

Цей винахід належить до галузі фіброзних захворювань та дифузних хвороб сполучної тканини. Зокрема, цей винахід має відношення до застосування остеопротегерину для лікування та/або запобігання фіброзних захворювань, зокрема, склеродермії. Комбінації остеопротегерину з інтерфероном, антагоністом TNF (некротичного пухлинного фактора) або додатковим протифіброзним засобом, наприклад, білком SARP-1 (секретований апоптоз-асоційований білок 1), також входять до обсягу цього винаходу.

Фіброз є станом, пов'язаним із надпродукуванням колагену, наприклад, у внутрішніх органах, у тому числі нирках, серці, легенях, шлунку та суглобах.

Фіброз легень є одним з поширених фіброзів. Ідіопатичний фіброз легень (IPF) характеризується хронічним запаленням стінок альвеол із прогресуючим фіброзом невідомої етіології. Ідіопатичний фіброз легень або фіброзний альвеоліт невідомого походження є причиною 50-60% випадків ідіопатичного інтерстиціального захворювання легень.

Звичайна інтерстиціальна пневмонія (UIP), специфічна гістопатологічна картина інтерстиціальної пневмонії, є класичною картиною, що спостерігається при біопсії легень у разі ідіопатичного фіброзу легень. При невеликому збільшенні тканина виглядає неоднорідною, з переміжними ділянками нормальної легеневої тканини, інтерстиціального запалення, фіброзу і пористості. У разі інтерстиціального запалення спостерігається інфільтрація мікальвеолярних перегородок лімфоцитами, плазмocyтами і гістіocyтами, що пов'язується з гіперплазією пневмоцитів II типу. Фіброзні зони складаються, головним чином, із щільного безклітинного колагену, хоча можуть спостерігатись (як правило, на інтраальвеолярних ділянках) розсіяні осередки проліферуючих фібробластів (фібробластні осередки), які являють собою ділянки початкової стадії та активного перебігу захворювання. Пористі ділянки включають кістозні фіброзні порожнини, часто-густо вистелені бронхіолярним епітелієм і заповнені слизом. У слизу можуть накопичуватись нейтрофіли. На ділянках фіброзу та пористості часто відбувається гіперплазія гладеньких м'язів. Найкориснішими особливостями при ідентифікуванні звичайної інтерстиціальної пневмонії є підплевральний та навколосептальний розподіл, плямистий характер і тимчасова неоднорідність.

Ідентична картина інтерстиціального запалення та фіброзу спостерігається у разі дифузних хвороб сполучної тканини судин (наприклад, ревматоїдного артриту, системного червоного вовчака, прогресуючого системного склерозу, змішаної хвороби сполучної тканини, цукрового діабету), пневмоконіозу (наприклад, асбестозу), радіаційного ураження і певних захворювань легень, індукованих лікарськими засобами (наприклад, нітрофурантоїном).

Клінічний перебіг ідіопатичного фіброзу легень є прогресуючим; середній рівень виживаності після встановлення діагнозу становить від 4 років до 6 років. Преднізон є звичайним лікарським засобом у разі ідіопатичного фіброзу легень. Реакція на лікування є змінною, однак у пацієнта з початковою фазою захворювання, на більш клітинній стадії перед тим, як домінуючим стає поява рубцевих змін у сполучній тканині, існує більша ймовірність поліпшення у разі застосування кортикостероїдної або цитотоксичної терапії. Підтримувальна терапія і паліативне лікування включають застосування  $O_2$  у великих концентраціях для полегшення гіпоксемії і, у разі бактеріальної інфекції, антибіотиків. Трансплантація легень була успішною у пацієнтів із хворобою легень кінцевої стадії.

Фіброз легень пов'язується із накопиченням у печінці сполучної тканини, що є наслідком порушення рівноваги між продукуванням та розкладом позаклітинного матриксу, і загострюється спадінням та ущільненням попередньо існуючих волокон.

Фіброз легень є звичайною реакцією на гепатоцелюлярний некроз або пошкодження, яке може викликатись найрізноманітнішими агентами, наприклад, будь-яким процесом, що порушує гомеостаз печінки (зокрема, запалення, токсичне пошкодження або зміна печінкового кровотоку) і інфекціями печінки (вірусними, бактеріальними, грибковими і паразитарними). Численні порушення накопичення, що є наслідком вроджених порушень обміну речовин, часто пов'язуються з фіброзом, у тому числі порушення ліпідного обміну (хвороба Гоше); глікогеноз (зокрема, типів III, IV, VI, IX та X); дефіцит інгібітора  $\alpha_1$ -трипсину; накопичення екзогенних речовин, що спостерігається у разі синдромів із підвищенням засвоєнням та надлишковим накопиченням заліза у організмі (гемохроматоз) та вроджені порушення метаболізму міді (хвороба Вільсона-Коновалова); накопичення токсичних метаболітів (наприклад, у разі тирозинемії, фруктоземії та галактоземії); і пероксисомні розлади (синдром Цельвегера). Фіброз викликають численні хімічні речовини і лікарські засоби, особливо спирт, метотрексат, ізоніазид, оксифенізатин, метилдофа, хлорпромазин, толбутамід і аміодарон. Порушення печінкового кровообігу (наприклад, хронічна серцева недостатність, синдром Бадда-Кіарі, первинний тромбоз вен, тромбофлебіт ворітної вени) і хронічна обструкція виділення жовчі можуть привести до виникнення фіброзу. 1, врешті-решт, вроджений фіброз печінки є аутосомним рецесивним пороком розвитку.

До складу нормальної печінки входять гепатоцити і синусоїдні капіляри, розподілені у межах позаклітинного матриксу, що складається з колагену (головним чином, типів I, III і IV) і неколагенових білків, у тому числі глікопротеїнів (наприклад, фібрoneктину, ламініну) і декількох протеогліканів (наприклад, гепаран-сульфату, хондроїтин-сульфату, дерматан-сульфату, гіалуронату). Фібробласти, які за нормальних обставин знаходяться лише у трактах ворітної вени, можуть продукувати колаген, великі глікопротеїни і протеоглікани.

Інші клітини печінки (зокрема, гепатоцити, жирові клітини, купферівські клітини і ендотеліальні клітини) також можуть продукувати компоненти позаклітинного матриксу. Жирові клітини, які знаходяться під синусоїдальним ендотелієм у просторі Діссе, є попередниками фібробластів, здатними до проліферації і продукування надлишку позаклітинного матриксу. Розвиток фіброзу з активного відкладення колагену є наслідком пошкодження клітин печінки, зокрема, некрозу, та клітин зони запалення. Точно визначені фактори, що виділяються з цих клітин, є невідомими, однак ймовірними є один або декілька цитокінів або продуктів переокисного окиснення ліпідів. Клітини Купфера і активовані макрофаги продукують запальні цитокіни. Нові фібробласти утворюються довкола некротичних клітин печінки; наслідком підвищеного синтезу колагену є поява рубцевих змін у сполучній тканині. Фіброз може бути наслідком активного фіброгенезу і порушеного розщеплення нормального або зміненого колагену. Жирові клітини, купферівські клітини і ендотеліальні клітини відіграють важливу роль у виведенні колагену типу I, декількох протеогліканів і денатурованих

колагенових волокон. Зміни активності цих клітин можуть модифікувати поширеність фіброзу. Для гістопатолога фіброзна тканина може стати більш явною наслідком пасивного спадіння та ущільнення попередньо існуючих волокон.

