в вирусный геном. Некоторые векторы способны к независимой репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, имеющие бактериальную природу репликации и эписомные векторы млекопитающего). Другие векторы (например, неэписомальные векторы млекопитающих) могут интегрироваться в геном клетки-хозяина после внесения в клетку-хозяина и, таким образом, реплицируются вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначаются в данном документе **«рекомбинантными векторами экспрессии»** (или просто **«векторами экспрессии»**). В общем, векторы экспрессии, используемые в методиках рекомбинантной ДНК, часто находятся в форме плазмид. В данном описании «плазида» и «вектор» могут использоваться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто используемой формой вектора. Однако также включены другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектной репликацией, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции.

[0128] Термин **«рекомбинантная клетка-хозяин»** (или просто **«клетка-хозяин»**), используемый в данном документе, предназначен для обозначения клетки, которая содержит нуклеиновую кислоту, которая в природе не присутствует в клетке, и может представлять собой клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Следует понимать, что такие термины предназначены для обозначения не только конкретной рассматриваемой клетки, но и потомства такой клетки. Поскольку определенные модификации могут происходить в последующих поколениях из-за мутаций или влияний окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным исходной клетке, но все же включено в объем термина **«клетка-хозяин»**, который используется в данном документе.

[0129] Используемый в данном документе термин **«введение»** относится к физическому введению молекулы (например, молекулы-миметика LRRC4) или композиции, содержащей эту молекулу, субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Неограничивающие примеры способов введения, которые можно использовать, включают внутривенный, внутрибрюшинный, внутримышечный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Фраза **«парентеральное введение»** означает режимы введения, отличные от энтерального и

местного введения, обычно посредством инъекции, и включают без ограничения внутривенную, внутрибрюшинную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, интрадермальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и интрастернальную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. В качестве альтернативы молекулу, описанную в данном документе (например, молекулы-миметики семейства LRRC4, описанные в данном документе), можно вводить непарентеральным путем, таким как местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например, интраназально, перорально, вагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может быть выполнено, например, один раз, много раз и/или в течение одного или большего количества продолжительных периодов.

[0130] Используемый в данном документе термин «**субъект**» включает любого человека или отличного от человека животного. Термин «**отличное от человека животное**» включает всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как отличные от человека приматы, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии, рептилии и т. д.

[0131] Термин «**нейрон**» включает электрически возбудимые клетки, которые обрабатывают и передают информацию посредством электрических и химических сигналов. Нейроны являются основными компонентами головного и спинного мозга ЦНС, а также ганглиев периферической нервной системы (ПНС) и могут соединяться друг с другом, образуя нейронные сети. Типичный нейрон состоит из тела клетки (сомы), дендритов и аксона. Сомы (тело клетки) нейрона содержит ядро. Дендриты нейрона представляют собой клеточные расширения со множеством ветвей, где возникает большая часть входных данных нейрона. Аксон представляет собой более тонкий, похожий на кабель выступ, идущий от сомы и переносящий нервные сигналы от сомы, а также определенные типы информации обратно в сому.

[0132] Термин «**терапевтически эффективное количество**», используемый в данном документе, относится к количеству вещества (например, молекул-миметиков LRRC4, описанных в данном документе), отдельно или в комбинации с другим терапевтическим средством, эффективному для «лечения» заболевания или расстройства у субъекта или снижения риска, потенциала, возможности или возникновения заболевания или расстройства (например, неврологического заболевания, описанного в данном

документе). «Терапевтически эффективное количество» включает количество вещества или терапевтического средства, которое обеспечивает некоторое улучшение или пользу для субъекта, имеющего или подверженного риску возникновения заболевания или расстройства (например, неврологического заболевания, описанного в данном документе). Таким образом, «терапевтически эффективное» количество представляет собой количество, которое снижает риск, потенциал, возможность или возникновение заболевания или расстройства или обеспечивает некоторое облегчение, смягчение, и/или снижает по меньшей мере один показатель, и/или уменьшает по меньшей мере один клинический симптом заболевания или расстройства.

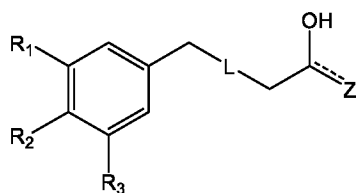
II. Молекулы-миметики

[0133] В данном документе раскрыты молекулы-миметики членов семейства белков LRRC4 (обозначаемые в данном документе «**молекулами-миметиками семейства LRRC4**»). Как показано в данном документе впервые (см., например, пример 1), белок FAM19A5 проявляет высокую аффинность связывания со всеми членами семейства белков LRRC4. Молекулы-миметики, описанные в данном документе, напоминают членов семейства LRRC4 тем, что они могут конкурировать за связывание с белком FAM19A5. В некоторых аспектах молекулы-миметики семейства LRRC4, описанные в данном документе, проявляют одно или более свойств (например, повышенную аффинность связывания и/или стабильность), так что они могут конкурировать с естественно существующими членами семейства белков LRRC4 за связывание с белком FAM19A5. Как продемонстрировано в данном документе, это может привести к ингибированию, снижению и/или диссоциации взаимодействия между членами семейства белков LRRC4 и белком FAM19A5.

[0134] Как очевидно из настоящего изобретения, хотя молекулы-миметики семейства LRRC4, описанные в данном документе, имеют определенные общие свойства с членами семейства белков LRRC4, молекулы-миметики семейства LRRC4 отличаются (структурно и/или функционально) от естественно существующих членов семейства белков LRRC4. Например, в некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применимая для настоящего изобретения, включает малую молекулу. Как дополнительно описано в других разделах настоящего изобретения, в некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 включает полипептид, где полипептид содержит, состоит из или по сути состоит из домена члена семейства белков LRRC4, где домен способен связываться с белком FAM19A5 (также обозначаемым в данном документе «**FAM19A5-связывающим доменом**»). В таких аспектах полипептиды могут содержать одну или более

аминокислотных замен в FAM19A5-связывающем домене. Как описано в других разделах в настоящем изобретении, в некоторых аспектах такие аминокислотные замены могут улучшить одно или более свойств полипептидов, например, повысить стабильность и/или аффинность связывания полипептидов с белком FAM19A5. В некоторых аспектах полипептиды могут содержать FAM19A5-связывающий домен, но не имеют одного или более других доменов членов семейства белков LRRC4. Например, в некоторых аспектах полипептид содержит FAM19A5-связывающий домен, но не содержит трансмембранный домен. В некоторых аспектах полипептид содержит FAM19A5-связывающий домен, но не содержит внутриклеточный домен членов семейства белков LRRC4 (например, постсинаптический домен, связывающий плотность (PB)). В некоторых аспектах полипептид содержит FAM19A5-связывающий домен, но не содержит ни трансмембранный домен, ни внутриклеточный домен. Соответственно, в некоторых аспектах полипептиды, описанные в данном документе, короче, чем существующие в природе члены семейства белков LRRC4. Кроме того, при осуществлении своей биологической активности (например, образовании нейронной цепи) члены семейства белков LRRC4 (LRRC4, LRRC4B и LRRC4C) взаимодействуют со своим лигандом (нетрин-G2, рецептор тирозинфосфатазы LAR и нетрин-G1 соответственно). См., например, *Li et al., Mol Cancer* 13: 266 (Dec. 2014). Поскольку полипептиды по настоящему изобретению не содержат все домены членов семейства белков LRRC4, в некоторых аспектах полипептиды не связываются с лигандами семейства белков LRRC4 и вместо этого специфически нацелены на белок FAM19A5. Соответственно, в некоторых аспектах полипептиды, описанные в данном документе, не заменяют эндогенных членов семейства белков LRRC4. Вместо этого, в некоторых аспектах, путем ингибирования, снижения и/или диссоциации взаимодействия между FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4, полипептиды по настоящему изобретению могут высвободить эндогенные белки семейства LRRC4 и позволить им осуществлять свою естественную биологическую активность.

[0135] Когда молекулы-миметики семейства LRRC4 включают низкомолекулярные соединения, в некоторых аспектах молекула-миметик представляет собой:



(формула I),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила,

фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила;

(ii) --- представляет собой одинарную или двойную связь;

(iii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀)арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH-C(O)-CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид, и

(iv) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь.

[0136] В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси и фторметокси. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, гидроксид и метокси. В некоторых аспектах R₁ и R₂ выбраны из гидроксид и метокси, а R₃ представляет собой водород.

[0137] В некоторых аспектах Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила и -CH-C(O)-CH=CH-Q, где Q выбран из (C₆-C₁₀)арила и (5-6-членного)гетероарила; где арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси и гидроксид. В некоторых аспектах Z выбран из линейного или разветвленного (C₁-C₈)алкила, линейного или разветвленного (C₂-C₈)алкенила и -CH-C(O)-

$\text{CH}=\text{CH}-\text{Q}$, где Q представляет собой (C_6-C_{10})арил, необязательно замещенный одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C_1-C_6)алкокси, (C_1-C_6)алкила, галогена, (C_1-C_6)галогеналкокси и гидроксила.

[0138] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (I), где:

(i) R_1 , R_2 и R_3 выбраны из водорода, гидрокси, метокси, этокси, н-пропилокси, изопрпилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси и фторметокси;

(ii) --- представляет собой одинарную или двойную связь;

(iii) Z выбран из прямого или разветвленного (C_1-C_8)алкила, прямого или разветвленного (C_2-C_8)алкенила, прямого или разветвленного (C_2-C_8)алкинила и $-\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}=\text{CH}-\text{Q}$, где Q выбран из (C_6-C_{10})арила и (5-6-членного)гетероарила; где арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C_1-C_6)алкокси, (C_1-C_6)алкила, галогена, (C_1-C_6)галогеналкокси и гидрокси;

и

(iv) L представляет собой двойную или тройную связь.

[0139] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (I), где:

(i) R_1 , R_2 и R_3 выбраны из водорода, гидрокси, метокси, этокси, н-пропилокси, изопрпилокси и н-бутокси;

(ii) --- представляет собой одинарную или двойную связь;

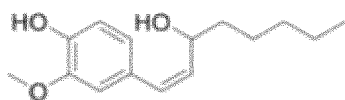
(iii) Z выбран из линейного или разветвленного (C_1-C_8)алкила, линейного или разветвленного (C_2-C_8)алкенила и $-\text{CH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}=\text{CH}-\text{Q}$, где Q представляет собой (C_6-C_{10})арил, необязательно замещенный одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C_1-C_6)алкокси, (C_1-C_6)алкила, галогена, (C_1-C_6)галогеналкокси и гидрокси;

и

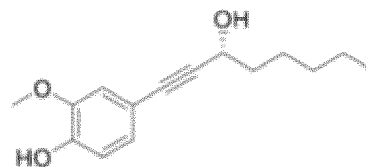
(iv) L представляет собой двойную или тройную связь.

[0140] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 выбрана из:

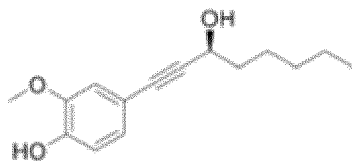
KB 2356



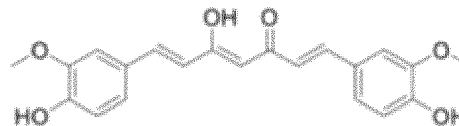
KB 2357



KB 2358



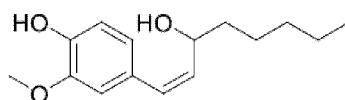
KB 2399
(куркумин)



или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0141] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:

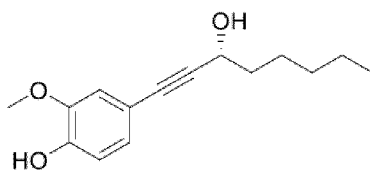
KB 2356



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0142] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:

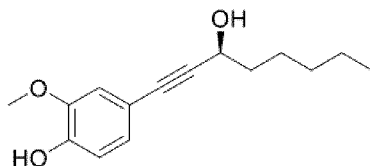
KB 2357



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0143] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:

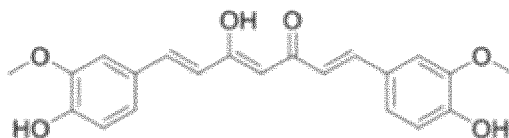
KB 2358



или ее фармацевтически приемлемую соль.

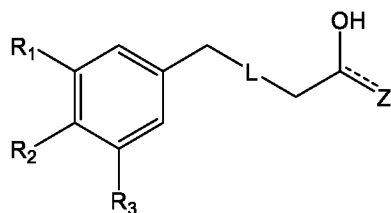
[0144] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:

КВ 2399
(куркумин)



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0145] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



(формула I),

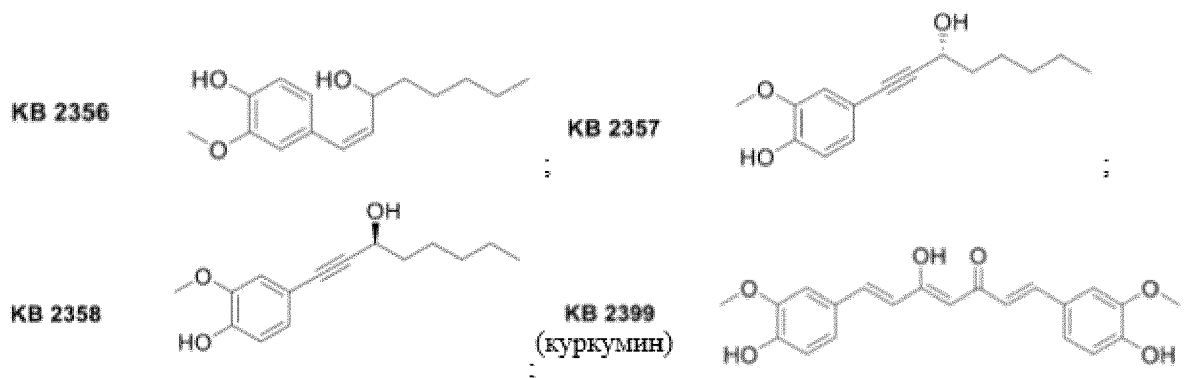
или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила;

(ii) --- представляет собой одинарную или двойную связь;

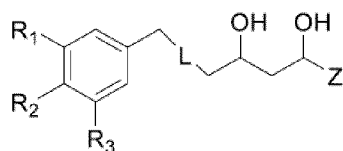
(iii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH-C(O)-CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид, и

(iv) представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и где молекула-миметик семейства LRRC4 не выбрана из:



или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0146] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



(формула II),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокс, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидрокс, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, арил и

гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид, и

(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь.

[0147] В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино и N,N-диметиламино. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино и N,N-диметиламино. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, гидроксид, метокси и N,N-диметиламино. В некоторых аспектах R₁ и R₂ выбраны из фтора, гидроксид, метокси и N,N-диметиламино, а R₃ представляет собой водород.

[0148] В некоторых аспектах Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила и -CH=CH-Q, где Q выбран из (C₆-C₁₀)арила и (5-6-членного)гетероарила; где арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси и гидроксид. В некоторых аспектах Z выбран из линейного или разветвленного (C₁-C₈)алкила, линейного или разветвленного (C₂-C₈)алкенила и -CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₆-C₁₀)арил, необязательно замещенный одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси и гидроксид.

[0149] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства theLRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (II), где:

(i) R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино и N,N-диметиламино. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксид, метокси, этокси, н-пропилокси, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино и N,N-диметиламино;

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила и -CH=CH-

Q, где Q выбран из (C₆-C₁₀)арила и (5-6-членного)гетероарила; где арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси и гидроксиды; и

(iii) L представляет собой двойную связь.

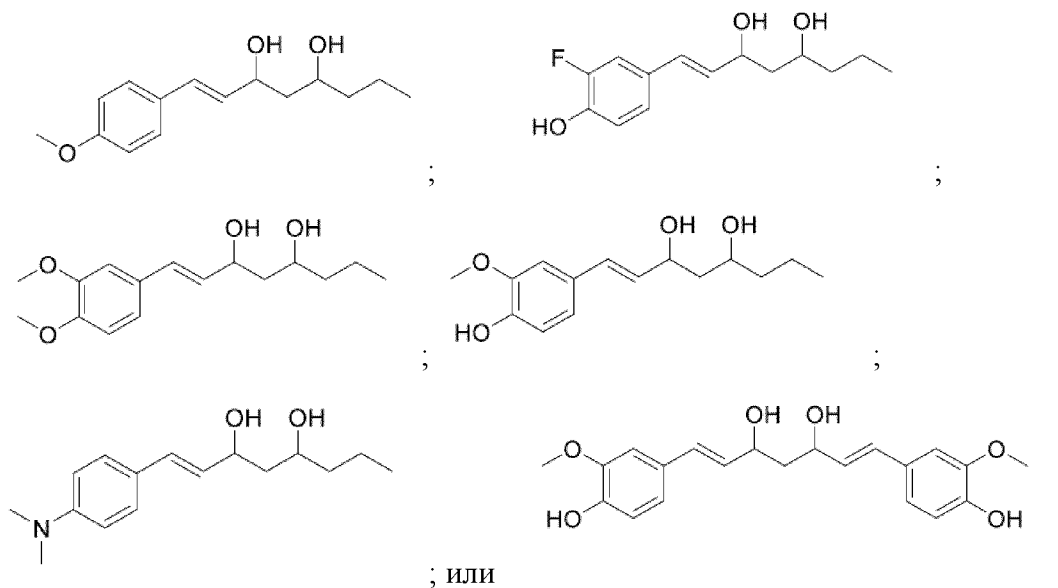
[0150] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (ii), где:

(i) R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, гидроксиды, метоксиды, этоксиды, н-пропилокси, амино, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино и N,N-диметиламино;

(ii) Z выбран из линейного или разветвленного (C₁-C₈)алкила, линейного или разветвленного (C₂-C₈)алкенила и -CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₆-C₁₀)арил, необязательно замещенный одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси и гидроксиды; и

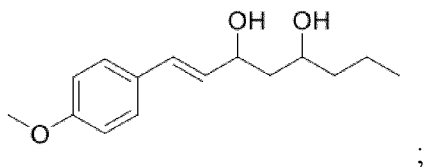
(iii) L представляет собой двойную связь.

[0151] В некоторых аспектах молекула семейства LRRC4 выбрана из:



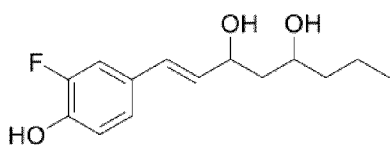
или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0152] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

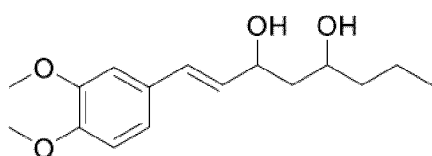
[0153] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



;

или ее фармацевтически приемлемую соль.

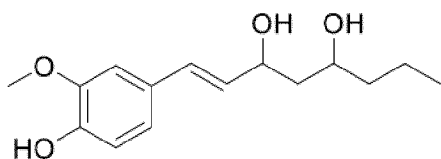
[0154] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



;

или ее фармацевтически приемлемую соль.

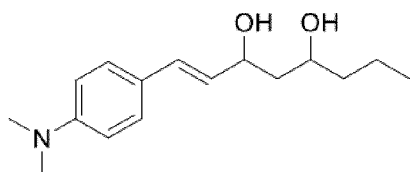
[0155] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



;

или ее фармацевтически приемлемую соль.

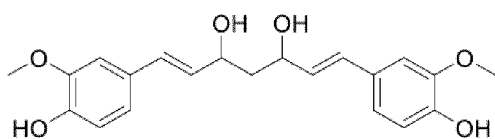
[0156] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



;

или ее фармацевтически приемлемую соль.

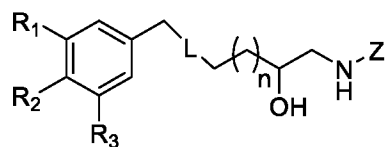
[0157] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



;

или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0158] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



(формула III),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокс, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидрокс, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, -Y-(C₃-C₈)циклоалкила, -Y-(C₅-C₈)циклоалкенила, -Y-(3-8-членного) гетероциклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкенила, -Y-(7-14-членного) гетеробициклоалкила, -Y-(C₆-C₁₀)арила и -Y-(5-10-членного) гетероарила, где Y представляет собой связь или C₁-C₃ прямой или разветвленный алкилен, и где циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкила, галогена, C₁-C₆галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидрокс,

(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и

(iv) n равно 0 или 1.

[0159] В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, гидрокс, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокс, трифторметокси, дифторметокси и фторметокси. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃ выбраны из водорода, гидрокс, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокс. В некоторых аспектах R₁, R₂ и R₃

выбраны из водорода, гидроксид и метокси. В некоторых аспектах R_1 и R_2 выбраны из гидроксид и метокси, а R_3 представляет собой водород.

[0160] В некоторых аспектах Z выбран из $-Y-(C_3-C_8)$ циклоалкила, $-Y-(C_5-C_8)$ циклоалкенила, $-Y-(3-8-членного)$ гетероциклоалкила, $-Y-(C_7-C_{14})$ бициклоалкила, $-Y-(C_7-C_{14})$ бициклоалкенил, $-Y-(7-14-членного)$ гетеробициклоалкила, $-Y-(C_6-C_{10})$ арила и $-Y-(5-10-членного)$ гетероарила, где Y представляет собой связь или C_1-C_3 прямой или разветвленный алкилен, причем циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из C_1-C_6 алкокси, C_1-C_6 алкила, галогена, C_1-C_6 галогеналкокси, нитро, амина, N -метиламино, N -этиламино, $N-N$ -пропиламино, N,N -диметиламино, формила и гидроксид. В некоторых аспектах Z выбран из $-Y-(C_6-C_{10})$ арила и $-Y-(5-10-членного)$ гетероарила, где Y представляет собой связь или C_1-C_3 прямой или разветвленный алкилен, и где арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C_1-C_6 алкокси и галогена.

[0161] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (III), где:

(i) R_1 , R_2 и R_3 выбраны из водорода, гидроксид, метокси, этокси, n -пропилокси, изопрпилокси, n -бутокси, трифторметокси, дифторметокси и фторметокси;

(ii) Z выбран из $-Y-(C_3-C_8)$ циклоалкила, $-Y-(C_5-C_8)$ циклоалкенила, $-Y-(3-8-членного)$ гетероциклоалкила, $-Y-(C_7-C_{14})$ бициклоалкила, $-Y-(C_7-C_{14})$ бициклоалкенил, $-Y-(7-14-членного)$ гетеробициклоалкила, $-Y-(C_6-C_{10})$ арила и $-Y-(5-10-членного)$ гетероарила, где Y представляет собой связь или C_1-C_3 прямой или разветвленный алкилен, причем циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклилалкил, арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из C_1-C_6 алкокси, C_1-C_6 алкила, галогена, C_1-C_6 галогеналкокси, нитро, амина, N -метиламино, N -этиламино, $N-N$ -пропиламино, N,N -диметиламино, формила и гидроксид;
и

(iii) L представляет тройную связь.

[0162] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу формулы (III), где:

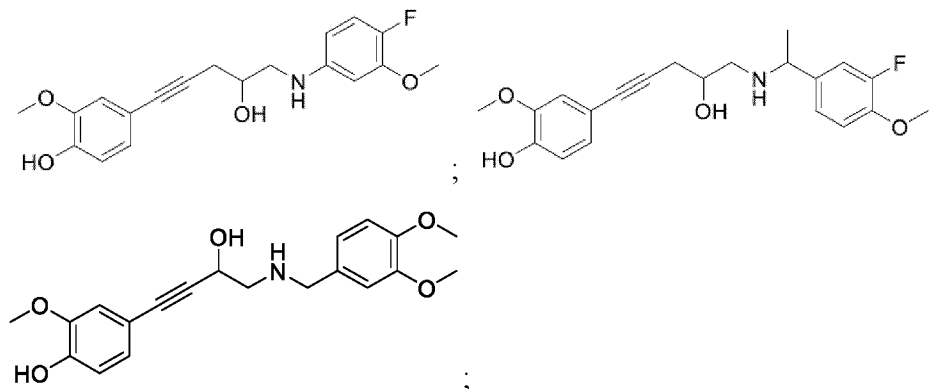
(i) R_1 , R_2 и R_3 выбраны из водорода, гидроксид, метокси, этокси, n -пропилокси, изопрпилокси и n -бутокси;

(ii) Z выбран из $-Y-(C_6-C_{10})$ арила и $-Y-(5-10-членного)$ гетероарила, где Y представляет собой связь или C_1-C_3 прямой или разветвленный алкилен, и где арил и

гетероарил необязательно замещен одним, двумя или тремя заместителями, независимо выбранными из C₁-C₆алкокси и галогена; и

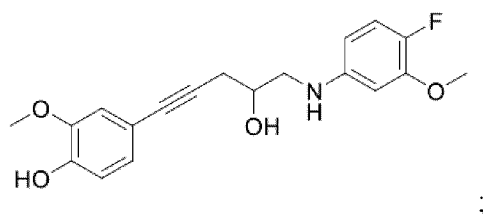
(iii) L представляет тройную связь.

[0163] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 выбрана из:



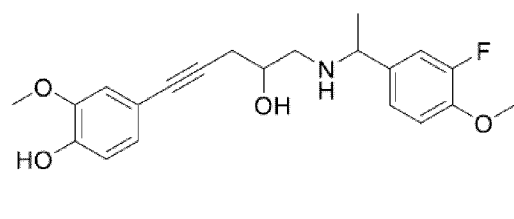
или ее фармацевтически приемлемой соли.

[0164] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



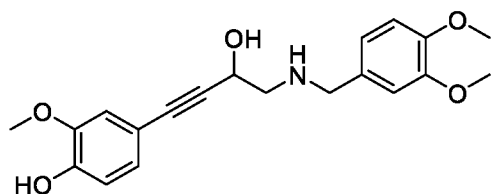
или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0165] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

[0166] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой:



[0167] Как описано в данном документе, если молекула-миметик семейства LRRC4,

применимая для настоящего изобретения, содержит полипептид, в некоторых аспектах полипептид содержит по меньшей мере FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4. Если не указано иное, общая длина FAM19A5-связывающего домена конкретно не ограничена, при условии, что домен способен связываться с белком FAM19A5. В некоторых аспектах длина FAM19A5-связывающего домена составляет по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19, по меньшей мере около 20, по меньшей мере около 21, по меньшей мере около 22, по меньшей мере около 23, по меньшей мере около 24, по меньшей мере около 25, по меньшей мере около 26, по меньшей мере около 27, по меньшей мере около 28, по меньшей мере около 29 или по меньшей мере около 30 аминокислот. В некоторых аспектах длина связывающего домена FAM19A5 составляет от около 10 до около 23 аминокислот. В некоторых аспектах длина FAM19A5-связывающего домена составляет около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16, около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22 или около 23 аминокислот. В некоторых аспектах длина FAM19A5-связывающего домена молекулы-миметика семейства LRRC4 составляет около 10 аминокислот.

[0168] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV) (SEQ ID NO: 25), где:

(i) «A» содержит X1-(T/S)-(Y/F)-F-X5 и (ii) «B» содержит (V/I)-T-V-(E/V), и где:

X1 представляет собой тирозин (Y), фенилаланин (F), валин (V), лейцин (L) или изолейцин (I);

(T/S) представляет собой треонин (T) или серин (S);

(Y/F) представляет собой тирозин (Y) или фенилаланин (F);

X5 представляет собой любую аминокислоту;

(V/I) представляет собой валин (V) или изолейцин (I); и

(E/V) представляет собой глутаминовую кислоту (E) или валин (V).

[0169] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, имеющую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV) (SEQ ID NO: 26), где:

(i) «А» содержит (Y/W/M)-(T/Y)-(Y/W)-(F/Y/W)-(T/Y) и (ii) «В» содержит X7-(T/S/Y)-X9-X10, и где

(Y/W/M) представляет собой тирозин (Y), триптофан (W) или метионин (M);

(T/Y) представляет собой треонин (T) или тирозин (Y);

(Y/W) представляет собой тирозин (Y) или триптофан (W);

(F/Y/W) представляет собой фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W);

X7 представляет собой валин (V), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M);

(T/S/Y) представляет собой треонин (T), серин (S) или тирозин (Y);

X9 представляет собой валин (V), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M); и

X10 представляет собой глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), метионин (M) или триптофан (W).

[0170] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применимая для настоящего изобретения, содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

X1-X2-X3-F-X5-T-X7-T-V-X10 (формула V) (SEQ ID NO: 27), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L или I;

X2 представляет собой T или S;

X3 представляет собой Y или F;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X7 представляет собой V или I; и/или

X10 представляет собой E или V,

и где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4.

[0171] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, содержит полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (формула VI) (SEQ ID NO: 28), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L, I, W или M;

X2 представляет собой T, S или Y;

X3 представляет собой Y, F или W;

X4 представляет собой F, Y или W;

X5 представляет собой любую аминокислоту, например, T, S или Y;

X6 представляет собой T, S или Y;

X7 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M;

X8 представляет собой T, S или Y;

X9 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M; и/или

X10 представляет собой E, D, V, I, Y, F, M или W,

и где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4.

[0172] Для любой из вышеупомянутых молекул-миметиков семейства LRRC4 в некоторых аспектах (i) X1 представляет собой Y, F, V, L или I; (ii) X2 представляет собой T или S; (iii) X3 представляет собой Y или F; (iv) X4 представляет собой F; (v) X5 представляет собой T или S; (vi) X6 представляет собой T; (vii) X7 представляет собой V или I; (viii) X8 представляет собой T; (ix) X9 представляет собой V; (x) X10 представляет собой E или V; и (xi) любые комбинации (i)-(x). В некоторых аспектах X1 представляет собой Y, F, V, L или I. В некоторых аспектах X2 представляет собой T или S. В некоторых аспектах X3 представляет собой Y или F. В некоторых аспектах X4 представляет собой F. В некоторых аспектах X5 представляет собой T или S. В некоторых аспектах X6 представляет собой T. В некоторых аспектах X7 представляет собой V или I. В некоторых аспектах X8 представляет собой T. В некоторых аспектах X9 представляет собой V. В некоторых аспектах X10 представляет собой E или V. В некоторых аспектах аминокислота в положении X2 является фосфорилированной. В некоторых аспектах аминокислота в положении X2 является O-гликозилированной.

[0173] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотами, отличными от аминокислотной последовательности (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4, раскрытый в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотами, отличными от аминокислотной последовательности (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4, раскрытый в данном документе, по сути состоит из аминокислотной

последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотами, отличными от аминокислотной последовательности (например, заменами).

[0174] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 по сути состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE). Как продемонстрировано в данном документе, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), соответствует FAM19A5-связывающему домену белка LRRC4B.

[0175] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 по сути состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE). Как продемонстрировано в данном документе, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE), соответствует FAM19A5-связывающему домену белка LRRC4.

[0176] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE). В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 по сути состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE). Как продемонстрировано в данном документе, аминокислотная последовательность, представленная в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE), соответствует FAM19A5-связывающему домену белка LRRC4C.

[0177] Как описано в данном документе, FAM19A5-связывающие домены членов семейства белков LRRC4 в значительной степени консервативны среди позвоночных (см., например, фиг. 20). Соответственно, не ограничиваясь какой-либо одной теорией, можно заменить один или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности,

представленной в любой из SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), 30 (YSFFTTVTVE) и 31 (FSYFSTVTVE), аминокислотой, присутствующей в соответствующем остатке у других позвоночных. В данном документе представлены примеры таких замен (см., например, фиг. 20).

[0178] В некоторых аспектах один или более аминокислотных остатков аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), 30 (YSFFTTVTVE) и 31 (FSYFSTVTVE), могут быть заменены аминокислотой, имеющей сходные биохимические свойства. Например, в аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), в некоторых аспектах Y в положении 1 может быть заменен другими гидрофобными аминокислотами (например, F, V, L, I, W или M). В некоторых аспектах T в положении 2 может быть заменен другими аминокислотами, имеющими сходную гидроксильную (OH) группу в боковой цепи (например, S или Y). В некоторых аспектах Y в положении 3 может быть заменен другими аминокислотами, имеющими общее ароматическое кольцо в боковой цепи, которое может участвовать во взаимодействии Ван-дер-Ваальса (например, F или W). В некоторых аспектах F в положении 4 может быть заменен аминокислотами, такими как Y или W. В некоторых аспектах T в положении 5 может быть заменен аминокислотами, такими как S или Y. В некоторых аспектах T в положении 6 может быть заменен аминокислотами, такими как S или Y. В некоторых аспектах V в положении 7 может быть заменен другими аминокислотами, имеющими гидрофобные объемные боковые цепи (например, I, Y, F, L, W или M). В некоторых аспектах T в положении 8 может быть заменен другими аминокислотами, такими как S или Y. В некоторых аспектах V в положении 9 может быть заменен другими аминокислотами, такими как I, Y, F, L, W или M. В некоторых аспектах E в положении 10 может быть заменен другими аминокислотами, имеющими кислотную боковую цепь (например, I, Y, F, M или W).

[0179] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей

мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4, где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 91%, по меньшей мере около 92%, по меньшей мере около 93%, по меньшей мере около 94%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или по меньшей мере около 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 6, где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4.

[0180] Как очевидно из настоящего изобретения, в некоторых аспектах полипептиды молекул-миметиков семейства LRRC4, описанные в данном документе (например, содержащие FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4), содержат одну или более аминокислотных модификаций. В некоторых аспектах одна или более аминокислотных модификаций могут повысить аффинность связывания молекулы-

миметика семейства LRRC4 с белком FAM19A5. Соответственно, в некоторых аспектах аффинность связывания молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе, с белком FAM19A5 повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, соответствующей молекулой-миметиком семейства LRRC4 без аминокислотной модификации или естественно существующими членами семейства белков LRRC4). В некоторых аспектах одна или более аминокислотных модификаций могут улучшить стабильность молекулы-миметика семейства LRRC4. Соответственно, в некоторых аспектах стабильность молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе, повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, соответствующей молекулой-миметиком семейства LRRC4 без аминокислотной модификации или естественно существующими членами семейства белков LRRC4).

[0181] В некоторых аспектах одна или более аминокислотных модификаций могут улучшить способность молекул-миметиков семейства LRRC4, описанных в данном документе, ингибировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4 (например, с помощью повышения аффинности связывания и/или стабильности). Соответственно, в некоторых аспектах способность молекулы-миметика семейства LRRC4 ингибировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4 повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере

мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, соответствующей молекулой-миметиком семейства LRRC4 без аминокислотной модификации или естественно существующими членами семейства белков LRRC4).

[0182] Неограничивающие примеры аминокислотных модификаций, которые могут быть применимы для настоящего изобретения, представлены в настоящем изобретении. Например, в некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит один из FAM19A5-связывающих доменов членов семейства белков LRRC4 – т.е. YTYFTTVTVE (SEQ ID NO: 29), YSFFTTVTVE (SEQ ID NO: 30) или FSYFSTVTVE (SEQ ID NO: 31) – и одну или более аминокислот на N-конце, C-конце или как на N-конце, так и на C-конце полипептида. В некоторых аспектах полипептид, применимый для настоящего изобретения, содержит по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на N-конце полипептида. В некоторых аспектах полипептид содержит по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на C-конце полипептида. В некоторых аспектах полипептид содержит: (i) по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на N-конце полипептида; и (ii) по меньшей мере около 1, по меньшей мере

около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на С-конце полипептида. Как продемонстрировано в данном документе (см., например, пример 9), в некоторых аспектах одна или более аминокислот отличаются от аминокислот, присутствующих в конкретных остатках в существующем в природе члене семейства белков LRRC4.

[0183] Например, в некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE), с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 18.

[0184] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17

(GYTYFTTVTVETLETQ) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 17. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 17.

[0185] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD) с двумя аминокислотными

модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 19. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGKEKPPGPTTD) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGKEKPPGPTTD) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 19.

[0186] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 143. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 143. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с одной или более аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с двумя аминокислотными модификациями (например, заменами). В некоторых аспектах аминокислотные модификации присутствуют в остатках T12 и L13 SEQ ID NO: 143.

[0187] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит

аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEPYETQPGEE (SEQ ID NO: 123). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEPYETQPGEE (SEQ ID NO: 123). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), по сути состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEPYETQPGEE (SEQ ID NO: 123).

[0188] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEMRETQPGEE (SEQ ID NO: 124). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEMRETQPGEE (SEQ ID NO: 124). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), по сути состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEMRETQPGEE (SEQ ID NO: 124).

[0189] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEIFETQPGEE (SEQ ID NO: 125). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEIFETQPGEE (SEQ ID NO: 125). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEIFETQPGEE (SEQ ID NO: 125).

[0190] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVENHFETQPGEE (SEQ ID NO: 126). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVENHFETQPGEE (SEQ ID NO: 126). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVENHFETQPGEE (SEQ ID NO: 126).

LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~RETQPGEE (SEQ ID NO: 130).

[0195] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~**DY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 131). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**DY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 131). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**DY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 131).

[0196] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~**FF**ETQPGEE (SEQ ID NO: 132). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**FF**ETQPGEE (SEQ ID NO: 132). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**FF**ETQPGEE (SEQ ID NO: 132).

[0197] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~**HY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 133). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**HY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 133). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~**HY**ETQPGEE (SEQ ID NO: 133).

[0198] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~**MM**ETQPGEE (SEQ ID NO: 134). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности

GYTYFTT~~V~~TVEMMETQPGEE (SEQ ID NO: 134). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEMMETQPGEE (SEQ ID NO: 134).

[0199] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEDFETQPGEE (SEQ ID NO: 135). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEDFETQPGEE (SEQ ID NO: 135). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEDFETQPGEE (SEQ ID NO: 135).

[0200] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEDIETQPGEE (SEQ ID NO: 136). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEDIETQPGEE (SEQ ID NO: 136). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEDIETQPGEE (SEQ ID NO: 136).

[0201] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVELIETQPGEE (SEQ ID NO: 137). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVELIETQPGEE (SEQ ID NO: 137). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVELIETQPGEE (SEQ ID NO: 137).

[0202] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEEIETQPGEE (SEQ ID NO: 138). В

некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEE~~IETQPGEE (SEQ ID NO: 138). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEE~~IETQPGEE (SEQ ID NO: 138).

[0203] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVEA~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 139). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEA~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 139). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEA~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 139).

[0204] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVEN~~HETQPGEE (SEQ ID NO: 140). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEN~~HETQPGEE (SEQ ID NO: 140). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEN~~HETQPGEE (SEQ ID NO: 140).

[0205] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVEP~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 141). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEP~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 141). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVEP~~FETQPGEE (SEQ ID NO: 141).

[0206] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе

(например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVED**W**ETQPGEE (SEQ ID NO: 142). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVED**W**ETQPGEE (SEQ ID NO: 142). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVED**W**ETQPGEE (SEQ ID NO: 142).

[0207] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEP**Y**ETQPGEEA (SEQ ID NO: 144). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEP**Y**ETQPGEEA (SEQ ID NO: 144). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEP**Y**ETQPGEEA (SEQ ID NO: 144).

[0208] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEN**H**FETQPGEEA (SEQ ID NO: 145). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEN**H**FETQPGEEA (SEQ ID NO: 145). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEN**H**FETQPGEEA (SEQ ID NO: 145).

[0209] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~V~~TVEQ**R**ETQPGEEA (SEQ ID NO: 146). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~V~~TVEQ**R**ETQPGEEA (SEQ ID NO: 146). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности

GYTYFTT~~VTVE~~QRETQPGEEA (SEQ ID NO: 146).

[0210] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~WYETQPGEEA (SEQ ID NO: 147).

В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~WYETQPGEEA (SEQ ID NO: 147). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~WYETQPGEEA (SEQ ID NO: 147).

[0211] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~MRETQPGEEA (SEQ ID NO: 148).

В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~MRETQPGEEA (SEQ ID NO: 148). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~MRETQPGEEA (SEQ ID NO: 148).

[0212] В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), содержит аминокислотную последовательность GYTYFTT~~VTVE~~IFETQPGEEA (SEQ ID NO: 149).

В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~IFETQPGEEA (SEQ ID NO: 149). В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе (например, содержащий FAM19A5-связывающий домен LRRC4B), состоит по сути из аминокислотной последовательности GYTYFTT~~VTVE~~IFETQPGEEA (SEQ ID NO: 149).