Таким чином, наслідком підвищеного синтезу або зменшеного розщеплення колагену є активне відкладення надлишкової сполучної тканини, яка негативно впливає на функціонування печінки: (1) Довколаклітинний фіброз порушує живлення клітин і веде до гепатоцелюлярної атрофії. (2) Фіброзна тканина у просторі Діссе накопичується довкола синусоїдних капілярів і перешкоджає вільному проходженню речовин із крові до гепатоцитів. (3) Фіброз довкола венул печінки і трактів ворітної вени порушує печінковий кровотік. Венозний опір печінки зростає від гілок ворітної вени до синусоїдних капілярів і, врешті-решт, до вен печінки. Залученими до цього процесу можуть бути усі три згадані шляхи.

Фіброзні зв'язки, які з'єднують тракти ворітної вени з центральними венами, також сприяють утворенню анастомозних каналів: артеріальна кров, що обходить нормальні гепатоцити, переключається на еферентні печінкові вени, що додатково ослаблює функціонування печінки і може посилити гепатоцелюлярний некроз. Поширеність цих процесів визначає ступінь порушення функціонування печінки: наприклад, у разі вродженого фіброзу печінки, великі фіброзні зв'язки охоплюють переважно ділянки ворітної вени і, як правило, не пошкоджують паренхіму печінки. Вроджений фіброз печінки виглядає, таким чином, як портальна гіпертензія зі збереженою гепатоцелюлярною функцією.

Склеродермія є захворюванням сполучної тканини, що характеризується фіброзом шкіри і внутрішніх органів, наслідком чого є недостатність внутрішніх органів і смерть (Блек (Black) та ін., 1998; Клементе (Clements), Фюрст (Furst), 1996). Склеродермія має певний спектр проявів і цілий ряд різноманітних терапевтичних аспектів. Сюди входить локалізована склеродермія, прогресуючий системний склероз, склеродермоподібні розлади та склеродермія Сайна (Сміт (Smith), 2000). У той час як локалізована склеродермія є рідкісним дерматологічним захворюванням, пов'язаним із фіброзом та проявами, які обмежуються шкірою, прогресуючий системний склероз є багатовислідним захворюванням зі змінним ступенем ризику щодо ураження внутрішніх органів та коливаннями ступеню ураження шкіри. Прогресуючий системний склероз може бути дифузним або обмеженим. Обмежений системний склероз називають також синдромом CREST (кальциноз, дисфункція стравоходу Рейно, склеродактилія, телеангіектазія). Склеродермоподібні розлади, як гадають, пов'язуються з впливом промислового забруднення навколишнього середовища. У разі хвороби Сайна спостерігається ураження внутрішніх органів без шкірних змін.

Головними проявами склеродермії і, зокрема, прогресуючого системного склерозу, є невідповідно надмірний синтез та відкладення колагену, порушення функціонування ендотелію, судоми, колапс та облітерація, як наслідок фіброзу.

Склеродермія є рідкісним захворюванням зі стабільною захворюваністю приблизно 19 випадків на 1 млн. людей. Причина виникнення склеродермії є невідомою. Важливою, однак, є генетична схильність. До відхилень від норми належать автоімунітет та зміна функцій ендотеліальних клітин і фібробластів. Дійсно, прогресуючий системний склероз є, ймовірно, найбільш тяжким з автоімунних захворювань із зареєстрованою 50% смертністю у межах 5 років з моменту встановлення діагнозу (Сілмен (Silman), 1991).

З точки зору встановлення діагнозу, важливим клінічним параметром є товщина шкіри на ділянці, проксимальній до гілково-фалангових суглобів. Синдром Рейно є частою, майже універсальною складовою склеродермії. Він діагностується за зміною забарвлення шкіри під впливом холоду. Ішемія і товщина шкіри є симптомами хвороби Рейно.

Як гадають, декілька вихідних біологічних процесів є залученими до початку, тяжкості і прогресування захворювання. Вони включають порушення функції судин, активацію і пошкодження ендотеліальних клітин, накопичення лейкоцитів, продукування автоантитіл і, найважливіше, неконтрольовану фіброзну реакцію, яка може привести до смерті (Клементе (Clements), Фюрст (Furst), 1996). Фібробласти відіграють центральну роль у патогенезі цієї хвороби. Первинні фібробласти, одержані від пацієнтів, що страждають на склеродермію, демонструють багато характеристичних властивостей цього захворювання, що спостерігаються *in vivo*, а саме підвищений синтез і відкладення позаклітинного матриксу, а саме колагену і фібронектину, та змінене продукування фактора росту і цитокінів, наприклад, TGF $\beta$  (трансформуючий фактор росту) і CTGF (фактор росту сполучної тканини) (Стреглоу (Strehlow), Корн (Korn), 1998; Лерой (LeRoy), 1974).

Методів цілющого лікування склеродермії не існує. Інноваційним, однак пов'язаним із високим ступенем ризику, терапевтичним методом пропонується трансплантація аутологічних стовбурових клітин (Мартіні (Martini) та ін., 1999). На сучасному етапі, зокрема, не існує методів лікування склеродермії, спрямованих на фіброзний процес (Уіглі (Wigley), Боулінг (Boling), 2000).

Ідентифікація генів, пов'язаних із ризиком виникнення хвороби та прогресуванням склеродермії, може привести до розробки ефективних стратегій втручання на різних стадіях захворювання.

Остеопротегерин (OPG) вперше ідентифікували у 1997 році як новий цитокін, що секретується фібробластами (Сімонет (Simonet) та ін., 1997). Людський OPG являє собою білок із 401 амінокислоти, до складу якого входить сигнальний пептид із 21 амінокислоти, який розщеплюється перед глутаміновою кислотою 22 з одержанням зрілого білка, що складається з 380 амінокислот. Таким чином, OPG є розчинним білком. Він є членом сімейства рецепторів TNF (некротичний пухлинний фактор) (Морінага (Morinaga) та ін., 1998, Ясуда (Yasuda) та ін., 1998), N-кінцева ділянка якого має чотири збагачені цистеїном TNFR-подібні ділянки (TNFR — рецептор некротичного пухлинного фактора) (Сімонет (Simonet) та ін., 1997). Було показано, що OPG відіграє роль у розвитку кісткової тканини, і миші, яким бракує гена OPG, мали остеопорозний фенотип і значні відхилення скелета від норми (Мін (Min) та ін., 2000).

Остеопротегерин, який продукується остеобластами та стромальними клітинами кісткового мозку, не має трансмембранного домену і діє як секретований рецептор-приманка, який не має здатності до прямої передачі сигналу. OPG діє шляхом зв'язування зі своїм природним лігандом остеопротегерину (OPGL), відомим також як RANKL (рецептор-активатор ліганду NF-каппа В). Завдяки зв'язуванню OPG і OPGL, запобігається активація OPGL його спорідненого рецептора RANK, який являє собою рецептор остеокластів, життєво

важливий для диференціювання, активування та виживаності остеокластів.

Людський OPG є членом сімейства TNFR і являє собою одноколіїний ген, що складається з 5 екзонів і займає у геномі 29 т.п.н. (Сімонет (Simonet) та ін., 1997). Рекombінантний OPG існує у мономерній та димерній формах з позірною молекулярною масою 55кДа і 110кДа, відповідно (Сімонет (Simonet) та ін., 1997). "Скорочення" N-кінцевої ділянки до цистеїну 185 викликає інактивацію, ймовірно, шляхом розриву SS3 дисульфідного зв'язку TNFR-подібної ділянки, у той час як "скорочення" C-кінцевої ділянки білка до амінокислоти 194 зміни біологічної активності не викликає. Таким чином, N-кінцева TNFR-подібна ділянка OPG є достатньою для запобігання остеокластогенезу (Сімонет (Simonet) та ін., 1997).

Надекспресія OPG у трансгенних мишей веде до глибокого вродженого системного остеопетрозу, що є наслідком майже повної відсутності остеокластів. І, навпаки, видалення гена OPG викликає у мишей тяжкий остеопороз. Видалення OPGL або RANK також викликає глибокий вроджений системний остеопетроз, що вказує на важливу фізіологічну роль цих білків у регулюванні резорбції кістки. Секреція OPG і OPGL остеобластами та стромальними клітинами регулюється численними гормонами і цитокінами, часто реципронним чином. Гадають, що відносні рівні продукування OPG і OPGL кінцевим чином диктують ступінь резорбції кістки. Надлишок OPGL підвищує резорбцію кістки, у той час як надлишок OPG резорбцію пригнічує. Рекombінантний OPG блокує ефекти фактично усіх факторів, які стимулюють остеокласта, *in vitro* та *in vivo*. OPG також пригнічує резорбцію кістки у разі різноманітних хвороб, що моделюються на тваринах, у тому числі при остеопорозі, індукваному оваріоектомією, гуморальній гіперкальціємії, обумовленій злоякісною пухлиною, та експериментальних метастазах до кісткової тканини. Таким чином, OPG може являти собою ефективний терапевтичний варіант для захворювань, пов'язаних із надмірною активністю остеокластів (Костенюк (Kostenuik), Шалгуб (Shalhoub), 2001).

Поки що, однак, припущення про залучення остеопротегерину до фіброзів не висувалось.

Цей винахід ґрунтується на відкритті того, що наслідком введення остеопротегерину є значне зменшення інтенсивності симптомів захворювання у тварин, на яких моделюють фіброз легень. Фіброз легень є одним із проявів склеродермії.

Таким чином, перша ціль цього винаходу полягає у застосуванні остеопротегерину для одержання лікарського засобу для лікування та/або запобігання фіброзних захворювань, зокрема, склеродермії. Другою ціллю цього винаходу є застосування клітини, що експресує остеопротегерин, або вектора експресії, що містить кодувальну послідовність остеопротегерину, для одержання лікарського засобу для лікування та/або запобігання фіброзного захворювання, зокрема, прогресуючого системного склерозу. Фармацевтичні композиції, що містять остеопротегерин і додаткові протифіброзні лікарські засоби, наприклад, галофугінон, і способи лікування, що включають введення остеопротегерину до людського організму, також знаходяться у межах обсягу цього винаходу.

Фіг.1. Експресія мРНК OPG у нормальних (нависна штриховка) та уражених хворобою (горизонтальна штриховка) фібробластах 6 пацієнтів, що страждають на склеродермію, визначена шляхом гібридизаційного аналізу на комплектах мікрофільтрів. Частина (а) відображає середній рівень експресії, частина (b) відображає медіану.

Фіг.2. ПЛР (полімеразна ланцюгова реакція) - аналіз у масштабі реального часу мРНК OPG 9 пацієнтів, що страждають на склеродермію. Для кожного пацієнта результати виражено як відношення експресії мРНК OPG патологічно зміненими/непошкодженими фібробластами.

Фіг.3. Експресія мРНК OPG у біопсіях патологічно зміненої і непошкодженої шкіри 5 пацієнтів, що страждають на склеродермію, визначена за допомогою ПЛР у масштабі реального часу. Столпчики означають середній рівень експресії для кожної групи.

Фіг.4. Вестерн-блот-аналіз експресії OPG патологічно зміненими і непошкодженими фібробластами шкіри. Патологічно змінені фібробласти (A1-A4) і нормальні фібробласти (N1-N4). Стрілки з лівого боку гелю вказують положення нативного OPG (55кДа мономер) і його димерної форми (110кДа). Гібридний білок OPG Fc (закуплений від фірми R&D systems) було застосовано як позитивний контроль для антитіла.

Фіг.5. Вплив OPG на синтез колагену людськими фібробластами лінії AG1518. Клітини лінії AG1518 або зовсім не піддавались обробці, або піддавались попередній обробці 10нг/мл, 20нг/мл, 40нг/мл OPG впродовж 24год чи 40нг OPG+анти-OPG нейтралізуюче моноклональне антитіло (1мкг/мл) або лише анти-OPG нейтралізуючим моноклональним антитілом із подальшою обробкою 2нг/мл TGFβ1 впродовж 24 год. Синтез колагену визначали за допомогою ELISA (твердофазного імуоферментного аналізу). Результати являють собою середнє потрійних визначень + середня квадратична помилка середнього.

Фіг.6. Вплив трансфекції OPG на синтез колагену α2 типу I первинними людськими фібробластами (клітини OBHC). Клітини OBHC трансфікували pcDNA3.1/OPG (OPG) або лише pcDNA3.1 (контроль), як описано у методах. Вміст колагену у кондиціонованому середовищі визначали через 24год після обробки TGFβ1 засобами ELISA. Результати являють собою середнє потрійних визначень + середня квадратична помилка середнього.

Фіг.7A. Вплив OPG на активність промотору колагену α2 типу I у фібробластах мишачого зародка. Фібробласти мишачого зародка (клітини 3T3) трансфікували вектором pGL3, що містить 3,5 т.п.н. промотору колагену α2 типу I, зв'язаним із кДНК люцифери. Після трансфекції клітини переносили до свіжого живильного середовища і або не піддавали обробці (контроль), або обробляли лише галофугіноном ( $10^{-10}$ M) (HF); TGFβ1 (5нг/мл) (TGFβ1); або TGFβ (5нг/мл)+HF ( $10^{-8}$ M) (HF+TGFβ) впродовж 12год зі зростаючими концентраціями остеопротегерину. Результати являють собою середнє потрійних визначень. \* означає  $P<0,05$  і \*\* означає  $P<0,01$ .

Фіг.7B показує ступінь експресії репортерного гена за умов застосування промотору CTGF (фактор росту сполучної тканини) після інкубування або лише з TGFβ, або у комбінації з різними кількостями OPG.