[0213] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, содержит один или более компонентов, которые могут улучшить способность полипептида ингибировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4. Например, в некоторых аспектах молекула содержит (i) любой из полипептидов, описанных в данном документе, и (ii) одну или более дополнительных аминокислот на N-конце полипептида, C-конце полипептида или как на

N-конце полипептида, так и на С-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения, содержит по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на N-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула содержит по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на С-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула содержит: (i) по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на N-конце полипептида; и (ii) по меньшей мере около 1, по меньшей мере около 2, по меньшей мере около 3, по меньшей мере около 4, по меньшей мере около 5, по меньшей мере около 6, по меньшей мере около 7, по меньшей мере около 8, по меньшей мере около 9, по меньшей мере около 10, по меньшей мере около 11, по меньшей мере около 12, по меньшей мере около 13, по меньшей мере около 14, по меньшей мере около 15, по меньшей мере около 16, по меньшей мере около 17, по меньшей мере около 18, по меньшей мере около 19 или по меньшей мере около 20 дополнительных аминокислот на С-конце полипептида.

[0214] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на N-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит:

(i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на С-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту как на N-конце, так и на С-конце. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD).

[0215] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, включает: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на N-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на С-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE), и (ii) по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту как на N-конце, так и на C-конце. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVETTEISPEDTTRK). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVETTEISPEDTTRK). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVETTEISPEDTTRK).

[0216] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, включает: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на N-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE), и (ii) по меньшей мере 1 дополнительную аминокислоту на C-конце полипептида. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит: (i) полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE), и (ii) по меньшей мере одну дополнительную аминокислоту как на N-конце, так и на C-конце. В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применяемая для настоящего изобретения, содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVETMEPSQDERTTR). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVETMEPSQDERTTR). В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 состоит по сути из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVETMEPSQDERTTR).

[0217] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и где аминокислотная последовательность дополнительно содержит одну или более гидрофобных аминокислот на N-конце. В некоторых аспектах гидрофобные аминокислоты содержат по меньшей мере две

аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере девять аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере по меньшей мере 45 аминокислот или по меньшей мере 50 аминокислот на N-конце.

[0218] В некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80% или по меньшей мере около 90% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и где аминокислотная последовательность дополнительно содержит на N-конце и/или на C-конце одну или более аминокислот. В некоторых аспектах одна или более аминокислот, связанных с N-концом и/или C-концом, содержат одну или более аминокислотных последовательностей, полученных из белка LRRC4B. В некоторых аспектах одна или более аминокислот, связанных с N-концом, содержат по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот или по меньшей мере 50 аминокислот на N-конце. В некоторых аспектах одна или более аминокислот, связанных с C-концом, содержат по меньшей мере две аминокислоты, по меньшей мере три аминокислоты, по меньшей мере четыре аминокислоты, по меньшей мере пять аминокислот, по меньшей мере шесть аминокислот, по меньшей мере семь аминокислот, по меньшей мере восемь аминокислот, по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот, по меньшей мере 30 аминокислот, по меньшей мере 35 аминокислот, по меньшей мере 40 аминокислот, по меньшей мере 45 аминокислот или по меньшей мере 50 аминокислот на C-конце. В некоторых аспектах одна или более аминокислот, связанных с N-концом и/или C-концом, связаны посредством

линкера. В некоторых аспектах линкер представляет собой пептидный линкер.

[0219] В некоторых аспектах одна или более дополнительных аминокислот, добавленных к N-концу и/или C-концу, могут содержать любые подходящие аминокислоты, известные в данной области техники. В некоторых аспектах одна или более дополнительных аминокислот представляют собой гидрофильные аминокислоты. В некоторых аспектах одна или более дополнительных аминокислот могут содержать D-аминокислоты. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, в некоторых аспектах добавление одной или более D-аминокислот к N-концу и/или C-концу полипептида может повышать устойчивость молекулы-миметика семейства LRRC4, например, при введении субъекту. Например, включение D-аминокислот может защищать полипептид от расщепления протеазами и пептидазами в крови субъекта. Соответственно, как продемонстрировано в данном документе (см., например, пример 10), в некоторых аспектах полипептид, применимый для настоящего изобретения, может содержать как D-аминокислоты, так и L-аминокислоты. Например, в некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит D-аминокислоту на N-конце и L-аминокислоту во всех других аминокислотных остатках. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, который содержит D-аминокислоту на C-конце и L-аминокислоту во всех других аминокислотных остатках. В некоторых аспектах полипептид, описанный в данном документе, содержит D-аминокислоту как на N-конце, так и на C-конце, и L-аминокислоту во всех других аминокислотных остатках.

[0220] Как описано в данном документе, в некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная выше, содержит полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), 30 (YSFFTTVTVE) и 31 (FSYFSTVTVE), с одной, двумя, тремя, четырьмя, пятью или шестью аминокислотами, отличными от аминокислотной последовательности (например, заменами).

[0221] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применимая для настоящего изобретения, содержит дополнительные модификации на N-конце, C-конце или как на N-конце, так и на C-конце полипептида, где дополнительные модификации могут повышать стабильность полипептида. Например, в некоторых аспектах N-терминальный конец полипептида был метилирован. Неограничивающие примеры дополнительных модификаций, которые можно осуществить на N-конце и/или C-конце, включают: Fmoc, ПЭГилирование, ацетилирование или их комбинации. В некоторых аспектах для повышения стабильности полипептид можно циклизировать. Для осуществления таких

модификаций можно использовать любые подходящие способы, известные в данной области техники.

[0222] Как дополнительно описано в других разделах настоящего изобретения, в некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения, содержит FAM19A5-связывающий домен членов белка семейства LRRC4 и дополнительный фрагмент, который способен улучшать одно или более свойств молекул (например, аффинность связывания молекул с белком FAM19A5). Как продемонстрировано в данном документе (см., например, пример 10), автор настоящей заявки определил, что добавление юкстамембранной последовательности членов семейства белков LRRC4 может значительно улучшить аффинность связывания молекул с белком FAM19A5. Юкстамембранная последовательность является высококонсервативной среди членов семейства LRRC4 и представлена в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) (LRRC4 и LRRC4B) и SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK) (LRRC4C) (см. также фиг. 22D).

[0223] Соответственно, в некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4 (т.е. YSFFTTVTVE; SEQ ID NO: 30) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK). В некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4 (т.е. YSFFTTVTVE; SEQ ID NO: 30) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK). В некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4B (т.е. YTYFTTVTVE; SEQ ID NO: 29) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK). В некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4 (т.е. YTYFTTVTVE; SEQ ID NO: 29) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK). В некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4B (т.е. FSYFSTVTVE; SEQ ID NO: 31) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK). В некоторых аспектах молекула, описанная в данном документе, содержит FAM19A5-связывающий домен белка LRRC4 (т.е. FSYFSTVTVE; SEQ ID NO: 31) и юкстамембранную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK). В некоторых аспектах юкстамембрана добавлена к С-концу молекулы.

[0224] Как очевидно из настоящего изобретения, любая из модификаций, описанных в данном документе, для улучшения одного или более свойств молекулы (например,

аминокислотных замен, добавления юкстамембранной последовательности, D-аминокислот) может использоваться в комбинации. Например, в некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE), с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; и (ii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; (ii) D-аминокислоты на N-конце и/или С-конце; и (iii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; и (ii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; (ii) D-аминокислоты на N-конце и/или С-конце; и (iii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKPPGPTTD) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; и (ii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKPPGPTTD) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; (ii) D-аминокислоты на N-конце и/или С-конце; и (iii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применимая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с аминокислотными

модификациями в остатках T12 и L13; и (ii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы. В некоторых аспектах молекула, применяемая для настоящего изобретения (например, полипептид), содержит: (i) аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA) с аминокислотными модификациями в остатках T12 и L13; (ii) D-аминокислоты на N-конце и/или С-конце; и (iii) юкстамембранную последовательность (например, SEQ ID NO: 151 или SEQ ID NO: 152) на С-конце молекулы.

[0225] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, может содержать один или более дополнительных пептидов, которые позволяют специфично направлять молекулу на различные ткани, например, при введении субъекту. Например, в некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит пептид, который позволяет молекуле проникать через гематоэнцефалический барьер (также называемый в данном документе «**ВВВ-челноком**»). Примеры таких ВВВ-челноков известны в данной области техники. Неограничивающие примеры представлены в таблице 5 (ниже). См., например, Oller-Salvia *et al.*, *Chem Soc Rev* 45:4690 (2016).

Таблица 5. ВВВ-челноки

SEQ ID NO	Пептид	Последовательность
32	Angioprep-2	TFFYGGSRGKRNNFKTEEY-OH
33	АpoB (3371–3409)	SSVIDALQYKLEGTTRLTRKRGLKLATALSLSNKFVEGS
34	АpoE (159–167) ₂	(LRKLRKRL) ₂
35	Пептид-22	Ac-C(&)MPRLRGC(&)-NH ₂
36	THR	THRPPMWSPVWP-NH ₂
37	Ретро-энантиоизомер THR	pwvpswmpprht-NH ₂
38	CRT	C(&)RTIGPSVC(&)
39	Лептин 30	YQQILTSMPSRNVIQISNDLENLRDLLHVL
40	RVG29	YTIWMPENPRPGTPCDIFTNSRGKRASNG-OH
41	CDX	GreirtGraerwsekf-OH
42	Апамин	C(&1)NC(&2)KAPETALC(&1)-ARRC(&2)QQH-NH ₂
43	MiniAp-4	[Dap](&)KAPETALD(&)
44	GSH	γ-L-глутамин-CG-OH

45	G23	HLNILSTLWKYRC
46	g7	GFtGFLS(O-b-Glc)-NH ₂
47	TGN	TGNYKALHPHNG
48	TAT (47–57)	YGRKKRRQRRR-NH ₂
49	SynB1	RGGRLSYSRRRFSTSTGR
50	Дикетопиперазины	&(N-MePhe)–(N-MePhe)дикетопиперазины
51	PhPro	(Фенилпролин)4-NH ₂

Номенклатура циклических пептидов (&) адаптирована к 3-буквенному аминокислотному коду, описанному в Spengler *et al.*, *J Pept Res* 65: 550-555 (2005); [Dap] означает диаминопропионовую кислоту.

[0226] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, применимая для настоящего изобретения, включает слитый белок. Например, в некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4, описанная в данном документе, может содержать: (i) любой из полипептидов по настоящему изобретению и (ii) продлевающий период полужизни фрагмент. Любые подходящие продлевающие период полужизни фрагменты, известные в данной области техники, можно использовать для создания слитых белков по настоящему изобретению. Неограничивающие примеры таких продлевающих период полужизни фрагментов включают: Fc, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), С-концевой пептид (СТР) β-субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (ПЭГ), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропилкрахмал (HES), альбумин-связывающую малую молекулу или их комбинацию.

[0227] В некоторых аспектах молекула-миметик семейства LRRC4 содержит конъюгат белок-лекарственное средство. Например, в некоторых аспектах полипептид молекулы-миметика семейства LRRC4 может быть конъюгирован с терапевтическим средством, например, со средством, которое применимо для лечения заболевания или нарушения.

[0228] Конъюгаты белок-лекарственное средство, описанные в данном документе, можно получить способами, известными в данной области техники. В некоторых аспектах способы конъюгации приводят к образованию связей, которые по сути (или почти) неиммуногенны, например, пептидные (т.е. амидные), сульфидные (стерически затрудненные), дисульфидные, гидразоновые и эфирные связи. Эти связи почти неиммуногенны и демонстрируют достаточную стабильность в сыворотке крови (см.,

например, Senter, P. D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886, каждое из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте).

[0229] В зависимости от биохимической природы фрагмента и полипептидов можно использовать различные стратегии конъюгации (см., например, Hackenberger, C. P. R., and Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 47 (2008) 10030-10074). В некоторых аспектах сайт-специфическая реакция и ковалентное связывание основаны на преобразовании природной аминокислоты в аминокислоту, реакционная способность которой ортогональна реакционной способности других присутствующих функциональных групп. Например, специфический цистеин в контексте редкой последовательности может быть ферментативно преобразован в альдегид (см. Frese, M. A., and Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427). Также возможно получить требуемую аминокислотную модификацию, используя специфическую ферментативную реактивность определенных ферментов с природной аминокислотой в контексте данной последовательности (см., например, Taki, M. *et al.*, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. *et al.*, *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; а катализируемое протеазой образование связей C—N используется в Bordusa, F., *Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403).

[0230] Сайт-специфическая реакция и ковалентное связывание также могут быть достигнуты путем селективной реакции концевых аминокислот с соответствующими модифицирующими реагентами. Реакционную способность N-концевого цистеина с бензонитрилами (см. Ren, H. *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662) можно использовать для достижения сайт-специфического ковалентного связывания. Нативное химическое лигирование также может основываться на C-концевых цистеиновых остатках (Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96).

[0231] Фрагмент также может представлять собой синтетический пептид или пептид-миметик. В таких случаях полипептид может быть синтезирован химически, в ходе такого синтеза могут быть включены аминокислоты с ортогональной химической реакционной способностью (см., например, de Graaf, A. J. *et al.*, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295). Для получения меченого полипептида конъюгат со стехиометрией 1:1 можно отделить хроматографией от других побочных продуктов конъюгации. Эту процедуру можно облегчить, используя член связывающей пары, меченый красителем, и заряженный линкер. Благодаря такому типу меченого члена связывающей пары с высоким отрицательным зарядом моноконъюгированные полипептиды легко отделяются от

немеченых полипептидов и полипептидов, которые несут более одного линкера, поскольку для разделения можно использовать разницу в заряде и молекулярной массе. Флуоресцентный краситель может быть применим для очистки комплекса от несвязанных компонентов, таких как меченое одновалентное связующее вещество.

IV. Фармацевтические композиции

[0232] В данном документе представлены композиции, содержащие молекулу-миметик семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки или белковые конъюгаты, описанные в данном документе, имеющие требуемую степень чистоты в физиологически приемлемом носителе, наполнителе или стабилизаторе (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Истон, Пенсильвания). Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы являются нетоксичными для реципиентов при используемых дозировках и концентрациях и включают в себя буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил или пропилпарабен; катехол; резорцинол; циклогексанол, 3-пентанол, и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем около 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатообразующие средства, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; комплексы металлов (например, комплексы Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN[®], PLURONICS[®] или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

[0233] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, применимая для настоящего изобретения, содержит любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты, описанные в данном документе, и необязательно один или более дополнительных профилактических или терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах фармацевтические композиции содержат любые молекулы-миметики семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты, описанные в данном документе, и необязательно одно или более дополнительных профилактических

терапевтических средств в фармацевтически приемлемом носителе. В некоторых аспектах молекулы-миметики семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты, описанные в данном документе, являются единственным активным ингредиентом, включенным в фармацевтическую композицию. Фармацевтические композиции, описанные в данном документе, могут быть применимы для ингибирования, снижения и/или диссоциации взаимодействия белка FAM19A5 и членов семейства белков LRRC4. Как описано в других разделах настоящего изобретения, ингибирование, снижение и/или диссоциация взаимодействия белка FAM19A5 и членов семейства белков LRRC4 может улучшить образование нейронных цепей (например, с помощью стимулирования удлинения нейритов и образования синапсов).

[0234] Фармацевтически приемлемые носители, применяемые в парентеральных препаратах, включают водные носители, неводные носители, противомикробные средства, изотонические средства, буферы, антиоксиданты, местные анестетики, суспендирующие и диспергирующие средства, эмульгаторы, секвестрирующие или хелатирующие средства, и другие фармацевтически приемлемые вещества. Примеры водных носителей включают инъекционный раствор хлорида натрия, инъекционный раствор Рингера, инъекционный изотонический раствор декстрозы, инъекционную стерильную воду, инъекционный раствор декстрозы и инъекционный раствор Рингера с лактатом. Неводные парентеральные носители включают нелетучие масла растительного происхождения, хлопковое масло, кукурузное масло, кунжутное масло и арахисовое масло. Антимикробные средства в бактериостатических или фунгистатических концентрациях могут быть добавлены к парентеральным препаратам, упакованным в контейнеры с множеством - доз, которые включают фенолы или крезосы, ртутные вещества, бензиловый спирт, хлорбутанол, сложные эфиры метил- и пропил-п-гидроксibenзойной кислоты, тимеросал, хлорид бензалкония и хлорид бензетония. Изотонические средства включают хлорид натрия и декстрозу. Буферы включают фосфат и цитрат. Антиоксиданты включают бисульфат натрия. Местные анестетики включают прокаин гидрохлорид. Суспендирующие и диспергирующие средства включают карбоксиметилцеллюлозу натрия, гидроксипропилметилцеллюлозу и поливинилпирролидон. Эмульгирующие средства включают Polysorbate 80 (TWEEN® 80). Секвестрирующее или хелатирующее средство ионов металлов включает EDTA. Фармацевтические носители также включают этиловый спирт, полиэтиленгликоль и пропиленгликоль для смешиваемых с водой носителей, и гидроксид натрия, хлористоводородную кислоту, лимонную кислоту, или молочную кислоту для регулирования pH.

[0235] Фармацевтическая композиция может быть составлена для любого пути введения субъекту. Конкретные примеры путей введения включают интраназальный, пероральный, парентеральный, интратекальный, интрацеребровентрикулярный, легочный, подкожный или интравентрикулярный. В данном документе также рассматривается парентеральное введение, характеризующееся подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекцией. Инъекционные препараты могут быть приготовлены как обычные лекарственные формы, либо в виде жидких растворов, либо в виде суспензий, в виде твердых форм, пригодных для растворения или суспендирования в жидкости перед инъекцией, или в виде эмульсий. Инъекционные препараты, растворы и эмульсии также содержат одно или более вспомогательных веществ. Подходящими вспомогательными веществами являются, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин или этанол. Кроме того, если желательно, фармацевтические композиции, которые должны вводиться, могут также содержать незначительные количества - нетоксичных вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, буферные средства рН, стабилизаторы, усилители растворимости и другие такие средства, такие как, например, натрий ацетат, монолаурат сорбитана, олеат триэтаноламина и циклодекстрины.

[0236] Препараты для парентерального введения молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе, включают стерильные растворы, готовые для инъекций, стерильные сухие растворимые продукты, такие как лиофилизированные порошки, готовые к смешиванию с растворителем непосредственно перед использованием, включая подкожные таблетки, стерильные суспензии, готовые для инъекций, стерильные сухие нерастворимые продукты, готовые к применению в сочетании с наполнителем непосредственно перед использованием, и стерильные эмульсии. Растворы могут быть водными или неводными.

[0237] При внутривенном введении подходящие носители включают физиологический раствор или забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS) и растворы, содержащие загустители и солюбилизирующие средства, такие как глюкоза, полиэтиленгликоль и полипропиленгликоль, а также их смеси.

[0238] Смеси для местного применения, содержащие молекулу-миметик семейства LRRC4, готовят, как описано, для местного и системного введения. Получаемая смесь может представлять собой раствор, суспензию, эмульсии или тому подобное и может быть составлена в виде кремов, гелей, мазей, эмульсий, растворов, эликсиров, лосьонов, суспензий, настоек, паст, пенопластов, аэрозолей, орошений, спреев, суппозиторий,

дермальных пластырей или любых других препаратов, подходящих для местного применения.

[0239] Фармацевтическая композиция (например, содержащая любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов, описанных в данном документе) может быть составлена в виде аэрозоля для местного применения, например, путем ингаляции (см., например, патенты США №№ 4044126, 4414209 и 4364923). Эти составы для введения в дыхательные пути могут быть в форме аэрозоля или раствора для распылителя или в виде микродисперсного порошка для инсуффляций, отдельно или в комбинации с инертным носителем, таким как лактоза. В таком случае частицы состава могут, в некоторых аспектах, иметь диаметр менее около 50 микрон, например, менее около 10 микрон.

[0240] Фармацевтическая композиция (например, содержащая любые молекулы-миметики семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки или белковые конъюгаты, описанные в данном документе) может быть составлена для локального или местного применения, например, для местного нанесения на кожу и слизистые оболочки, например, например, для глаз, в виде гелей, кремов и лосьонов, а также для нанесения на глаза или для интрацистернального или интраспинального применения. Местное введение предназначено для трансдермальной доставки, а также для введения в глаза или слизистую оболочку или для ингаляционной терапии. Также могут быть введены назальные растворы антитела отдельно или в комбинации с другими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

[0241] Трансдермальные пластыри, включающие устройства для ионофореза и электрофореза, хорошо известны специалистам в данной области техники и могут быть использованы для введения любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов, описанных в данном документе). Например, такие пластыри раскрыты в патентах США №№ 6267983, 6261595, 6256533, 6167301, 6024975, 6010715, 5985317, 5983134, 5948433 и 5860957.

[0242] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, представляет собой лиофилизированный порошок, который можно восстановить для введения в виде растворов, эмульсий и других смесей. Его также можно восстановить и приготовить в виде твердых веществ или гелей. Лيوфилизированный порошок получают растворением любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов, описанных в данном документе, или их фармацевтически приемлемого производного, в подходящем

растворителе. В некоторых аспектах лиофилизированный порошок является стерильным. Растворитель может содержать вспомогательное вещество, которое улучшает стабильность или другой фармакологический компонент порошка или восстановленного раствора, полученного из порошка. Вспомогательные вещества, которые могут быть применены, включая, но не ограничиваясь ими, декстрозу, сорбит, фруктозу, кукурузный сироп, ксилит, глицерин, глюкозу, сахарозу или другое подходящее средство. Растворитель также может содержать буфер, такой как цитрат, фосфат натрия или калия, или другой такой буфер, известный специалистам в данной области техники. В некоторых аспектах буфер имеет примерно нейтральный pH. Последующая стерильная фильтрация раствора с последующей лиофилизацией в стандартных условиях, известных специалистам в данной области техники, приводит к образованию требуемого состава. В некоторых аспектах полученный раствор можно распределить по флаконам для лиофилизации. Каждый флакон может содержать одну дозу или несколько доз соединения (например, любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов). Лиофилизированный порошок можно хранить в соответствующих условиях, например, при температуре от около 4 °C до комнатной температуры.

[0243] Восстановление этого лиофилизированного порошка водой для инъекций обеспечивает состав для парентерального введения. Для восстановления лиофилизированный порошок добавляют к стерильной воде или другому подходящему носителю. Точное количество зависит от выбранного соединения. Такое количество может быть определено эмпирически.

[0244] В некоторых аспектах фармацевтическая композиция, содержащая любую из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток или белковых конъюгатов, описанных в данном документе, также может быть составлена так, чтобы быть нацеленной на конкретную ткань, рецептор или другую область тела субъекта, подлежащие лечению. Неограничивающие примеры способов нацеливания см., например, в патентах США №№ 6316652, 6274552, 6271359, 6253872, 6139865, 6131570, 6120751, 6071495, 6060082, 6048736, 6039975, 6004534, 5985307, 5972366, 5900252, 5840674, 5759542 и 5709874.

[0245] Композиции, используемые для введения *in vivo*, могут быть стерильными. В некоторых аспектах это может быть достигнуто путем фильтрации, например, через стерильные фильтрационные мембраны.

V. Нуклеиновые кислоты, векторы, клетки-хозяева

[0246] Дополнительный аспект, описанный в данном документе, относится к одной

или более молекулам нуклеиновой кислоты (также обозначаемым в данном документе «**нуклеиновыми кислотами**» или их производными), которые кодируют молекулу (например, молекулу-миметик семейства LRRC4, описанную в данном документе). Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или в частично очищенной или практически чистой форме. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота представляет собой последовательность ДНК и/или последовательность РНК (например, mRNA). В некоторых аспектах нуклеиновые кислоты содержат модифицированный аналог нуклеотида. Нуклеиновая кислота является «**выделенной**» или «**становится по сути чистой**» при очистке от других клеточных компонентов или других загрязнителей, *например*, других клеточных нуклеиновых кислот (*например*, другой хромосомной ДНК, *например*, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК из природного источника) или белков с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/SDS, разделение в CsCl, хроматографию на колонке, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие, хорошо известные в данной области техники. См. F. Ausubel, *et al.*, ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. В некоторых аспектах молекула нуклеиновой кислоты может содержать или не содержать интронные последовательности. В некоторых аспектах нуклеиновая кислота представляет собой молекулу сДНК. Нуклеиновые кислоты, описанные в данном документе, могут быть получены с использованием стандартных методов молекулярной биологии, известных в данной области техники.

[0247] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к вектору, содержащему выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую терапевтическое средство, раскрытое в данном документе (например, молекулу-миметик семейства LRRC4, описанную в данном документе). Подходящие векторы по настоящему изобретению включают без ограничения векторы экспрессии, вирусные векторы и плазмидные векторы. В некоторых аспектах вектор представляет собой вирусный вектор.

[0248] Используемый в данном документе термин «**вектор экспрессии**» относится к любой конструкции нуклеиновой кислоты, которая содержит необходимые элементы для транскрипции и трансляции вставленной кодирующей последовательности, или, в случае вирусного вектора РНК, необходимые элементы для репликации и трансляции, при введении в подходящую клетку-хозяина. Векторы экспрессии могут включать плазмиды, фагмиды, вирусы и их производные.

[0249] Используемый в данном документе термин «**вирусные векторы**» включает без ограничения последовательности нуклеиновых кислот из следующих вирусов:

ретровируса, такого как вирус мышинного лейкоза Молони, вирус саркомы мышей Харви, вирус опухоли молочной железы мышей и вирус саркомы Рауса; лентивирус; аденовирус; аденоассоциированный вирус; вирусы типа SV40; полиомавирусы; вирусы Эпштейна-Барра; вирусы папилломы; вирус герпеса; вирус коровьей оспы; вирус полиомиелита; и РНК-вирус, такой как ретровирус. Некоторые вирусные векторы основаны на нецитопатических эукариотических вирусах, в которых несущественные гены были заменены на представляющий интерес геном. Нечитопатические вирусы включают ретровирусы, жизненный цикл которых включает обратную транскрипцию геномной вирусной РНК в ДНК с последующей интеграцией провирусов в клеточную ДНК хозяина.

[0250] В некоторых аспектах вектор получен из аденоассоциированного вируса. В некоторых аспектах вектор получен из лентивируса. Примеры лентивирусных векторов раскрыты в WO9931251, WO9712622, WO9817815, WOO9817816 и WO9818934, каждый из которых включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0251] Другие векторы включают плазмидные векторы. См., например, , Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. В последние несколько лет было обнаружено, что плазмидные векторы особенно выгодны для доставки генов в клетки *in vivo* из-за их неспособности реплицироваться и интегрироваться в геном хозяина. Эти плазмиды, однако, имеющие промотор, совместимый с клеткой-хозяином, могут экспрессировать пептид из гена, функционально кодируемого в плазмиде. Некоторые широко используемые плазмиды, доступные от коммерческих поставщиков, включают pBR322, pUC18, pUC19, различные плазмиды pcDNA, pRC / CMV, различные плазмиды pCMV, pSV40 и pBlueScript. Дополнительные примеры конкретных плазмид включают pcDNA3.1, номер по каталогу V79020; pcDNA3.1/hygro, номер по каталогу V87020; pcDNA4/мус-His, номер по каталогу V86320; и pBudCE4.1, номер по каталогу V53220, все от Invitrogen (Карлсбад, Калифорния). Кроме того, плазмиды можно создавать по индивидуальному заказу с использованием стандартных методик молекулярной биологии для удаления и/или добавления определенных фрагментов ДНК.

[0252] В данном документе также охвачен способ получения молекулы, раскрытой в данном документе (например, молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе). В некоторых аспектах такой способ может включать экспрессию молекулы (например, молекулы-миметика семейства LRRC4, описанной в данном документе) в клетке, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую молекулу. Клетки-хозяева, содержащие эти нуклеотидные последовательности, включены в данный

документ. Неограничивающие примеры клеток-хозяев, которые можно использовать, включают иммортализованную гибридную клетку, клетку миеломы NS/0, клетку 293, клетку яичника китайского хомячка (CHO), клетку HeLa, клетку, полученную из амниотической жидкости человека (СарТ-клетку), клетку COS, или их комбинации.

VI. Наборы

[0253] В данном документе также представлены наборы, содержащие одну или более молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в данном документе представлена фармацевтическая упаковка или набор, содержащих один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, описанных в данном документе, такими как одна или более молекул-миметиков семейства LRRC4, представленных в данном документе, и необязательно инструкцию по применению. В некоторых аспектах наборы содержат фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, и любое профилактическое или терапевтическое средство, например, описанное в данном документе.

VII. Способы по настоящему изобретению

[0254] Как продемонстрировано в данном документе, молекулы-миметики семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты или композиции применимы для ингибирования, снижения и/или диссоциации взаимодействия между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4. Соответственно, в некоторых аспектах в данном документе представлен способ ингибирования, снижения и/или диссоциации образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту эффективного количества любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах после введения образование комплекса снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 15%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 25%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 35%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 45%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 55%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 65%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или около 100% по сравнению с эталоном (например, соответствующим

значением у субъекта до введения или значением у соответствующего субъекта, не получавшего введения).

[0255] Как описано в других разделах в настоящем изобретении, связывание белка FAM19A5 с членами семейства белков LRRC4 может ингибировать активность членов семейства белков LRRC4. Например, в некоторых аспектах образование белковых комплексов семейства FAM19A5-LRRC4 может приводить к нарушению образования нейронных цепей, что приводит к дисбалансу динамического усиления и потери синапсов, что имеет основополагающее значение для нормальной функции нейронов в центральной и периферической нервной системе.

[0256] Соответственно, в некоторых аспектах снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4 может повышать активность членов семейства белков LRRC4. В некоторых аспектах после введения активность членов семейства белков LRRC4 повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 6 раз, по меньшей мере около 7 раз, по меньшей мере около 8 раз, по меньшей мере около 9 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 15 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 35 раз, по меньшей мере около 40 раз, по меньшей мере около 45 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, соответствующим значением у субъекта до введения или значением у соответствующего субъекта, который не получал введения). Неограничивающие примеры такой активности могут включать удлинение нейритов, миграцию нейронов, а также образование и функциональную сборку синаптических контактов.

[0257] Как очевидно из настоящего изобретения, в некоторых аспектах настоящее изобретение направлено на способ повышения удлинения нейритов и/или образования синапсов в нейронах, включающий приведение нейронов в контакт с любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *in vivo* (например, у субъекта, нуждающегося в этом). В таких аспектах способ может дополнительно включать введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций перед приведением в контакт. В некоторых аспектах приведение в контакт происходит *ex vivo*. В некоторых аспектах приведение в контакт повышает удлинение нейритов в нейронах в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по

меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, удлинением нейритов в соответствующем нейроне, который не контактировал ни с одним из полипептидов, молекулами, нуклеиновыми кислотами, векторами, клетками, белковыми конъюгатами или композициями, описанными в данном документе). В некоторых аспектах приведение в контакт повышает образование синапсов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, образованием синапсов в соответствующем нейроне, который не контактировал ни с одной из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе).

[0258] В некоторых аспектах терапевтические эффекты молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или комбинаций (например, снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4; повышение удлинения нейритов; и/или повышенное образование синапсов) может уменьшить один или более симптомов заболевания или состояния, например, ассоциированных с нарушением образования нейронных цепей.

[0259] Соответственно, в некоторых аспектах настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение субъекту терапевтически эффективного количества любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе, где заболевание или состояние выбрано из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций. Как описано далее ниже, в некоторых аспектах в данном документе представлен способ лечения бокового амиотрофического склероза (ALS), включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения болезни Альцгеймера, включающий

введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения глаукомы, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения диабетической ретинопатии, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения нейропатической боли, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения повреждения спинного мозга, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения черепно-мозговой травмы, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения инсульта, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения болезни Паркинсона, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе.

[0260] Соответственно, некоторые аспекты настоящего изобретения направлены на способ лечения ALS у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах ALS, который можно лечить согласно настоящему изобретению, включает спорадический ALS, семейный ALS или и то, и другое. Используемый в данном документе термин «спорадический» ALS относится к ALS, который не ассоциирован с каким-либо семейным анамнезом возникновения ALS. Примерно около 90% или более случаев ALS

приходится на спорадический ALS. Используемый в данном документе термин «семейный» ALS относится к ALS, который возникает более одного раза в семье, что указывает на генетический компонент заболевания. В некоторых аспектах ALS, который можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает первичный боковой склероз (PLS). PLS может поражать верхние мотонейроны верхних и нижних конечностей. Однако более чем у 75% людей с очевидным PLS развиваются признаки нижних мотонейронов в течение четырех лет после появления симптомов, а это означает, что до этого момента точный диагноз PLS не может быть поставлен. PLS имеет более благоприятный прогноз, чем классический ALS, поскольку он прогрессирует медленнее, приводит к меньшему функциональному ухудшению, не влияет на способность дышать и вызывает менее выраженную потерю веса. В некоторых аспектах ALS включает прогрессирующую мышечную атрофию (PMA). PMA может влиять на нижние мотонейроны верхних и нижних конечностей. Хотя PMA ассоциирован с в среднем более долгой выживаемостью, чем при классическом ALS, но со временем он все равно прогрессирует на другие области спинного мозга, что в конечном итоге приводит к дыхательной недостаточности и смерти. Признаки верхних мотонейронов могут развиваться на поздних стадиях PMA, и в этом случае диагноз может быть изменен на классический ALS.

[0261] В некоторых аспектах введение любого из терапевтических средств, описанных в данном документе (например, любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе) может нормализовать один или более симптомов, ассоциированных с ALS. Неограничивающие примеры симптомов включают: трудности при ходьбе или выполнении обычной повседневной деятельности; спотыкание и падение; слабость конечностей; невнятную речь; проблемы с глотанием; мышечные спазмы и подергивания; неуместный плач, смех или зевание; деменцию; когнитивные и поведенческие изменения; и их комбинации.

[0262] Как продемонстрировано в данном документе (см., например, пример 11), в некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения болезни Альцгеймера у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, в некоторых аспектах лечение болезни Альцгеймера включает снижение нагрузки бляшками бета-амилоида (A β) у субъекта (например, страдающего болезнью Альцгеймера). Используемый в данном документе термин «**бета-амилоидная бляшка**» относится ко всем

формам аберрантного отложения бета-амилоида, включая крупные агрегаты и небольшие ассоциации нескольких бета-амилоидных пептидов, и может содержать любую вариацию бета-амилоидных пептидов. Известно, что бета-амилоидные бляшки (A β) вызывают изменения в нейронах, например, абберации в составе синапсов, форме синапсов, плотности синапсов, потере синаптической проводимости, изменениях диаметра дендритов, изменениях длины дендритов, изменениях плотности шипов, изменения площади шипов, изменения длины позвоночника или изменения диаметра головки позвоночника. В некоторых аспектах повышение нагрузки A β бляшек может привести к потере синапсов в нейронах. Соответственно, в некоторых аспектах в данном документе представлен способ уменьшения потери синапсов в нейронах, включающий приведение нейрона в контакт с любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В некоторых аспектах приведение в контакт может происходить *in vivo*. В некоторых аспектах приведение в контакт может происходить *ex vivo*.

[0263] Как также продемонстрировано в данном документе (см., например, пример 13), в некоторых аспектах в настоящем изобретении представлен способ лечения болезни Паркинсона у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе. В данном документе термин «болезнь Паркинсона» (PD) относится к нейродегенеративному заболеванию, приводящему к моторным и немоторным проявлениям (т.е. симптомам) и характеризующемуся обширной дегенерацией дофаминергических нейронов в нигростриарной системе. Неограничивающие примеры моторных и немоторных проявлений PD представлены в других разделах настоящего изобретения. Протеинопатия (аномальная агрегация альфа-синуклеина) является отличительным признаком PD. Другие иллюстративные особенности PD включают повреждение дофаминергических нейронов, митохондриальную дисфункцию, нейровоспаление, белковый гомеостаз (например, аутофагический клиренс поврежденных белков и дисфункцию органелл глиальных клеток) и их комбинации.

[0264] Как продемонстрировано в настоящем документе (см., например, пример 14), в некоторых аспектах терапевтические средства, представленные в данном документе (например, любая из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе) могут быть применимы в увеличении порога или задержки воздействия внешнего раздражителя (например, механического и/или термического раздражителя) у субъекта, нуждающегося в

этом. Соответственно, в некоторых аспектах после введения субъект имеет более высокий порог воздействия внешних раздражителей по сравнению с эталонным контролем (например, соответствующим субъектом, который не получал молекулу-миметик семейства LRRC4, описанную в данном документе). Используемый в данном документе термин «порог для внешних раздражителей» относится к величине давления (со стороны внешних раздражителей), прежде чем субъект ответит на раздражители (например, путем отстранения).

[0265] Как будет очевидно специалистам в данной области техники, такой терапевтический эффект может быть применим при лечении одного или более симптомов, ассоциированных с нейропатической болью. Соответственно, в некоторых аспектах в данном документе представлен способ лечения, предупреждения или облегчения нейропатической боли у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту любой из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе.

[0266] В некоторых аспектах невропатическая боль представляет собой центральную невропатическую боль, т.е. боль, вызванную травмой или повреждением, затрагивающим любой уровень ЦНС (например, повреждение головного мозга и повреждение спинного мозга), включая центральную соматосенсорную нервную систему, или ассоциированную с ней или в результате заболевания или расстройства, такого как инсульт, рассеянный склероз или латеральный медуллярный инфаркт. В некоторых аспектах невропатическая боль представляет собой периферическую невропатическую боль, боль вследствие травмы или повреждения, затрагивающего любой уровень системы периферических нервов (например, повреждение двигательного нерва, сенсорного нерва, вегетативного нерва или их комбинации) или в результате или ассоциированные с заболеванием или расстройством.

[0267] В некоторых аспектах терапевтические средства, представленные в данном документе (например, любая из молекул-миметиков семейства LRRC4, нуклеиновых кислот, векторов, клеток, белковых конъюгатов или композиций, описанных в данном документе) могут быть применимы в лечении ретинопатий. В некоторых аспектах ретинопатия, которую можно лечить с помощью настоящего изобретения, включает диабетическую ретинопатию. Термин «диабетическая ретинопатия» включает все типы диабетической ретинопатии, включая без ограничения непролиферативную диабетическую ретинопатию (NPDR), пролиферативную диабетическую ретинопатию (PDR), диабетическую макулопатию и диабетический макулярный отек. Не ограничиваясь какой-

либо одной теорией, в некоторых аспектах лечение ретинопатии (например, диабетической ретинопатии) включает улучшение потенциала сетчатки у субъекта, нуждающегося в этом. В некоторых аспектах улучшенный потенциал сетчатки включает увеличение значений А-волны, В-волны и/или колебательного потенциала по сравнению с эталоном (например, соответствующим субъектом, которого не лечили молекулой-миметиком семейства LRRC4, описанной в данном документе). Специалистам в данной области техники будет очевидно, что лечение ретинопатий может быть применимо в лечении других типов глазных заболеваний, включая без ограничения дегенерацию желтого пятна и глаукому.

[0268] В некоторых аспектах способы, описанные в данном документе (например, повышения удлинения нейритов, усиления образования синапсов и/или уменьшения образования комплекса между FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4) могут включать введение субъекту дополнительного терапевтического средства. Дополнительное терапевтическое средство может включать любые известные средства для лечения и/или облегчения одного или более симптомов, ассоциированных с любым из вышеописанных показаний. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает ингибитор ацетилхолинэстеразы. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает агонист дофамина. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает антагонист дофаминового рецептора. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает антипсихотическое средство. В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает ингибитор моноаминоксидазы (МАО). В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает ингибитор катехол-О-метилтрансферазы (COMT). В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает антагонист рецептора N-метил-D-аспартата (NMDA). В некоторых аспектах дополнительное терапевтическое средство включает иммуномодулятор. В некоторых аспектах представлено дополнительное терапевтическое средство, которое включает иммунодепрессант.