Фіг.8. Аналіз засобами зворотних транскрипції полімеразної ланцюгової реакції мРНК остеопротегерину після *in vitro* обробки галофугіноном патологічно змінених і непошкоджених фібробластів пацієнтів, що страждають на склеродермію. Одновідсотковий агарозний гель, забарвлений етидію бромідом, що показує

продукти реакції зворотних транскриптів полімеразної ланцюгової реакції для остеопротегерину (верхня частина) і GAPDH (гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназа) (нижня частина) у патологічно змінених (суфікс А) і непошкоджених (суфікс N) фібробластах.

Фіг.9. Вплив *in vivo* введення остеопротегерину на розвиток фіброзу легень у мишей, підданих обробці блеоміцином. А: Зміна маси мишачого тіла після обробки остеопротегерином. Результати виражені як середня маса у г/групу, яка визначалась кожного дня після інтратрахеальної інстиляції блеоміцину. В: Смертність унаслідок введення блеоміцину. Результати виражено як відсоток кількості смертельних випадків на групу з 10 тварин.

Фіг.10. Вплив *in vivo* введення остеопротегерину на розвиток фіброзу легень у мишей, підданих обробці блеоміцином. А: Ступінь розвитку фіброзу у легенях, визначений через 12 діб після введення блеоміцину. Легені забарвлювали трихромом. Результати виражено як процент репрезентативної частки легень, ураженої фіброзом, для кожної тварини, що залишилась у живих. В: Рівень відкладення колагену у легенях, визначений через 12 діб після введення блеоміцину. Вміст гідроксипроліну визначали у репрезентативній частці легень, яку відбирали від кожної тварини, що залишилась у живих.

За цим винаходом, гібридизаційний аналіз ДНК на комплексах мікрофільтрів застосовували для ідентифікування диференційно експресованих генів у фібробластах шкіри з фіброзних уражень, які були одержані від пацієнтів із прогресуючим системним склерозом (склеродермією), порівняно з нормальними фібробластами шкіри тих самих пацієнтів. Одним із генів, який постійно супресувався у склеродермійних фібробластах, був остеопротегерин (OPG), який називають також фактором пригнічення остеокластогенезу. Аномальні фібробласти постійно експресували значно нижчі рівні мРНК OPG, порівняно з нормальними фібробластами у 7 з 9 пацієнтів, які піддавались випробуванням. Ці результати були підтверджені ПЛР-аналізом у масштабі реального часу. Окрім того, аналіз засобами зворотних транскриптів полімеразної ланцюгової реакції у масштабі реального часу сукупної РНК, виділеної із загального об'єму біопсійних зразків аномальної шкіри пацієнтів, що страждають на склеродермію, показав більш низькі рівні мРНК OPG, порівняно з клінічно нормальними контрольними біопсіями, підібраними за віком, статтю та анатомічною ділянкою. Вміст білка OPG був також зменшеним у патологічно змінених фібробластах, порівняно з нормальними фібробластами, виділеними від тих самих пацієнтів. *In vitro*, OPG є здатним до зниження синтезу колагену, опосередкованого TGF $\beta$ , після трансфекції фібробластів кДНК OPG або після обробки рекомбінантним білком. Додаткова *in vitro* активність OPG полягає у пригніченні індукованої TGF $\beta$  експресії фактора росту сполучної тканини (CTGF). CTGF, за нормальних умов, індукує синтез компонентів позаклітинного матриксу у фібробластах.

Ці *in vitro* дані були додатково підтверджені *in vivo* даними на відомих модельних тваринах. Введення остеопротегерину зменшує інтенсивність фіброзу легень і відкладення колагену у модельних тварин з фіброзом легень, індукованим блеоміцином. На гістологічному рівні, легені тварин, які піддавались обробці остеопротегерином, нагадували легені тварин, які раніше у досліджах не використовувались і обробці не піддавались.

Таким чином, цей винахід має відношення до застосування речовини для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання фіброзного захворювання, де згадана речовина вибрана з групи, до складу якої входять:

- а) Поліпептид, що містить Послідовність №2 або Послідовність №4;
- б) Поліпептид, що містить амінокислоти 22-401 Послідовності №2 або Послідовності №4;
- с) Поліпептид, що містить одну, дві, три або чотири збагачені цистеїном ділянки остеопротегерину;
- д) Поліпептид, що містить амінокислоти 22-194 Послідовності №2 або Послідовності №4;
- е) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (а) до (д), де амінокислотна послідовність має щонайменше 40%, або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей поліпептидів від (а) до (д);
- ф) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (а) до (д), який кодується послідовністю ДНК, що гібридується з комплементом послідовності ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів від (а) до (д) за умов помірної жорсткості або за умов високої жорсткості;
- г) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (а) до (д), де будь-які зміни амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замшами амінокислотних послідовностей поліпептидів від (а) до (д);
- h) Сіль або ізоформа, гібридний білок, функціональна похідна, активна фракція або похідна з кільцевою перестановкою будь-якого поліпептиду від (а) до (г).

Фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що за цим винаходом речовина, що стимулює виділення або підсилює активність ендogenousного остеопротегерину, може також застосовуватись для лікування та/або запобігання фіброзного захворювання, зокрема, склеродермії. Згаданою речовиною може бути сам зрілий остеопротегерин або будь-який фрагмент остеопротегерину, що зв'язується з OPGL і, тим самим, запобігає зв'язуванню OPGL з RANK і запобігає ініціюванню передачі сигналу через RANK. Такою речовиною може бути, наприклад, антитіло, спрямоване на OPGL. Відомо, що OPG зв'язується з OPGL і що ця взаємодія запобігає зв'язуванню OPGL з його рецептором RANK. Таким чином, фахівцю у цій галузі буде зрозуміло, що будь-яка речовина, що запобігає зв'язуванню OPGL з його рецептором RANK або будь-який інший агент, що блокує активність або передачу сигналу RANK, буде мати таку саму активність, що і остеопротегерин відносно запобігання та/або лікування фіброзного захворювання, зокрема, склеродермії. Агентами, що блокують зв'язування OPGL з RANK, можуть бути, наприклад, антагоністичні антитіла, спрямовані на OPGL. Агентами, що блокують активність RANK, можуть також бути, наприклад, антагоністичні антитіла, спрямовані на RANK. Додатковими агентами, що блокують взаємодію OPGL/RANK, можуть бути, наприклад, хімічні сполуки, що запобігають взаємному зв'язуванню цих двох білків, але також будь-який інший хімічний або біологічний інгібітор передачі сигналу через рецептор RANK.

Непроцесовану кДНК людського остеопротегерину клонували, і вона зображена у вигляді Послідовності №1 у лістингу послідовностей, що додається. Відповідна амінокислотна послідовність зображена у вигляді

Послідовності №2 у лістингу послідовностей, що додається. Опис послідовностей подано за адресою [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) під номером AB-008821, а також у роботі Морінага (Morinaga) та ін. (1998). Опис ізоформи або поліморфної форми остеопротегерину наведено у роботі Сімонет (Simonet) та ін. (1997). кДНК, за Сімонет (Simonet) та ін. (1997), зображено у вигляді Послідовності № 3 у лістингу послідовностей, що додається, а відповідна амінокислотна послідовність зображена у вигляді Послідовності №4. Обидві послідовності є також доступними за адресою [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) під номером U94332. Єдина різниця між білками, встановлена Морінага (Morinaga) та ін. і Сімонет (Simonet) та ін., стосується амінокислоти у положенні 263, якою може бути аспарагінова кислота або аланін, відповідно.

Термін "остеопротегерин", вживаний у цьому описі, має відношення до будь-якої з речовин, що розглядались вище у (a)-(h).

Термін "лікування та/або запобігання", вживаний у цьому описі, охоплює будь-яке ослаблення, зменшення або часткове, значне чи повне запобігання або блокування появи, розвитку, прогресування хвороби або появи, розвитку або прогресування будь-якого одного, декількох або усіх симптомів хвороби.

Термін "фіброзне захворювання", вживаний у цьому описі, має відношення до захворювань, що включають фіброз, які можуть бути викликані, наприклад, хронічним запаленням, відновленням або реорганізацією тканин. Фіброзом може уражатись будь-який орган людського тіла, наприклад, шкіра, легені, підшлункова залоза, печінка або нирки. Таким чином, цей винахід має також відношення до лікування та/або запобігання фіброзних захворювань, наприклад, цирозу печінки, інтерстиціального фіброзу легень, контрактури Дюпюїтрена, келоїду та інших відхилень від норми, пов'язаних з появою рубцевих змін у сполучній тканині/загоєнням ран, післяопераційних спайок і реактивних фіброзів, а також хронічної серцевої недостатності, зокрема, після інфаркту міокарда. Додатковими захворюваннями або розладами, які лікують за допомогою остеопротегерину, є хвороби, пов'язані із загоєнням ран, зокрема, загоєнням ран у легенях, що включають хронічне запалення легень і, врешті-решт, фіброз або появу рубцевих змін на поверхні легень. Розладами, що включають запалення легень, є, наприклад, ідіопатичний фіброз легень, саркоїдоз, бронхолегенева дисплазія, фібропроліферативний синдром дихальної недостатності у дорослих (ARDS), а також легеневі симптоми або системні захворювання, наприклад, ревматоїдний артрит (Крейн (Krein) та ін., 2001).

Фіброз, як правило, включає утворення або проліферацію сполучної тканини, яка замінює функціонально спеціалізовану тканину даного органа. Таким чином, за варіантом здійснення цього винаходу, якому віддають перевагу, фіброзним захворюванням є дифузна хвороба сполучної тканини.

За варіантом здійснення, якому віддають перевагу, фіброзним захворюванням є склеродермія.

Термін "склеродермія", вживаний у цьому описі, має відношення до захворювання, яке називають також прогресуючим системним склерозом або системною склеродермією. Ці терміни застосовуються синонімічно у межах цієї заявки на патент. Прогресуючий системний склероз є хронічним захворюванням невідомої етіології, що характеризується дифузним фіброзом, дегенеративними змінами і судинними порушеннями у шкірі, суглобових структурах і внутрішніх органах (зокрема, наприклад, у стравоході, шлунково-кишковому тракті, легенях, серці та нирках). Це захворювання може бути локалізованим, змішаним, системним, обмеженим або дифузним.

Термін "склеродермія", за варіантом, якому віддають перевагу, має відношення до локалізованої, системної, обмеженої та дифузної склеродермії, а також до синдромів, що накладаються.

Локалізована склеродермія уражує, головним чином, шкіру, але може уражувати також м'язи та кістки, що знаходяться під цією ділянкою шкіри. Однак вона, як правило, не уражує внутрішні органи. Локалізована склеродермія є відносно легким захворюванням і може пов'язуватись із системною склеродермією з точки зору однакових поверхневих симптомів, наприклад, вигляду біопсії шкіри під мікроскопом.

Системна склеродермія включає симптоми або групи симптомів декількох типів, наприклад, CREST, обмежених або дифузних. Вона може також називатись прогресуючим системним склерозом або родинним прогресуючим системним склерозом. Системна склеродермія може, наприклад, уражувати шкіру, кровоносні судини та/або внутрішні органи. У разі ураження шкіри, шкіра твердне, найчастіше на кистях рук та/або обличчі. Системна склеродермія, у разі ураження кровоносних судин, викликає хворобу Рейно. Найсерйозніші форми системного склерозу уражують внутрішні органи, і можуть спричинювати втрату працездатності або навіть смерть. Серед інших, до симптомів системного склерозу належать: склеродермія легень, нирковий криз унаслідок склеродермії, серцеві симптоми, м'язова слабкість, у тому числі втомлюваність або обмежений синдром CREST, порушення моторики і спазм шлунково-кишкового тракту, а також відхилення від норми у центральній, периферичній і автономній нервовій системі. Щодо відхилень від норми у нервовій системі, найпоширенішим є синдром каналу зап'ястя, за яким іде невралгія трійчастого нерва.

Обмежена склеродермія може обмежуватись, наприклад, кистями рук, хоча уражатись можуть також обличчя і шия.

Дифузна склеродермія включає ущільнення шкіри і спостерігається також над зап'ястями (або ліктями). Існує декілька субкатегорій дифузного системного склерозу, наприклад "склеродермія без склеродермії", коли існує фіброз внутрішніх органів, але немає ущільнення шкіри, і родинний прогресуючий системний склероз, рідкісна форма, що спостерігається у родинах.

Синдроми, що накладаються, згадуються у тому разі, якщо пацієнт, що страждає на склеродермію, має також іншу аутоімунну хворобу (наприклад, червоний вовчак, ревматоїдний артрит тощо), як, наприклад, у разі дифузної склеродермії, на яку накладається червоний вовчак. Симптоми склеродермії можуть також бути частиною змішаної хвороби сполучної тканини (MCTD) або недиференційованої хвороби сполучної тканини (UCTD).

Термін "остеопротегерин", який застосовують у цьому описі, має відношення до білка, до складу якого входить уся або частина. Послідовності №2 або Послідовності №4 (обидві людські) з лістингу послідовностей, що додається, а також до його солей, ізоформ, мутантів, активних фракцій, функціональних похідних та похідних із кільцевою перестановкою. OPG інших видів, окрім людини, наприклад, миші або пацюка, може

також застосовуватись за цим винаходом доти, доки між білками існує ідентичність, достатня для того, щоб білок міг демонструвати свою біологічну активність, не викликаючи значної імунної реакції у людській істоті.

За варіантом, якому віддають перевагу, термін "остеопротегерин" означає зрілий білок, якому бракує сигнального пептиду. До складу сигнального пептиду входить 21 амінокислота N-кінця OPG, як визначається Послідовністю №2 або Послідовністю №4, тобто зрілий білок містить амінокислоти 22-401 Послідовності №2 або Послідовності №4. Термін "остеопротегерин", вживаний у цьому описі, додатково означає будь-який фрагмент, частину, домен або субдомен Послідовності № 2 або Послідовності № 4, який демонструє необхідну активність при склеродермії або інших фіброзах. Фрагменти білка, ізоформи, диференційно глікозиловані або сіалізовані форми або один чи декілька доменів білка можуть застосовуватись за цим винаходом доти, доки вони демонструють будь-який благотворний ефект на фіброзне захворювання, за варіантом, якому віддають перевагу, ефект, який принаймні є порівняним з ефектом непроцесованого білка. Благотворний ефект може визначатись за допомогою одного з *in vitro* або *in vivo* випробувань, опис яких наведено у наведених нижче прикладах, або за допомогою будь-якого іншого аналізу, достатнього для демонстрації ефекту при фіброзних захворюваннях, зокрема, при склеродермії.