[0269] Неограничивающие примеры таких средств включают: тетрабеназин (XENAZINE[®]), антипсихотические лекарственные средства, такие как галоперидол (HALDOL[®]), хлорпромазин, рисперидон (rRIDPERDAL[®]), кветиапин (SEROQUEL[®]), леводопу (с карбидопой или без нее) (LODOSYN[®]), агонисты дофамина, такие как прамипексол (MIRAPEX[®]), ропинирол (REQUIP[®]) и ротиготин (NEUPRO[®]), а также апоморфин (АРОКYN[®]), селегилин (ELDEPRYL[®], ZELAPAR[®]), разагилин (AZILECT[®]), энтакапон (COMTAN[®]), бензтропин (COGENTIN[®]), тригексифенидил, амантадин, донепезил (ARICEPT[®]), галантамин (RAZADYNE[®]), ривастигмин (EXELON[®]),

глатирамера ацетат (COPAXONE[®]), диметилфумарат (TECFIDERA[®]), финголимод (GILENYA[®]), терифлуномид (AUBAGIO[®]), натализумаб (TYSABRI[®]), алемтузумаб (LEMTRADA[®]), митоксантрон (NOVANTRONE[®]), рилузол (RILUTEK[®]), физостигмина салицилат (ANTILIRIUM[®]), физостигмина сульфат (ESERINE[®]), метрифонат, неостигмин, ганстигмин, пиридостигмин (MESTINON[®]), амбенониум (MYTELASE[®]), демаркарий, Debio 9902 (также известный как ZT-1[®]; дебиофармладостигил, NP-0361), такрин (COGNEX[®]), толсерин, велнакрина малеат, мемокин, гиперзин А (HUP-A[®]; NeuroHitech), фензерин, эдрофоний (ENLON[®], TENSILON[®]), INM-176, апоморфин (APOKYN[®]), бромокриптин (PARLODEL[®]), каберголин (DOSTINEX[®]), дигидроксидин, дигидроэргокриптин, фенолдопам (CORLOPAM[®]), лисурид (DOPERGIN[®]), тергурид сперголид (PERMAX[®]), приробедил (TRIVASTAL[®], TRASTAL[®]), хинпирол, SKF-82958 (GlaxoSmithKline), карипразин, пардопрунокс, саризотан, хлорпромазин, флуфеназин, локспин, респеридон, тиоридазин, тиотиксен, трифлуоперазин, 7-гидроксиамоксапин, дроперидол (INAPSINE[®], DRIDOL[®], DROPLETAN[®]), домперидон (MOTILIUM[®]), L-741742, L-745870, раклоприд, SB-277011A, SCH-23390, экопипам, SKF-83566, метоклопрамид (REGLAN[®]), луразидон (LATUDA[®], также известный как SM-13496; Dainippon Sumitomo), арипипразол (ABILIFY[®]), хлорпромазин (THORAZINE[®]), илоперидон (FANAPTA[®]), флупентиксол деканоат (DEPIXOL[®], FLUANXOL[®]), резерпин (SERPLAN[®]), пимозид (ORAP[®]), флуфеназина деканоат, флуфеназина гидрохлорид, прохлорперазин (COMPRO[®]), азенапин (SAPHRIS[®]), локсапин (LOXITANE[®]), молиндон (MOBAN[®]), перфеназин, тиоридазин, тиотиксин, трифлуоперазин (STELAZINE[®]), рамелтеон, клозапин (CLOZARIL[®]), норклозапин (ACP-104), палиперидон (INVEGA[®]), мелперон, оланзапин (ZYPREXA[®]), талнетант, амисульприд, зипрасидон (GEODON[®]), блонансерин (LONASEN[®]), ACP-103 (Acadia Pharmaceuticals), селегилина гидрохлорид (И-депренил, ELDEPRYL[®], ZELAPAR[®]), диметилселегилен, брофаромин, фенелзин (NARDIL[®]), транилципромин (PARNATE[®]), моклобемид (AURORIX[®], MANERIX[®]), бефлоксатон, сафинамид, изокарбоксамид (MARPLAN[®]), ниаламид (NIAMID[®]), ипрониазид (MARSILID[®], IPROZID[®], IPRONID[®]), CHF-3381 (Chiesi Farmaceutici), ипроклозид, толоксатон (HUMORYL[®], PERENUM[®]), бифемелан, дезоксипеганин, гармин (также известный как телепатин или банастерин), гармалин, линезолид (ZYVOX[®], ZYVOXID[®]), паргилин (EUDATIN[®], SUPIRDYL[®]), нитекапон, толкапон (TASMAR[®]), трополон, мемантин (NAMENDA[®], AXURA[®], EBIXA[®]), амантадин (SYMMETREL[®]), акампросат (CAMPRAL[®]), безонпродил, кетамин (KETALAR[®]), делюцемин, дексанабинол, дексефароксан, декстрометорфан, декстрорфан, траксопродил, CP-283097, гимантан,

идантадол, ипеноксазон, L-701252 (Merck), ланцисемин, леворфанол (DROMORAN[®]), LY-233536 и LY-235959 (оба Lilly), метадон (DOLOPHINE[®]), нерамексан, перзинфотел, фенциклидин, тианептин (STABLON[®]), дизоцилпин (также известный как МК-801), EAB-318 (Wyeth), ибогаин, воакангин, тилетамин, аптиганел (CERESOTAT[®]), гавестстинел, ремацимид, MBP -8298 (пептид синтетического основного белка миелина), роквинимекс (LINOMIDE[®]), лаквинимод (также известный как ABR-215062 и SAIK-MS), АВТ-874 (антитело к IL-12 человека; Abbott), ритуксимаб (RITUXAN[®]), лефлуномид, циклесонид, даклизумаб (ZENAPAX[®]), метотрексат (TREXALL[®], RHEUMATREX[®]), суплатаст тозилат, микофенолата мофетил (CELLCEPT[®]), микофенолат натрия (MYFORTIC[®]), азатиоприн (AZASAN[®], IMURAN[®]), меркаптопурин (PURI-NETHOL[®]), циклофосфамид (NEOSAR[®], CYTOXAN[®]), воклоспорин, PUR-118, AMG 357, AMG 811, BCT197, хлорамбуцил (LEUKERAN[®]), кладрибин (LEUSTATIN[®], MYLINAX[®]), альфа-фетопротеин, этанерцепт (ENBREL[®]), лефлуномид, циклесонид, хлорохин, гидроксихлорохин, d-пеницилламин, ауранофин, сульфасалазин, ауротиомалат натрия, циклоспорин, кромолин, инфликсимаб, адалимумаб, цертолизумаб пегол, голимумаб, ритуксимаб, окрелизумаб, офатумумаб, 4-бензилокси-5-((5-ундецил-2H-пиррол-2-илиден)метил)-2,2'-би-1-H-пиррол (также известный как PNU-156804) и их комбинации.

[0270] В некоторых аспектах любую молекулу-миметик семейства LRRC4, нуклеиновые кислоты, векторы, клетки, белковые конъюгаты или композиции, описанные в данном документе, вводят внутривенно, перорально, парентерально, транстекально, интратекально, интрацеребровентрикулярно, интравитреально, легочно, подкожно, внутрикожно, внутримышечно или внутрижелудочно.

[0271] Следующие примеры приведены с целью иллюстрации, а не с целью ограничения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1. АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ FAM19A5 И ЧЛЕНАМИ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4

[0272] Для понимания взаимодействия между FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4, клетки НЕК293 модифицировали для экспрессии меченого FLAG члена семейства белков LRRC4, т.е. белка LRRC4C, белка LRRC4 или белка LRRC4B. Затем клетки НЕК293 или первичные кортикальные нейроны обрабатывали рекомбинантным белком FAM19A5 (1 мкМ) в течение 30 минут и связывание между белком FAM19A5 и различными членами семейства белков LRRC4 оценивали с использованием как

коиммунопреципитации, так и иммунофлуоресцентного анализа.

[0273] Для анализа коиммунопреципитации клеточные лизаты из различных обработанных FAM19A5 клеток HEK293 собирали и иммунопреципитировали с помощью антитела к FLAG, антитела к FAM19A5 (1-65) или антитела IgG человека (контроль). Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG и антитела к FAM19A5 (3-2). Для иммунофлуоресцентного анализа клетки HEK293, обработанные рекомбинантным белком FAM19A5, подвергали иммуноокрашиванию антителом к FAM19A5 (3-2) (для обнаружения экспрессии белка FAM19A5) и антителами к FLAG (для обнаружения члена семейства белков LRRC4). Первичные кортикальные нейроны, обработанные рекомбинантным белком FAM19A5, подвергали иммуноокрашиванию антителом к FAM19A5 (3-2) и антителом к LRRC4B. Ядра окрашивали Hoechst33342 (синий).

[0274] Как показано на фиг. 1A, антитело к FLAG способно коиммунопреципитировать белок FAM19A5. Аналогично, как показано на фиг. 1B, антитело к FAM19A5 (1-65) было способно специфически коиммунопреципитировать белок LRRC4B. Аналогичные результаты наблюдали при использовании иммунофлуоресцентного анализа. Как в клетках HEK293, экспрессирующих LRRC4B, так и в первичных кортикальных нейронах белок FAM19A5 был в значительной степени связан с дендритоподобными отростками или нейритами, где белок LRRC4B был высоко экспрессирован (см. фиг. 1C и 1D), что указывает на взаимодействие между членами семейства белков LRRC4 (например, LRRC4B) и белком FAM19A5.

[0275] Затем для оценки того, были ли приведенные выше результаты специфичными для определенных изоформ белка FAM19A5, клетки HEK293 котрансфицировали сДНК, кодирующей меченый FLAG белок LRRC4B, и сДНК, кодирующей либо изоформу 1, либо изоформу 2 белка FAM19A5. Затем связывание оценивали с использованием анализов иммунофлуоресценции и коиммунопреципитации.

[0276] Для иммунофлуоресцентного анализа котрансфицированные клетки HEK293 иммуноокрашивали антителом к FAM19A5 (1-65) и антителом к FLAG для определения субклеточной локализации белков FAM19A5 и LRRC4B соответственно. Ядра окрашивали Hoechst33342 (синий). Для анализа коиммунопреципитации клеточные лизаты из котрансфицированных клеток HEK293 подвергали иммунопреципитации с помощью антитела к FLAG, антитела к FAM19A5 (1-65), антитела к FAM19A5 (3-2) или антитела IgG человека (контроль). Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG и антитела к FAM19A5 (3-2).

[0277] Подобно более ранним результатам, в котрансфицированных клетках НЕК293 обе изоформы белка FAM19A5 оказались в высокой степени колокализированы с белком LRRC4B, особенно в везикулоподобных точках вблизи цитоплазматической мембраны и дендритноподобных отростках (см. фиг. 2A и 2B). Аналогично, иммунопреципитация с помощью антитела к FLAG и антитела к FAM19A5 (1-65) подтвердила взаимодействие между белком LRRC4B и обеими изоформами белка FAM19A5. Например, антитело к FLAG было способно коиммунопреципитировать как изоформу 1, так и 2 белка FAM19A5 (см. фиг. 2C). Аналогично, антитело к FAM19A5 (1-65) было способно коиммунопреципитировать белок LRRC4B (см. фиг. 2D). Интересно, что антитело к FAM19A5 (3-2) не коиммунопреципитирует белок LRRC4B. Не ограничиваясь какой-либо одной теорией, различия, наблюдаемые в отношении антител к FAM19A5 1-65 и 3-2, могут быть обусловлены их связывающими эпитопами, поскольку известно, что эти антитела связываются с различными эпитопами в белке FAM19A5. См. публикацию США № 20200299373, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0278] Приведенные выше результаты демонстрируют взаимодействие между белком FAM19A5 и различными членами семейства белков LRRC4 (например, LRRC4B). За счет ингибирования, снижения и/или диссоциации этого взаимодействия в некоторых аспектах полипептиды по настоящему изобретению могут быть применимы для регулирования биологической активности, ассоциированной с таким взаимодействием.

ПРИМЕР 2. ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА FAM19A5 БЕЛКА LRRC4B

[0279] Чтобы определить специфический мотив или домен белка LRRC4B, который отвечает за связывание с белком FAM19A5, создавали различные меченые FLAG делеционные конструкции LRRC4B (см. таблицу 6 ниже). Клетки НЕК293 трансфицировали различными делеционными конструкциями, а затем обрабатывали рекомбинантным белком FAM19A5, как описано в примере 1. Затем клеточные лизаты из различных клеток НЕК293 иммунопреципитировали антителом к FLAG. Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG и антитела к FAM19A5 (3-2).

Таблица 6. Меченые FLAG делеционные конструкции LRRC4B

№ конструкции	Описание	Аминокислотная последовательность

<p>1 «LRRC4B (36-713)»</p>	<p>Аминокислоты 36-713 SEQ ID NO: 2</p>	<p>AGGGGVAVTSAAGGGSPPATSCPVACSCSNQASR VICTRRDLAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTD FKHLRHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLEL FDNRLTTVPTQAFEYLSKLRELWLRNPNIESIPSYA FNRVPSLRRLDLGELKRLEYISEAAFEGLVNLRYL NLGMCNLKDIPNLTA LVRLEEELELSGNRLDLIRPGS FQGLTSLRKLWLMHAQVATIERNAFDDLK SLEEL NLSHNNLMSLPHDLFTPLHRLERVHLNHNPPWHCN CDVLWLSWWLKETVPSNTTCCARCHAPAGLKGR YIGELDQSHFTCYAPVIVEPPTDLNVTEGMAAELK CRTGTSMTSVNWLTPNGTLMTHGSYRVRISVLHD GTLNFTNVTVQDTGQYTCMVTNSAGNTTASATLN VSAVDPVAAGGTGSGGGGGPGGSGGVGGGSGGYT YFTTVTVETLETQPGEALQPRGTEKEPPGPTTDG VWGGGRPGDAAGPASSSTTAPAPRSSRPTEKAFTV PITDVTENALKDLDDVMKTTKIIIGCFVAITFMAAV MLVAFYKLRKQHQHLKHHGPTRTVEIINVEDELPA ASAVSVAAAAAVASGGGVGGDShLALPALERDH LNHHHYVAAAFKAHYSSNPSGGGCGGKGPPLNS IHEPLLFKSGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 52)</p>
<p>2 «LRRC4B (157-713)»</p>	<p>Аминокислоты 157-713 SEQ ID NO: 2</p>	<p>LSKLRELWLRNPNIESIPSYAFNRVPSLRRLDLGEL KRLEYISEAAFEGLVNLRYLNLGMCNLKDIPNLTA LVRLEEELELSGNRLDLIRPGSFQGLTSLRKLWLMH AQVATIERNAFDDLK SLEELNLSHNNLMSLPHDLF TPLHRLERVHLNHNPPWHCNCDVLWLSWWLKETV PSNTTCCARCHAPAGLKGRYIGELDQSHFTCYAPV IVEPPTDLNVTEGMAAELK CRTGTSMTSVNWLTP NGTLMTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDTGQ YTCMVTNSAGNTTASATLN VSAVDPVAAGGTGSG GGGPGGSGGVGGGSGGYTYFTTVTVETLETQPGE EALQPRGTEKEPPGPTTDGVWGGGRPGDAAGPAS SSTTAPAPRSSRPTEKAFTVPITDVTENALKDLDDV MKTTKIIIGCFVAITFMAAVMLVAFYKLRKQHQHL KHHGPTRTVEIINVEDELPAASAVSVAAAAAVASG GGVGGDShLALPALERDHLNHHHYVAAAFKAHY SSNPSGGGCGGKGPPLNSIHEPLLFKSGSKENVQ ETQI (SEQ ID NO: 53)</p>
<p>3 «LRRC4B (230-713)»</p>	<p>Аминокислоты 230-713 SEQ ID NO: 2</p>	<p>RLEEELELSGNRLDLIRPGSFQGLTSLRKLWLMHAQ VATIERNAFDDLK SLEELNLSHNNLMSLPHDLFTP LHRLERVHLNHNPPWHCNCDVLWLSWWLKETVPS NTTCCARCHAPAGLKGRYIGELDQSHFTCYAPVIV EPPTDLNVTEGMAAELK CRTGTSMTSVNWLTPNG TLMTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDTGQYT CMVTNSAGNTTASATLN VSAVDPVAAGGTGSGG GGPGGSGGVGGGSGGYTYFTTVTVETLETQPGE ALQPRGTEKEPPGPTTDGVWGGGRPGDAAGPASS STTAPAPRSSRPTEKAFTVPITDVTENALKDLDDV MKTTKIIIGCFVAITFMAAVMLVAFYKLRKQHQHL KHHGPTRTVEIINVEDELPAASAVSVAAAAAVASG GGVGGDShLALPALERDHLNHHHYVAAAFKAHY</p>

		SSNPSGGGCGGKGPPLNSIHEPLLFKSGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 54)
4 «LRRC4B (364- 713)»	Аминокислоты 364-713 SEQ ID NO: 2	PVIVEPPTDLNVTEGMAAELKCRGTGTSMTSVNWL TPNGTLMTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDT GQYTCMVTNSAGNTTASATLNVSAVDPVAAGGT GSGGGGPGGSGGVGGGSGGYTYFTTIVTVETLETQ PGEEALQPRGTEKEPPGPTTDGVWGGGRPGDAAG PASSSTAPAPRSSRPTEKAFTVPITDVTENALKDL DDVMKTTKIIIGCFVAITFMAAVMLVAFYKLRKQH QLHKHHGPTRTVEIINVEDELPAASAVSVA AAAAV ASGGGVGGDSHLALPALERDHLNHHHYVAAAFK AHYSSNPSGGGCGGKGPPLNSIHEPLLFKSGSKE NVQETQI (SEQ ID NO: 55)
5 «LRRC4B (453- 713)»	Аминокислоты 453-713 SEQ ID NO: 2	VSAVDPVAAGGTGSGGGGPGGSGGVGGGSGGYT YFTTIVTVETLETQPGEEALQPRGTEKEPPGPTTDG VWGGGRPGDAAGPASSSTAPAPRSSRPTEKAFTV PITDVTENALKDLDDVMKTTKIIIGCFVAITFMAAV MLVAFYKLRKQHQLHKHHGPTRTVEIINVEDELPA ASAVSVA AAAAVASGGGVGGDSHLALPALERDHL LNHHHYVAAAFKAHYSSNPSGGGCGGKGPPLNS IHEPLLFKSGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 56)
6 «LRRC4B (577- 713)»	Аминокислоты 577-713 SEQ ID NO: 2	IIIGCFVAITFMAAVMLVAFYKLRKQHQLHKHHGP TRTVEIINVEDELPAASAVSVA AAAAVASGGGVG GDSHLALPALERDHLNHHHYVAAAFKAHYSSNPS GGGCGGKGPPLNSIHEPLLFKSGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 57)
7 «LRRC4B (36-576)»	Аминокислоты 36- 576 SEQ ID NO: 2	AGGGGVAVTSAAGGGSPATSCPVACSCSNQASR VICTRRDIAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTD FKHLRHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLEL FDNRLTTVPTQAFEYLSKLRELWLRNPNIESIPSYA FNRVPSLRRLDLGELKRLEYISEAAFEGLVNLRYL NLGMCNLKDIPNLTA LVRLEEELELSGNRLDLIRPGS FQGLTSLRKLWLMHAQVATIERNAFDDLKSLEEL NLSHNNLMSLPHDLFTPLHRLERVHLNHNPWHCN CDVLWLSWWLKETVPSNTTCCARCHAPAGLKGR YIGELDQSHFTCYAPVIVEPPTDLNVTEGMAAELK CRTGTSMTSVNWLTPNGTLMTHGSYRVRISVLHD GTLNFTNVTVQDTGQYTCMVTNSAGNTTASATLN VSAVDPVAAGGTGSGGGGPGGSGGVGGGSGGYT YFTTIVTVETLETQPGEEALQPRGTEKEPPGPTTDG VWGGGRPGDAAGPASSSTAPAPRSSRPTEKAFTV PITDVTENALKDLDDVMKTTK (SEQ ID NO: 58)
8 «LRRC4B (36-363)»	Аминокислоты 36- 363 SEQ ID NO: 2	AGGGGVAVTSAAGGGSPATSCPVACSCSNQASR VICTRRDIAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTD FKHLRHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLEL FDNRLTTVPTQAFEYLSKLRELWLRNPNIESIPSYA FNRVPSLRRLDLGELKRLEYISEAAFEGLVNLRYL NLGMCNLKDIPNLTA LVRLEEELELSGNRLDLIRPGS FQGLTSLRKLWLMHAQVATIERNAFDDLKSLEEL NLSHNNLMSLPHDLFTPLHRLERVHLNHNPWHCN

		CDVLWLSWWLKETVPSNTTCCARCHAPAGLKGR YIGELDQSHFTCYA (SEQ ID NO: 59)
9 «LRRC4B (Δ364- 576)»	Аминокислоты Δ364-576 SEQ ID NO: 2	AGGGGVAVTS AAGGGSPATSCP VACSCSNQASR VICTRRDLAEVPASIPVNTRYLNLQENGIQVIRTD FKHLRHLEILQLSKNLVRKIEVGAFNGLPSLNTLEL FDNRLTTVPTQAFEYLSKLRELWLRNPIESIPSYA FNRVPSLRRLDLGELKRLEYISEAAFEGLVNLRYL NLGMCNLKDIPNL TALVRLEEELELSGNRLDLIRPGS FQGLTSLRKLWLMHAQVATIERNAFDDLK SLEEL NLSHNNLMSLPHDLFTPLHRLERVHLNHNPPWHCN CDVLWLSWWLKETVPSNTTCCARCHAPAGLKGR YIGELDQSHFTCYAIIIGCFVAITFMAAVMLVAFYK LRKQHQLKHHGPTRTVEIINVEDELPAASAVSVA AAA AVASGGGVGGDSHLALPALERDHLNHHHYV AAAFKAHYSSNPSGGGCGGKGPPLNSIHEPLLFK SGSKENVQETQI (SEQ ID NO: 60)
10 «LRRC4B (364- 576)»	Аминокислоты 364-576 SEQ ID NO: 2	PVIVEPPTDLNVTEGMAAELKCRGTGTSMTSVNWL TPNGTLMTHGSYRVRISVLHDGTLNFTNVTVQDT GQYTCMVTNSAGNTTASATLNVSAVDPVAAGGT GSGGGGPGGSGGVGGGSGGTYFTT VTVETLETQ PGEEALQPRGTEKEPPGPTTDGVWGGGRPGDAAG PASSSTTAPAPRSSRPTEKAFTVPITDVTENALKDL DDVMKTTK (SEQ ID NO: 61)
11 «LRRC4B (453- 576)»	Аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2	VSAVDPVAAGGTGSGGGGPGGSGGVGGGSGGTY YFTT VTVETLETQPGEEALQPRGTEKEPPGPTTDG VWGGGRPGDAAGPASSSTTAPAPRSSRPTEKAFTV PITDVTENALKDLDDVMKTTK (SEQ ID NO: 62)
12 «LRRC4B (484- 576)»	Аминокислоты 484-576 SEQ ID NO: 2	YTYFTT VTVETLETQPGEEALQPRGTEKEPPGPTTD GVWGGGRPGDAAGPASSSTTAPAPRSSRPTEKAFT VPITDVTENALKDLDDVMKTTK (SEQ ID NO: 63)
13 «LRRC4B (498- 576)»	Аминокислоты 498-576 SEQ ID NO: 2	QPGEEALQPRGTEKEPPGPTTDGVWGGGRPGDAA GPASSSTTAPAPRSSRPTEKAFTVPITDVTENALKD LDDVMKTTK (SEQ ID NO: 64)

[0280] Как показано на фиг. 3А и 3В, все делеционные конструкции, содержащие богатый треонином домен белка LRRC4B («Thr» на фиг. 3А), были способны связываться с белком FAM19A5 в различной степени. Эти конструкции включали: LRRC4B (36-713) (т.е. конструкцию №1); LRRC4B (157-713) (т.е. конструкцию №2); LRRC4B (230-713) (т.е. конструкцию №3); LRRC4B (364-713) (т.е. конструкцию №4); LRRC4B (453-713) (т.е. конструкцию №5); LRRC4B (36-576) (т.е. конструкцию №7); LRRC4B (364-576) (т.е.

конструкцию №10); LRRC4B (453-576) (т.е. конструкцию 11); и LRRC4B (484-576) (т.е. конструкцию №12). В частности, аминокислотная последовательность в положениях 484-497 белка LRRC4B, по-видимому, играет важную роль в связывании, поскольку делеционная конструкция, содержащая аминокислоты 484-576 (т.е. конструкция №12), была способна связываться с белком FAM19A5, тогда как делеционная конструкция, содержащая аминокислоты 498-576 (т.е. конструкция № 13), не могла осуществлять это (см. фиг. 3А и 3В).

[0281] Затем, чтобы подтвердить вышеуказанные результаты коиммунопреципитации, использовали анализ ELISA для измерения связывания белка FAM19A5 либо с полноразмерным эктодоменом членов семейства белков LRRC4, либо с различными фрагментами белка эктодомена LRRC4B. В частности, планшет для ELISA был покрыт одним из следующих белков-эктодоменов LRRC4B, который был конъюгирован с Fc человека (100 нМ/лунка): (1) полноразмерный эктодомен белка LRRC4 (аминокислотные остатки 39-527 SEQ ID NO: 1) (SEQ ID NO: 4); (2) полноразмерный эктодомен белка LRRC4B (аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2; т.е. конструкция №7 в таблице 6) (SEQ ID NO: 5); (3) полноразмерный эктодомен белка LRRC4C (аминокислоты 45-527 SEQ ID NO: 3) (SEQ ID NO: 6); (4) фрагмент эктодомена LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; т.е. конструкция № 11 в таблице 6) (SEQ ID NO: 7); (5) фрагмент эктодомена LRRC4B (аминокислоты 484-576 SEQ ID NO: 2; т.е. конструкция № 12 в таблице 6) (SEQ ID NO: 8); (6) фрагмент эктодомена LRRC4B (аминокислоты 482-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 9); (7) фрагмент эктодомена LRRC4B (аминокислоты 482-497 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 10); и (8) фрагмент эктодомена LRRC4B (аминокислоты 498-576 SEQ ID NO: 2; т.е. конструкция № 13 в таблице 6) (SEQ ID NO: 11). Затем в соответствующие лунки добавляли рекомбинантные белки FAM19A5 (0,005, 0,01, 0,025, 0,05, 0,1, 0,25, 0,5, 1, 2,5, 5 и 10 нМ) и планшеты инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После этого количество белка FAM19A5, связанного с LRRC4B, определяли с использованием конъюгированного с HRP антитела к FAM19A5 (1-65).

[0282] Как показано на фиг. 4А, полноразмерный эктодомен всех членов семейства белков LRRC4 (т.е. белков LRRC4, LRRC4B и LRRC4C) способен в различной степени обнаруживать белок FAM19A5. Полноразмерные эктодомены белков LRRC4 и LRRC4B, связывались с белком FAM19A5, с EC50 0,48 нМ и 0,64 нМ соответственно. Никакого насыщения связывания не наблюдалось для полноразмерного белка LRRC4C при концентрации FAM19A5 10 нМ. И, в соответствии с анализом коиммунопреципитации, фрагменты эктодоменного белка LRRC4B, содержащие последовательность в положениях

484-497 SEQ ID NO: 2, имели значительную аффинность к FAM19A5, тогда как фрагмент белка эктодомена, у которого отсутствовала эта последовательность (т.е. LRRC4B(498-576)) не смог связаться с FAM19A5 (см. фиг. 4B).

[0283] В качестве дополнительного подтверждения конструировали три синтетических полипептида, содержащие аминокислоты 484-497 SEQ ID NO: 2 (т.е. YTYFTTVTVETLET; SEQ ID NO: 65): (1) FB-16 (GYTYFTTVTVETLETQ; SEQ ID NO: 17), (2) FB-20 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE; SEQ ID NO: 18) и (3) FB-28 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEKPPGPTTD; SEQ ID NO: 19). Пептиды различались по общей длине. Способность этих полипептидов связываться с рекомбинантным белком FAM19A5 оценивали с помощью анализа ELISA, как описано выше. Как видно на фиг. 6B, каждый из FB-16, FB-20 и FB-28 был способен связываться с рекомбинантным белком FAM19A5 с высокой аффинностью, подобно фрагментам белка эктодомена LRRC4B, которые содержали аминокислоты 484-497 SEQ ID NO: 2 (т.е., SEQ ID NO: 65).

[0284] В совокупности приведенные выше результаты предполагают важность аминокислотной последовательности в положениях 484-497 и, в частности, положениях 484-493 (т.е. YTYFTTVTVE; SEQ ID NO: 29) белка LRRC4B (т.е. SEQ ID NO: 65) при связывании с белком FAM19A5 (также обозначаемым в данном документе «FAM19A5-связывающим доменом»). Как показано на фиг. 20, эта последовательность обычно эволюционно консервативна в семействе белков LRRC4 среди различных позвоночных.

ПРИМЕР 3. ИДЕНТИФИКАЦИЯ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА FAM19A5 ДРУГИХ ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4

[0285] Как описано в примере 2, все члены семейства белков LRRC4 были способны в различной степени связываться с белком FAM19A5. Поэтому для сравнения доменов связывания аминокислотные последовательности белков LRRC4B, LRRC4 и LRRC4C выравнивали. Как показано на фиг. 5A, сравнение аминокислотной последовательности в положениях 484-522 LRRC4B с последовательностями в соответствующих положениях белков LRRC4 и LRRC4C показало большое сходство. Таким образом, чтобы оценить, важны ли соответствующие положения LRRC4 и LRRC4C для связывания этих белков с белком FAM19A5, конструировали сДНК, кодирующие либо (i) фрагмент белка LRRC4C (аминокислоты 354-527 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 66), либо (ii) фрагмент белка LRRC4 (аминокислоты 353-527 SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 67) (см. таблицу 7). Клетки HEK293 трансфицировали для экспрессии любого из белковых фрагментов, а затем обрабатывали рекомбинантным белком FAM19A5, как описано в примере 1. Затем клеточные лизаты из различных клеток HEK293 иммунопреципитировали антителом к FLAG.

Иммунопреципитированные белки подвергали иммуноблоттингу с помощью антитела к FLAG и антитела к FAM19A5 (3-2).

Таблица 7. Фрагменты белков LRRC4C и LRRC4

Конструкция	Описание	Аминокислотная последовательность
«LRRC4C (354-527)»	Аминокислоты 354-527 SEQ ID NO: 3	VIVEPPADLNVTEGMAAELKCRASLTSVSWITP NGTVMTHGAYKVRIAVLSDGTLNFTNVTVQDTG MYTCMVNSVGNNTASATLNVTAATTPFSYFST VTVETMEPSQDEARTTDNNVGTPVVDWETTNTV TTSLTPQSTRSTEKFTTIPVTDINSGIPGIDEVMKTT K (SEQ ID NO: 66)
«LRRC4 (353-527)»	Аминокислоты 353-527 SEQ ID NO: 1	PFIMDAPRDLNISEGRMAELKCRTPPMSSVKWLL PNGTVLSHASRHRPRISVLNDGTLNFSHVLLSDTGV YTCMVNTNVAGNSNASAYLNVSTAELNTSNYSFFT TVT VETTEISPEDTTRKYKPVPTTSTGYQPA YTTST TVLIQTTRVPKQVAVPATDTTDKMQTSLDEVMKTT TK (SEQ ID NO: 67)

[0286] Как показано на фиг. 5B, как пептидные фрагменты LRRC4C, так и LRRC4 были способны связываться с белком FAM19A5. Этот результат подчеркивает сходство связывающих доменов разных членов семейства LRRC4.

ПРИМЕР 4. АНАЛИЗ РОЛИ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА В ИНГИБИРОВАНИИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ БЕЛКА FAM19A5 И LRRC4B

[0287] Поскольку фрагменты белка LRRC4B, содержащие связывающий домен, описанный в примере 2 (например, LRRC4B (453-576); т.е. конструкция № 11 в таблице 6), были способны связываться с белком FAM19A5 с высокой аффинностью, затем оценивали, могут ли такие белковые фрагменты конкурировать с существующим в природе белком LRRC4B за связывание с белком FAM19A5 и тем самым диссоциировать комплекс семейства белков FAM19A5-LRRC4. Вкратце, клетки HEK293, экспрессирующие как изоформу 2 FAM19A5, так и белок LRRC4B, обрабатывали белковыми фрагментами *in vitro* в течение 30 минут либо LRRC4B (453-576)-hFc, либо мутантным LRRC4B (453-576)-hFc (включает замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 16). Затем клетки подвергали иммуноокрашиванию антителом к FAM19A5 (1-65) и антителом к LRRC4B для определения экспрессии белков FAM19A5 и полноразмерных белков LRRC4B соответственно. Фрагменты белка LRRC4B, слитые с hFc, определяли с использованием антитела к hIgG. Ядра окрашивали Hoechst 33342.

[0288] Как наблюдалось ранее (см. Фиг. 2A и 2B), когда белок FAM19A5 связывался с полноразмерным белком LRRC4B, комплекс был значительно колокализован, особенно в

цитоплазматической мембране и дендритноподобных отростках. В клетках, обработанных LRRC4B (453-576)-hFc, FAM19A5 в значительной степени диссоциировал от полноразмерного белка LRRC4B (см. фиг. 7, нижний ряд). В отличие от этого, в клетках HEK293, обработанных мутантным LRRC4B (453-576)-hFc, белок FAM19A5 оставался в значительной степени связанным с полноразмерным белком LRRC4B, что указывает на важность связывающего домена семейства FAM19A5, идентифицированного в примере 2.

[0289] Затем, чтобы дополнительно оценить роль, которую связывающий домен белка LRRC4B играет во взаимодействии между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4, использовали анализ конкурентного ингибирования, чтобы определить, могут ли различные делеционные конструкции LRRC4B из примера 2 ингибировать связывание FAM19A5 с полноразмерным эктодоменом белка LRRC4B (т.е. аминокислотами 36-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 5). Вкратце, для покрытия планшета использовали 100 нМ полноразмерного эктодомена белка LRRC4B, а затем к планшету добавляли рекомбинантный белок FAM19A5 (5 нг/мл) в комбинации со следующими делеционными конструкциями LRRC4B (возрастающие концентрации): (1) LRRC4B (453-576) (т.е. конструкция № 11 в таблице 6); (2) мутант LRRC4B (453-576) (содержит замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 16); (3) LRRC4B (484-576) (т.е. конструкция №12 в таблице 6); (4) LRRC4B (482-576); (5) LRRC4B (482-497); и (6) LRRC4B (498-576). Планшеты инкубировали при 37°C, а затем измеряли количество FAM19A5, связанного с покрытым белком эктодомена LRRC4B, с использованием конъюгированного с HRP антитела к FAM19A5 (1-65).

[0290] Как показано на фиг. 8A, LRRC4B (453-576) был способен ингибировать связывание белка FAM19A5 с покрытым полноразмерным белком эктодомена LRRC4B. Другие фрагменты белка LRRC4B, содержащие аминокислотные остатки 484-497 SEQ ID NO: 2 (т.е. связывающий домен белка LRRC4B; SEQ ID NO: 65), также были способны ингибировать взаимодействие между FAM19A5 и полноразмерным белком эктодомена LRRC4B. – см. LRRC4B (484-576), LRRC4B (482-576) и LRRC4B (482-497). Аналогичные результаты наблюдали с синтетическими пептидами FB-16, FB-20 и FB-28 (см. фиг. 8B). В отличие от этого, фрагменты белка LRRC4B, лишённые аминокислотных остатков 484-497 SEQ ID NO: 2, значительно уступали по своей способности ингибировать взаимодействие – см. мутант LRRC4B и LRRC4B (498-576) (см. фиг. 8A).

[0291] В совокупности приведенные выше результаты демонстрируют, что пептидные фрагменты (например, синтетические), содержащие связывающий домен белка LRRC4B, могут быть применимы для подавления образования белкового комплекса

FAM19A5-LRRC4B.

ПРИМЕР 5. АНАЛИЗ РОЛИ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА LRRC4 В ИНГИБИРОВАНИИ ОБРАЗОВАНИЯ БЕЛКОВОГО КОМПЛЕКСА СЕМЕЙСТВА FAM19A5-LRRC4

[0292] Как описано в примере 3, оказалось, что связывающие домены разных членов семейства LRRC4 имеют большое сходство. Поэтому, чтобы оценить, могут ли полипептиды, содержащие LRRC4B-связывающий домен, также ингибировать связывание других членов семейства белков LRRC4 с белком FAM19A5, планшеты для ELISA покрывали одним из следующих белков (100 нМ/лунка): (1) полноразмерный эктодомен белка LRRC4 (аминокислотные остатки 39-527 SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 4); (2) полноразмерный эктодомен белка LRRC4B (аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2; т.е. конструкция №7 в таблице 6; SEQ ID NO: 5); и (3) полноразмерный эктодомен белка LRRC4C (аминокислоты 45-527 SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 6). Затем добавляли рекомбинантный белок FAM19A5 (5 нг/мл) в комбинации с одним из следующих компонентов: (i) фрагментом белка LRRC4B (484-576), (ii) фрагментом белка LRRC4B (453-576, AA) и (iii) синтетическим пептидом FB-20. Планшеты инкубировали при 37°C, а затем измеряли количество белка FAM19A5, связанного с покрытыми белками LRRC4, LRRC4B или LRRC4C, с использованием антитела к FAM19A5 (1-65).

[0293] Как показано на фиг. 9A, 9B и 9C, как фрагмент белка LRRC4B (484-576), так и синтетический пептид FB-20 были способны ингибировать связывание белка FAM19A5 с покрытыми белками LRRC4 и LRRC4C. И, в соответствии с более ранними данными, фрагмент LRRC4B с заменами аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2, т.е. мутант LRRC4B (SEQ ID NO: 16), имел минимальный эффект.

[0294] Затем, чтобы оценить, могут ли полипептиды, содержащие связывающие домены белков LRRC4 или LRRC4C, оказывать сходное ингибирующее действие на связывание белка LRRC4B, конструировали следующие синтетические пептиды: (1) FBC4-23 (содержит связывающий домен белка LRRC4, т.е., YSFFTTVTVETTE); и (2) FBC4C-23 (содержит связывающий домен белка LRRC4C, т.е. FSYFSTVTVETME). Затем способность пептидов ингибировать связывание членов семейства белков LRRC4 с белком FAM19A5 оценивали с использованием анализа конкурентного ингибирования. Вкратце, планшеты покрывали 100 нМ либо фрагмента белка LRRC4B № 1 (аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 5), либо фрагмента белка LRRC4B № 2 (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7). Затем к планшетам добавляли рекомбинантный белок FAM19A5 (5 нг/мл для планшетов, покрытых фрагментом LRRC4B №1; и 1 нг/мл для планшетов, покрытых

фрагментом LRRC4B №2) в комбинации с 20 нМ пептидов FBC4-23, FBC4C-23 и FB-20. Планшеты инкубировали при 37°C, а затем оценивали количество белка FAM19A5, связанного с покрытыми фрагментами белка LRRC4B, с использованием конъюгированного с HRP антитела к FAM19A5 (1-65).

[0295] Как показано на фиг. 10А и 10В; и в таблице 8 (ниже), все три пептида (т.е. FB-20, FBC4-23 и FBC4C-23) значительно уменьшали взаимодействие между белком FAM19A5 и покрытыми фрагментами белка LRRC4B.

Таблица 8.

Пептид	Частота ингибирования (%)	
	LRRC4B (аминокислоты 36-576)-hFc	LRRC4B (аминокислоты 453-576)-hFc
FB-20	77,0	63,2
FBC4-23	64,1	40,4
FBC4C-23	65,7	40,4

[0296] В совокупности приведенные выше результаты демонстрируют, что пептиды, содержащие FAM19A5-связывающий домен любого члена семейства белков LRRC4, могут ингибировать взаимодействие между белками FAM19A5 и LRRC4B, и, таким образом, еще раз подчеркивают консервативную природу FAM19A5-связывающего домена членов семейства белков LRRC4.

ПРИМЕР 6. ИДЕНТИФИКАЦИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА, НЕОБХОДИМОЙ ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ БЕЛКОМ FAM19A5 И ЧЛЕНАМИ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4

[0297] Затем, чтобы определить минимальную последовательность, необходимую для ингибирования взаимодействия FAM19A5 и членов семейства белков LRRC4, конструировали десять вариантов пептида FB-20 с помощью последовательной делеции одной или более аминокислот с N-конца или C-конца пептида FB-20. См. таблицу 9. Затем использовали анализ конкурентного ингибирования для оценки способности различных вариантов пептида FB-20 ингибировать взаимодействие между FAM19A5 и белком LRRC4B. Планшеты снова покрывали 100 нМ любого фрагмента белка № 1 LRRC4B (аминокислоты 36-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 5) или фрагмента белка LRRC4B №2 (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7). Затем к планшетам добавляли рекомбинантный белок FAM19A5 (5 нг/мл для планшетов, покрытых фрагментом LRRC4B

№ 1; и 1 нг/мл для планшетов, покрытых фрагментом LRRC4B № 2) в комбинации с 20 нМ различных пептидов, описанных выше. После инкубации планшетов при 37°C количество белка FAM19A5, связанного с покрытыми фрагментами белка LRRC4B, оценивали с использованием конъюгированного с HRP антитела к FAM19A5 (1-65).

[0298] Как показано на фиг. 11А и 11В; и в таблице 9 пептидные фрагменты, содержащие первые десять аминокислот связывающего домена белка LRRC4B (т.е. YTYFTTVTVE; SEQ ID NO: 29), существенно ингибируют взаимодействие между FAM19A5 и покрытыми фрагментами белка LRRC4B (см. «FB-m11dC» и «FB-m10dC»). В отличие от этого, пептидные фрагменты, в которых отсутствует одна или более аминокислот в положениях 1-10 связывающего домена белка LRRC4B, не способны значительно ингибировать взаимодействие белков FAM19A5-LRRC4B (см. «FB-m10dC», «FB-m9dC», «FB-m8dC», «FB-m7dC», «FB-m6dC», «FB-m10dN», «FB-m9dN», «FB-m8dN» и «FB-m7dN»).

Таблица 9.

Пептид	Аминокислотная последовательность	Частота ингибирования (%)	
		LRRC4B (аминокислоты 36-576)-hFc	LRRC4B (аминокислоты 453-576)-hFc
FB-20	GYTYFTTVTVETLETQPGE (SEQ ID NO: 18)	84,3	62,0
FB-m11dC	KNYTYFTTVTVETNKETQ (SEQ ID NO: 68)	65,0	30,4
FB-m10dC	KNYTYFTTVTVENKETQ (SEQ ID NO: 69)	62,0	21,9
FB-m9dC	KNYTYFTTVTVNKETQ (SEQ ID NO: 70)	16,8	2,7
FB-m8dC	KNYTYFTTVTVNKETQ (SEQ ID NO: 71)	5,1	-0,9
FB-m7dC	KNYTYFTTVTVNKETQ (SEQ ID NO: 72)	4,4	0,4
FB-m6dC	KNYTYFTTVNKETQ (SEQ ID NO: 73)	14,9	5,5

FB-m10dN	KN TYFTTVTV ETNKETQ (SEQ ID NO: 74)	7,7	0,0
FB-m9dN	KN YFTTVTV ETNKETQ (SEQ ID NO: 75)	2,5	-1,6
FB-m8dN	KN FTTVTV ETNKETQ (SEQ ID NO: 76)	3,3	-1,1
FB-m7dN	KN TTVTV ETNKETQ (SEQ ID NO: 77)	2,0	-1,8

[0299] Приведенные выше результаты свидетельствуют о важности по меньшей мере первых десяти аминокислот FAM19A5-связывающего домена членов семейства белков LRRC4 в ингибировании, снижении и/или диссоциации взаимодействия между членами семейства белков LRRC4 и белком FAM19A5.

ПРИМЕР 7. ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВАЖНЫХ ОСТАТКОВ СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА ДЛЯ ИНГИБИРОВАНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ЧЛЕНАМИ СЕМЕЙСТВА БЕЛКА LRRC4 И БЕЛКОМ FAM19A5

[0300] Для идентификации критических аминокислотных остатков конструировали многочисленные мутанты пептида FB-20, в которых отдельные остатки основного связывающего домена (т.е. YTYFTTVTVETLE; SEQ ID NO: 15) заменяли аланином (A) или аспарагином (N). См. таблицу 10. Затем оценивали способность этих мутантов пептида FB-20 ингибировать взаимодействие между белками LRRC4B и FAM19A5, как описано в примерах 3 и 4.

[0301] Как показано на фиг. 12A и 12B; и в таблице 10, мутанты пептида FB-20 с заменами аланина или аспарагина в положениях 5, 11, 12 и 13 основного связывающего домена все еще были способны значительно ингибировать взаимодействие между белками FAM19A5 и LRRC4B. В отличие от этого, замены аланина или аспарагина в положениях 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9 и 10 приводили к заметному снижению способности пептида ингибировать связывание белка LRRC4B с FAM19A5, что указывает на важность этих положений аминокислот в основном связывающем домене при ингибировании, снижении и/или диссоциации взаимодействия между FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4.

Таблица 10.

Пептид	Аминокислотная последовательность	Частота ингибирования (%)
--------	-----------------------------------	---------------------------

		LRRC4B (аминокислоты 36-576)-hFc	LRRC4B (аминокислоты 453-576)-hFc
FB-20	<i>GYTYFTTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 18)	77,0	63,2
FB-20[A1]	<i>GATYFTTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 78)	17,2	3,6
FB-20[A2]	<i>GYAYFTTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 79)	1,0	-0,4
FB-20[A3]	<i>GYTAFITTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 80)	5,9	0,0
FB-20[A4]	<i>GYTYATTTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 81)	2,7	1,5
FB-20[A5]	<i>GYTYFATVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 82)	53,4	22,2
FB-20[A6]	<i>GYTYFTAIVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 83)	17,9	11,0
FB-20[A7]	<i>GYTYFTTATVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 84)	26,8	7,9
FB-20[A8]	<i>GYTYFTTVAVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 85)	3,9	-0,4
FB-20[A9]	<i>GYTYFTTVTAETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 86)	21,5	3,8
FB-20[A10]	<i>GYTYFTTVVAITLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 87)	19,6	6,4
FB-20[A11]	<i>GYTYFTTVTVEALETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 88)	73,4	50,3
FB-20[A12]	<i>GYTYFTTVTVETAETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 89)	73,0	56,2
FB-20[A13]	<i>GYTYFTTVTVETLATQPGEE</i> (SEQ ID NO: 90)	51,4	27,2
FB-20[N1]	<i>GNTYFTTVTVETLETQPGEE</i> (SEQ ID NO: 91)	11,9	3,1

FB-20[N2]	GYNYFTTVTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 92)	-0,7	-2,0
FB-20[N3]	GYTNFTTVTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 93)	-5,0	4,0
FB-20[N4]	GYTYNTTVTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 94)	-1,3	2,5
FB-20[N5]	GYTYFNTVTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 95)	56,1	30,5
FB-20[N6]	GYTYFTNVTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 96)	-11,4	-0,4
FB-20[N7]	GYTYFTTNTVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 97)	24,5	8,3
FB-20[N8]	GYTYFTTVNVETLETQPGEE (SEQ ID NO: 98)	2,9	-2,4
FB-20[N9]	GYTYFTTVTNETLETQPGEE (SEQ ID NO: 99)	17,5	6,5
FB-20[N10]	GYTYFTTVTVNTLETQPGEE (SEQ ID NO: 100)	27,0	10,8
FB-20[N11]	GYTYFTTVTVENLETQPGEE (SEQ ID NO: 101)	74,1	55,6

ПРИМЕР 8. АНАЛИЗ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4

[0302] Чтобы оценить терапевтический потенциал полипептидов, описанных в данном документе, уровни транскриптов *FAM19A5*, *LRRC4B* и *PTPRF* (постсинаптический партнер LRRC4B) оценивали в первичных нейронах гиппокампа (полученных из головного мозга мыши в день 1 постнатального периода) в различные временные точки после культивирования с помощью РНК-секвенирования. Как показано на фиг. 13А, даже уже в день 1 после культивирования уровень транскрипта *FAM19A5* был значимо выше по сравнению с другими членами семейства *FAM19* и оставался высоким вплоть до дня 15 после культивирования. Как показано на фиг. 13В, первичные нейроны гиппокампа также экспрессировали высокие уровни транскриптов как *LRRC4B*, так и *PTPRF*, которые также сохранялись по меньшей мере до 15 дня после культивирования. Высокий уровень экспрессии этих генов в первичных нейронах позволяет предположить их важность в

различных аспектах нейрогенеза.

[0303] Затем первичные кортикальные нейроны (день 1 постнатального периода) культивировали *in vitro* с различными концентрациями (от 0,006 до 60 нМ) фрагмента белка LRRC4B (453-576) (т.е. аминокислотными остатками 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7), а затем в день 3 после первоначального культивирования оценивали влияние на удлинение нейритов путем иммуноокрашивания клеток антителом к бета-тубулину III. В качестве контроля использовали клетки, культивированные с DMSO («нес. среда»).

[0304] Как показано на фиг. 14A, 14B, 14C и 14D, первичные кортикальные нейроны, обработанные фрагментом белка LRRC4B (453-576), демонстрировали повышенное удлинение нейритов дозозависимым образом. По сравнению с контрольной группой, нейроны, обработанные фрагментом белка LRRC4B, имели повышенную длину нейритов (фиг. 14A), повышенное количество первичных и вторичных нейритов (фиг. 14B и 14D соответственно) и повышенное количество точек ветвления (фиг. 14C). Повышенное удлинение нейритов наблюдали также при использовании пептидов FB-16, FB-20 и FB-28 вместо фрагмента белка LRRC4B (453-576) (см. фиг. 18A, 18B, 18C, 18D и 18E). Среди пептидов FB-16, FB-20 и FB-28 все они, по-видимому, оказывали одинаковое положительное влияние на удлинение нейритов.

[0305] Далее, общеизвестно, что нейриты, которые удлиняются из других нейритов, способны дифференцироваться в аксоны, образуя пресинапсы. Другие нейриты остаются второстепенными нейритами и дифференцируются в дендриты, образуя постсинапсы. Таким образом, также оценивалось, может ли фрагмент белка LRRC4B (453-576) влиять на образование пре- и постсинапсов. Вкратце, первичные нейроны гиппокампа мыши культивировали *in vitro* с фрагментом белка LRRC4B (453-576) (6 или 60 нМ). Контрольные клетки обрабатывали либо DMSO («нес. среда»), либо мутантным фрагментом белка LRRC4B (453-576), который не способен связываться с белком FAM19A5 (включает замены аланина в положениях 488 и 489). Затем, в дни 3 и 6 после первоначального культивирования, оценивали уровень экспрессии синаптофизина (SYP; пресинаптический маркер). В день 7 после первоначального культивирования оценивали уровень экспрессии постсинаптической плотности 95 (PSD95; постсинаптический маркер).

[0306] Как показано на фиг. 15A и 15B, фрагмент белка LRRC4B (453-576) (в обеих концентрациях) повышал экспрессию как SYP, так и PSD95 в нейронах, подтверждая, что наблюдаемое повышенное удлинение нейритов может приводить к повышенному образованию синапсов. В поддержку, как показано на фиг. 15C, в первичных нейронах гиппокампа мыши, обработанных пептидом, наблюдали повышение количества точек,

меченых совместно SYP и PSD95, что указывает на слияние пресинапсов и постсинапсов. Как показано на фиг. 19А, 19В и 19С, аналогичные результаты наблюдались для пептидов FB-16, FB-20 и FB-28 (60 нМ для каждого пептида).

[0307] Кроме того, для подтверждения вышеуказанного эффекта на удлинение нейритов *in vivo* использовали мышей APP/PS1 (мышинная модель болезни Альцгеймера). У мышей APP/PS1 наблюдается потеря синапсов в СА1 гиппокампа через 4 месяца после рождения, о чем свидетельствует 50% снижение количества точек, совместно меченых пре- и постсинаптическими маркерами, такими как SYP и PSD95 соответственно. Hong *et al.*, *Science* 352(6286): 712-716 (May 2016). Эти синаптические потери и потеря нейронов, вероятно, ассоциированы с нарушениями пространственного обучения и способности памяти. Yoshiyama *et al.*, *Neuron* 53: 337-351 (2007). СА1 в гиппокампе является основным пунктом входных сигналов от ЕС в гиппокамп. Информация из ЕС достигает СА1 двумя основными путями. Один из них представляет собой прямой перфорантный путь от ЕС к СА1, а другой представляет собой непрямой путь с использованием трисинаптической цепи от ЕС к зубчатой извилине (1-й синапс) к СА3 (2-й синапс) и к СА1 (3-й синапс). Поэтому исследовали, оказывает ли введение фрагмента белка LRRC4В (453-576) (содержит FAM19А5-связывающий домен белка LRRC4В) какой-либо эффект на синаптические связи в гиппокампе, в частности, в областях СА1 и СА3. Вкратце, мышей APP/PS1 обрабатывали (i) фрагментом белка LRRC4В дикого типа (аминокислотные остатки 453-576 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 7) или (ii) мутантным фрагментом белка LRRC4В (т.е. содержащим замены аланина в положениях 488 и 489 SEQ ID NO: 2) (SEQ ID NO: 16).

[0308] Как показано на фиг. 16А-16С и 17А-17С, по сравнению с мышами APP/PS1, обработанными мутантным фрагментом белка LRRC4В, мыши APP/PS1, обработанные фрагментом белка LRRC4В дикого типа, демонстрировали повышенную иммунореактивность SYP и PSD95 в СА1 и СА3 мышей. Уровни были аналогичны тем, которые наблюдали у необработанных нормальных животных («контр.»).

[0309] В совокупности приведенные выше результаты демонстрируют, что любые пептиды, содержащие основной связывающий домен членов семейства белков LRRC4, могут служить рецептором-ловушкой для FAM19А5 и тем самым предупреждать ингибирующий эффект белка FAM19А5 на активность (например, стимулируя рост нейритов и образование синапсов) членов семейства белков LRRC4.

ПРИМЕР 9. СКАНИРОВАНИЕ *IN SILICO* ОСТАТКОВ КОМПЛЕКСА СЕМЕЙСТВА FAM19А5-LRRC4 С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПЛАТФОРМЫ ШРЕДИНГЕРА

[0310] Для дальнейшей характеристики остатков, которые играют роль во

взаимодействии между белком FAM19A5 и членами семейства LRRC4, был использован SCHRODINGER BIOLUMINATE® для проведения аланинового сканирования *in silico* каждого отдельного неаланинового остатка комплекса членов семейства FAM19A5-LRRC4, и было определено, что изменение свободной энергии Гиббса отражает аффинность связывания для каждого из аминокислотных остатков. В частности, все неаланиновые остатки FB-20 (т.е. GYTYFTTVTVETLETQPGEE; SEQ ID NO: 18), который представляет собой фрагмент белка LRRC4B и содержит FAM19A5-связывающий домен, мутировали в аланин. Последовательности различных вариантов пептида FB-20 представлены в таблице 11 (ниже).

Таблица 11. Белковые последовательности варианта пептида FB-20

Пептид	Аминокислотная последовательность
FB-20 (G1A) (SEQ ID NO: 103)	AYTYFTTVTVETLETQPGEE
FB-20 (Y2A) (SEQ ID NO: 78)	GATYFTTVTVETLETQPGEE
FB-20 (T3A) (SEQ ID NO: 79)	GYAYFTTVTVETLETQPGEE
FB-20 (Y4A) (SEQ ID NO: 80)	GYTAFSTTVTVETLETQPGEE
FB-20 (F5A) (SEQ ID NO: 81)	GYTYATTTVTVETLETQPGEE
FB-20 (T6A) (SEQ ID NO: 82)	GYTYFATVTVETLETQPGEE
FB-20 (T7A) (SEQ ID NO: 83)	GYTYFTAFTVTVETLETQPGEE
FB-20 (V8A) (SEQ ID NO: 84)	GYTYFTTATVTVETLETQPGEE
FB-20 (T9A) (SEQ ID NO: 85)	GYTYFTTVAVETLETQPGEE
FB-20 (V10A) (SEQ ID NO: 86)	GYTYFTTVTAETLETQPGEE
FB-20 (E11A) (SEQ ID NO: 87)	GYTYFTTVTVATLETQPGEE
FB-20 (T12A) (SEQ ID NO: 88)	GYTYFTTVTVEALETQPGEE
FB-20 (L13A) (SEQ ID NO: 89)	GYTYFTTVTVETAETQPGEE
FB-20 (E14A) (SEQ ID NO: 90)	GYTYFTTVTVETLATQPGEE
FB-20 (T15A) (SEQ ID NO: 117)	GYTYFTTVTVETLEAQPGE
FB-20 (Q16A) (SEQ ID NO: 118)	GYTYFTTVTVETLETAPGEE
FB-20 (P17A) (SEQ ID NO: 119)	GYTYFTTVTVETLETQAGEE
FB-20 (G18A) (SEQ ID NO: 120)	GYTYFTTVTVETLETQPAEE
FB-20 (E19A) (SEQ ID NO: 121)	GYTYFTTVTVETLETQPGAEE
FB-20 (E20A) (SEQ ID NO: 122)	GYTYFTTVTVETLETQPGAEE

[0311] Как показано на фиг. 21A (и в соответствии с более ранними данными – см., например, пример 7), определенные специфические остатки пептидного фрагмента FB-20

(например, от остатков Y2 до E11), по-видимому, играют важную роль во взаимодействии между белком FAM19A5 и LRRC4B, поскольку при введении мутации аланина в этих остатках происходило значительное повышение изменения свободной энергии. Аналогичным образом, определенные остатки (например, остатки T12 и L13), по-видимому, играют минимальную роль, поскольку замена аланина в этих остатках не значительно изменяет аффинность связывания белок-пептид.

[0312] Затем, чтобы оценить, можно ли улучшить аффинность связывания пептидных фрагментов FB-20, остатки T12 и L13 (которые, по-видимому, играли минимальную роль во взаимодействии между белком FAM19A5 и LRRC4B) заменяли всеми другими возможными аминокислотными заменами, а затем определяли аффинность связывания с использованием SCHRODINGER BIOLUMINATE®. Поскольку гистидин может иметь три различные молекулярные структуры в своем протонированном состоянии (сокращенно HIP, HID и HIE; HIP: +1 заряжен, протонированы как δ-, так и ε-азот; HID: нейтральный, протонированный δ-азот; HIE: нейтральный, протонированный ε-азот), каждый остаток можно было заменить 21 другой отличной аминокислотой. Таким образом, двойная мутация как на T12, так и на L13 приводила к образованию 441 мутанта. Последовательности двадцати наиболее эффективных мутантов пептида FB-20 (в T12 и L13), которые, по прогнозам, повышают аффинность связывания между FAM19A5 и LRRC4B, представлены в таблице 12 (ниже).

Таблица 12. Последовательности иллюстративных пептидных фрагментов FB-20 с заменами T12 и/или L13

Пептид	Аминокислотная последовательность
FB-20 (T12P и L13Y) (т.е. P12Y13) (SEQ ID NO: 123)	GYTYFTT VTVE PY ETQPGE E
FB-20 (T12M и L13R) (т.е. M12R13) (SEQ ID NO: 124)	GYTYFTT VTVE M RETQPG EE
FB-20 (T12I и L13F) (т.е. I12F13) (SEQ ID NO: 125)	GYTYFTT VTVE I FETQPGE E
FB-20 (T12HID и L13F) (т.е. H12F13) (SEQ ID NO: 126)	GYTYFTT VTVE H FETQPGE E
FB-20 (T12W и L13Y) (т.е. W12Y13) (SEQ ID NO: 127)	GYTYFTT VTVE W YETQPG EE
FB-20 (T12Q и L13R) (т.е. Q12R13) (SEQ ID NO: 128)	GYTYFTT VTVE Q RETQPGE E
FB-20 (T12W и L13F) (т.е. W12F13) (SEQ ID NO: 129)	GYTYFTT VTVE W FETQPG EE
FB-20 (T12E и L13R) (т.е. E12R13) (SEQ ID NO: 130)	GYTYFTT VTVE E RETQPGE E

FB-20 (T12D и L13Y) (т.е. D12Y13) (SEQ ID NO: 131)	GYTYFTT V TVED D YETQPGE E
FB-20 (T12F и L13F) (т.е. F12F13) (SEQ ID NO: 132)	GYTYFTT V TVVE F FETQPGE E
FB-20 (T12HID и L13Y) (т.е. H12Y13) (SEQ ID NO: 133)	GYTYFTT V TVVE H YETQPGE E
FB-20 (T12M и L13M) (т.е. M12M13) (SEQ ID NO: 134)	GYTYFTT V TVVEM M ETQPG EE
FB-20 (T12D и L13F) (т.е. D12F13) (SEQ ID NO: 135)	GYTYFTT V TVVED F FETQPGE E
FB-20 (T12D и L13I) (т.е. D12I13) (SEQ ID NO: 136)	GYTYFTT V TVVED I IETQPGE E
FB-20 (T12L и L13I) (т.е. L12I13) (SEQ ID NO: 137)	GYTYFTT V TVVEL I IETQPGE E
FB-20 (T12E и L13I) (т.е. E12I13) (SEQ ID NO: 138)	GYTYFTT V TVVE E IETQPGE E
FB-20 (T12A и L13F) (т.е. A12F13) (SEQ ID NO: 139)	GYTYFTT V TVVE A FETQPGE E
FB-20 (T12HID и L13HIP) (т.е. H12H13) (SEQ ID NO: 140)	GYTYFTT V TVVE H HETQPG EE
FB-20 (T12P и L13F) (т.е. P12F13) (SEQ ID NO: 141)	GYTYFTT V TVVE P FETQPGE E
FB-20 (T12D и L13W) (т.е. D12W13) (SEQ ID NO: 142)	GYTYFTT V TVVED W WETQPG EE

[0313] Как показано на фиг. 21B, пептидные фрагменты LRRC4B, содержащие определенные двойные мутанты T12/L13 (например, T12P-L13Y и T12I-L13F), проявляют повышенную аффинность связывания с белком FAM19A5.

[0314] Приведенные выше результаты дополнительно подтверждают, что определенные аминокислотные остатки (например, от Y2 до E11) пептидного фрагмента LRRC4B важны для связывания с белком FAM19A5. Приведенные выше результаты дополнительно демонстрируют, что аффинность связывания пептидных фрагментов LRRC4B может быть улучшена, например, путем мутации аминокислотных остатков, которые в природе не играют важной роли в связывании, и тем самым помогают стабилизировать взаимодействие между полипептидами, описанными в данном документе (которые содержат FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4) и белок FAM19A5.

ПРИМЕР 10. АНАЛИЗ АФФИННОСТИ СВЯЗЫВАНИЯ РАЗЛИЧНЫХ МУТАНТОВ ПЕПТИДА FB-21

[0315] Анализ *in silico*, представленный в примере 9, показал, что некоторые

двойные мутанты T12 и L13 могут быть важны для улучшения аффинности связывания полипептидов по настоящему изобретению с белком FAM19A5. Таким образом, способность как пептида FB-21 дикого типа (который аналогичен пептиду FB-20, описанному в данном документе, за исключением того, что пептид FB-21 дополнительно содержит аланин на С-конце), так и нескольких мутантов FB-21 тестировали в отношении их ингибирующего эффекта на образование комплекса hFc-слитый hLRRC4B-и FAM19A5. В частности, последовательности различных тестируемых пептидных фрагментов FB-21 представлены в таблице 13 (ниже). Вкратце, планшет покрывали 100 нМ LRRC4B(453-576, TT/TT)-hFc, а затем инкубировали 1 нг/мл rFAM19A5 при 37°C в присутствии возрастающих концентраций различных пептидных фрагментов FB-21 (0,03, 0,1, 0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300 и 1000 нМ). Уровни FAM19A5, связанного с LRRC4B, измеряли с использованием конъюгированного с HRP антитела 1-65.

Таблица 13. Последовательности иллюстративных пептидных фрагментов FB-21

Пептид	Аминокислотная последовательность
FB-21 (дикого типа) (SEQ ID NO: 143)	GYTYFTTVTVETLETQPGEEA
FB-21 (P12Y13) (SEQ ID NO: 144)	GYTYFTTVTVEPYETQPGEEA
FB-21 (H12F13) (SEQ ID NO: 145)	GYTYFTTVTVEHFETQPGEEA
FB-21 (Q12R13) (SEQ ID NO: 146)	GYTYFTTVTVEQRETQPGEEA
FB-21 (W12Y13) (SEQ ID NO: 147)	GYTYFTTVTVEWYETQPGEEA
FB-21 (M12R13) (SEQ ID NO: 148)	GYTYFTTVTVEMRETQPGEEA
FB-21 (I12F13) (SEQ ID NO: 149)	GYTYFTTVTVEIFETQPGEEA

[0316] Как показано на фиг. 22A (и в соответствии с данными, представленными в примере 9), некоторые из тестируемых мутантов пептида FB-21 были способны ингибировать взаимодействие между hFc-слитым белком hLRRC4B и белком FAM19A5 (см. таблицу 14 для IC50 ингибирования). Например, по сравнению с FB-21 дикого типа способность мутанта FB-21 (W12Y13) диссоциировать комплекс LRRC4B-FAM19A5 была повышена в 2,9 раза.

Таблица 14. Ингибирование (IC50) в составе комплекса между белком LRRC4B человека и рекомбинантным белком FAM19A5 (1 нг/мл)

Пептид	IC50 (нМ)
FB-21 (дикого типа) (SEQ ID NO: 143)	11,9
FB-21 (P12Y13) (SEQ ID NO: 144)	39
FB-21 (H12F13) (SEQ ID NO: 145)	9,8

FB-21 (Q12R13) (SEQ ID NO: 146)	39,9
FB-21 (W12Y13) (SEQ ID NO: 147)	4,1
FB-21 (M12R13) (SEQ ID NO: 148)	47,9
FB-21 (I12F13) (SEQ ID NO: 149)	9,9

[0317] Для дополнительной оценки ингибирующего эффекта мутантов FB-21 тестировали способность дополнительных мутантов FB-21, описанных в примере 9, в отношении их способности ингибировать взаимодействие между белком FAM19A5 и белком LRRC4B. Вкратце, планшеты покрывали 100 нМ His-TEV LRRC4B, а затем инкубировали 1 нг/мл rFAM19A5 при 37 °С в присутствии возрастающих концентраций пептидных фрагментов FB-21 (0,3, 1, 3, 10, 30, 100, 300, 1000, 3000 и 10000 нМ). Уровни связанного с LRRC4B FAM19A5 измеряли с использованием конъюгированного с HRP антитела 1-65 SS01. Как показано на фиг. 22В (см. таблицу 15 для IC50), большинство (если не все) мутантов FB-21 обладали улучшенной способностью ингибировать взаимодействие между LRRC4B и рекомбинантным белком FAM19A5. Например, мутант FB-21 (D12Y13) был в 2,4 и 7 раз более эффективным в диссоциации образования комплекса LRRC4B-FAM19A5 по сравнению с FB-21 и FB-21 (W12Y13) соответственно.

Таблица 15. Ингибирование (IC50) в составе комплекса между антителом к FAM19A5 и рекомбинантным белком FAM19A5 (1 нг/мл)

Пептид	IC50 (нМ)
FB-21 (дикого типа) (SEQ ID NO: 143)	138,1
FB-21 (W12Y13) (SEQ ID NO: 147)	46,7
FB-21 (D12Y13) (SEQ ID NO: 131)	19,2
FB-21 (F12F13) (SEQ ID NO: 132)	31,5
FB-21 (H12Y13) (SEQ ID NO: 133)	39,6
FB-21 (D12F13) (SEQ ID NO: 135)	21,2
FB-21 (D12I13) (SEQ ID NO: 136)	21,8

[0318] Затем для оценки того, можно ли улучшить другие свойства полипептидов, описанных в данном документе (например, растворимость, предупреждение расщепления под действием протеазы и пептидазы и введение *in vivo*), конструировали следующие дополнительные мутанты пептида FB-21 и тестировали в отношении их способности ингибировать взаимодействие между белком FAM19A5 и LRRC4B: (1) пептид FB-21 в d-форме («dFB-21»), (2) пептид FB-21 в d-форме с юкстамембранной (JM)

последовательностью («dFB-JM-31»), (3) пептид FB-21 в d-форме с последовательностью, проникающей через BBB на каждом конце последовательности («dFB-BBB-39»), и (4) мутантный пептид FB-21 в d-форме с заменой DY и дополнительной последовательностью JM («dFB-DY-JM31»). Последовательность пептида FB-21 в d-форме представлена в SEQ ID NO: 153 (nYTYFTTVETLETQPGEEa; где аминокислоты в нижнем регистре представляют собой D-форму аминокислоты, а аминокислоты заглавными буквами представляют L-форму аминокислоты). Последовательность dFB-BBB-39 представлена в SEQ ID NO: 154 (nYTYFTTVTVETLETQPGEEALRKLRLKRLLRKLRKRL); где аминокислоты строчными буквами представляют собой D-форму аминокислоты, а аминокислоты заглавными буквами представляют собой L-форму аминокислоты). Последовательность dFB-JM-31 представлена в SEQ ID NO: 155 (nYTYFTTVTVETLETQPGEEALDEVMKTTKa; где аминокислоты строчными буквами представляют собой D-форму аминокислоты, а аминокислоты заглавными буквами представляют собой L-форму аминокислоты). Последовательность dFB-DY-JM31 представлена в SEQ ID NO: 156 (nYTYFTTVTVEDYETQPGEEALDEVMKTTKa; где аминокислоты строчными буквами представляют собой D-форму аминокислоты, а аминокислоты заглавными буквами представляют собой L-форму аминокислоты). Общие экспериментальные методы были такими же, как описано выше. Как показано на фиг. 22D, JM последовательность представляет собой консервативный мотив в юкстамембранной области гена семейства LRRC4. Как показано на фиг. 22C, FB-21, содержащий JM-мотив, включающий мутантный пептид, который был заменен с T12L13 на D12Y13, был более эффективен в ингибировании образования комплекса в 4 раза по сравнению с FB-21 дикого типа.

[0319] Приведенные выше результаты подтверждают, что определенные модификации, описанные в данном документе (например, аминокислотные замены в остатках T12 и L13 FAM19A5-связывающего домена членов семейства LRRC4; и добавление юкстамембранного мотива членов семейства LRRC4) могут улучшить способность полипептидов по настоящему изобретению ингибирования взаимодействия между белком FAM19A5 и членами семейства белков LRRC4.

ПРИМЕР 11. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА ИНДУЦИРОВАННУЮ БЕТА-АМИЛОИДОМ ПОТЕРЮ СИНАПСА

[0320] Болезнь Альцгеймера (AD) тесно ассоциирована с дисметаболизмом амилоида- β (A β). Для начала оценки того, могут ли полипептиды, представленные в данном

документе (т.е. содержащие FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4), оказывать какие-либо терапевтические эффекты на AD, оценивали эффект различных пептидных фрагментов FB-21, описанных в данном документе, на деформацию синапса, индуцированную токсичным олигомером A β и последующее структурное восстановление. В частности, тестировали следующие пептидные фрагменты FB-21: FB-21, FB-JM-31 и FB-BBB-39 (см. пример 10).

[0321] Как показано на фиг. 23B, только пептид FB с JM последовательностью со значительным повышением количества колокализованных вокселей для PSD95 и синаптофизина совместно обрабатывали токсичным олигомером A β . Кроме того, не наблюдали существенных изменений интенсивности для PSD95 и синаптофизина (см. фиг. 23C и 23D). Эти результаты подчеркивают структурную сохранность и нейропротекторные свойства полипептидов, представленных в данном документе (т.е. содержащих FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4), в отношении токсичных олигомеров A β .

ПРИМЕР 12. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА УДЛИНЕНИЕ НЕЙРИТОВ

[0322] Повреждение спинного мозга (SCI) представляет собой повреждение спинного мозга, которое вызывает временные или постоянные изменения в его двигательной и/или чувствительной и/или вегетативной функции в частях тела, обслуживаемых спинным мозгом, ниже уровня повреждения. В большинстве случаев повреждение является результатом физической травмы, такой как падение, автомобильная авария или спортивная травма, но оно также может быть результатом нетравматических причин, таких как инфекция или опухоль. Для оценки регенеративной способности мотонейронов после повреждения, такого как SCI, оценивали терапевтический эффект полипептидов, описанных в данном документе, на спинальные мотонейроны. Вкратце, мотонейроны спинного мозга мыши, отобранные в день 1 постнатального периода, обрабатывали 10 нМ пептидных фрагментов FB-21 (dFB-dWY-JM31 и dFB-DY-JM31) в 1 и 2 DIV и иммуноокрашивали антителом к Tau-5 в 3 DIV. Необработанные клетки («NT») использовали в качестве контроля.

[0323] Как показано на фиг. 24A и 24B, у мышей с индуцированным SCI, обработанных пептидным фрагментом LRRC4B, описанным в данном документе, наблюдали повышение общей длины нейритов спинальных мотонейронов. Такие результаты дополнительно подчеркивают терапевтический потенциал полипептидов,

описанных в данном документе (т.е. содержащих FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4), в том числе для лечения SCI.

ПРИМЕР 13. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА ИНДУЦИРОВАННУЮ 6-ОНДА ГИБЕЛЬ КЛЕТОК

[0324] Болезнь Паркинсона (PD) представляет собой хроническое дегенеративное заболевание центральной нервной системы, которое в основном поражает двигательную систему за счет дегенерации дофаминергических нейронов. Для оценки возможной нейропротекторной способности при PD, оценивали эффект полипептидов, описанных в данном документе, на нейродегенерацию и гибель клеток дофаминергических нейронов (часто наблюдаемую при PD). Вкратце, мезенцефальные клетки Лунда (LUHMES) человека дифференцировали в дофаминергические нейроны и обрабатывали 6-ОНДА (известный нейротоксин, который вызывает PD-подобную дегенерацию дофаминергических нейронов) отдельно или в комбинации с различными дозами (10, 30 и 100 нМ) пептидного фрагмента FB-21 (dFB-dWY-JM31) в течение 12 часов. Некоторые клетки LUHMES обрабатывали только пептидным фрагментом FB-21 (т.е. без обработки 6-ОНДА). Затем экспрессию люминесценции измеряли с помощью анализа CellTiter-Glo.

[0325] Как показано на фиг. 25, обработка 6-ОНДА пептидом FB-21 (dFB-dWY-JM31) показала дозозависимое изменение жизнеспособности клеток LUHMES, подчеркивая потенциальное использование полипептидов, описанных в данном документе (т.е., содержащих FAM19A5-связывающий домен члена семейства белков LRRC4) в качестве нового терапевтического средства для лечения PD.

ПРИМЕР 14. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА НЕЙРОПАТИЧЕСКУЮ БОЛЬ

[0326] Нейропатическая боль представляет собой трудноизлечимое заболевание, вызванное повреждением или повреждением нервов периферической и центральной нервной системы. Боль обычно описывается как ощущение жжения, а пораженные участки часто чувствительны к прикосновению. Для оценки обезболивающего эффекта полипептидов, описанных в данном документе, при нейропатическом состоянии использовали модель животного с хронической компрессией (CCI). Вкратце, после индукции CCI животным интратекально вводили несущую среду или 50 мкг варианта пептида FB-21 (dFB-dDY-JM31) два раза в неделю пять раз. Затем механическую аллодинию измеряли с помощью теста фон Фрея в дни 8, 11, 15 и 18 после индукции CCI.

[0327] Как показано на фиг. 26А, у мышей, индуцированных ССИ, обработанных пептидным фрагментом FB-21 (dFB-dDY-JM31), наблюдали повышенный порог отдергивания лапы (PWT) во все оцениваемые временные точки по сравнению с группой несущей среды. Значимая разница между обработанными и контрольными животными была еще более очевидной, когда общий результат преобразовывали в площадь под кривой (AUC) (см. фиг. 26В). Эти результаты демонстрируют, что введение полипептидов, представленных в данном документе (например, dFB-dDY-JM31), может быть применимым для устранения механической аллодинии, вызванной ССИ, что подчеркивает потенциальное применение в качестве анальгетика.

ПРИМЕР 15. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА ДИСФУНКЦИЮ СЕТЧАТКИ И МОДУЛЯЦИЮ КОЛЕБАНИЙ НЕЙРОНОВ

[0328] Для оценки терапевтических эффектов полипептидов, представленных в данном документе (т.е. содержащих FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4) на дисфункцию сетчатки (например, индуцированную диабетической ретинопатией (DR)), амплитуду реакций связанной с биполярными клетками и клетками Мюллера b-волной, измеряли у трансгенных модельных мышей с диабетом (db/db) с помощью электроретинограммы (ERG). Несущий контроль или 10 мкг dFB-dDY-JM31 вводили еженедельно посредством интравитреальной (ivt) инъекции в течение 12-18 недель.

[0329] Как показано на фиг. 27, контрольные животные db/db демонстрировали значимо сниженную амплитуду В-волны по сравнению с однопаметными животными дикого типа (db/+). Однако когда контрольных животных db/db обрабатывали пептидным фрагментом FB-21 (dFB-dWY-JM31), наблюдали значимое увеличение амплитуды В-волны. Такие результаты подчеркивают терапевтический потенциал полипептидов, описанных в данном документе (т.е. содержащих FAM19A5-связывающий домен членов семейства белков LRRC4) при дисфункции сетчатки, в том числе вызванной DR.

ПРИМЕР 16. ЭФФЕКТ ПОЛИПЕПТИДОВ, СОДЕРЖАЩИХ FAM19A5-СВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН ЧЛЕНОВ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4, НА ПОВРЕЖДЕНИЕ ГОЛОВНОГО МОЗГА, ВЫЗВАННОЕ ЧЕРЕПНО-МОЗГОВОЙ ТРАВМОЙ

[0330] Для дополнительной оценки терапевтических эффектов полипептидов, описанных в данном документе, использовали мышиную модель черепно-мозговой травмы (т.е. холодовой ТВИ). Через примерно 24 часа после индукции ТВИ животным вводили

(посредством интраназального введения) либо контроль несущей средой, либо пептид dFB-dWY-JM31 (100 мкг). Затем, через примерно 24 часа после обработки, ткани головного мозга получали и окрашивали Ноеchst.

[0331] Как показано на фиг. 28, по сравнению с контрольными животными с ТВИ (т.е. обработанными контролем несущей средой после индукции ТВИ), у животных с ТВИ, обработанных пептидным фрагментом FB-21, наблюдали значимо уменьшенный объем поражения. Эти результаты демонстрируют, что полипептиды, описанные в данном документе (например, dFB-dWY-JM31) могут уменьшать размер поражения головного мозга, вызванного ТВИ, демонстрируя потенциал в качестве терапевтического средства при ТВИ.

ПРИМЕР 17. РАЗРАБОТКА ХИМИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, КОТОРЫЕ МОГУТ ИНГИБИРОВАТЬ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МЕЖДУ ЧЛЕНАМИ СЕМЕЙСТВА БЕЛКОВ LRRC4 И FAM19A5

[0332] Для разработки дополнительных подходов к ингибированию, снижению и/или диссоциации взаимодействия между членами семейства белков LRRC4 и FAM19A5 разрабатывали ряд каркасных химических соединений, как описано ниже.

[0333] *Реагенты и условия:* (i)-*трет*-бутилдиметилсилилхлорид, имидазол, CH₂Cl₂, к.т., 18 ч; (ii) PPh₃, CBr₄, CH₂Cl₂, к.т., 3 ч; (iii) *n*-BuLi 1,6 М в гексанах (3,0 экв.), THF, к.т., 2 ч; (iv) *n*-BuLi 1,6 М в гексанах (1,1 экв.), *N*-метокси-*N*-метилгексанамид, THF, -78 °С до к.т., 16 ч; (v) NaBH₄, MeOH, к.т., 1 ч; (vi) RuCl[(*R,R*)-TsDPEN(мезитилен)], KOH, 2-пропанол, 4 ч; (vii) RuCl[(*S,S*)-TsDPEN(мезитилен)], KOH, 2-пропанол, 4 ч; (viii) кат. Линдлара, газ H₂, 1,4-бензохинон, MeOH, 0 °С, 1 ч; (ix) *n*-Bu₄NF, 0,1 М в THF, к.т., 1 ч.

[0334] *Синтез 4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-метоксибензальдегида (соединение 1):* к перемешиваемому раствору ванилина (1,00 г, 6,57 ммоль), растворенного в сухом CH₂Cl₂ (50 мл), добавляли имидазол (1,29 г, 18,96 ммоль) и *трет*-бутилдиметилсилилхлорид (1,42 г, 9,39 ммоль) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре в течение 16 ч, гасили водой и экстрагировали CH₂Cl₂ (3 × 25 мл). Органический слой промывали водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc = 4:1, об./об.) с получением соединения **17** с выходом 94% в виде бесцветного масла. *R*_f = 0,89 (Гексан/EtOAc = 1:1, об./об.). ¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ 9,85 (с, 1H), 7,40 (д, *J* = 1,9 Гц, 1H), 7,37 (дд, *J* = 4,0 и 8,0 Гц, 1H), 6,97 (д, *J* = 8,0 Гц, 1H), 3,87 (с, 3H), 1,00 (с, 9H), 0,20 (с, 6H); ¹³C ЯМР (150 МГц, CDCl₃) δ 191,19, 151,80, 151,51, 131,09, 126,40, 120,87, 110,25, 55,61,

25,74, 18,66, -4,41.