Наприклад, до складу N-кінця остеопротегерину входить збагачена цистеїном TNFR-подібна ділянка, як описано Сімонет (Simonet) та ін., 1997. Було показано, що фрагмент, до складу якого входить ця ділянка, зберігає біологічну активність OPG в *in vitro* випробуваннях. Таким чином, до складу фрагмента OPG, якому віддають перевагу, входить TNFR-подібна ділянка OPG, зокрема, фрагмент, що містить амінокислоти 22-194 Послідовності №2 або Послідовності №4.

За цим винаходом остеопротегерин може бути природним, тобто нативним білком або рекомбінантним білком. Рекомбінантне продукування може здійснюватись в еукаріотних клітинах, наприклад, в дріжджових клітинах або клітинах ссавців, за варіантом, якому віддають перевагу, у культурах клітин CHO (яєчника китайського хом'ячка), культурах клітин HEK (нирки людського ембріону) або у клітинах чи лініях клітин людських фібробластів. Згаданий білок додатково може продукуватись у прокаріотних клітинах, наприклад, *E.coli*.

Остеопротегерин, за описом, існує у мономерній та димерній формах (Сімонет (Simonet) та ін., 1997). Таким чином, за цим винаходом OPG може бути мономером, димером або мультимером.

За варіантом, якому віддають перевагу, остеопротегерин глікозилюється на одній або декількох ділянках. Він може бути також неглікозилованим, у залежності від конкретних потреб та джерела продукування або виділення білка.

Термін "солі" у цьому описі означає як солі карбоксильних груп, так і одержані доданням кислоти солі аміногруп молекули остеопротегерину або їхні аналоги. Солі карбоксильної групи можна одержувати засобами, відомими у цій галузі, і до них належать неорганічні солі, наприклад, солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку тощо, і солі з органічними основами, наприклад, одержані з амінами, наприклад, триетаноламін, аргінін або лізин, піперидин, прокаїн тощо. До солей з кислотами належать, наприклад, солі з мінеральними кислотами, наприклад, хлористоводневою кислотою або сірчаною кислотою, і солі з органічними кислотами, наприклад, оцтовою кислотою або щавлевою кислотою. Звичайно, будь-яка з таких солей повинна зберігати біологічну активність остеопротегерину відповідно до цього винаходу, тобто виявляти благотворний ефект на фіброзні захворювання, зокрема, склеродермію.

Ізоформи або сплайсингові варіанти остеопротегерину можуть також застосовуватись за цим винаходом доти, доки вони є здатними до пригнічення розвитку захворювання та/або симптомів захворювання.

Термін "мутеїни", вживаний у цьому описі, означає аналоги остеопротегерину, у яких один або декілька амінокислотних залишків природного остеопротегерину замінюють на різні амінокислотні залишки або видаляють, або один чи декілька амінокислотних залишків додають до природної послідовності остеопротегерину, що мають, за варіантом, якому віддають перевагу, щонайменше таку саму активність, що і остеопротегерин дикого типу або навіть ще більшу активність. Біологічна активність OPG може, наприклад, визначатись шляхом аналізу зв'язування OPG з його природним лігандом OPGL. Аналізи для визначення білок-білкових взаємодій є добре відомими фахівцю у цій галузі. Прикладами таких аналізів є аналізи зв'язування типу ELISA, імунопреципітаційні аналізи або виміри за допомогою будь-якої іншої придатної системи, наприклад, системи BIAcore. Ці мутеїни одержують відомими методами синтезу та/або сайтспрямованого мутагенезу чи будь-якими іншими відомими методами, придатними для цього.

Будь-який з таких мутеїнів, за варіантом, якому віддають перевагу, має послідовність амінокислот, яка достатньою мірою повторює послідовність зрілого остеопротегерину, причому настільки, що мутеїн має активність, щонайменше значною мірою подібну до активності остеопротегерину. Активність мутанта остеопротегерину може додатково випробуватись у аналізах, пояснення яких наведено у поданих нижче прикладах. Визначення інтенсивності синтезу колагену у фібробластах, оброблених OPG, може бути придатним тестом для визначення активності, наприклад, мутеїнів остеопротегерину.

До мутеїнів за цим винаходом належать білки, що кодуються нуклеїновою кислотою, наприклад, ДНК або РНК, яка гібридується з ДНК або РНК, що кодує остеопротегерин за цим винаходом за жорстких умов. Термін "жорсткі умови" означає умови гібридизації і подальшого промивання, які пересічні фахівці у цій галузі традиційно називають "жорсткими". Дивись, Осбел (Ausubel) та ін., *Current Protocols in Molecular Biology*, див. вище, Interscience, N.Y., §§6.3 і 6.4 (1987, 1992); Сембрук та ін. [Сембрук Дж.К. (Sambrook J.C.), Фрітш Е.Ф. (Fritsch E.F.), Маніатіс Т. (Maniatis T.) (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY].

Без обмежень, приклади жорстких умов включають умови промивання при температурі на 12-20°C нижче за розрахункову  $T_m$  гібриду, що піддається випробуванням, у, наприклад, 2×SSC (стандартний цитратний фізіологічний розчин: цитрат натрію+хлорид натрію) і 0,5% SDS (додецилсульфат натрію) впродовж 5хв, 2×SSC і 0,1% SDS впродовж 15хв; 0,1×SSC і 0,5% SDS при температурі 37°C впродовж 30-60хв, після чого 0,1×SSC і 0,5% SDS при температурі 68°C впродовж 30-60хв. Пересічним фахівцям у цій галузі зрозуміло, що умови жорсткості залежать також від довжини послідовностей ДНК, олігонуклеотидних зондів (наприклад, 10-

40 п.н.) або змішаних олігонуклеотидних зондів. У разі застосування змішаних зондів, перевагу віддають застосуванню TMAC (тетраметиламонію хлорид) замість SSC. Дивись Осбел (Ausubel), вище.

Будь-який з таких мутеїнів, за варіантом, якому віддають перевагу, має послідовність амінокислот, яка достатньою мірою повторює послідовність остеопротегерину, причому настільки, що мутеїн має активність по суті подібну, або навіть більшу, за активність остеопротегерину.

Однією з активностей остеопротегерину, яка легко піддається визначенню, є здатність до зменшення синтезу колагену. Доти, доки мутеїн має значну активність зменшення синтезу колагену, він може розглядатись як такий, активність якого є по суті подібною до активності остеопротегерину. Таким чином, шляхом звичайного експериментального дослідження, якому піддають мутеїн, можна визначити, чи має будь-який даний мутеїн щонайменше практично таку саму активність, що і остеопротегерин.