[0335] *Синтез* *трет-бутил-(4-(2,2-дибромвинил)-2-метоксифеноксидиметилсилана (соединение 2):* к перемешиваемому раствору СВг₄ (3,37 г, 10,14 ммоль) растворяли в сухом СH₂Сl₂ (30 мл) медленно добавили РPh₃ (5,32 г, 20,28 ммоль) при 0 °С. После перемешивания в атмосфере аргона в течение 1 ч при той же температуре медленно в течение 10 мин добавляли раствор соединения **1** (1,35 г, 5,07 ммоль) в сухом СH₂Сl₂ (10 мл). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 2 ч и экстрагировали СH₂Сl₂ (3 × 25 мл). Органический слой промывали водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/ЕtОAc = 15:1, об./об.) с получением соединения **2** с выходом 98% в виде бесцветного масла. R_f = 0,87 (Гексан/ЕtОAc = 8:1, об./об.). ¹H ЯМР (600 МГц, СDCl₃) δ 7,42 (с, 1H), 7,19 (д, J = 2,0 Гц, 1H), 7,03 (дд, J = 4,1 и 8,3 Гц, 1H), 6,84 (д, J = 8,2 Гц, 1H), 3,83 (с, 3H), 1,02 (с, 9H), 0,19 (с, 6H); ¹³C ЯМР (150 МГц, СDCl₃) δ 150,62, 145,64, 136,59, 128,77, 121,96, 120,68, 112,03, 87,10, 55,51, 25,69, 25,66, 18,47, -4,58.

[0336] *Синтез* *трет-бутил(4-этинил-2-метоксифеноксидиметилсилана (соединение 3):* к перемешиваемому раствору соединения **2** (1,41 г, 3,34 ммоль) в сухом THF (20 мл) добавляли *n*-BuLi (1,6 М в гексанах, 5,30 мл, 8,35 ммоль) при -78 °С. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 2 ч при той же температуре, гасили водным NH₄Cl (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 25 мл). Органический слой промывали водой, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/ЕtОAc = от 16:1 до 10:1, об./об.) с получением соединения **3** с 96% выходом в виде бесцветного масла. R_f = 0,80 (Гексан/ЕtОAc = 8:1, об./об.). ¹H ЯМР (600 МГц, СDCl₃) δ 7,00 (дд, J = 4,0 и 8,1 Гц, 1H), 6,97 (д, J = 1,9 Гц, 1H), 3,80 (с, 3H), 2,99 (с, 1H), 0,99 (с, 9H), 0,15 (с, 6H); ¹³C ЯМР (150 МГц, СDCl₃) δ 150,66, 146,23, 125,46, 120,90, 115,66, 115,04, 83,96, 75,57, 55,45, 25,67, 18,47, -4,64.

[0337] *Синтез 1-(4-((трет-бутилдиметилсиллил)окси)-3-метоксифенил)окт-1-ин-3-она (соединение 4):* к перемешиваемому раствору соединения **3** (400 мг) в THF (40 мл) добавляли *n*-BuLi (1,1 экв.) при -78 °С. Раствор перемешивали в атмосфере аргона в течение 1 ч при той же температуре, затем по каплям добавляли *N*-метокси-*N*-метилгексанамида (364 мг, 2,28 ммоль). Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при той же температуре до тех пор, пока TLC анализ не указывал на полную конверсию (12 ч), гасили водным NH₄Cl (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 25 мл). Органический слой промывали

солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/эфир = от 120:1 до 80:1, об./об.) с получением соединения **4**. $R_f = 0,75$ (Гексан/ EtOAc = 8:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 7,12 (д, $J = 8,1$ Гц, 1H), 7,07 (с, 1H), 6,84 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H), 3,82 (с, 3H), 2,65 (т, $J = 7,4$ Гц, 2H), 1,77–1,75 (м, 2H), 1,38–1,37 (м, 4H), 1,00 (с, 9H), 0,93 (т, $J = 6,5$ Гц, 3H), 0,18 (с, 6H); ^{13}C ЯМР (150 МГц, CDCl_3) δ 188,36, 150,90, 148,19, 127,18, 121,14, 116,48, 112,74, 91,88, 87,48, 55,51, 45,41, 31,21, 25,62, 23,99, 22,43, 18,48, 13,92, –4,59.

[0338] Синтез *1-(4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-метоксифенил)окт-1-ин-3-ола* (соединение **5**): к перемешиваемому раствору **4** (210 мг, 0,582 ммоль) в MeOH 15 мл добавляли NaBH_4 (33,0 мг, 0,874 ммоль) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона в течение 1 часа при комнатной температуре. Реакционную смесь концентрировали, затем экстрагировали EtOAc (3 × 25 мл). Органический слой промывали водой, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/ EtOAc = 8:1, об./об.) с получением соединения **5** с выходом 77% в виде бесцветного масла. $R_f = 0,59$ (Гексан/ EtOAc = 4:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 6,94–6,92 (м, 2H), 6,77 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H), 4,58 (к, $J = 6,4$ Гц, 1H), 3,79 (с, 3H), 1,92 (д, $J = 5,2$ Гц, 1H), 1,81–1,76 (м, 2H), 1,53–1,49 (м, 2H), 1,35–1,34 (м, 4H), 0,98 (с, 9H), 0,91 (т, $J = 7,0$ Гц, 3H), 0,15 (с, 6H); ^{13}C ЯМР (150 МГц, CDCl_3) δ 150,66, 145,84, 124,96, 120,90, 115,69, 115,31, 88,72, 85,01, 63,08, 55,44, 37,97, 31,51, 25,68, 24,95, 22,60, 18,47, 14,04, –4,65.

[0339] Синтез *((Z)-1-(4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-метоксифенил)окт-1-ен-3-ола* (соединение **6**): к раствору **5** (70,0 мг, 0,19 ммоль) в MeOH (3 мл) добавляли хинолин (7 мг, 0,06 ммоль) и катализатор Линдлара (7 мг, 0,02 ммоль) и смесь перемешивали при 0 °С в течение 1 часа в атмосфере водорода (баллон). После полной конверсии соединения **5** (TLC, толуол/ EtOAc = 10:1, об./об.) реакционную смесь фильтровали через слой целита и промывали MeOH (3 × 5 мл). Объединенные фильтраты концентрировали при пониженном давлении с получением неочищенного продукта, который очищали хроматографией на колонке с силикагелем (толуол/ EtOAc = 10:1, об./об.) с получением соединения **6** в виде бесцветного масла. $R_f = 0,36$ (толуол/ EtOAc = 10:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 6,83 (д, $J = 1,8$ Гц, 1H), 6,81 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6,77 (дд, $J = 1,8$ и 8,1 Гц, 1H), 6,46 (д, $J = 11,4$ Гц, 1H), 5,57 (дд, $J = 9,0$ и 12,0 Гц, 1H), 4,60 (дд, $J = 7,2$ и 15,3 Гц, 1H), 3,80 (с, 3H), 1,69–1,62 (м, 1H), 1,61 (ушир. с., 1H), 1,59–1,52 (м, 1H), 1,46–1,21 (м, 6H), 1,00 (с, 9H), 0,88 (т, $J = 6,6$ Гц, 3H), 0,16 (с, 6H).

[0340] *Синтез (Z)-4-(3-гидроксиокт-1-ен-1-ил)-2-метоксифенола (соединение 7, «KB2356»):* к перемешиваемому раствору соединения **6** в THF (5 мл) добавляли тетрабутиламмоний. раствор фторида (1М в THF, 2,0 экв.) при 0 °С. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при той же температуре до тех пор, пока TLC анализ не указывал на полную конверсию (обычно 1 ч), гасили водным NH₄Cl (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3 × 25 мл). Органический слой промывали солевым раствором, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc) с получением соединения **7** с выходом 70% (в течение двух стадий начиная от соединения **5**) в виде бесцветного масла. $R_f = 0,21$ (толуол/EtOAc = 10:1, об./об.). ¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ 6,89 (д, $J = 8,4$ Гц, 1H), 6,88–6,86 (м, 1H), 6,85–6,81 (м, 1H), 6,48 (д, $J = 11,4$ Гц, 1H), 5,64 (с, 1H), 5,57 (дд, $J = 9,0$ и 11,7 Гц, 1H), 4,56–4,51 (м, 1H), 3,90 (с, 3H), 1,71–1,63 (м, 1H), 1,61–1,54 (м, 1H), 1,52 (ушир. с., 1H), 1,46–1,23 (м, 6H), 0,88 (т, $J = 6,6$ Гц, 3H); ¹³C ЯМР (150 МГц, CDCl₃) δ 146,36, 145,14, 133,27, 131,25, 129,15, 122,29, 114,34, 111,50, 68,20, 56,01, 37,94, 31,94, 25,31, 22,74, 14,13. HRMS m/z рассчитано для C₁₅H₂₂O₃ [M–H][–]: 249,1496; обнаружено: 249,1523. Чистота >95%.

[0341] *Общая процедура для соединений 8 и 9:* к 0,1 М раствору соединения **4** в 2-пропаноле добавляли KOH и катализатор в соотношении соединение **4** : катализатор : KOH = 200:1:1,2. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при комнатной температуре до тех пор, пока TLC анализ не указывал на полную конверсию (обычно 4 часа), и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле с получением стереоселективных соединений. Значения *ee* определяли с помощью анализов на основе хиральной HPLC на хиральной колонке (CHIRALPAK IG, 10% этанол в гексане).

[0342] *Синтез (R)-1-(4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-метоксифенил)окт-1-ин-3-ола (соединение 8):* соединение **8** получали с выходом 88% в виде бесцветного масла с помощью той же процедуры, что описана в приведенной выше общей процедуре, с соединением **4** (150 мг, 0,416 ммоль) в 2-пропаноле (4,16 мл), RuCl[(*R,R*)-TsDPEN(мезитилен)] (1,29 мг, 2,08 мкмоль) и KOH (0,138 мг, 2,50 мкмоль). Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc = 12:1, об./об.) с получением соединения **8**. $R_f = 0,59$ (гексан/EtOAc = 4:1, об./об.). ¹H ЯМР (600 МГц, CDCl₃) δ 6,94–6,92 (м, 2H), 6,77 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H), 4,58 (q, $J = 6,4$ Гц, 1H), 3,79 (с, 3H), 1,90 (д, $J = 5,5$ Гц, 1H), 1,81–1,76 (м, 2H), 1,53–1,50 (м, 2H), 1,36–1,33 (м, 4H), 0,98 (с, 9H), 0,91 (т, $J = 7,0$ Гц, 3H), 0,15 (с, 6H); ¹³C ЯМР (150 МГц, CDCl₃) δ 150,66, 145,84, 124,95, 120,90,

115,68, 115,30, 88,71, 85,02, 63,09, 55,44, 37,97, 31,51, 25,68, 24,95, 22,60, 18,47, 14,04, -4,65.

[0343] *Синтез (S)-1-(4-((трет-бутилдиметилсилил)окси)-3-метоксифенил)окт-1-ин-3-ола (соединение 9)*: соединение **9** получали с выходом 68% в виде бесцветного масла с помощью той же процедуры, что описана для соединения **8**, со следующими исходными веществами; соединение **4** (150 мг, 0,416 ммоль) в 2-пропанол (4,16 мл), RuCl[(S,S)-TsDPEN(мезитилен)] (1,29 мг, 2,08 мкмоль) и KOH (0,138 мг, 2,50 мкмоль). Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc = 12:1, об./об.) с получением соединения **9**. $R_f = 0,59$ (гексан/EtOAc = 4:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 6,94–6,92 (м, 2H), 6,77 (д, $J = 7,9$ Гц, 1H), 4,58 (т, $J = 6,5$ Гц, 1H), 3,79 (с, 3H), 1,91 (с, 1H), 1,81–1,76 (м, 2H), 1,53–1,49 (м, 2H), 1,35–1,34 (м, 4H), 0,98 (с, 9H), 0,91 (т, $J = 7,0$ Гц, 3H), 0,15 (с, 6H); ^{13}C ЯМР (150 МГц, CDCl_3) δ 150,66, 145,84, 124,95, 120,90, 115,68, 115,31, 88,71, 85,01, 63,08, 55,44, 37,97, 31,51, 25,68, 24,95, 22,60, 18,47, 14,04, -4,65.

[0344] *Общая процедура для соединений 10 и 11*: к перемешиваемому раствору силилзащищенного соединения в THF (5 мл) добавляли раствор фторида тетрабутиламмония (1M в THF, 2,0 экв.) при 0°C. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере аргона при той же температуре до тех пор, пока TLC анализ не указывал на полную конверсию (обычно 1 ч), гасили водным NH_4Cl (10 мл) и экстрагировали EtOAc (3 \times 25 мл). Органический слой промывали солевым раствором, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали при пониженном давлении. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией на силикагеле (гексан/EtOAc) с получением соединения.

[0345] *Синтез (R)-4-(3-гидроксиокт-1-ин-1-ил)-2-метоксифенола (соединение 10, «KB2357»)*: соединение **10** (28,0 мг, 0,077 ммоль) получали с выходом 94% в виде масла белого цвета, следуя общей процедуре. $R_f = 0,21$ (Гексан/EtOAc = 5:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 6,98 (дд, $J = 1,7$ и $8,2$ Гц, 1H), 6,92 (д, $J = 1,7$ Гц, 1H), 6,84 (д, $J = 8,2$ Гц, 1H), 5,72 (ушир. с., 1H), 4,58 (q, $J = 6,4$ Гц, 1H), 3,89 (с, 3H), 1,87–1,73 (м, 3H), 1,58–1,47 (м, 2H), 1,39–1,30 (м, 4H), 0,91 (т, $J = 7,2$ Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (150 МГц, CDCl_3) δ 146,29, 146,12, 125,67, 114,46, 114,23, 113,93, 88,32, 84,97, 63,10, 55,98, 37,98, 31,50, 24,94, 22,59, 14,03. HRMS m/z рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ [M-H] $^-$: 247,1339; обнаружено: 247,1397. Чистота >95%.

[0346] *Синтез (S)-4-(3-гидроксиокт-1-ин-1-ил)-2-метоксифенола (соединение 23c, «KB2358»)*: соединение **23c** (20,0 мг, 0,055 ммоль) получали с выходом 93% в виде масла желтого цвета, следуя общей процедуре. $R_f = 0,21$ (Гексан/EtOAc = 5:1, об./об.). ^1H ЯМР (600 МГц, CDCl_3) δ 6,97 (т, $J = 6,6$ Гц, 1H), 6,92 (д, $J = 1,8$ Гц, 1H), 6,84 (д, $J = 7,8$ Гц, 1H), 4,58 (т, $J = 6,6$ Гц, 1H), 3,88 (с, 3H), 1,89–1,76 (м, 2H), 1,63–1,55 (м, 2H), 1,43–1,31 (м, 4H),

0,90 (т, $J = 7,2$ Гц, 3H); ^{13}C ЯМР (150 МГц, CDCl_3) δ 146,30, 146,15, 125,65, 114,50, 114,21, 113,96, 88,34, 84,97, 63,09, 55,97, 37,97, 31,50, 24,95, 22,59, 14,03. HRMS m/z рассчитано для $\text{C}_{15}\text{H}_{20}\text{O}_3$ $[\text{M}-\text{H}]^-$: 247,1339; обнаружено: 247,1415. Чистота >95%.

[0347] В частности, получали следующие соединения: (1) KB734, (2) KB761, (3) KB763, (4) KB1157, (5) KB1161, (6) KB1542, (7) KB1543, (8) KB2256, (9) KB2258, (10) KB2310, (11) KB2357, (12) KB2718, (13) KB2719, (14) KB3111, (15) KB3112, (16) KB3220, (17) KB3201, (18) KB3250 и (19) KB3251. Затем способность вышеуказанных химических соединений ингибировать связывание членов семейства белков LRRC4 с белком FAM19A5 оценивали с использованием анализа конкурентного ингибирования. Вкратце, планшеты для ELISA покрывали 100 нМ конъюгированного с Fc фрагмента LRRC4B (аминокислоты 453-576 SEQ ID NO: 2; SEQ ID NO: 7). Затем в планшеты добавляли рекомбинантный белок FAM19A5 (1 нг/мл) в комбинации с одним из указанных выше химических соединений (100 мкМ). В качестве контроля использовали рекомбинантный белок FAM19A5 отдельно («контр.») или в комбинации с DMSO. Планшеты инкубировали при 37°C, а затем оценивали количество белка FAM19A5, связанного с покрытым фрагментом белка LRRC4B, с использованием конъюгированного с HRP антитела к ротив FAM19A5 (1-65).

[0348] Как показано на фиг. 29А, из 19 различных тестируемых соединений KB2357 имело наибольший эффект, поскольку оно было способно снижать взаимодействие между FAM19A5 и покрытым фрагментом белка LRRC4B на около 10% по сравнению с контролями. Другие 18 тестируемых соединений не оказывали существенного эффекта по сравнению с контролями.

[0349] Затем для оценки того, может ли повышение концентрации химических соединений улучшить ингибирующий эффект, возрастающие концентрации соединений KB734, KB2310 и KB2357 подвергали такому же анализу конкурентного ингибирования, как описано выше. KB734 и KB2310 использовали в качестве отрицательных контролей, поскольку они не ингибировали взаимодействие между FAM19A5 и белком LRRC4B. Как показано на фиг. 29В, повышение концентрации соединения KB2357 приводило к более высокому снижению взаимодействия между FAM19A5 и фрагментом белка LRRC4B. Повышение концентрации KB734 и KB2310 не оказывало явного эффекта.

[0350] Для дополнительной оценки ингибирующего эффекта химического соединения KB2357 на белок FAM19A5 и членов семейства белков LRRC4 синтезировали следующие производные соединения KB2357, как описано ранее: (1) KB2304, (2) KB2305, (3) KB2308, (4) KB2309, (5) KB2314, (6) KB2315, (7) KB2324, (8) KB2325, (9) KB2328, (10) KB2329, (11) KB2336, (12) KB2337, (13) KB2350, (14) KB2356, (15) KB2358, (16) KB2359,

(17) KB2369, (18) KB2372 и (19) KB2399. Производные соединения также тестировали в анализе конкурентного ингибирования, как описано выше. Как видно на фиг. 30А и 30В, KB2356, KB2358 и KB2399 вели себя аналогично KB2357 и были способны дозозависимым образом снижать взаимодействие между членами семейства белков LRRC4 и FAM19A5.

[0351] Приведенные выше результаты подтверждают, что по меньшей мере химическое соединение KB2357 и несколько его производных (т.е. KB2356, KB2358 и KB2399) могут быть применимы для ингибирования, снижения и/или диссоциации взаимодействия между членами семейства белков LRRC4 и FAM19A5, в частности, при более высоких концентрациях (например, более или равных около 100 мкМ).

ПРИМЕР 18. МЕТОДЫ И МАТЕРИАЛ

[0352] В примерах, представленных в данном документе (см. выше) используется один или более из следующих методов.

Получение Аβ42

[0353] Пептид Аβ42 (№ 20276) приобретали у AnaSpec (Фремонт, США). Лиофилизированную аликвоту (1 мг) пептида Аβ42 растворяли в 80 мкл 1% NH₄OH, а затем в 920 мкл стерильного фосфатно-солевого буферного раствора (PBS) с получением маточного раствора с концентрацией 1 мг/мл (хранили в виде аликвот по 100 мкл при – 20°C). Рабочие растворы Аβ готовили за день до обработки путем разведения исходной концентрации до конечной концентрации пептида Аβ 100 нМ в среде Neurobasal (Gibco, Life Technologies, США). Рабочие растворы инкубировали при 4°C в течение 24 ч с получением олигомерных условий, как описано в Zheng *et al.*, *Amyloid* 20(1): 13-20 (2013), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В день использования рабочие растворы центрифугировали при 14000 g, 4 °C, 10 мин для очистки олигомерной фракции Аβ от фибрилл.

Первичная культура нейронов гиппокампа

[0354] Первичные нейроны гиппокампа получали от детенышей в постнатальном периоде (день 1 постнатального периода) C57BL/6 (Nara Biotech, Сеул, Корея), как описано ранее в Beaudoin *et al.*, *Nature protocols* 7(9): 1741-1754 (2012), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, корковый слой препарировали в забуференном солевом растворе Хэнка (HBSS) (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) и расщепляли 2,5% трипсином в течение 15 минут при 37 °C. Супернатант удаляли и ткани промывали HBSS. Ткани осторожно растирали, а диссоциированные клетки высевали из расчета 8×10⁵ клеток на чашку на стеклянные покровные стекла, покрытые поли-D-лизином, в культуральные чашки диаметром 60 мм в

минимальной среде Игла (MEM), дополненной 0,5% глюкозы, 1 мМ пирувата, 1,2 мМ L-глутамина и 12 % фетальной бычьей сыворотки. Через шесть часов после высевания среду заменяли средой Neurobasal (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США), дополненной 2% B-27 и 0,5 мМ L-глутамина. Клетки хранили при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂-увлажненным инкубаторе. Среду Neurobasal меняли наполовину каждые 3-4 дня.

Первичная культура спинальных мотонейронов

[0355] Первичные спинальные мотонейроны получали от детенышей в постнатальном периоде (день 1 постнатального периода) C57BL/6 (Nara Biotech, Сеул, Корея), как ранее описано в Eldeiry *et al.*, *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 125: 255856 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, спинной мозг препарировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS) (Gibco, Life Technologies, США) и расщепляли папаином (2,5 мг/мл) в течение 30 мин при 30°C. Супернатант центрифугировали и удаляли, а ткани промывали Hibernate A (Gibco, Life Technologies, США) с добавлением 2% B-27 и 0,5 мМ L-глутамина. Ткани осторожно растирали, а диссоциированные клетки высевали из расчета 3×10^5 клеток на лунку на покровные стекла, покрытые поли-D-лизином и ламинином (ThermoFisher Scientific, США), в 12-луночный планшет в среде Neurobasal (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) с добавлением 2% B-27 и 0,5 мМ L-глутамина. Клетки хранили при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂-увлажненным инкубаторе.

Иммуноокрашивание

[0356] Первичные нейроны фиксировали 4% параформальдегидом (PFA) при соответствующем DIV. Клетки блокировали 3% бычьим сывороточным альбумином (BSA) и 0,1% Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере (PBS) в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем первичные антитела наносили на клетки на ночь при 4°C. Первичными антителами, используемыми в данном исследовании, были антитела к Tau5 мыши (Invitrogen, Калифорния, США), антитела к PSD95 кролика (Invitrogen) и антитела к синаптофизину мыши (Sigma). После нескольких промываний PBS соответствующие флуоресцентные конъюгированные вторичные антитела наносили с Hoechst 33342 (Invitrogen) на 30 минут при комнатной температуре. Впоследствии изображения клеток получали с помощью конфокального микроскопа (Leica, Вецлар, Германия).

Количественный анализ синаптогенеза

[0357] Нейроны гиппокампа обрабатывали 6,6 нМ FB-21, 6,6 нМ FB-13-JM и 6,6 нМ FB-13-BBBX2 в 14, 17 и 20 DIV для определения уровня синаптогенеза в 21 DIV путем иммуноокрашивания SYP, пресинаптического маркерного белка и PSD95,

постсинаптического маркерного белка. Для количественной оценки интенсивность флуоресценции для SYN и PSD95 и количество колокализованных вокселей между сигналами SYN и PSD95, конфокальные изображения z-stack глубиной 3 мкм преобразовывали в 3D-изображения с использованием программного обеспечения IMARIS (IMARIS9.0, Bitplane AG, Цюрих, Швейцария). «Инструмент Surface» программного обеспечения IMARIS использовали для исключения всех сигналов, обнаруженных в телах нейронов, а количество колокализованных вокселей между сигналами SYN и PSD95 в нейритах рассчитывали с использованием «инструмента Coloc». Затем измеряли общую интенсивность флуоресценции SYN и PSD95 в нейритах.

Количественный анализ удлинения нейритов

[0358] Нейроны гиппокампа мыши обрабатывали пептидами LRRC4B в 1 и 2 DIV для определения роста нейритов. Его измеряли с использованием 3 различных параметров: общей длины нейритов, количества первичных и вторичных нейритов. После окрашивания нейронов бета-тубулином III в 3 DIV длину нейритов и точки ветвления измеряли с использованием Фиджи (Изображение J, NIH, Бетесда). Отдельные нейроны отбирали вручную, и эти параметры подсчитывали с помощью плагина Simple neurite tracer. Мотонейроны спинного мозга мыши, отобранные в день 1 постнатального периода, обрабатывали 10 нМ пептидов NS101 и LRRC4B (dFB-dWY-JM31 и dFB-DY-JM31) в 1 и 2 DIV и иммуноокрашивали антителом к Tau-5 в 3 DIV. Общая длина нейритов и количество сом на изображениях измеряли с помощью плагина Neurphology Image J.

Культура и дифференциация клеток LUHMES

[0359] Клетки-предшественники нейронов человека LUHMES получали из ATCC (CRL 2927). Как описано ранее в Harischandra *et al.*, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease* 1866(4): 165533 (2020), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Вкратце, пластиковые культуральные планшеты предварительно покрывали 50 мкг/мл поли-l-орнитина (Sigma Aldrich) на ночь, дважды промывали водой качества для клеточных культур (Invitrogen) в конце инкубации, а затем инкубировали с 1 мкг/мл фибронектина (Sigma) в течение ночи. Клетки пролиферировали в CO₂-инкубаторе, поддерживаемом при 37 °C, с использованием пролиферационной среды, состоящей из модифицированной среды Игла по Дульбекко (DMEM)/F12, добавки N-2 (1×), 2 mM L-глутамин и 40 нг/мл рекомбинантного основного фактор роста фибробластов (bFGF) (Sigma). Во время пролиферации половину среды меняли через день, а клетки ферментативно диссоциировали с помощью 0,025% трипсина и субкультивировали, когда культуры достигали 80% конfluence. Вкратце, $3,5 \times 10^6$

клеток высевали в предварительно покрытые колбы T75 в среде для пролиферации и инкубировали в течение 24 ч. Дифференцировку индуцировали на следующий день путем замены среды на свежеприготовленную среду для дифференцировки и инкубирования в течение 48 ч. Среда для дифференциации состояла из Advanced DMEM/F12, добавки N-2 (1×), 2 mM L-глутамина, 1 mM дибутирил-сАМР, 1 мкг/мл тетрациклина и 2 нг/мл рекомбинантного GDNF человека (R&D Systems). В конце 48-часовой инкубации клетки диссоциировали с помощью 0,025% трипсина/EDTA и пересевали на предварительно покрытые планшеты при плотности клеток $1,5 \times 10^5$ клеток/см² в среде для дифференцировки. После пересевания клеток среду для дифференцировки меняли через день, и, если не указано иное, все эксперименты проводили на пятый день дифференцировки.

Количественный анализ жизнеспособности клеток

[0360] Дифференцированные клетки LUNMES обрабатывали 10, 30, 100 нМ dFB-dWY-JM31 для определения уровня жизнеспособности клеток в отношении 5 мкМ гидробромида 6-гидроксидофамина (Tocris) с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo (Promega). Для определения уровня жизнеспособности клеток реагент CellTiter-Glo добавляли в соотношении 1:1 к среде культуры клеток, присутствующей в каждой лунке, и перемешивали содержимое на орбитальном шейкере для индуцирования лизиса клеток. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала, и сигнал люминесценции считывали в микропланшет-ридере (Synergy H1, Biotek). Каждый эксперимент проводили в трех повторностях.

Хроническая компрессия (CCI)

[0361] CCI проводили на здоровых субъектах, которые являются здоровыми в период привыкания. Дату первой операции назначали на день 0. Крыс SD извлекали из анестезиологической камеры и фиксировали. После стерилизации операционного поля повидоном (бетадином) и 70% спиртом разрезали кожу левой нижней конечности (0,5 см позади кожи и на расстоянии около 3~4 см параллельно бедренному отростку). Пинцетом делали небольшое отверстие и в отверстие вставляли изогнутый иглодержатель для отделения седалищного нерва от состояния притупленности. При наблюдении под микроскопом мембрану (фасцию) с обеих сторон седалищного нерва удерживали щипцами и надрезали микроножницами. Нерв перевязывали трижды на расстоянии 1 мм швом 4-0.

Измерение порога отдергивания лапы (PWT)

[0362] Каждую крысу приучали к тестовой среде в течение по меньшей мере 30

минут. Для измерения порога отдергивания лапы на 50% (PWT) использовали 0,4, 0,6, 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 и 15,0 г нитей фон Фрея. 2,0 г нити фон Фрея наносили на заднюю конечность крыс ССИ на 4-5 секунд. Когда у крысы проявлялись симптомы (поднимание лап или подергивание), дозу у крысы снижали на 2,0 г. Когда у крысы не проявлялось никаких симптомов, дозу у крысы повышали на 2,0 г. Таким образом последовательно наносили от 0,4 г до 15,0 г нитей фон Фрея. В момент возникновения измененной реакции (начиная с 2,0 г нити фон Фрея, времени, когда она начинала реагировать или когда она не начинала реагировать с 2,0 г нити фон Фрея), применяли в 5 раз больше стимуляций для получения PWT.

Измерение электроретинограммы (ERG) в мышинной модели диабетической ретинопатии (db/db)

[0363] Для оценки диабетической нейродегенерации сетчатки использовали мышей db/db и db/+. См., например, Bogdanov *et al.*, *PLoS One* 9(5): e97302 (2014), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. ERG фиксировали для измерения электрических сигналов, излучаемых сетчаткой в ответ на вспышки света. Каждую мышь подвергали офтальмологическому обследованию для тестирования ERG в соответствии со стандартом Международного общества клинической электрофизиологии зрения, и каждую мышь приучали в течение 12 часов в темной камере. После инъекции (через 6 недель и через 10 недель) проводили темновую адапционную ERG. Амплитуды b-волн ERG измеряли и сравнивали между группами, когда b-волны, вызванные интенсивностью света $-0,9 \log \text{кд} \cdot \text{см}^{-2}$. Анализ ERG проводили с помощью программы LabScribeERG (iWorx DataAcquisition Software).

Холодовая черепно-мозговая травма (TBI)

[0364] После анестезии мышей ингаляционным воздействием изофлурана каждую мышь стационарно помещали в стереотаксическое устройство. На средней линии черепа делали разрез длиной 3,0 мм. Холодовую TBI выполняли путем прикладывания кончика (2,5 мм) медного цилиндрического стержня, охлажденного жидким азотом (-80°C), к правой лобной части черепа на 45 секунд для создания криогенного повреждения. См., например, Keskin *et al.*, *Neural regeneration research* 12(5): 761-764 (2017), которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Через сорок восемь часов после травмы и через двадцать четыре часа после инъекции несущей среды или пептида dFB-dWY-JM31 посредством интраназального введения всех животных умерщвляли посредством сердечной перфузии.

Количественный анализ поражения головного мозга TBI

[0365] Головной мозг травмированных мышей удаляли и получали срезы головного мозга в общей сложности в виде 8-9 последовательных корональных срезов (толщиной 20 мкм) по всему головному мозгу, которые окрашивали красителем Hoechst (ThermoFisher, Уолтем, Массачусетс, США). Границу поврежденных и неповрежденных участков выделяли с помощью программы Image J (НИН, Бетесда, Мэриленд, США). Площадь повреждения оценивали путем вычитания площади непораженного ипсилатерального полушария из площади контрлатеральной стороны. Объем повреждения рассчитывали путем объединения этих пораженных участков. Все 8-9 сечений измеряли индивидуально и рассчитывали соответствующие объемы.

Статистический анализ

[0366] Весь статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., Калифорния, США), а данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего значения (SEM). Статистическую значимость оценивали с использованием t-критерия Стьюдента и/или однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с апостериорными критериями Бонферрони. Значение p менее 0,05 считалось статистически значимым.

[0367] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Краткое описание сущности изобретения» и «Реферат» указаны один или несколько, но не все иллюстративные аспекты настоящего изобретения, как это предусмотрено изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[0368] Настоящее изобретение было описано выше с помощью функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществление указанных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в настоящем документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[0369] Вышеизложенное описание конкретных аспектов полностью отражает общий характер настоящего изобретения, который другие могут, применяя знания в пределах уровня техники, легко модифицировать и/или адаптировать для различных путей применения таких конкретных аспектов, без излишнего экспериментирования, не отступая

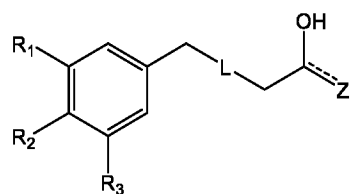
от общей концепции настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы находиться в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрываемых аспектов на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Следует понимать, что формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки настоящего описания должны интерпретироваться специалистом в данной области техники в свете инструкций и указаний.

[0370] Объем притязаний и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных аспектов, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

[0371] Все публикации, патенты, заявки на патенты, интернет-сайты и последовательности номеров доступа/баз данных (включая как полинуклеотидные, так и полипептидные последовательности), цитируемые в данном документе, настоящим включены посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка, интернет-сайт или номер доступа/последовательность базы данных были конкретно и отдельно указаны как включенные посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Молекула-миметик семейства белка 4, содержащего богатый лейцином повтор («LRRC4»), которая способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком-членом A5 семейства со сходством последовательностей 19, («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4.
2. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 1, которая не является антителом или его антигенсвязывающей частью.
3. Молекула-миметик семейства LRRC4, по п. 1 или п. 2, которая содержит пептид.
4. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 1 или п. 2, которая представляет собой малую молекулу.
5. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 4, которая представляет собой малую молекулу формулы (I):



(формула I),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

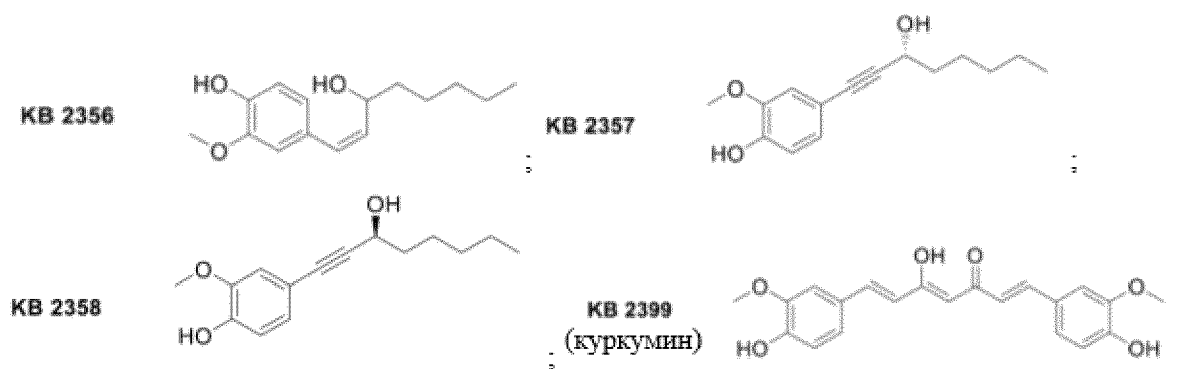
(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила;

(ii) --- представляет собой одинарную или двойную связь;

(iii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH-C(O)-CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, арил

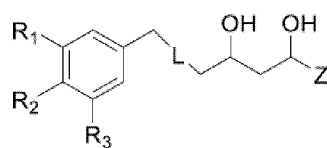
и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид, и

(iv) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и где молекула-миметик семейства LRRC4 не является малой молекулой, выбранной из:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

6. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 4, которая представляет собой малую молекулу формулы (II):



(формула II),

или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

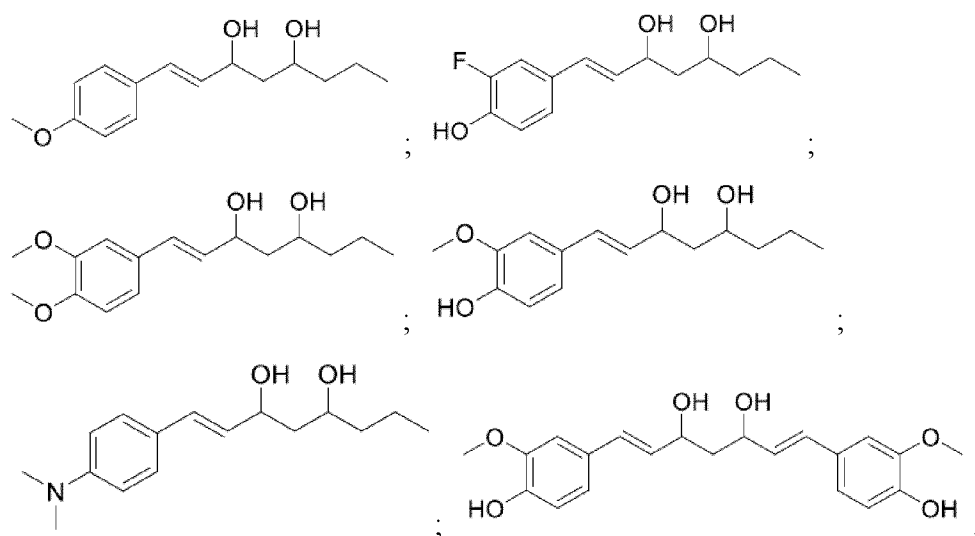
(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутокси, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, (C₃-C₈)циклоалкила, (C₅-C₈)циклоалкенила, (3-8-членного) гетероциклоалкила, (C₇-

C₁₄)бициклоалкила, (C₇-C₁₄)бициклоалкенила, (7-14-членного) гетеробициклоалкила, (C₆-C₁₀) арила, (5-10-членного) гетероарила и -CH=CH-Q, где Q представляет собой (C₃-C₈)циклоалкил, (C₅-C₈)циклоалкенил, (3-8-членный)гетероциклоалкил, (C₆-C₁₀)арил и (5-6-членный)гетероарил; где каждый циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклоалкил, арил и гетероарил необязательно замещен одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из (C₁-C₆)алкокси, (C₁-C₆)алкила, галогена, (C₁-C₆)галогеналкокси, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксиды, и

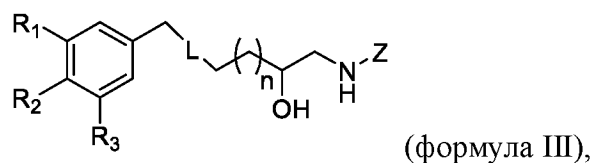
(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь.

7. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 6, которая выбрана из:



или ее фармацевтически приемлемая соль.

8. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 4, которая представляет собой малую молекулу формулы (III):



или ее фармацевтически приемлемую соль, где:

(i) R₁, R₂ и R₃ независимо выбраны из водорода, фтора, хлора, брома, метила, этила, н-пропила, изопропила, н-бутила, изобутила, трет-бутила, н-пентила, изо-пентила, фторметила, дифторметила, трифторметила, 2-фторэтила, 1-фторэтила, 2,2-дифторэтила, 1,2-дифторэтила, 1,1-дифторэтила, 2,2,2-трифторэтила, метокси, этокси, н-пропилокси, изопропилокси, н-бутоксиды, трифторметокси, дифторметокси, фторметокси, ацетила, пропионила, н-бутаноила, изобутаноила, н-пентаноила, нитро, amino, N-метиламино, N-этиламино, N-н-пропиламино, N,N-диметиламино, N-ацетиламино, N-пропиониламино, N-

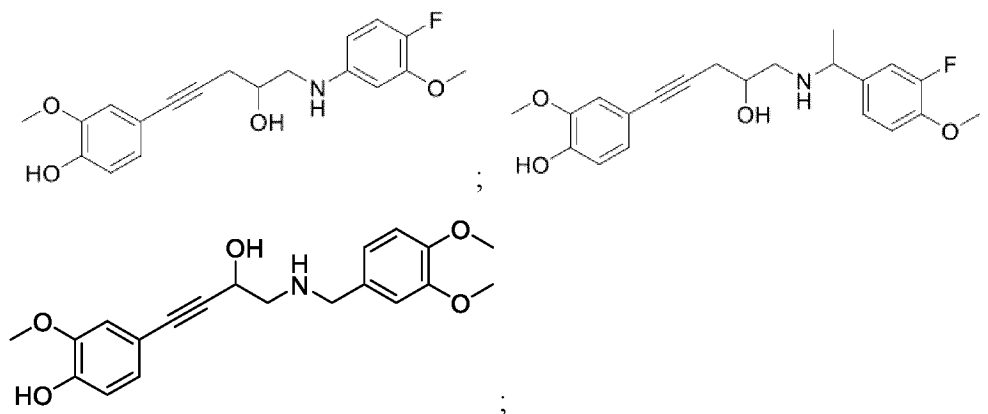
(трифторацетил)амино, формила, гидроксид, метилтио, этилтио, н-пропилтио, метилсульфонила, этилсульфонила, н-пропилсульфонила, фенила, гидроксиметила, 1-гидроксиэтила и 2-гидроксиэтила,

(ii) Z выбран из прямого или разветвленного (C₁-C₈)алкила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкенила, прямого или разветвленного (C₂-C₈)алкинила, -Y-(C₃-C₈)циклоалкила, -Y-(C₅-C₈)циклоалкенила, -Y-(3-8-членного) гетероциклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкила, -Y-(C₇-C₁₄)бициклоалкенила, -Y-(7-14-членного) гетеробициклоалкила, -Y-(C₆-C₁₀)арила и -Y-(5-10-членного) гетероарила, где Y представляет собой связь или C₁-C₃ прямой или разветвленный алкилен, и где циклоалкил, циклоалкенил, гетероциклический алкил, арил и гетероарил необязательно замещены одним, двумя, тремя, четырьмя или пятью заместителями, независимо выбранными из C₁-C₆алкокси, C₁-C₆алкила, галогена, C₁-C₆галогеналкокси, нитро, амино, N-метиламино, N-этиламино, N,N-пропиламино, N,N-диметиламино, формила и гидроксид,

(iii) L представляет собой одинарную, двойную или тройную связь, и

(iv) n равно 0 или 1.

9. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 8, которая выбрана из:



или ее фармацевтически приемлемой соли.

10. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-3, которая содержит полипептид, содержащий, состоящий из или по сути состоящий из домена члена семейства белков LRRC4, где домен способен связываться с белком FAM19A5 («FAM19A5-связывающий домен»), и где полипептид является более коротким, чем соответствующий полноразмерный член семейства белков LRRC4 (SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 5; или SEQ ID NO: 6).

11. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 10, где длина FAM19A5-связывающего домена составляет от около 10 до около 23 аминокислот.

12. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 11, где длина FAM19A5-связывающего домена составляет около 10, около 11, около 12, около 13, около 14, около 15, около 16,

около 17, около 18, около 19, около 20, около 21, около 22 или около 23 аминокислот.

13. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 12, где длина FAM19A5-связывающего домена составляет около 10 аминокислот.

14. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-13, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV), где:

(i) A содержит X1-(T/S)-(Y/F)-F-X5; где:

X1 представляет собой тирозин (Y), фенилаланин (F), валин (V), лейцин (L) или изолейцин (I);

(T/S) представляет собой треонин (T) или серин (S);

(Y/F) представляет собой тирозин (Y) или фенилаланин (F); и

X5 представляет собой любую аминокислоту; и

(ii) B содержит (V/I)-T-V-(E/V); где:

(V/I) представляет собой валин (V) или изолейцин (I); и

(E/V) представляет собой глутаминовую кислоту (E) или валин (V).

15. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-13, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к C-концу):

A-(T/S)-B (формула IV), где:

(i) A содержит (Y/W/M)-(T/Y)-(Y/W)-(F/Y/W)-(T/Y); где:

(Y/W/M) представляет собой тирозин (Y), триптофан (W) или метионин (M);

(T/Y) представляет собой треонин (T) или тирозин (Y);

(Y/W) представляет собой тирозин (Y) или триптофан (W); и

(F/Y/W) представляет собой фенилаланин (F), тирозин (Y) или триптофан (W); и

(ii) B содержит X7-(T/S/Y)-X9-X10; где:

X7 представляет собой валин (V), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M);

(T/S/Y) представляет собой треонин (T), серин (S) или тирозин (Y);

X9 представляет собой валин (V), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), лейцин (L), триптофан (W) или метионин (M); и

X10 представляет собой глутаминовую кислоту (E), аспарагиновую кислоту (D), изолейцин (I), тирозин (Y), фенилаланин (F), метионин (M) или триптофан (W).

16. Молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит

аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу (от N-конца к С-концу):

X1-X2-X3-F-X5-T-X7-T-V-X10 (формула V), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L или I;

X2 представляет собой T или S;

X3 представляет собой Y или F;

X5 представляет собой любую аминокислоту;

X7 представляет собой V или I; и/или

X10 представляет собой E или V, и

где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

17. Молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую следующую формулу: (от N-конца к С-концу):

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10 (формула VI), где:

X1 представляет собой Y, F, V, L, I, W или M;

X2 представляет собой T, S или Y;

X3 представляет собой Y, F или W;

X4 представляет собой F, Y или W;

X5 представляет собой любую аминокислоту, например, T, S или Y;

X6 представляет собой T, S или Y;

X7 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M;

X8 представляет собой T, S или Y;

X9 представляет собой V, I, Y, F, L, W или M; и/или

X10 представляет собой E, D, V, I, Y, F, M или W, и

где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

18. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 17, где X1 представляет собой Y, F, V, L или I.

19. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 17 или п. 18, где X2 представляет собой T или S.

20. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-19, где X3 представляет

собой Y или F.

21. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-20, где X4 представляет собой F.
22. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-21, где X5 представляет собой T или S.
23. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-22, где X6 представляет собой T.
24. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-23, где X7 представляет собой V или I.
25. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-24, где X8 представляет собой T.
26. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-25, где X9 представляет собой V.
27. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 17-26, где X10 представляет собой E или V.
28. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE).
29. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE).
30. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVETTEISPEDTTRK).
31. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 20 (NYSFFTTVTVETTEISPEDTTRK).
32. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE).
33. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 30 (YSFFTTVTVE).
34. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVETMEPSQDERTTR).

35. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 21 (NFSYFSTVTVETMEPSQDERTTR).

36. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE).

37. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 31 (FSYFSTVTVE).

38. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE).

39. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-27, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18 (GYTYFTTVTVETLETQPGEE).

40. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 30 или п. 31, где аминокислотные остатки T12 и L13 являются модифицированными (например, замещенными) относительно соответствующих остатков SEQ ID NO: 18.

41. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 32, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 123-142.

42. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 32, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 123-142.

43. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 40-42, где один или более аминокислотных остатков находятся в форме D-аминокислоты.

44. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ).

45. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 17 (GYTYFTTVTVETLETQ).

46. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19

(GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD).

47. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 19 (GYTYFTTVTVETLETQPGEKEPPGPTTD).

48. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA).

49. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-19, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 143 (GYTYFTTVTVETLETQPGEEA).

50. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 47 или п. 48, где аминокислотные остатки T12 и L13 являются модифицированными (например, замещенными) относительно соответствующих остатков SEQ ID NO: 143.

51. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 50, где полипептид содержит аминокислотную последовательность, представленную в любой из SEQ ID NO: 123-149.

52. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 50, где полипептид состоит из аминокислотной последовательности, представленной в любой из SEQ ID NO: 123-149.

53. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 16-52, где аминокислота в положении X2 является фосфорилированной или O-гликозилированной.

54. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-53, где полипептид конъюгирован с фрагментом.

55. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 54, где фрагмент способен усиливать одно или более из следующих свойств полипептида: (1) аффинность связывания с белком FAM19A5, (2) растворимость, (3) устойчивость к расщеплению под действием протеазы и/или пептидазы, (4) пригодность для введения *in vivo*, (5) способность ингибировать взаимодействие членов семейства белков FAM19A5-LRRC4 или (6) любую комбинацию (1)-(5).

56. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 53 или п. 54, где указанный фрагмент содержит юкстамембранную последовательность членов семейства белков LRRC4.

57. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 56, где юкстамембрана содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK).

58. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 56, где юкстамембрана состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO:

152 (IDEVMKTTK).

59. Молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95% или по меньшей мере около 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 29 (YTYFTTVTVE), где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

60. Молекула-миметик семейства LRRC4, содержащая полипептид, который содержит аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 75%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 85%, по меньшей мере около 90%, по меньшей мере около 95%, по меньшей мере около 96%, по меньшей мере около 97%, по меньшей мере около 98% или около 99% идентична аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6, и содержит по меньшей мере одну аминокислотную модификацию относительно аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 6 соответственно, и где полипептид способен связываться с белком FAM19A5 и тем самым ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

61. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 60, где по меньшей мере одна аминокислотная модификация повышает связывание полипептида с белком FAM19A5.

62. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 60 или п. 61, где по меньшей мере одна аминокислотная модификация повышает стабильность полипептида.

63. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 61 или п. 62, где повышение связывания и/или стабильности улучшает способность полипептида ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4.

64. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 63, где способность полипептида ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышается в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40

раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с соответствующим полипептидом без по меньшей мере одной аминокислотной модификации.

65. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-64, где аминокислотный остаток в положении 453 SEQ ID NO: 5 представляет собой Т или модифицирован до S или Y.
66. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-65, где аминокислотный остаток в положении 454 SEQ ID NO: 5 представляет собой Т или модифицирован до S или Y.
67. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-66, где аминокислотный остаток в положении 449 SEQ ID NO: 5 представляет собой Y или модифицирован до F, V, L, I, W или M.
68. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-67, где аминокислотный остаток в положении 450 SEQ ID NO: 5 представляет собой Т или модифицирован до S или Y.
69. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-68, где аминокислотный остаток в положении 451 SEQ ID NO: 5 представляет собой Y или модифицирован до F или W.
70. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-69, где аминокислотный остаток в положении 452 SEQ ID NO: 5 представляет собой F или модифицирован до Y или W.
71. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-70, где аминокислотный остаток в положении 455 SEQ ID NO: 5 представляет собой V или модифицирован до I, Y, F, L, W или M.
72. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-71, где аминокислотный остаток в положении 456 SEQ ID NO: 5 представляет собой Т или модифицирован до S или Y.
73. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-72, где аминокислотный остаток в положении 457 SEQ ID NO: 5 представляет собой V или модифицирован до I, Y, F, L, W или M.
74. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-73, где аминокислотный остаток в положении 458 SEQ ID NO: 5 представляет собой E или модифицирован до D, V, I, Y, F, M или W.
75. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-74, где один или более аминокислотных остатков находятся в D-форме.

76. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 75, где аминокислота в D-форме находится на N-конце, C-конце или на обоих.
77. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 60-76, которая конъюгирована с фрагментом.
78. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 77, где указанный фрагмент способен усиливать одно или более из следующих свойств полипептида: (1) аффинность связывания с белком FAM19A5, (2) растворимость, (3) устойчивость к расщеплению под действием протеазы и/или пептидазы, (4) пригодность для введения *in vivo*, (5) способность ингибировать взаимодействие членов семейства белков FAM19A5-LRRC4 или (6) любую комбинацию (1)-(5).
79. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 77 или п. 78, где указанный фрагмент содержит юкстамембранную последовательность членов семейства белков LRRC4.
80. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 79, где юкстамембрана содержит последовательность, представленную в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK).
81. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 79, где юкстамембрана состоит из последовательности, представленной в SEQ ID NO: 151 (LDEVMTTK) или SEQ ID NO: 152 (IDEVMTTK).
82. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-81, которая не содержит трансмембранный домен и/или внутриклеточный домен членов семейства белков LRRC4.
83. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-82, которая способна конкурировать с членом семейства белков LRRC4 за связывание с белком FAM19A5.
84. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-83, где член семейства белков LRRC4 включает белок LRRC4, белок LRRC4B, белок LRRC4C или их комбинации.
85. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-84, которая дополнительно содержит одну или более дополнительных аминокислот на N-конце полипептида, C-конце полипептида или как на N-конце, так и на C-конце полипептида.
86. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 85, где одна или более дополнительных аминокислот представляют собой гидрофильные аминокислоты.
87. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 85 или п. 86, где одна или более дополнительных аминокислот представляют собой D-аминокислоты.
88. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-87, где N-конец, C-конец или как N-конец, так и C-конец полипептида содержат модификацию, которая повышает стабильность полипептида.

89. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 88, где модификация включает Fmoc, ПЭГилирование, ацетилирование, метилирование, циклизацию или их комбинации.
90. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-89, которая представляет собой слитый белок.
91. Молекула-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-90 дополнительно содержащая продлевающий период полужизни фрагмент.
92. Молекула-миметик семейства LRRC4 по п. 91, где продлевающий период полужизни фрагмент содержит Fc, альбумин, альбумин-связывающий полипептид, Pro/Ala/Ser (PAS), C-концевой пептид (СТР) β -субъединицы хорионического гонадотропина человека, полиэтиленгликоль (ПЭГ), длинные неструктурированные гидрофильные последовательности аминокислот (XTEN), гидроксипропилкрахмал (HES), альбумин-связывающую малую молекулу или их комбинацию.
93. Нуклеиновая кислота, кодирующая молекулу-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-92.
94. Нуклеиновая кислота по п. 93, которая представляет собой ДНК или РНК.
95. Нуклеиновая кислота по п. 94, которая представляет собой мРНК.
96. Нуклеиновая кислота по любому из пп. 93-95, содержащая аналог нуклеиновой кислоты.
97. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп. 93-96.
98. Клетка, содержащая вектор по п. 97.
99. Белковый конъюгат, содержащий молекулу-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 10-92, связанную с агентом.
100. Композиция, содержащая молекулу-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-92, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 93-96, вектор по п. 97, клетку по п. 98 или белковый конъюгат по п. 99.
101. Композиция по п. 100, которая дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель.
102. Набор, содержащий молекулу-миметик семейства LRRC4 по любому из пп. 1-92, нуклеиновую кислоту по любому из пп. 93-96, вектор по п. 97, клетку по п. 98, белковый конъюгат по п. 99 или композицию по п. 100 или п. 101 и инструкцию по применению.
103. Способ получения молекулы, которая способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4, включающий синтез молекулы по любому из пп. 1-9 или культивирование клетки по п. 98 в подходящих условиях, тем самым обеспечивая получение молекулы.

104. Способ по п. 103, дополнительно включающий выделение полученной молекулы.
105. Способ повышения удлинения нейритов и/или образования синапсов в нейронах, включающий приведение нейрона в контакт с молекулой-миметиком семейства LRRC4 по любому из пп. 1-92, нуклеиновой кислотой по любому из пп. 93-96, вектором по п. 97, клеткой по п. 98, белковым конъюгатом по п. 99 или композицией по п. 100 или п. 101.
106. Способ по п. 105, где приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта, нуждающегося в этом.
107. Способ по п. 106, который включает введение молекулы-миметика семейства LRRC4, нуклеиновой кислоты, вектора, клетки, белкового конъюгата или композиции субъекту перед приведением в контакт.
108. Способ по п. 107, где приведение в контакт происходит *ex vivo*.
109. Способ по любому из пп. 105-108, где приведение в контакт повышает удлинение нейритов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, удлинением нейритов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).
110. Способ по любому из пп. 105-109, где приведение в контакт повышает образование синапсов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, образованием синапсов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).
111. Способ по любому из пп. 105-110, где повышение удлинения нейритов и/или образование синапсов уменьшает один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, выбранным из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.
112. Способ ингибирования или снижения образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4 по любому из пп.

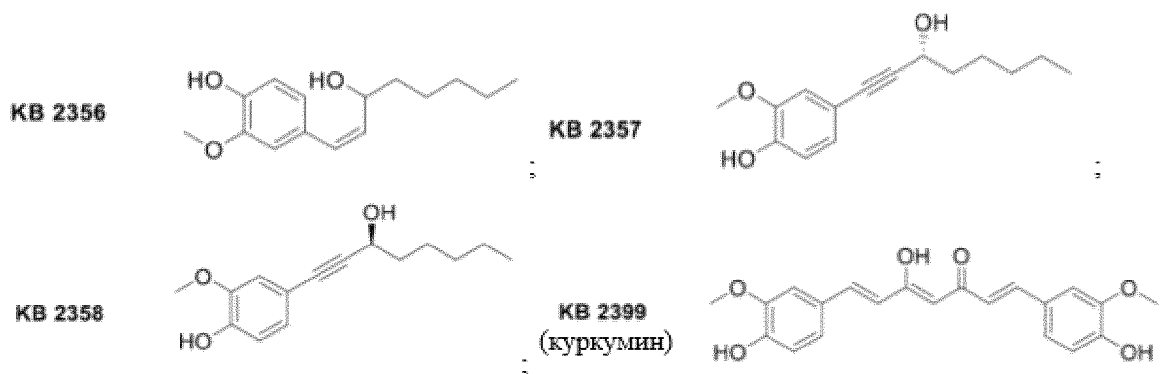
1-92, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 93-96, вектора по п. 97, клетки по п. 98, белкового конъюгата по п. 99 или композиции по п. 100 или п. 101.

113. Способ по п. 112, где образование комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% после введения.

114. Способ по п. 112 или п. 113, где снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышает активность члена семейства белков LRRC4 у субъекта.

115. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4 по любому из пп. 1-92, нуклеиновой кислоты по любому из пп. 93-96, вектора по п. 97, клетки по п. 98, белкового конъюгата по п. 99 или композиции по п. 100 или п. 101, где заболевание или состояние выбрано из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

116. Способ повышения удлинения нейритов и/или образования синапсов в нейронах, включающий приведение нейрона в контакт с молекулой-миметиком семейства белка 4, содержащего богатый лейцином повтор («LRRC4»), где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком-членом A5 семейства со сходством последовательностей 19, («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:



или ее фармацевтически приемлемую соль.

117. Способ по п. 116, где приведение в контакт происходит *in vivo* у субъекта,

нуждающегося в этом.

118. Способ по п. 117, который включает введение субъекту молекулы-миметика семейства LRRC4 перед приведением в контакт.

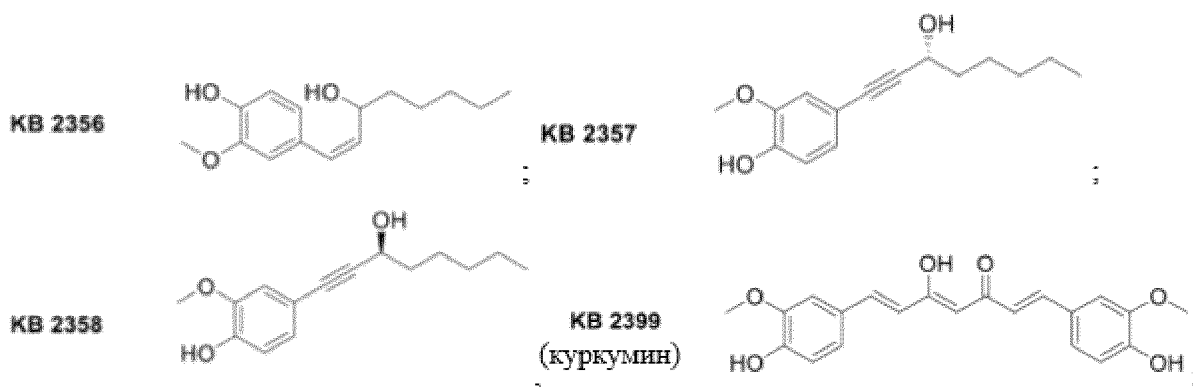
119. Способ по п. 118, где приведение в контакт происходит *ex vivo*.

120. Способ по любому из пп. 116-119, где приведение в контакт повышает удлинение нейритов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, удлинением нейритов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).

121. Способ по любому из пп. 116-120, где приведение в контакт повышает образование синапсов в нейроне в по меньшей мере около 0,5 раза, по меньшей мере около 1 раз, по меньшей мере около 2 раза, по меньшей мере около 3 раза, по меньшей мере около 4 раза, по меньшей мере около 5 раз, по меньшей мере около 10 раз, по меньшей мере около 20 раз, по меньшей мере около 30 раз, по меньшей мере около 40 раз или по меньшей мере около 50 раз по сравнению с эталоном (например, образованием синапсов в соответствующем нейроне, который не приводили в контакт).

122. Способ по любому из пп. 116-121, где повышение удлинения нейритов и/или образование синапсов уменьшает один или более симптомов, ассоциированных с заболеванием или состоянием, выбранным из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы, диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

123. Способ ингибирования или снижения образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства белка 4, содержащего богатый лейцином повтор («LRRC4»), где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком- членом A5 семейства со сходством последовательностей 19, («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:

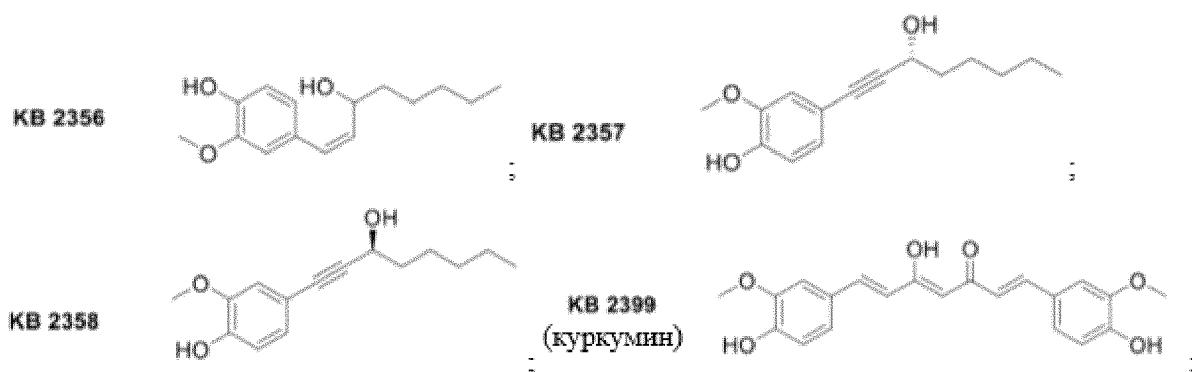


или ее фармацевтически приемлемую соль.

124. Способ по п. 123, где образование комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 снижается на по меньшей мере около 5%, по меньшей мере около 10%, по меньшей мере около 20%, по меньшей мере около 30%, по меньшей мере около 40%, по меньшей мере около 50%, по меньшей мере около 60%, по меньшей мере около 70%, по меньшей мере около 80%, по меньшей мере около 90% или около 100% после введения.

125. Способ по п. 123 или п. 124, где снижение образования комплекса между белком FAM19A5 и членом семейства белков LRRC4 повышает активность члена семейства белков LRRC4 у субъекта.

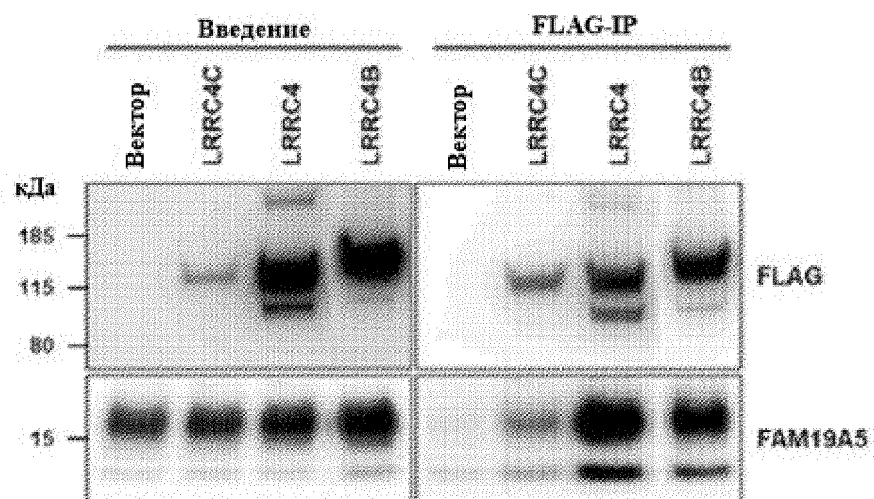
126. Способ лечения заболевания или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту молекулы-миметика семейства 4, содержащего богатые лейцином повторы («LRRC4»), где молекула-миметик семейства LRRC4 способна ингибировать, снижать и/или диссоциировать взаимодействие между белком-членом A5 семейства со сходством последовательностей 19, («FAM19A5») и членом семейства белков LRRC4, где молекула-миметик семейства LRRC4 представляет собой малую молекулу, выбранную из:



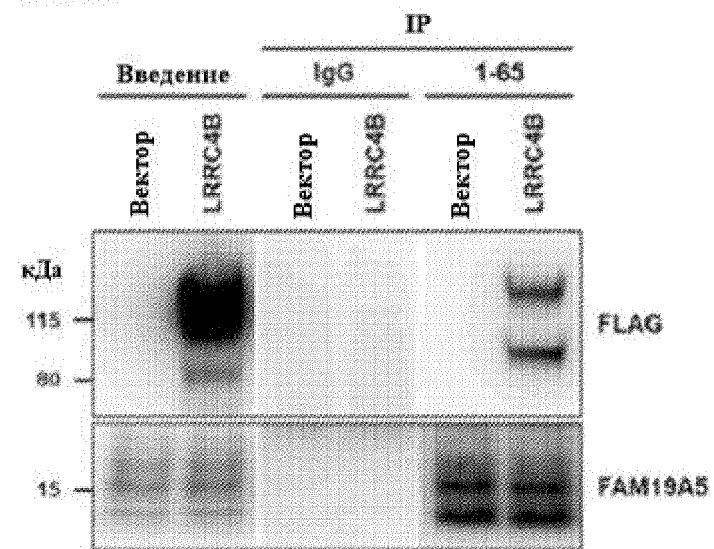
или его фармацевтически приемлемую соль, и где заболевание или состояние выбрано из бокового амиотрофического склероза (ALS), болезни Альцгеймера, глаукомы,

диабетической ретинопатии, нейропатической боли, повреждения спинного мозга, черепно-мозговой травмы, инсульта, болезни Паркинсона или их комбинаций.