За варіантом здійснення, якому віддають перевагу, будь-який з таких мутеїнів має щонайменше 40% ідентичність або гомологію з послідовністю зрілого остеопротегерину. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, він має щонайменше 50%, щонайменше 60%, щонайменше 70%, щонайменше 80%, або за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, щонайменше 90% ідентичність або гомологію зі зрілим остеопротегерином.

Ідентичність відображає взаємозв'язок між двома або декількома поліпептидними послідовностями або двома чи декількома полінуклеотидними послідовностями, що визначається шляхом порівняння послідовностей. Взагалі, ідентичність означає точну взаємну відповідність нуклеотидів або амінокислот двох полінуклеотидів або двох поліпептидних послідовностей, відповідно, по довжині послідовностей, які порівнюються.

Для послідовностей, що не мають точної відповідності, може визначатись "процент (%) ідентичності". Взагалі, дві послідовності, які порівнюються, впорядковано розміщують для одержання максимальної кореляції між послідовностями. Цей процес може включати введення "проривів" до однієї або обох послідовностей для підвищення ступеню впорядкованого розміщення. Процент ідентичності може бути визначеним для усієї довжини кожної з послідовностей, що порівнюються (так зване глобальне впорядковане розміщення), що є особливо придатним для послідовностей однакової або дуже подібної довжини, або для коротших визначених довжин (так зване локальне впорядковане розміщення), що є більш придатним для послідовностей неоднакової довжини.

Способи порівняння ідентичності та гомології двох або декількох послідовностей є добре відомими у цій галузі. Так, наприклад, програми пакету Wisconsin Sequence Analysis Package, версія 9.1 (Деверо Дж. (Devereux J.) та ін., 1984), наприклад, програми BESTFIT і GAP, можуть застосовуватись для визначення процента ідентичності між двома полінуклеотидними і процента ідентичності та процента гомології між двома поліпептидними послідовностями. Програма BESTFIT застосовує алгоритм "локальної гомології" Сміта (Smith) і Уотермена (Waterman) (1981) і знаходить одну найкращу ділянку подібності між двома послідовностями. У цій галузі відомими є також інші програми для визначення ідентичності та/або подібності між послідовностями, наприклад, сімейство програм BLAST [Альтшуль С.Ф. (Altschul S.F.) та ін., 1990, Альтшуль С.Ф. (Altschul S.F.) та ін., 1997, доступне через веб-сторінку NCBI за адресою [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)] і FASTA (Пірсон У.Р. (Pearson W.R.), 1990; Пірсон (Pearson), 1988).

Мутеїни остеопротегерину, які можуть застосовуватись за цим винаходом, або нуклеїнові кислоти, що їх кодують, містять кінцевий набір по суті відповідних послідовностей, як замісних пептидів або полінуклеотидів, одержання яких є звичайною практикою для пересічного фахівця у цій галузі без зайвого експериментування, виходячи з роз'яснень та методик, наведених у цьому описі.

Зміни мутеїнів, яким віддають перевагу за цим винаходом, відомі під назвою "консервативних" заміні. Консервативні амінокислотні заміни поліпептидів або білків остеопротегерину можуть включати синонімічні амінокислоти, які входять до групи, яка має достатньо подібні фізико-хімічні властивості для того, щоб у разі заміни між членами цієї групи зберігалась біологічна функція молекули (Грантем (Grantham), 1974). Зрозуміло, що вищевизначені послідовності можуть також піддаватись інсерціям та делеціям без зміни їхньої функції, зокрема, якщо інсерції або делеції залучають лише невелику кількість амінокислот, наприклад, менше тридцяти, а за варіантом, якому віддають перевагу, менше десяти, і не видаляють або зміщують амінокислоти, які є критичними для функціональної конформації, наприклад, залишки цистеїну. Білки та мутеїни, одержані шляхом таких делецій та/або інсерцій, входять до сфери цього винаходу.

За варіантом, якому віддають перевагу, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці I. За варіантом, якому віддають більшу перевагу, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці II; і за варіантом, якому віддають найбільшу перевагу, групами синонімічних амінокислот є групи, визначені у Таблиці III.

Таблиця I

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

Таблиця II

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають більшу перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

Таблиця III

Групи синонімічних амінокислот, яким віддають найбільшу перевагу

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val



Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys
Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади здійснення амінокислотних заміни у білках, до якого можуть вдаватись для одержання мутеїнів поліпептидів або білків остеопротегерину для застосування у цьому винаході, включають стадії будь-яких відомих методів, наприклад, представлені у патентах США №4,959,314, №4,588,585 і №4,737,462 (виданих на ім'я Марк (Mark) та ін.); №5,116,943 (виданому на ім'я Коте (Koths) та ін.); №4,965,195 (виданому на ім'я Неймен (Namen) та ін.); №4,879,111 (виданому на ім'я Чонг (Chong) та ін.); і №5,017,691 (виданому на ім'я Лі (Lee) та ін.); і білки, замінені на лізин, представлені у патенті СІЛА № 4,904,584 (виданому на ім'я Шоу (Shaw) та ін.).

Термін "гібридний білок" означає поліпептид, до складу якого входить остеопротегерин, або його мутеїн, злитий з іншим білком, який, наприклад, має подовжений час перебування у загальній воді організму. Перевагу за цим винаходом віддають гібридним білкам, які містять увесь або функціональну частину остеопротегерину, зливу з усім або функціональною частиною білка, здатного до поліпшення біологічних активностей молекули, наприклад, часу половини строку життя у людському тілі. За варіантом здійснення, якому віддають перевагу, гібридний білок містить ділянку імуноглобуліну (Ig). Велику перевагу віддають гібридним білкам, до складу яких входить весь або частина остеопротегерину, злита з усім або частиною імуноглобуліну. Вони можуть бути мономерними або мультимерними, гетеро- або гомомультимерними. За варіантом, якому віддають перевагу, гібридний білок містить константну ділянку імуноглобуліну, зокрема, Fc-фрагмент імуноглобуліну. Додаткову перевагу віддають варіантам здійснення цього винаходу, де імуноглобуліном є ізотип IgG1 або IgG2. За варіантом, якому віддають перевагу, згаданою ділянкою є Fc-фрагмент.

Таким чином, остеопротегерин може бути злитим з іншим білком, поліпептидом тощо, наприклад, імуноглобуліном або його фрагментом. Злиття може бути прямим або здійснюватись через короткий лінкерний пептид, який може мати у довжину від 1 амінокислотного залишку до 3 амінокислотних залишків або більше, наприклад, 13 амінокислотних залишків. Згаданий лінкер може бути, наприклад, трипептидом із послідовністю E-F-M (Glu-Phe-Met) або 13-амінокислотною лінкерною послідовністю, що містить Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, введеною між послідовністю остеопротегерину і послідовністю імуноглобуліну.