Фиг. 1А



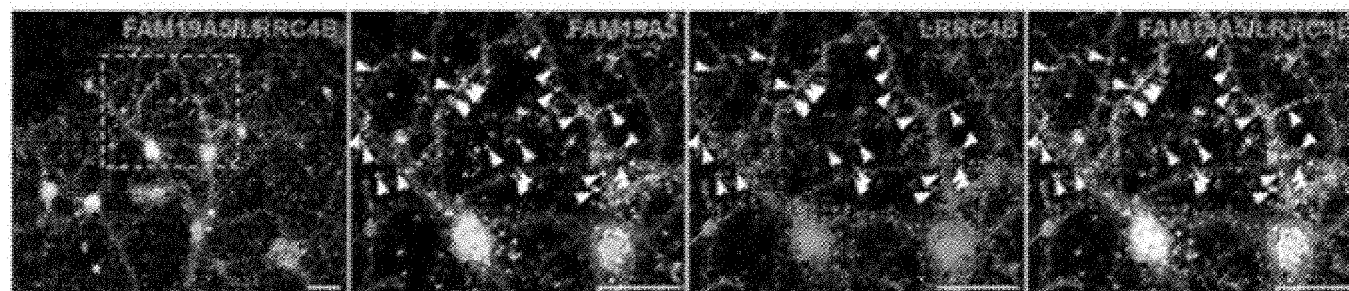
Фиг. 1В



Фиг. 1С

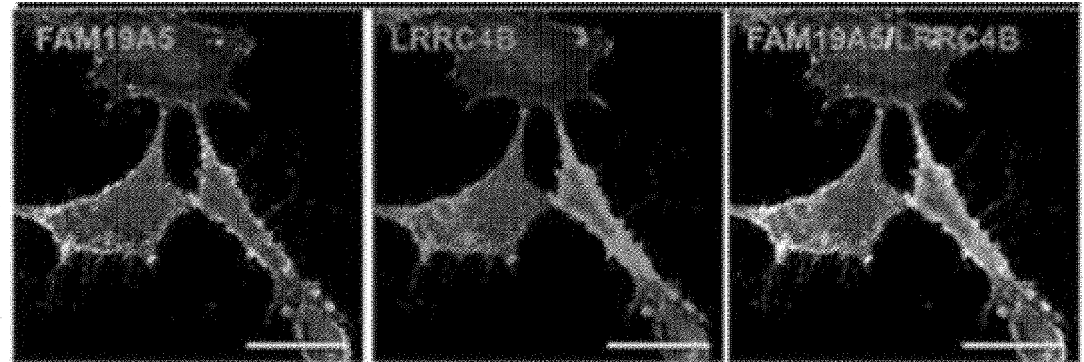


Фиг. 1D



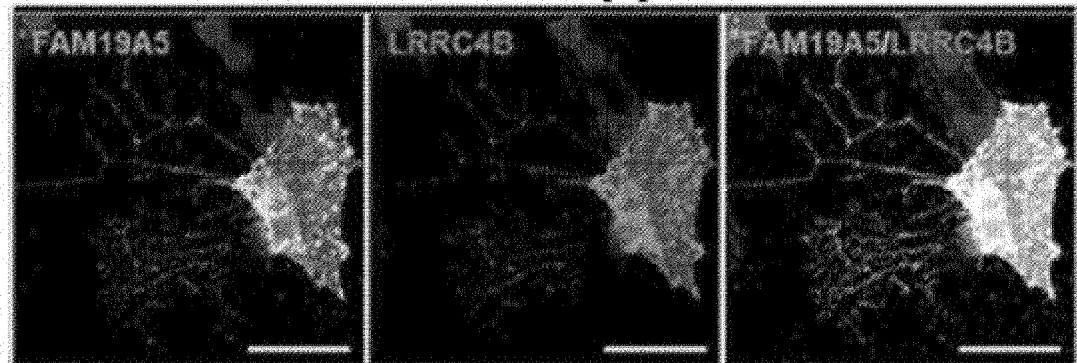
Фиг. 2А

FAM19A5, изоформа 1

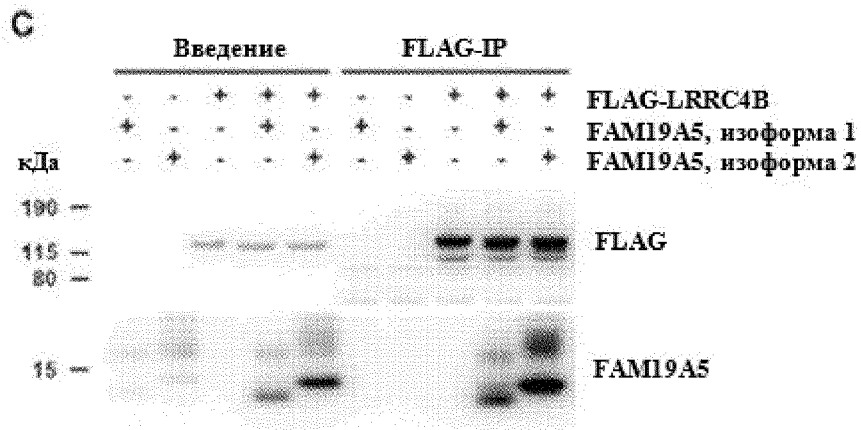


Фиг. 2В

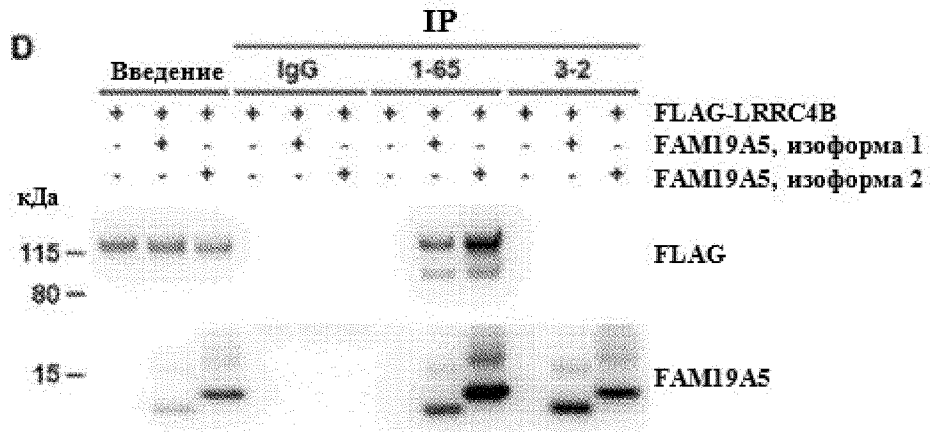
FAM19A5, изоформа 2



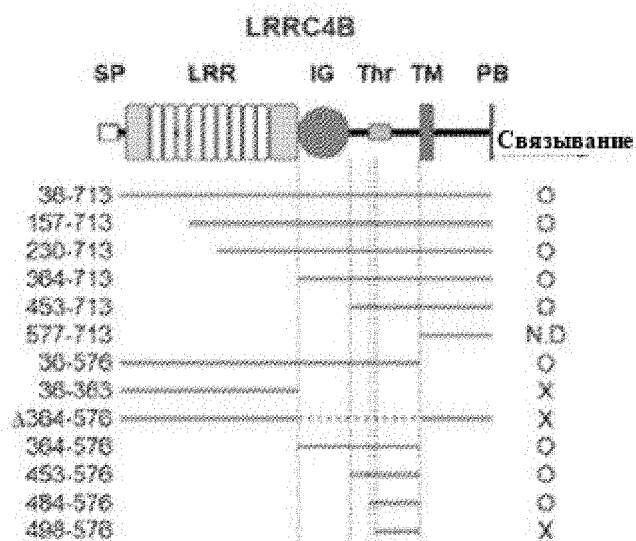
Фиг. 2С



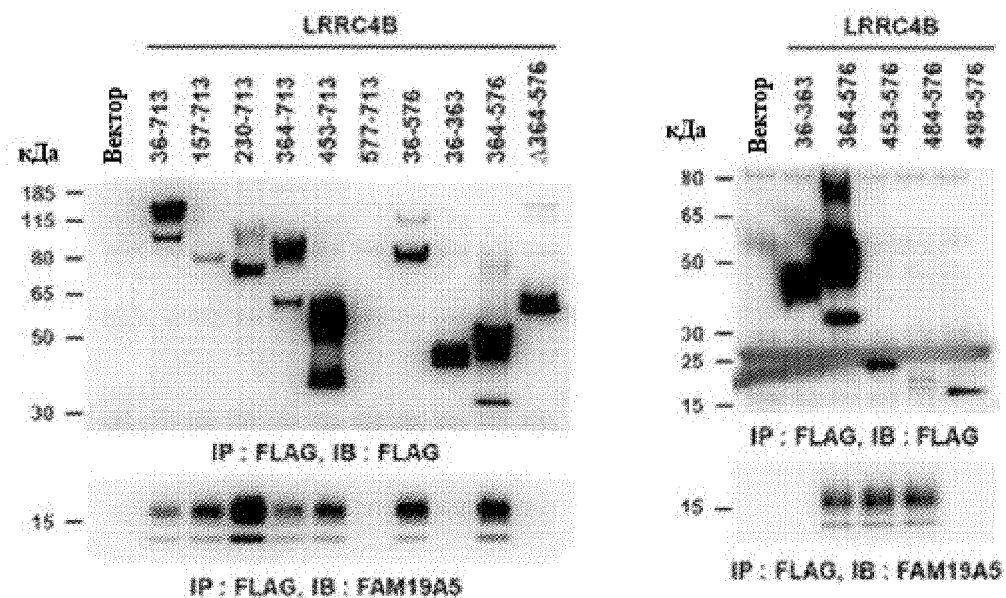
Фиг. 2D



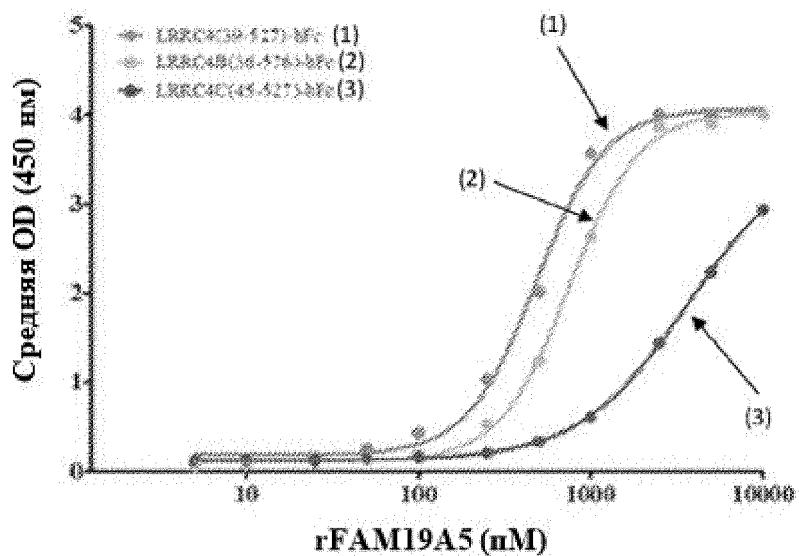
Фиг. 3А



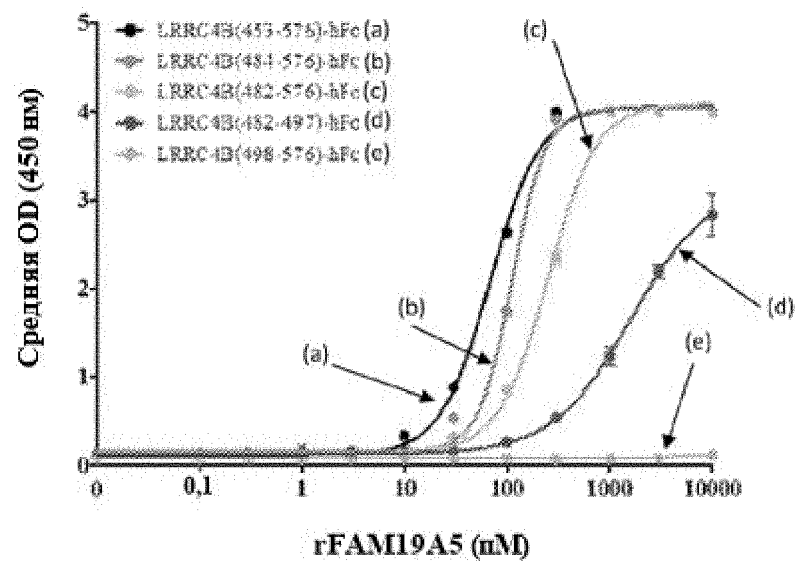
Фиг. 3В



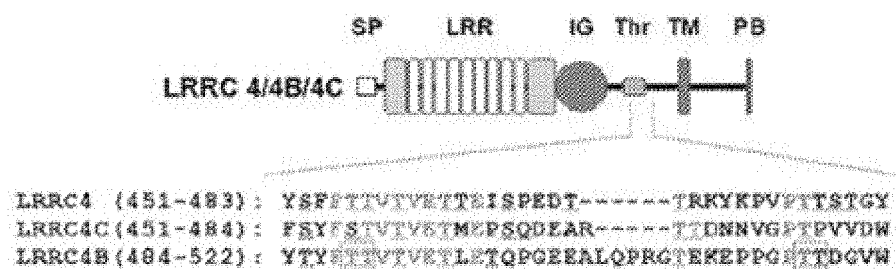
Фиг. 4А



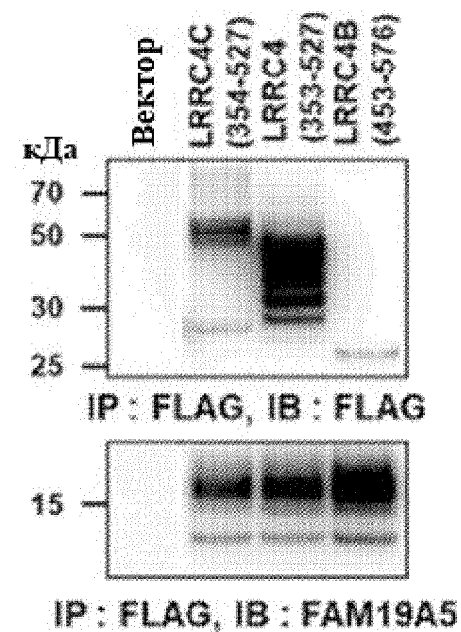
Фиг. 4В



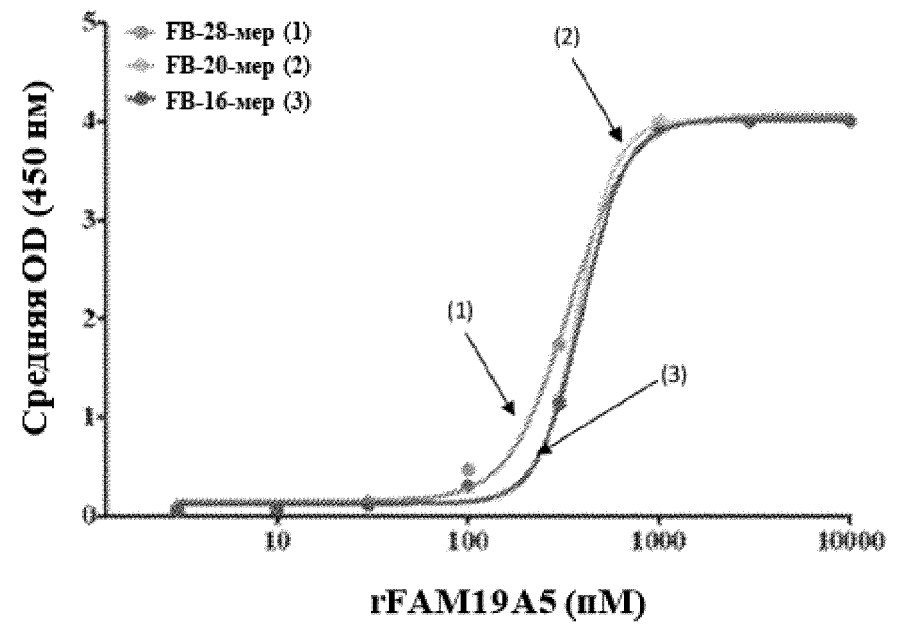
Фиг. 5А



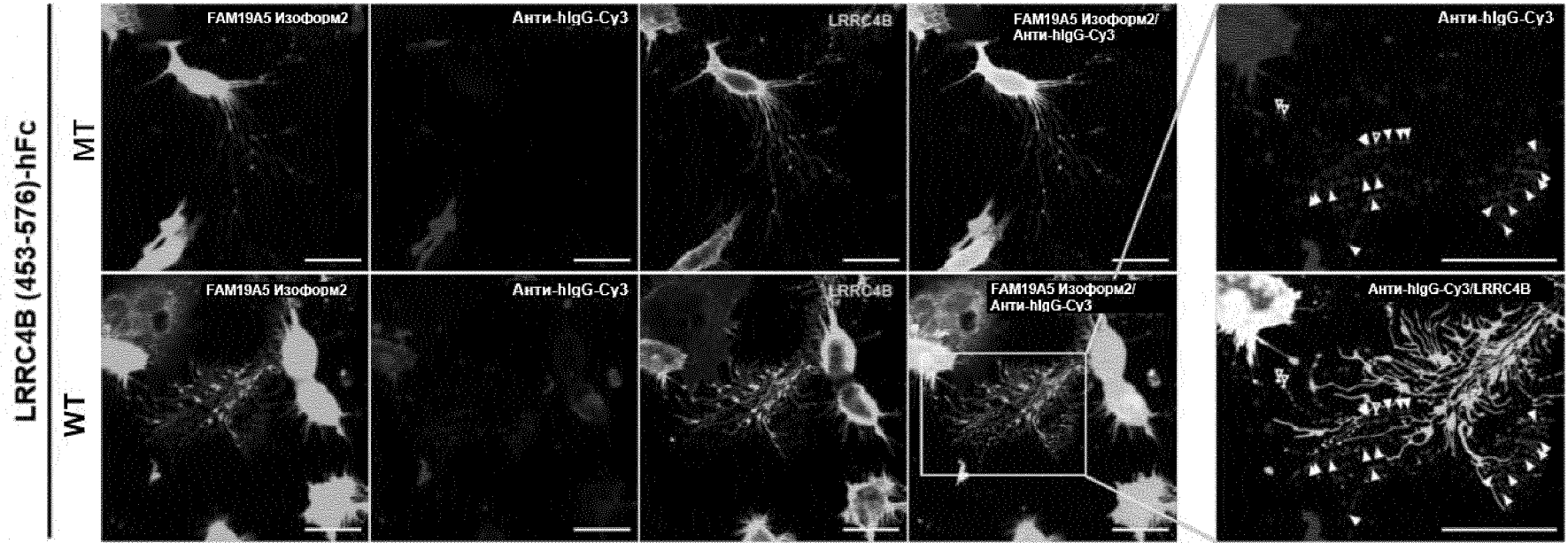
Фиг. 5В



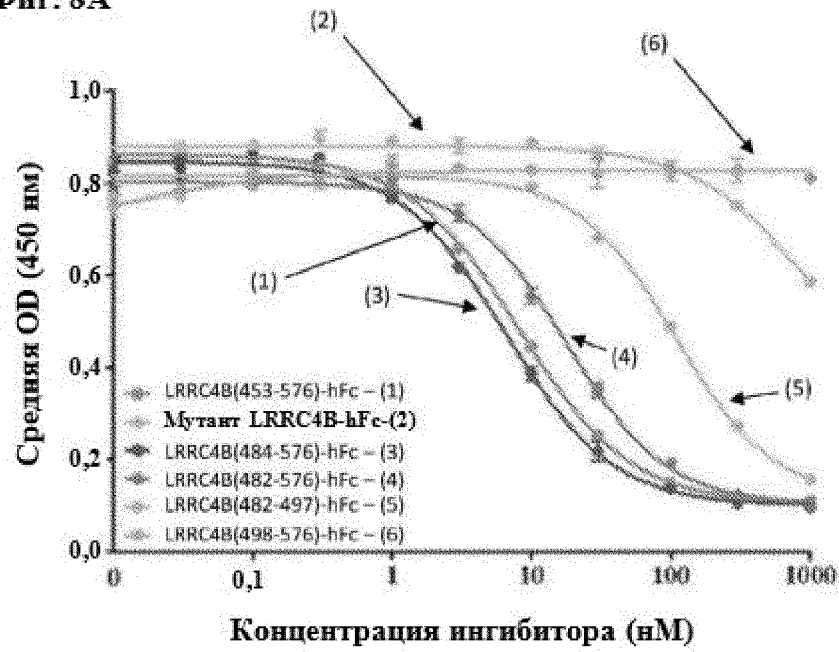
Фиг. 6



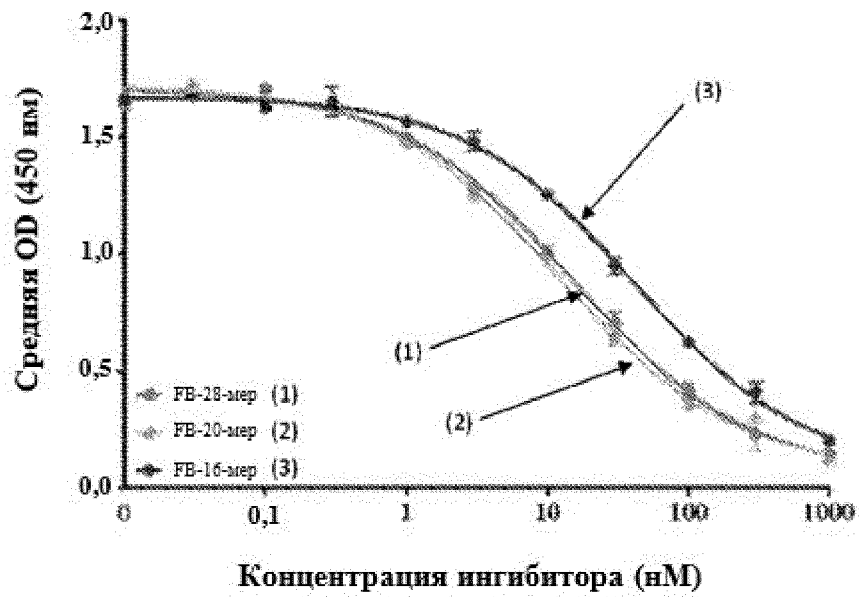
Фиг. 7



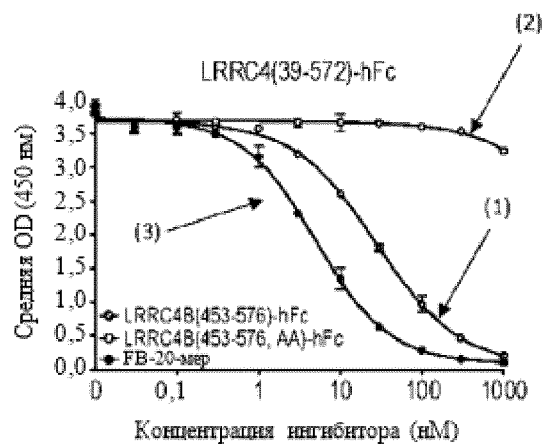
Фиг. 8А



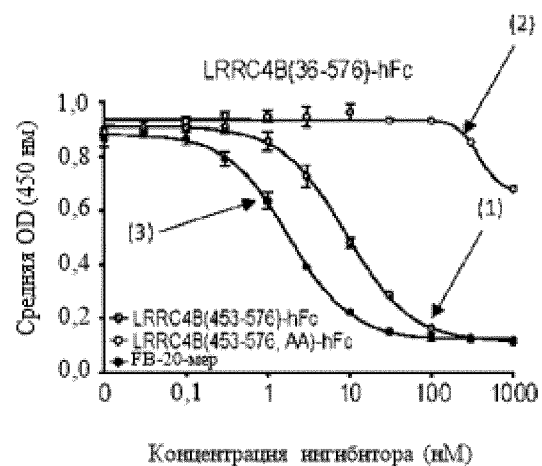
Фиг. 8В



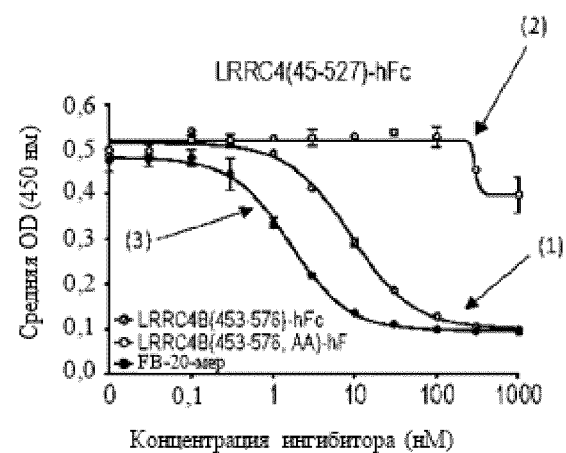
Фиг. 9А



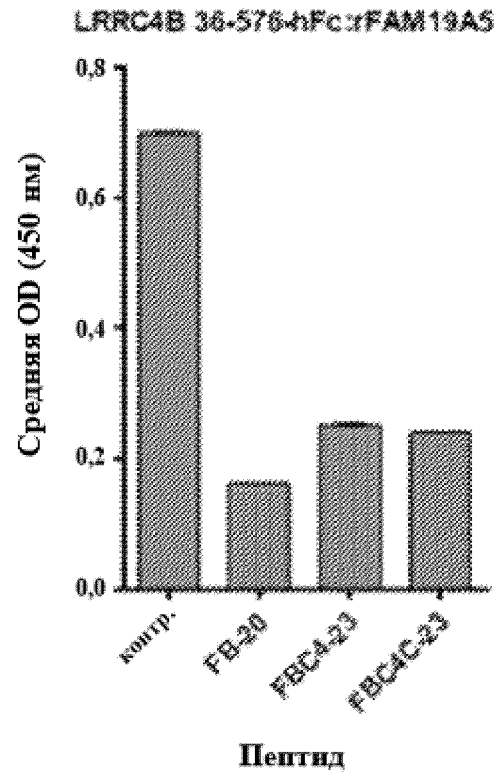
Фиг. 9В



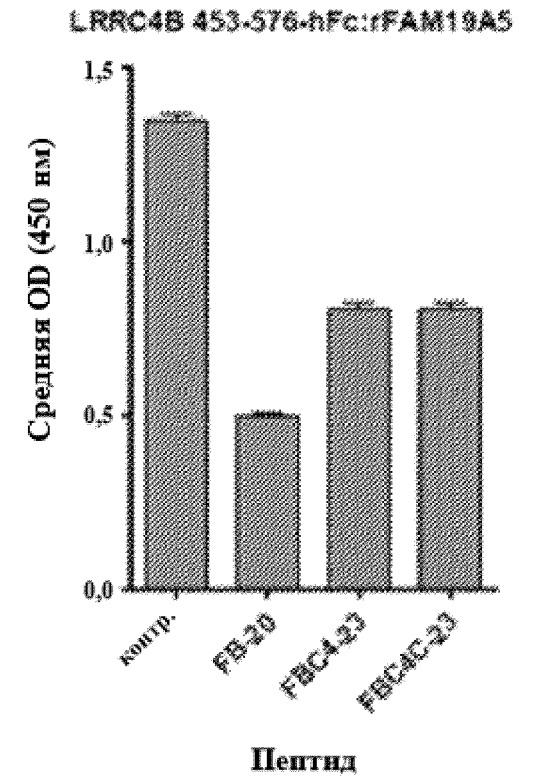
Фиг. 9С



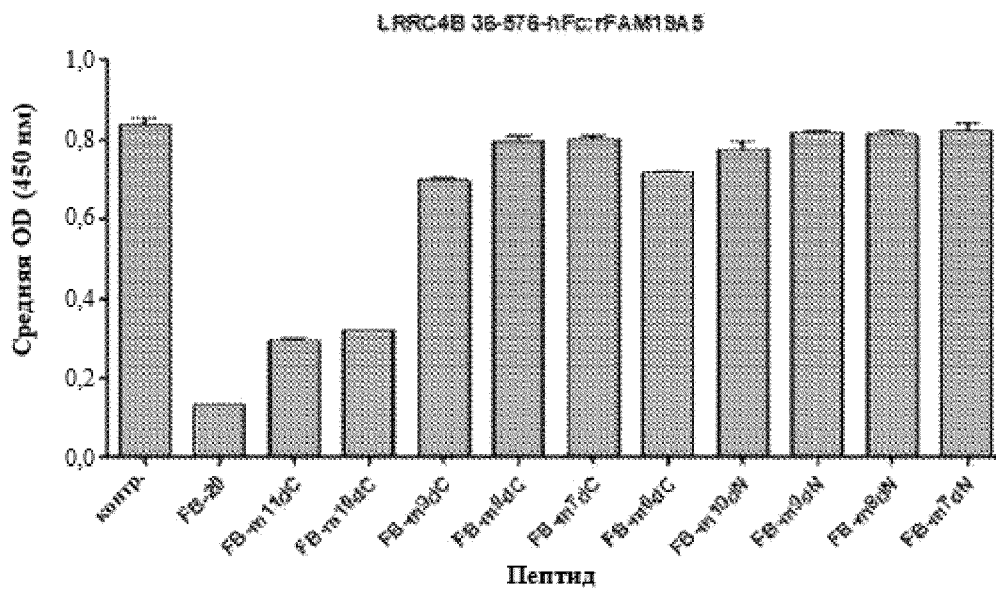
Фиг. 10А



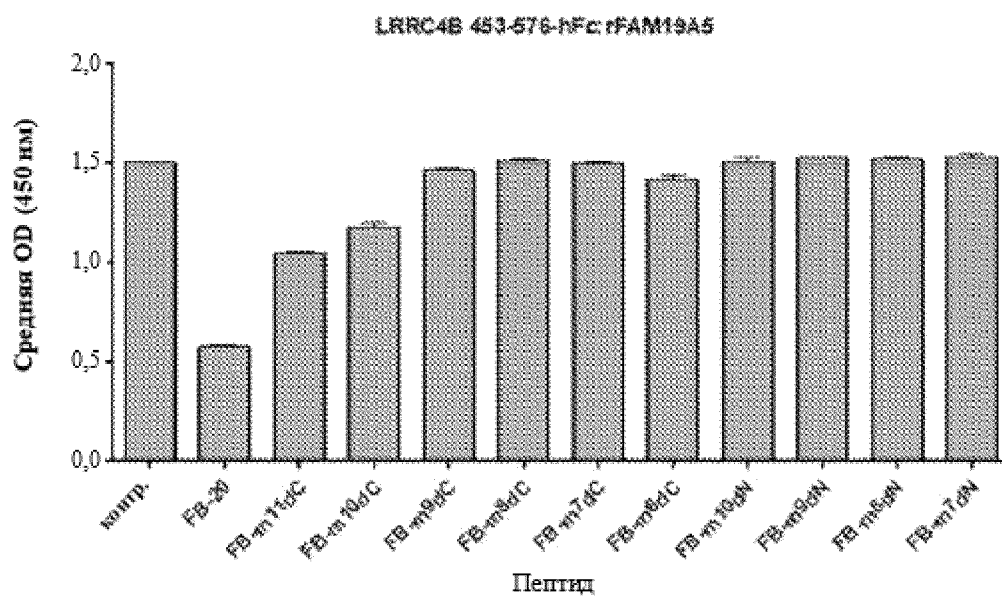
Фиг. 10В



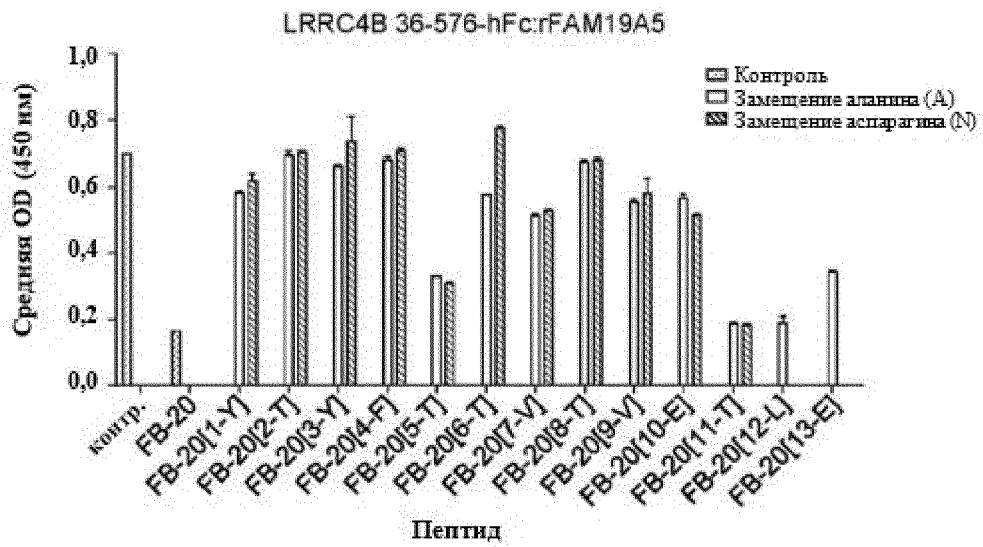
Фиг. 11А



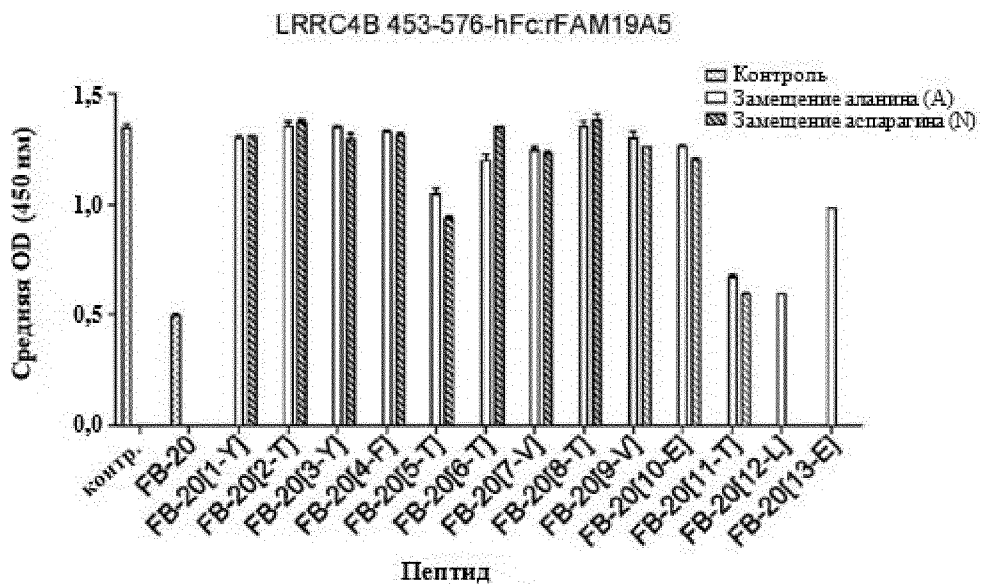
Фиг. 11В



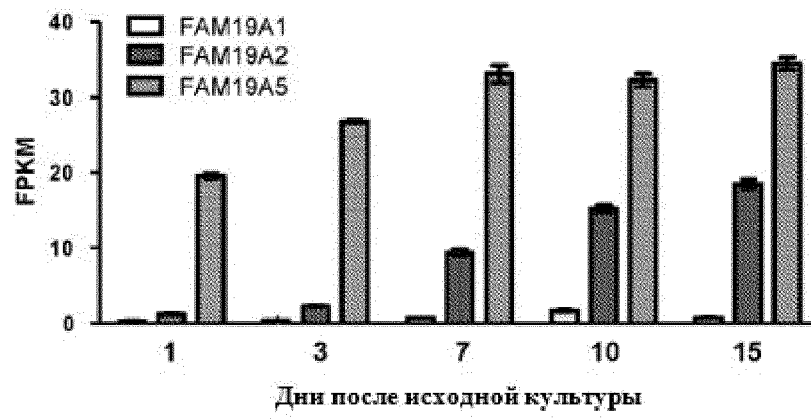
Фиг. 12А



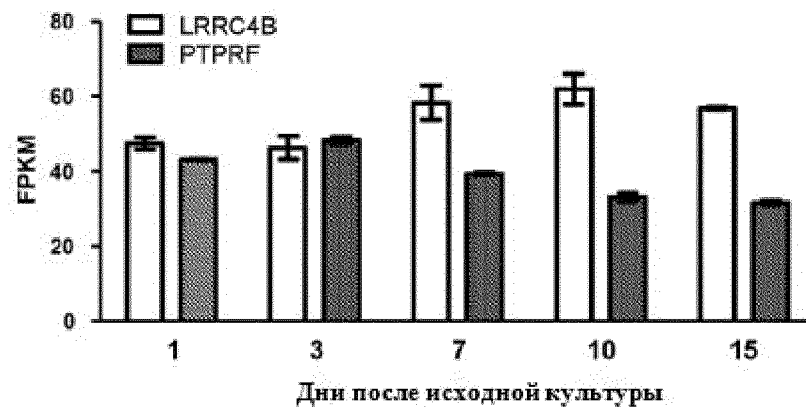
Фиг. 12В



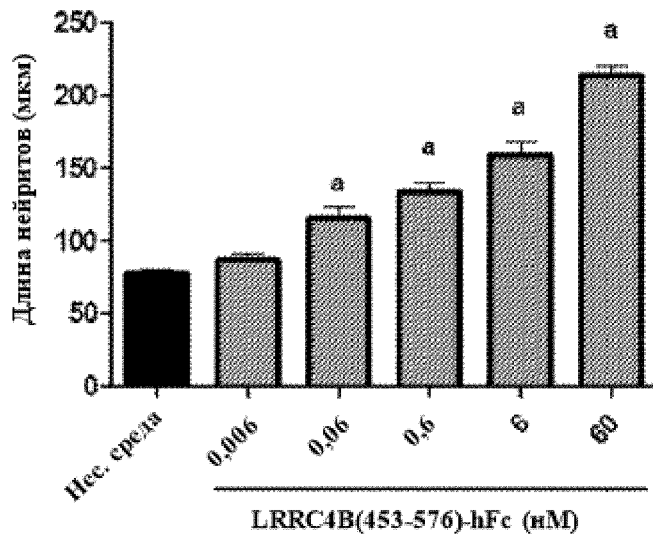
Фиг. 13А



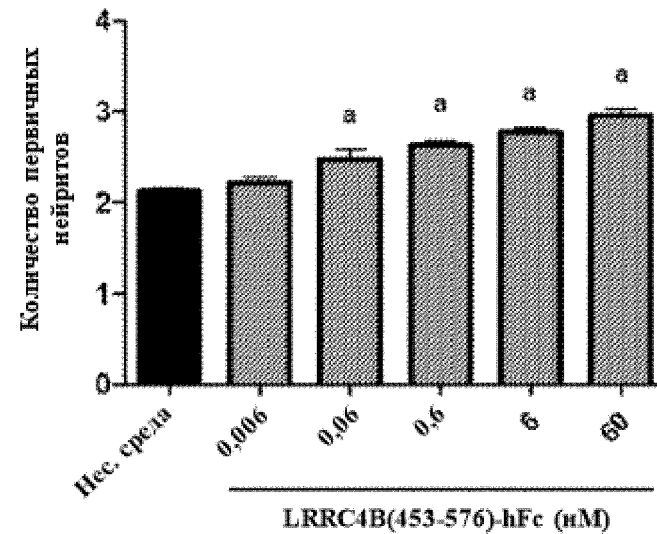
Фиг. 13В



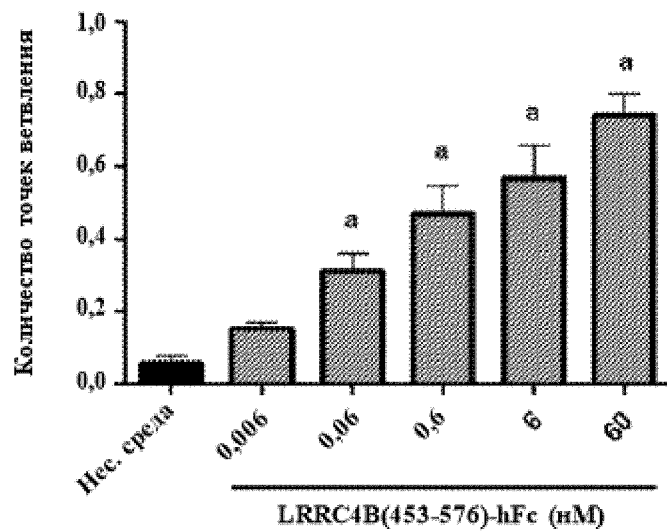
Фиг. 14А



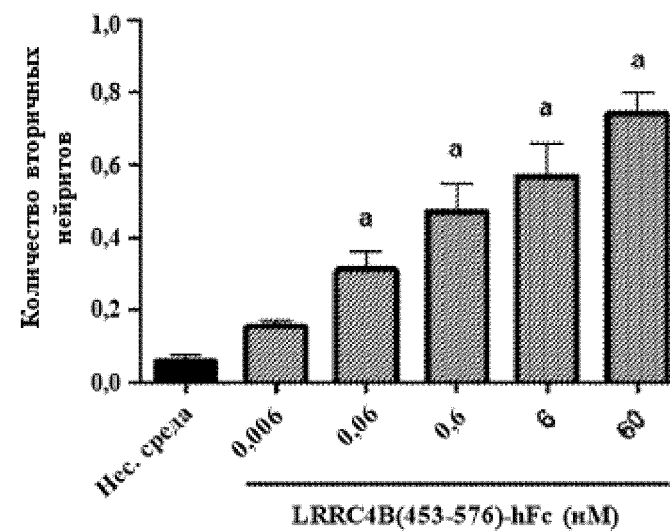
Фиг. 14В



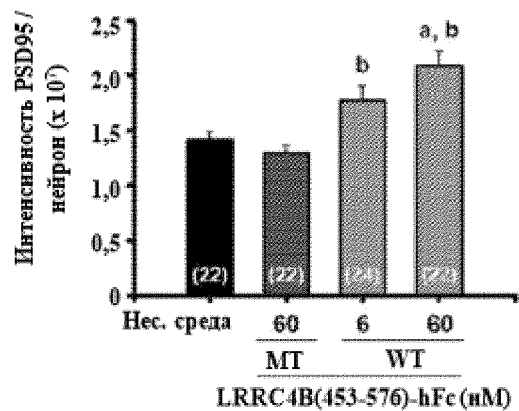
Фиг. 14С



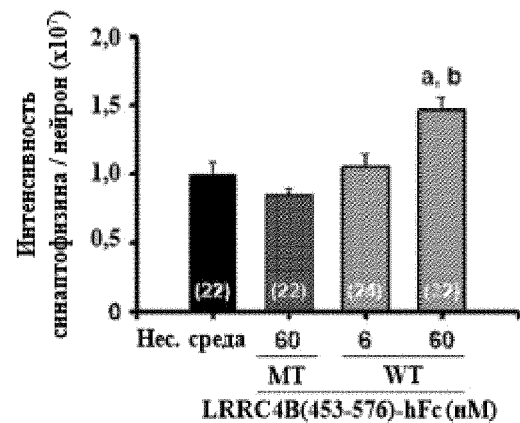
Фиг. 14Д



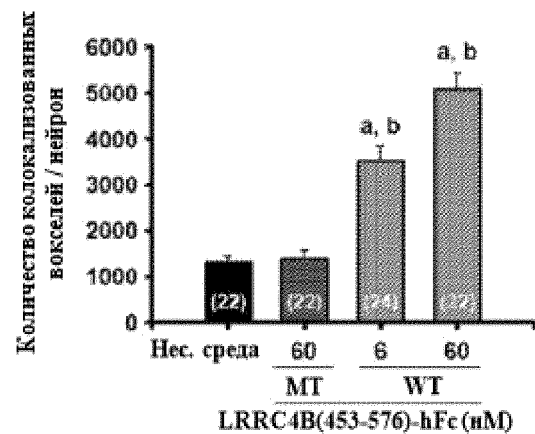
Фиг. 15А



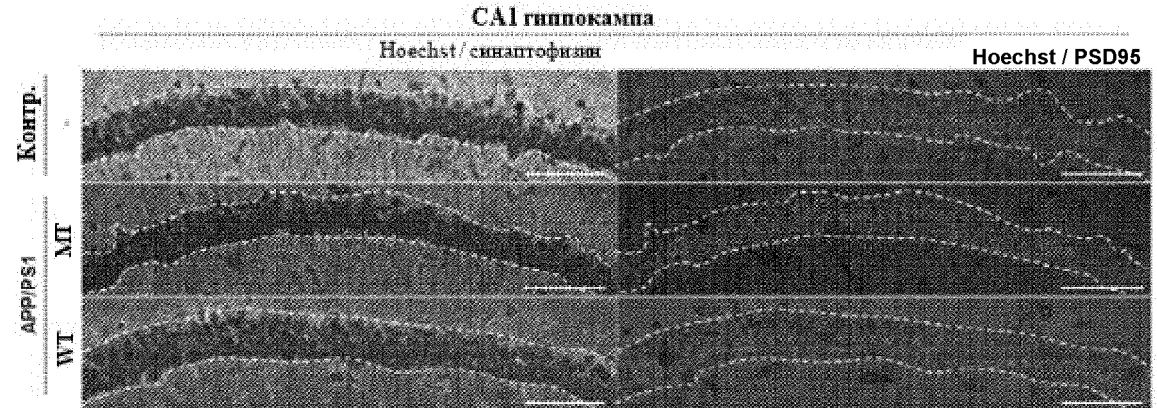
Фиг. 15В



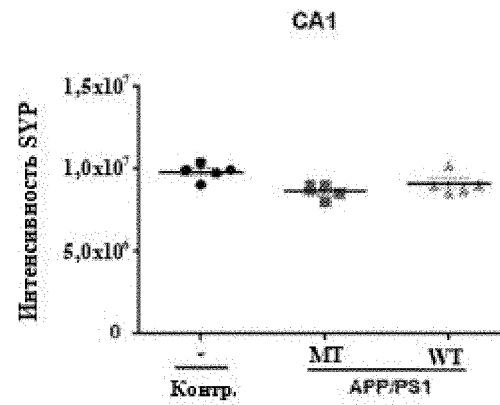
Фиг. 15С



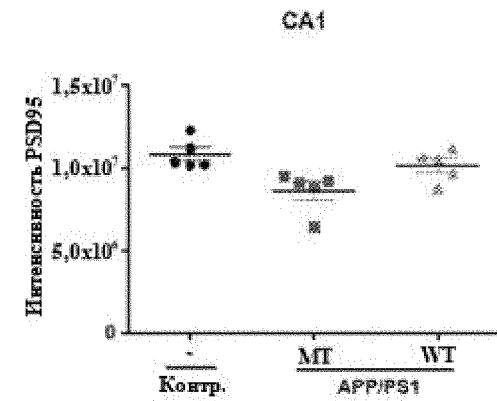
Фиг. 16А



Фиг. 16В

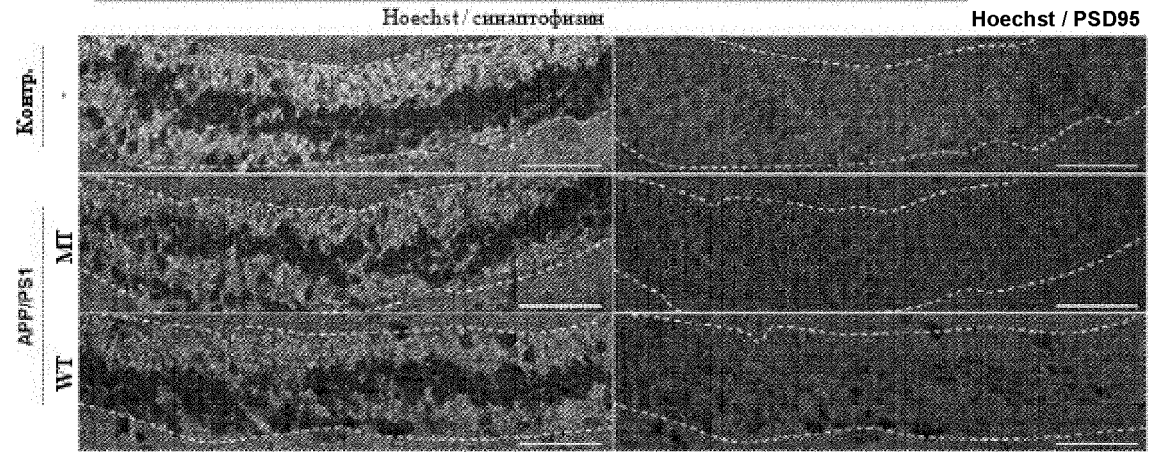


Фиг. 16С



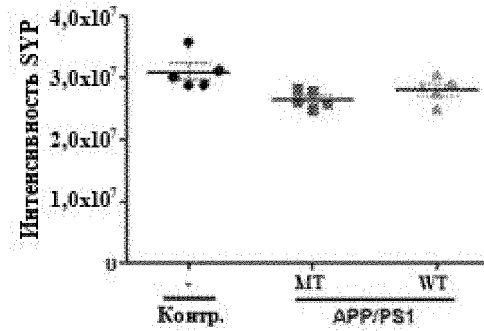
Фиг. 17А

CA3 ГИПОКАМПА



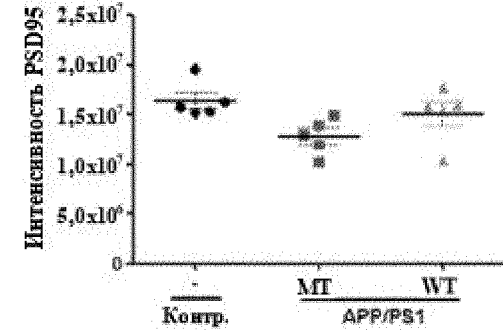
Фиг. 17В

CA3

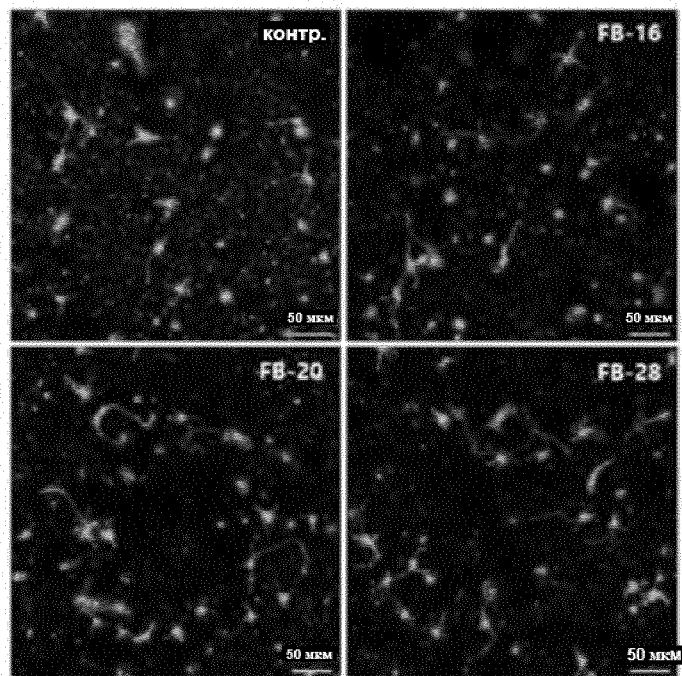


Фиг. 17С

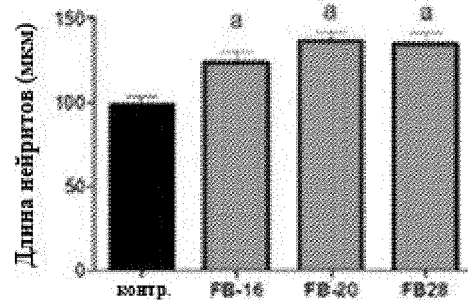
CA3



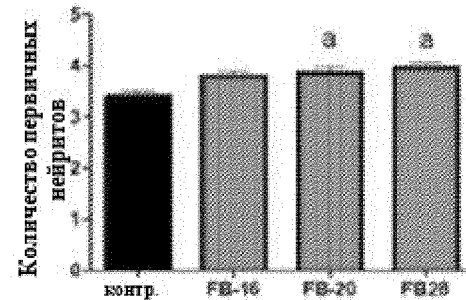
Фиг. 18А



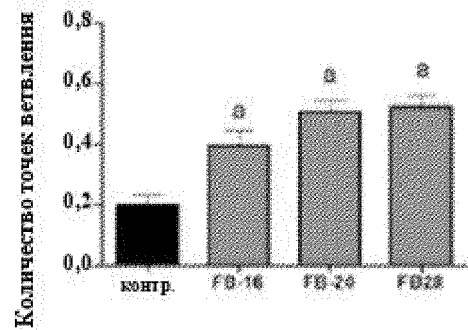
Фиг. 18В



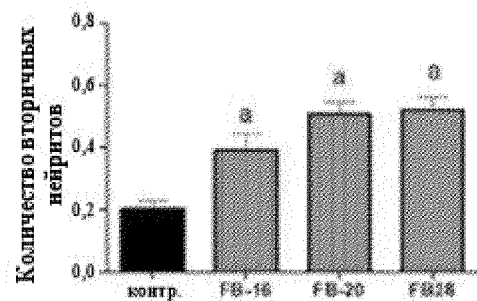
Фиг. 18С



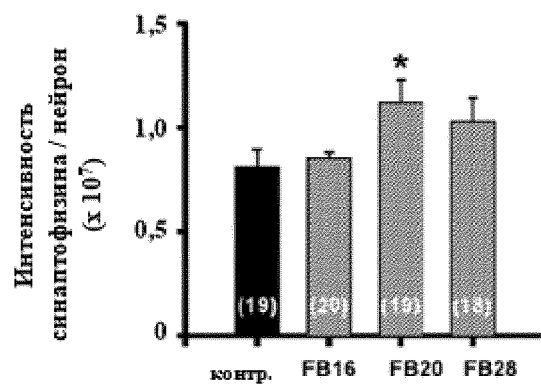
Фиг. 18D



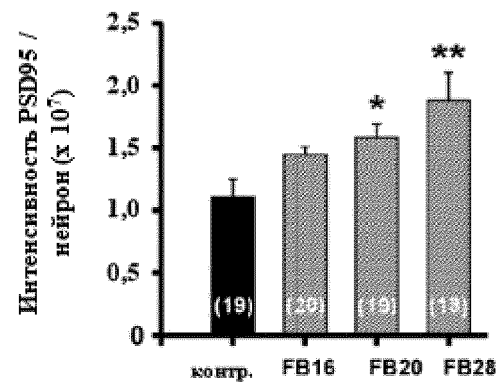
Фиг. 18Е



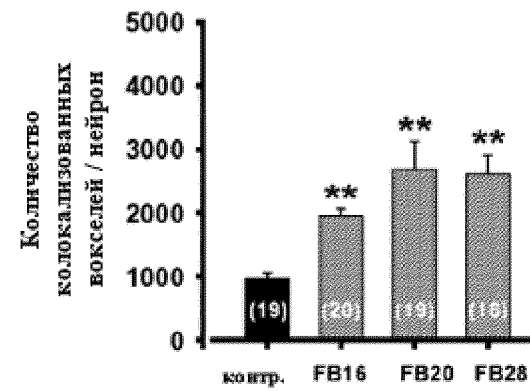
Фиг. 19А



Фиг. 19В



Фиг. 19С



Фиг. 20

```

C4 человека -----LNTSMYSF FTTVTVETTELSPEDT-----TRKYKPVPTTS
C4B человека AAGGTGSGGGGPGGGGGVGGGSGGTYFTT VTVETLEIQPGEEALQPRGTEKEPPGPTTD
C4C человека AA-----TTTTFSYFSTVTVETMEPSQD-EARTDNN----VGPTPV
C4B латимерии -----NSYSYFTT VTVETVTV---VEEKPTLND---PGPTPA
C4C латимерии -----NNSVTYFTT VTVETMEPSLDDTRTTEHN----VGPTPT
C4 латимерии -----LNTSMYSF FTTITVEITAPSPGAHPKPK--VVTTPSTEYK
C4B мыши AA---GGPGGGGPGGGGGAGGAGGYTYFTT VTVETLEIQPGEEAQQPRGTEKEPPGPTTD
C4B утконоса AGGPAGGPGGGGGGPGGAGGAGGGTYFTT VTVETLEIQQGEELILRATEKEKPGPTAA
C4C утконоса P-----FSYFSTVTVETMEPSQD-EARTTENN---VGPTPV
C4B коалы ---GAGGPGG-P-----GGSSGGGYTYFTT VTVETLEIQSGDEILLPRGTEKEPPGPTTD
C4B утки AA-----AAAAAAAATGTYFTT VTVETTDAGGEEPAP-----QTAPAPTAG
C4C утки -----NPGTYFSTVTVETVE--PSQDEAQ--TTEQVGPFTVTN
C4 утки -----LNTSMYSF FTTVTVETTELSP--EDVSPKFTK--PVPTTS
C4B перепела -----AAAAAAAAAAAAATGTYFTT VTVETTDGGGGGGGGEDPALQTAPLPTLG
C4C курицы -----NPGTYFSTVTVETVEPSQDEAQ--TTEQVG---PTPVTS
C4B черепахи TT-----GTYFTT VTVETMEFAQEDALP--TKKE--PGPTPA
C4B ящерицы TT-----GTYFTT VTVETMDSPEESV----PTKKE--PGPTPS
C4C ящерицы -----SATLNVTAQECITYFSTITVETVEPSQD-EARTTEQVW---PTPVIE
C4B жабы AT-----TDTYFTT VTVETMESSEET---KSTEKE--PGPTPT
C4B шпорцевой лягушки ATT-----DNTYFTT VTVETMDSNVEET---KPTDKE--PGPTP
C4B трески-B N-----SYSYFTT VTVESVETVQEENSARQYINETLIEFFSPT
C4B трески-A -----VSVNYTYFTT VTVETVDSIGDLDLSALTPPINETFIRIHFG
Zfish-A C4B -----VSVNYTYFTT VTVETVEFTGEEDSALRTFNETFIRHFGPT
Zfish-B C4B N-----GYSYFTT VTVETVETGQEGHDSPARQFVNETFISFFG
C4B акулы-B N-----SYSYFTT VTVETVEVVD----EPKGAEFE--PGPTPS
C4B S.Gar -----STNNYSYFTT VTVETVESCAQEENSARQDINETYVQQPAP
C4C S.Gar -----NSTFSYFTT VTVETIEPSQD--EGRTTEQN--VGPTAT
C4 S.Gar -----LNTSMLSYFTT VTVETVEIPEPT-SEETKPKTVTASP-----
    
```

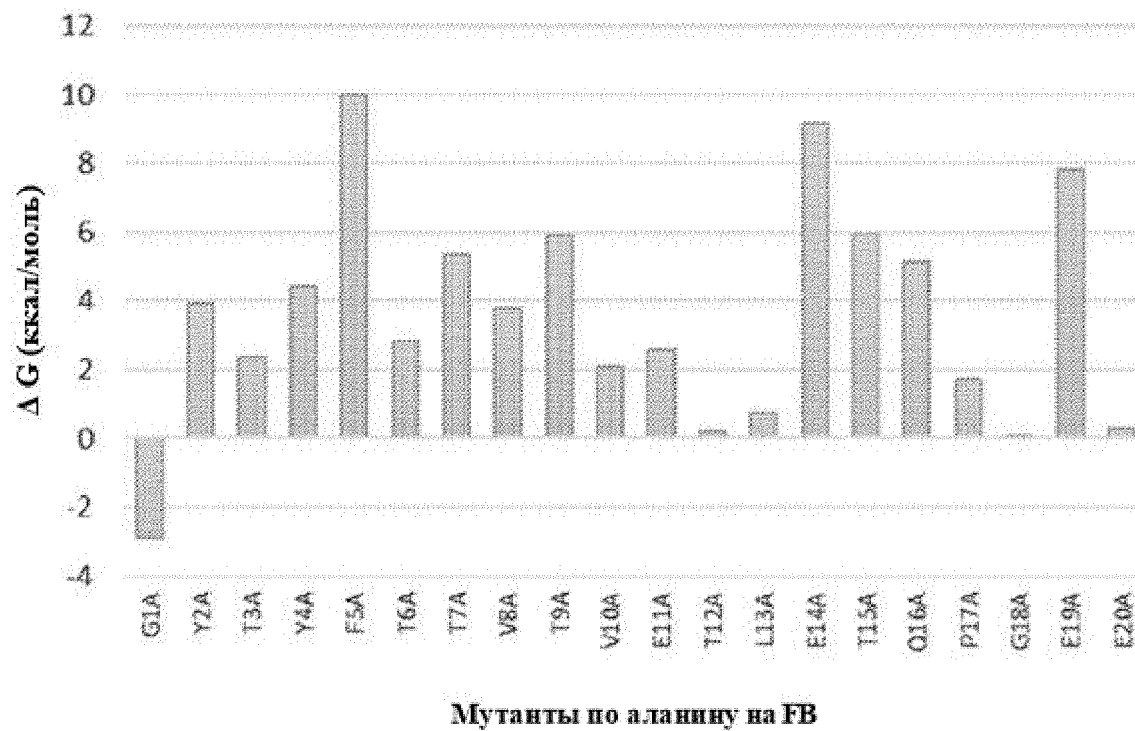
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

YTYFTT VTVETLE

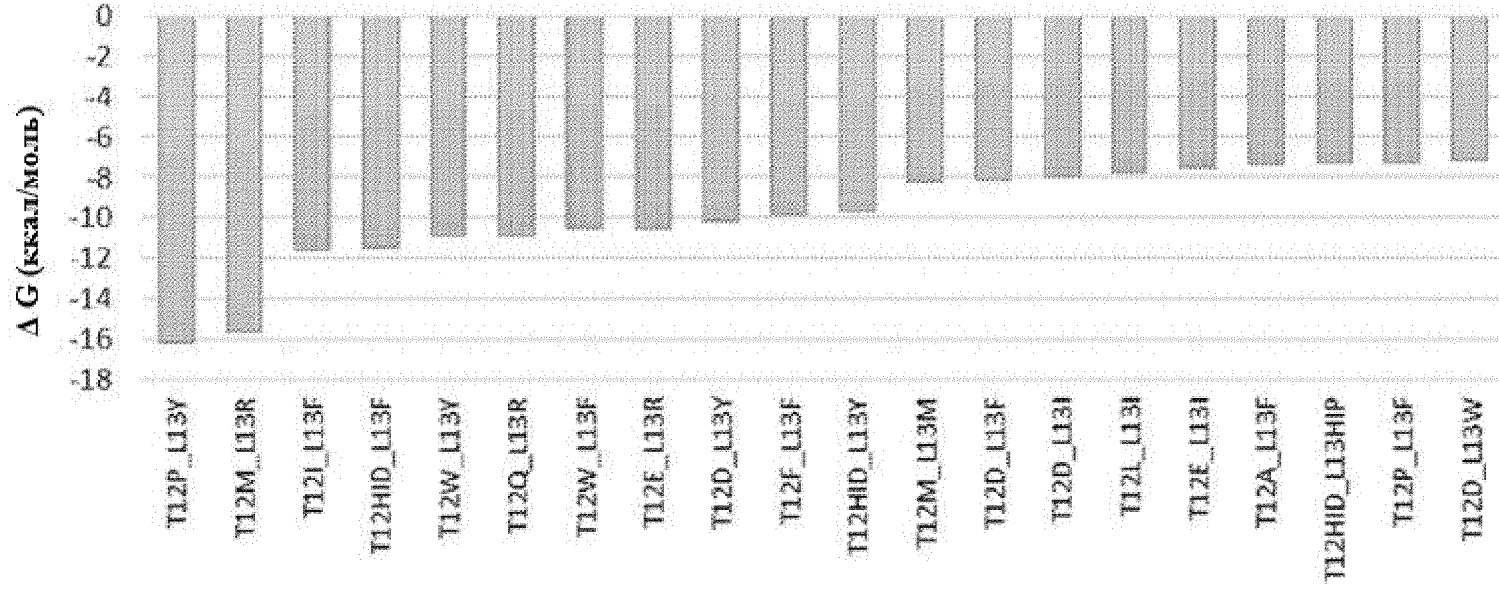
Аминокислотные
остатки,
обнаруженные у
других
позвоночных

	F	S	I	V	S	T	A
	V				I	S	D
	L					M	G
	I					I	
							V

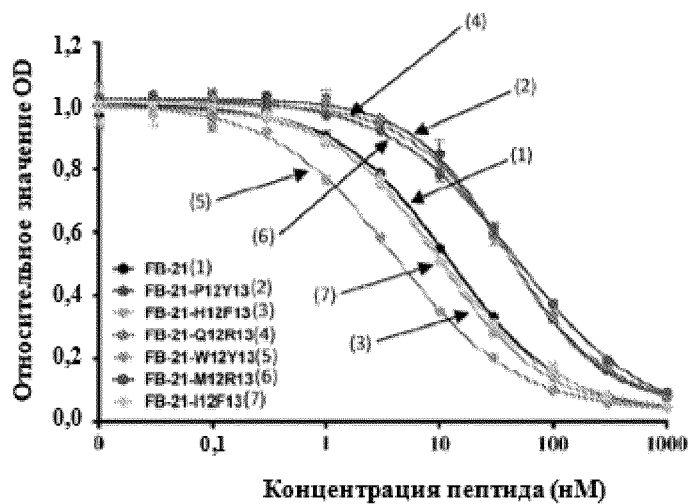
Фиг. 21А



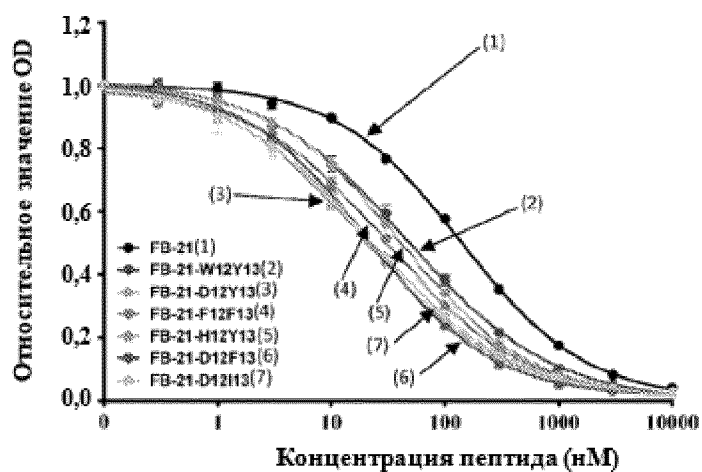
Фиг. 21В



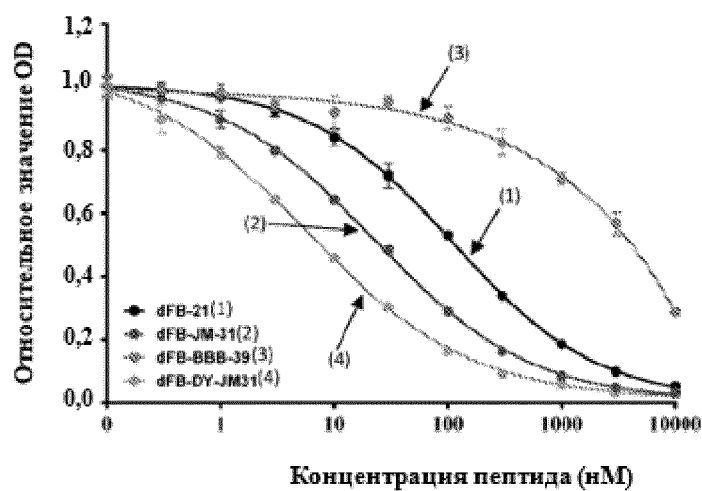
Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 22С

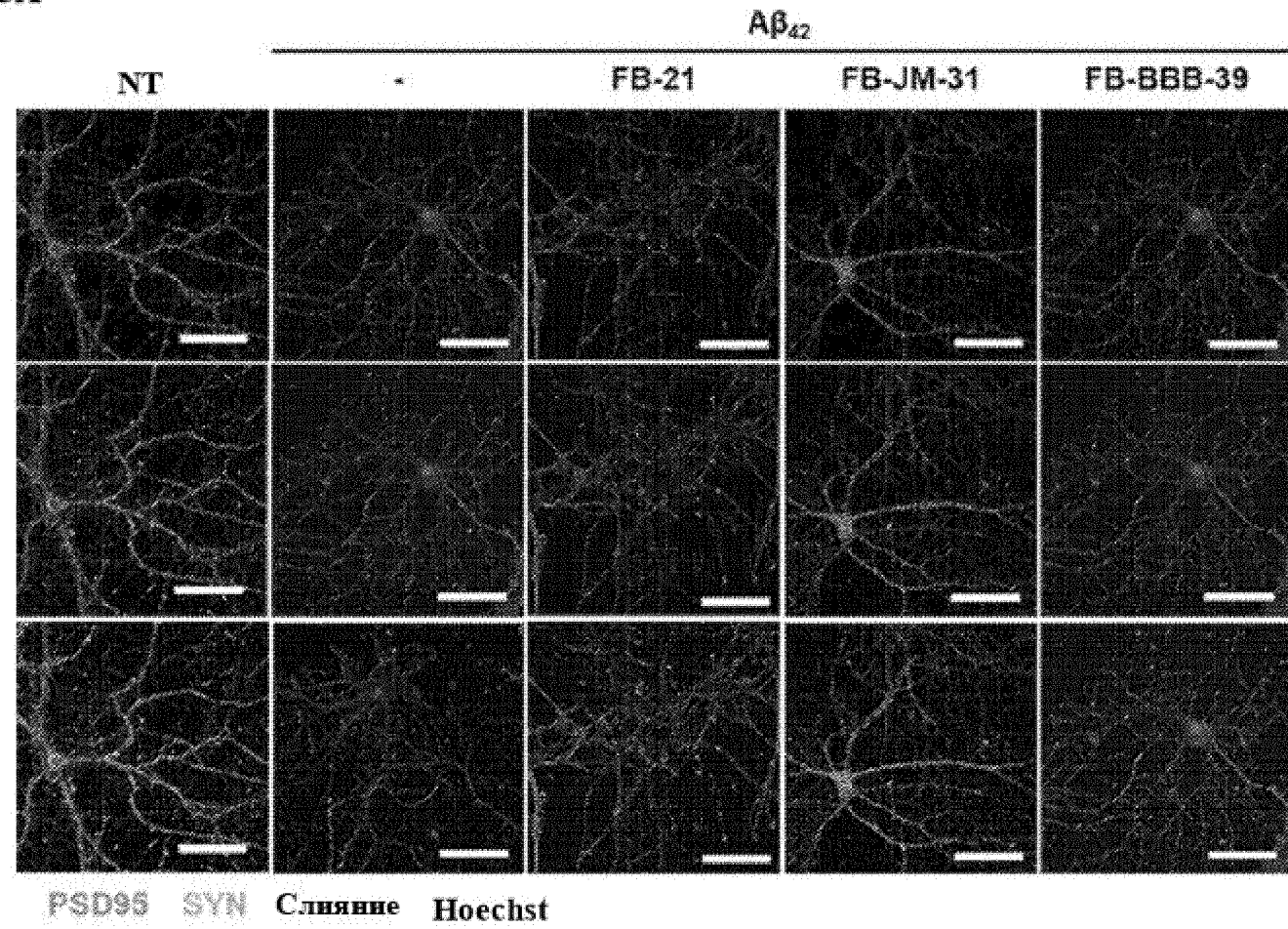


Фиг. 22D

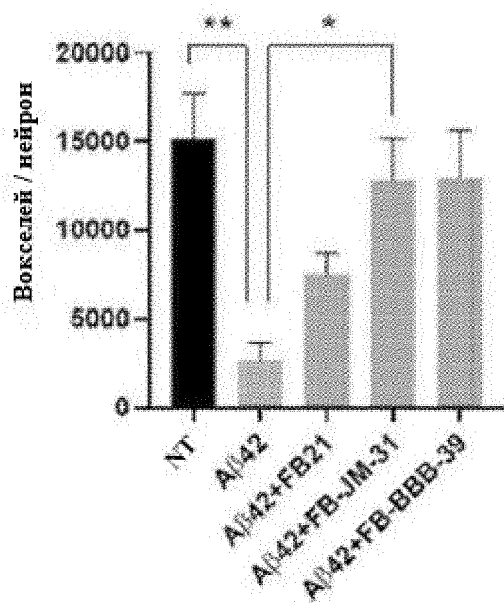
LRR4	ISPEIT-----IRKYKPVSTSTGYQ-----PAYTTSITVLIQTIN-VPIQVAVPAIDTDDKMOTS	LDDEPKATPS	ITIGCFVAVVLLAAAPLIVP
LRR4B	ITPTTIVVITLITQPGKEALQPRGTEKEPPGGITDGVGGGRPGDAAGPASSSTYAPAPRSSPTEKAFVVIITGVTENALKD	LDDEPKATPS	ITIGCFVAVVITPAAVVIAPI
LRR4C	ISPEIT-----IRKYKPVSTSTGYQ-----PAYTTSITVLIQTIN-VPIQVAVPAIDTDDKMOTS	LDDEPKATPS	ITIGCFVAVVLLAAAPLIVP

FB JM TM

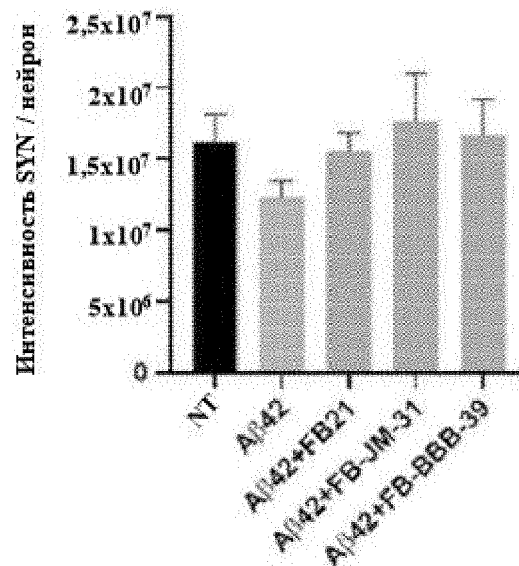
Фиг. 23А



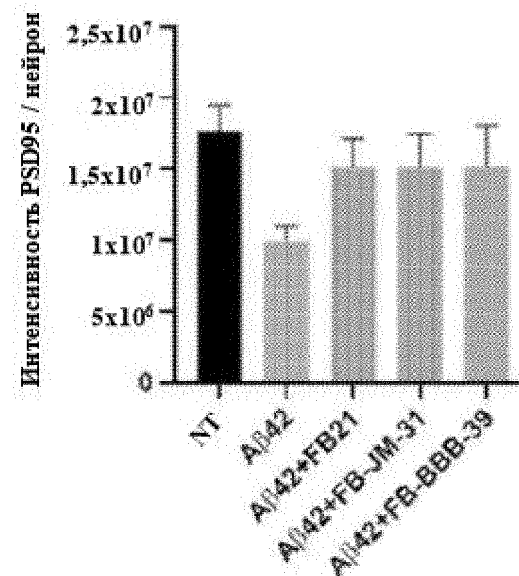
Фиг. 23В



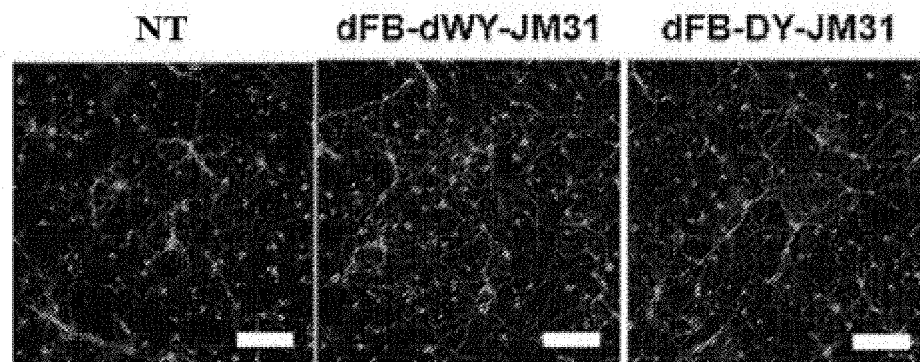
Фиг. 23С



Фиг. 23D

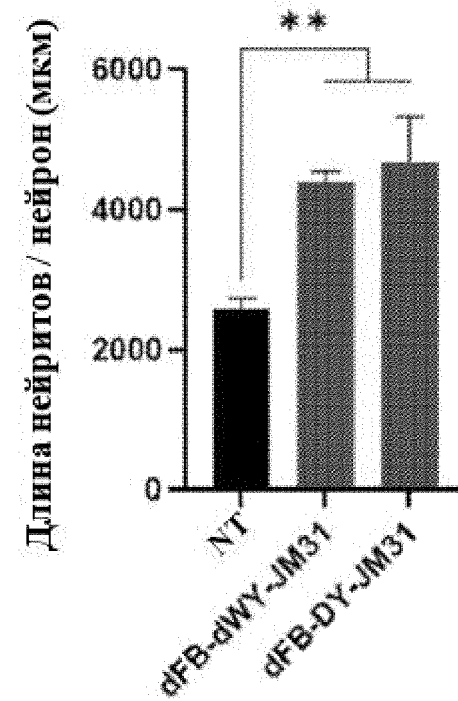


Фиг. 24А

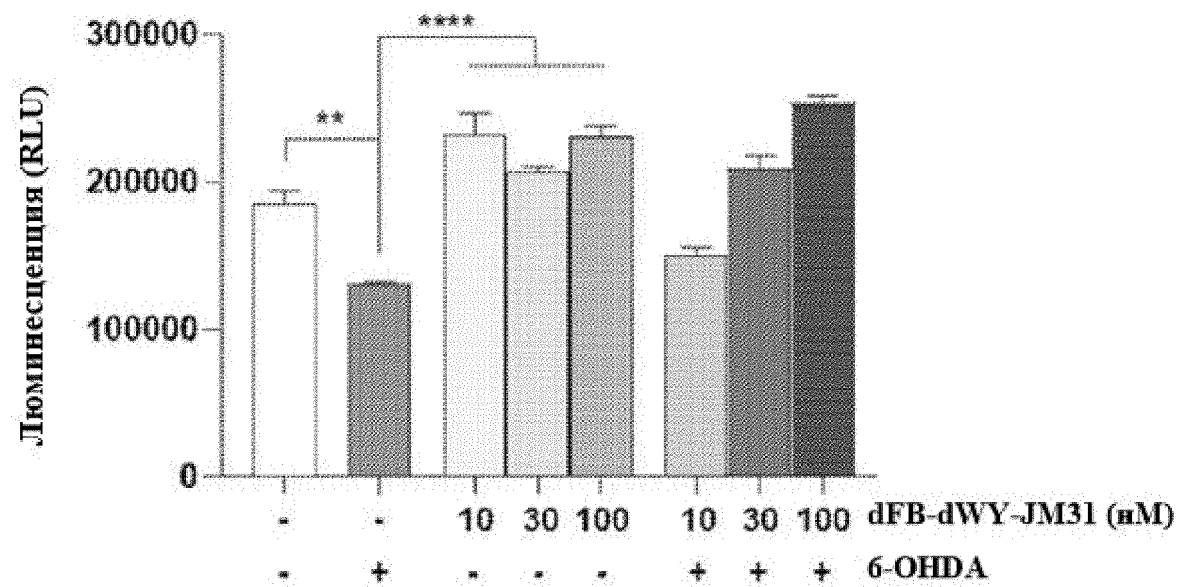


Фиг. 24В

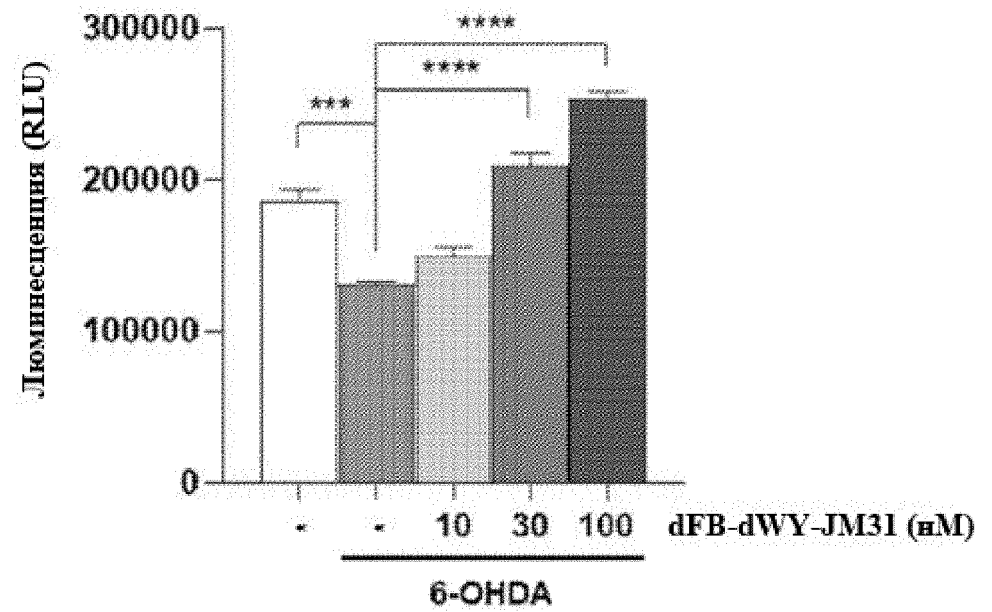
Спинальный мотонейрон 3DIV



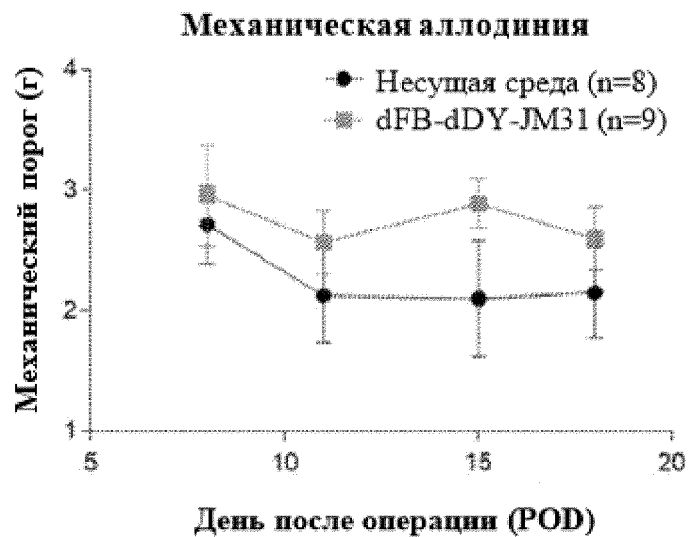
Фиг. 25А



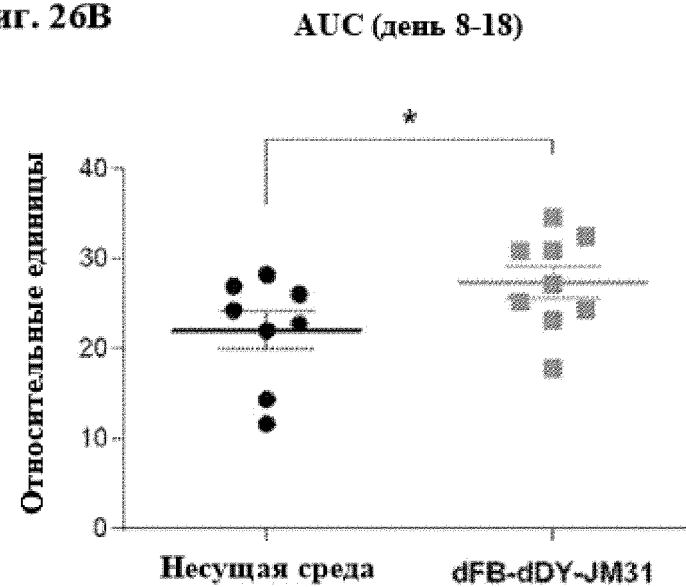
Фиг. 25В



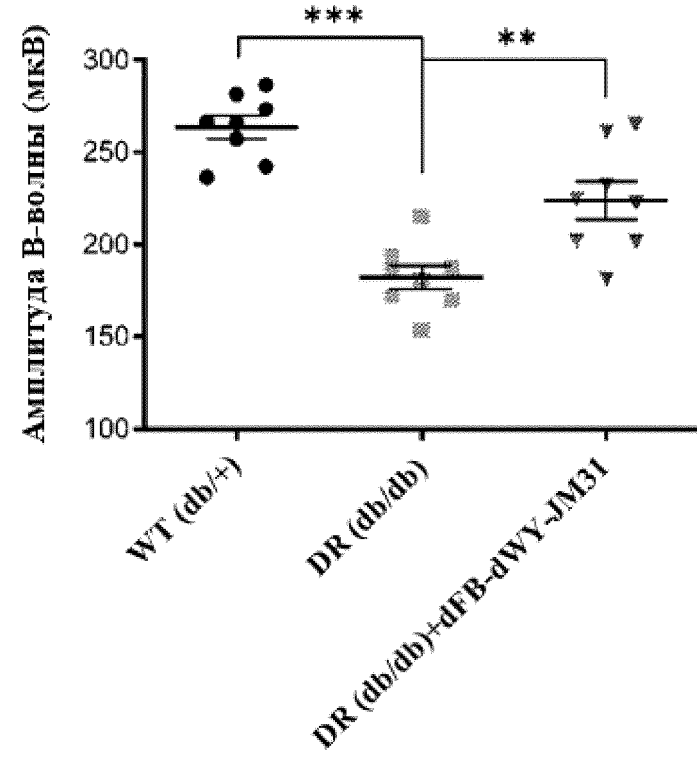
Фиг. 26А



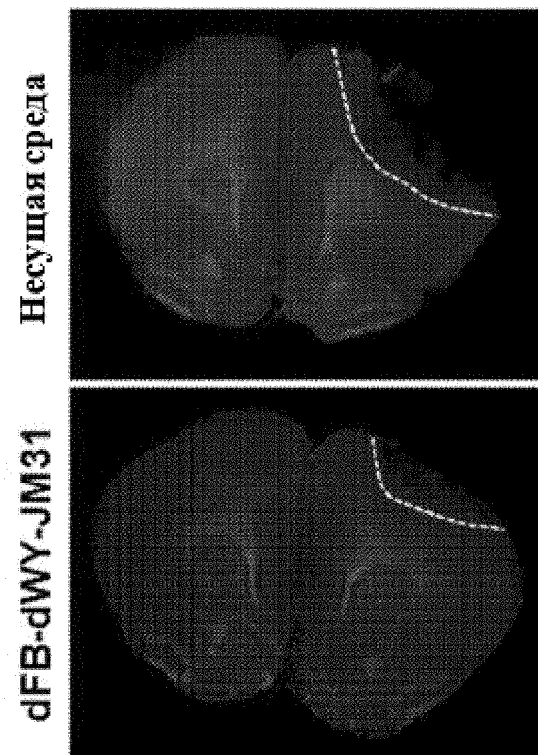
Фиг. 26В



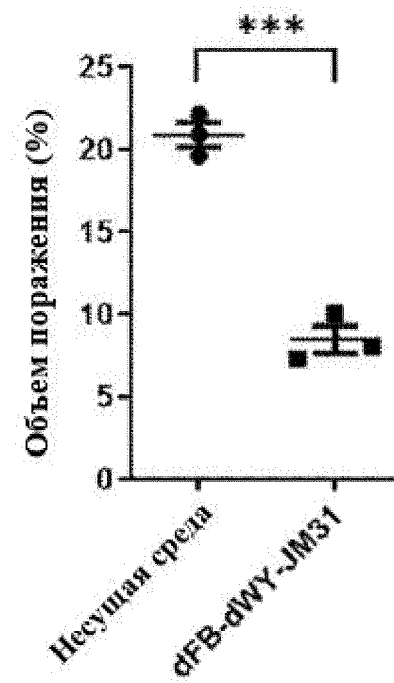
Фиг. 27



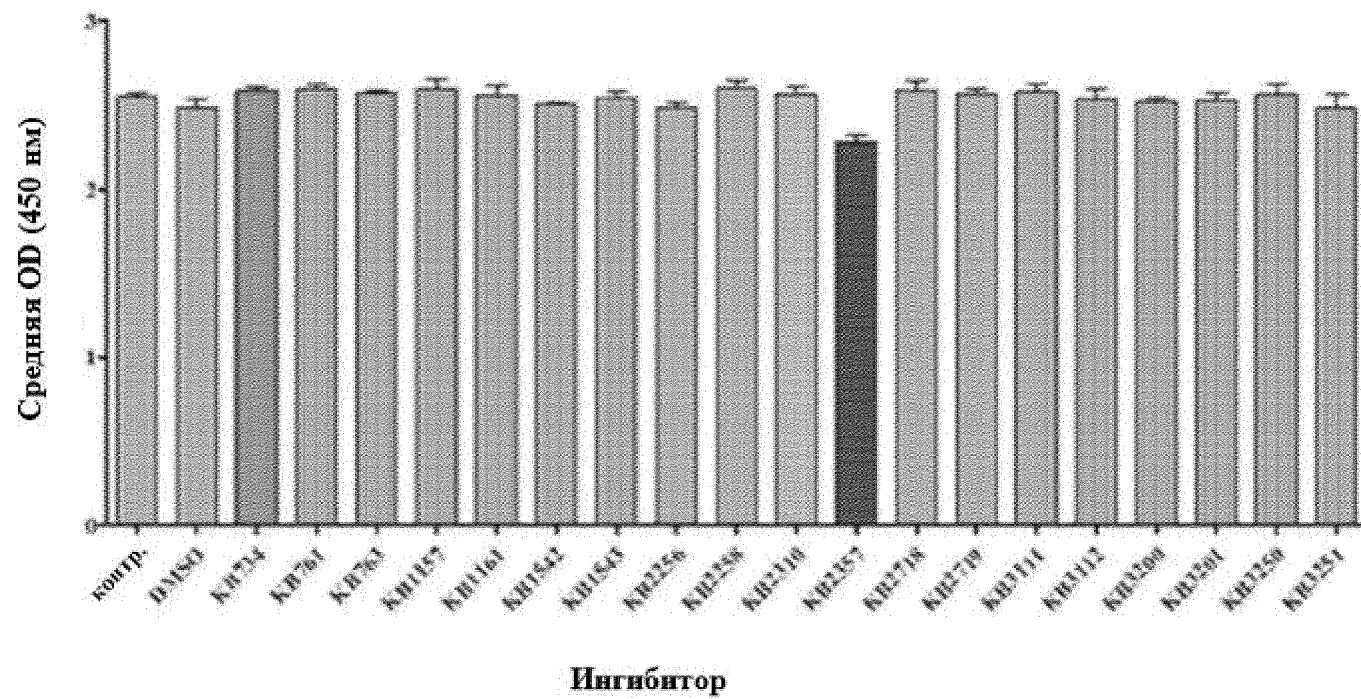
Фиг. 28А



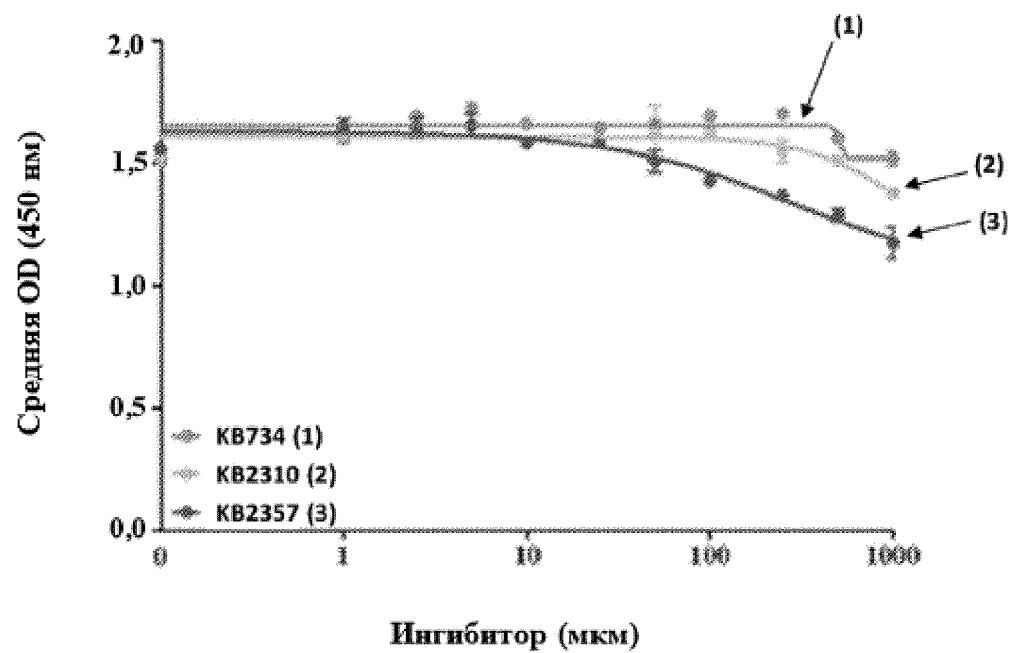
Фиг. 28В



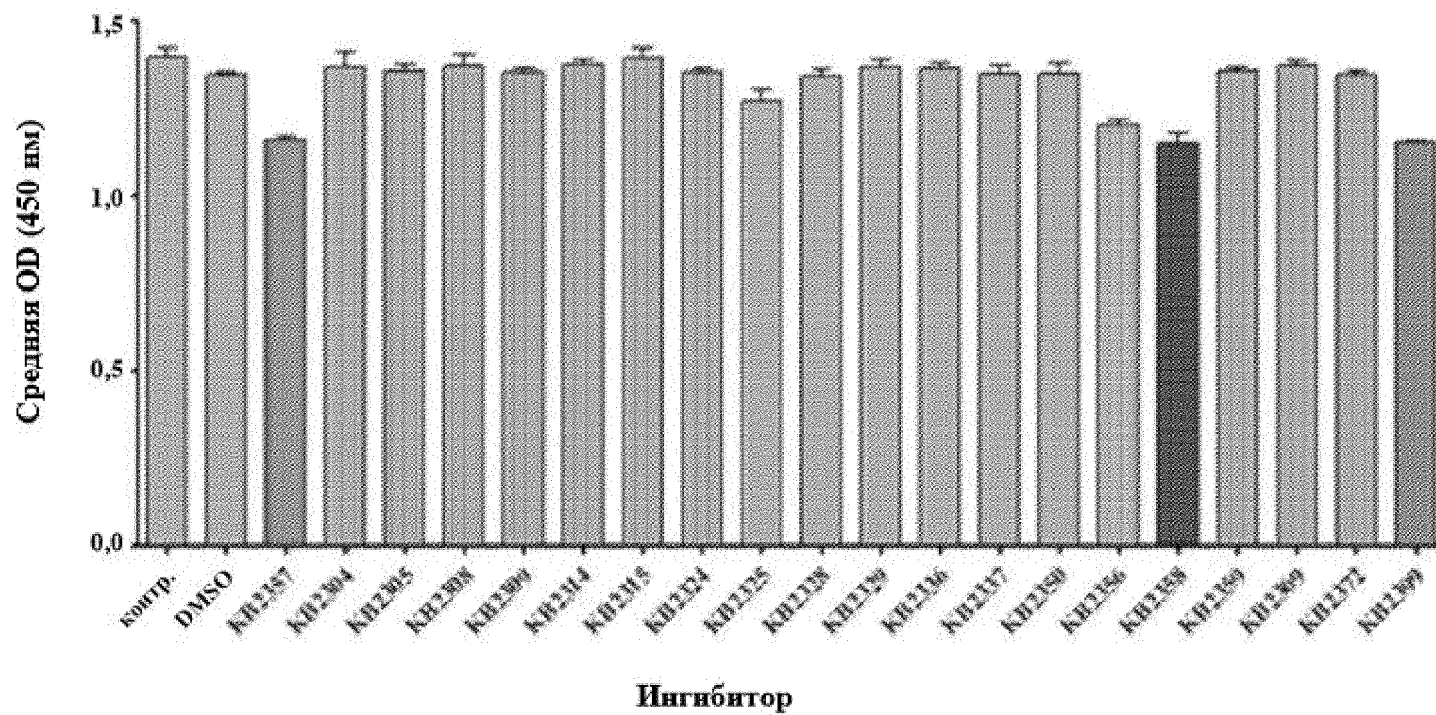
Фиг. 29А



Фиг. 29В



Фиг. 30А



Фиг. 30В