Термін "функціональні похідні", який застосовують у цьому описі, означає похідні остеопротегерину, їхні мутеїни та гібридні білки, які можна одержати з функціональних груп, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- чи C-кінцевих групах, засобами, відовими у цій галузі, і їх включають до цього винаходу доти, доки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знищують активності білка, яка є щонайменше суттєво подібною до активності остеопротегерину, і не надають токсичних властивостей композиціям, які їх містять. Таким чином, за варіантом здійснення, якому віддають перевагу, функціональна похідна містить щонайменше одну складову, приєднану до однієї або декількох функціональних груп, які існують як один або декілька бічних ланцюгів на амінокислотних залишках.

За цим винаходом складовими, яким віддають велику перевагу, є поліетиленглікольні (PEG) бічні ланцюги. Поліетиленглікольні бічні ланцюги можуть маскувати ділянки детермінанти і подовжувати перебування речовини, з якою вони з'єднані, у загальній воді організму. Іншими похідними є аліфатичні складні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп, які одержують шляхом реакції з аміаком або з первинними чи вторинними амінами, N-ацильні похідні вільних аміногруп амінокислотних залишків, одержаних з ацильними складовими (наприклад, алканойльними або карбоциклічними ароїльними групами) або O-ацильні похідні вільних гідроксильних груп (наприклад, гідроксильних груп залишків серилу або треонілу), одержаних з ацильними складовими.

Термін "активні фракції" остеопротегерину і його мутеїнів і гібридних білків означають будь-який фрагмент або попередники поліпептидного ланцюга білкової молекули самостійно або разом зі зв'язаними молекулами або залишками, сполученими з ними, наприклад, залишки цукру або фосфату або агрегати білкової молекули чи залишки цукру самі по собі, за умови, що згадана активна фракція має активність, щонайменше суттєво подібну до активності остеопротегерину.

Цей винахід додатково має відношення до застосування молекули нуклеїнової кислоти для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання склеродермії, де до складу молекули нуклеїнової кислоти входить нуклеїновокислотна послідовність, що кодує поліпептид, який містить амінокислотну послідовність, вибрану з групи, до складу якої входять:

- Поліпептид, що містить Послідовність №2 або Послідовність №4;
- Поліпептид, що містить амінокислоти 22-401 Послідовності №2 або Послідовності №4;
- Поліпептид, що містить одну, дві, три або чотири збагачені цистеїном ділянки остеопротегерину;

d) Поліпептид, що містить амінокислоти 22-194 Послідовності №2 або Послідовності №4;  
e) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (a) до (d), де амінокислотна послідовність має щонайменше 40%, або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичність із щонайменше однією з послідовностей поліпептидів від (a) до (d);

f) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (a) до (d), який кодується послідовністю ДНК, що гібридується з комплементом послідовності нативної ДНК, що кодує будь-який з поліпептидів від (a) до (d) за умов помірної жорсткості або за умов високої жорсткості;

g) Мутеїн будь-якого з поліпептидів від (a) до (d), де будь-які зміни амінокислотної послідовності є консервативними амінокислотними замшами амінокислотних послідовностей поліпептидів від (a) до (d);

h) Ізоформа, гібридний білок або активна фракція будь-якого поліпептиду від (a) до (g)

для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання фіброзних захворювань. Цей винахід, за варіантом, якому віддають перевагу, має відношення до застосування згаданих молекул нуклеїнової кислоти для лікування та/або запобігання дифузних хвороб сполучної тканини, і, зокрема, склеродермії.

За цим винаходом, остеопротегерин може також вводитись до людського тіла у формі вектора, що містить згадану молекулу нуклеїнової кислоти. Таким чином, цей винахід додатково має відношення до застосування вектора, що містить згадану молекулу нуклеїнової кислоти, для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання склеродермії або іншого фіброзу. За варіантом, якому віддають перевагу, згаданим вектором є вектор експресії, що містить промотор, функціонально зв'язаний з усією або частиною кодувальної послідовності остеопротегерину. За додатковим варіантом здійснення, згаданим вектором є генотерапевтичний вектор. Генотерапевтичні вектори є відомими у цій галузі; більшість з них є векторами на основі геному вірусу, наприклад, вектори на основі аденовірусу або лентивирусу.

За цим винаходом, остеопротегерин може також вводитись до людського тіла у формі клітини, що продукує та/або секретує остеопротегерин. Таким чином, цей винахід додатково має відношення до застосування клітини, що експресує остеопротегерин, для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання склеродермії або будь-якого іншого фіброзу, тобто до клітинної терапії для лікування та/або запобігання склеродермії або інших фіброзів. Згадана клітина може продукувати остеопротегерин природним шляхом та/або це може бути трансфікована клітина, що продукує рекомбінантний остеопротегерин. Перевагу віддають клітинам, що експресують і секретують велику кількість білка, наприклад, надекспресуючим клітинам, які несуть велику кількість копій вектора експресії, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, яка кодує остеопротегерин.

Оскільки фібробласти являють собою комплекс фіброзу, вони є найпридатнішими клітинами для протифіброзної та склеродерміїної терапії. Таким чином, за цим винаходом, за варіантом, якому віддається перевага, застосовують фібробласти, що експресують остеопротегерин.

Цей винахід додатково має відношення до клітини, що містить вектор, до складу якого входить молекула нуклеїнової кислоти, яка кодує увесь або частину остеопротегерину для виготовлення лікарського засобу для лікування та/або запобігання фіброзного захворювання, зокрема, склеродермії. Клітина, яку було піддано генетичній модифікації для одержання поліпептиду за цим винаходом також входить до обсягу цього винаходу.

За цим винаходом передбачається також застосування вектора експресії для індукування та/або підсилення ендогенного продукування остеопротегерину клітиною, що за нормальних обставин є "німою" або експресує недостатню кількість інгібітора. Таким чином, у цьому винаході застосовують технологію, відому як активація ендогенних генів (EGA), для продукування необхідного білка.

Перевага за цим винаходом віддається декільком комбінованим способам лікарського впливу. Таким чином, за варіантом, якому віддають перевагу, лікарський засіб за цим винаходом додатково містить:

- Інтерферон, зокрема, інтерферон- $\beta$ ;
- Антагоніст некротичного пухлинного фактора (TNF), зокрема, розчинні TNFR, наприклад, розчинний p55 (TBPI) та/або розчинний p75 (TBPII);

- Додатковий протисклеродерміїний агент;

- Протисклеродерміїний агент, вибраний з групи, до складу якої входять галофугінон, інгібітори ацетилхоліністерази (ACE), блокатори кальцієвого каналу, інгібітори протонного насоса, нестероїдні протизапальні лікарські препарати (NSAID), інгібітори циклооксигенази (COX), кортикостероїди, тетрациклін, пентоксифілін, буциламін, інгібітори геранілгеранілтрансферази, роттерлін, інгібітори проліл-4-гідроксилази, інгібітори с-протеїнази, інгібітори лізілоксидази, релаксин, простагландини, простацикліни, ендотелій-1, оксид азоту, інгібітори ангіотензину II, антиоксиданти або білок SARP-1.

Було показано, що білок SARP-1 має благотворний ефект при фіброзах, наприклад, при склеродермії (WO 02/46225). За цим винаходом, фрагменти, ізоформи, активні фракції, гібридні білки або функціональні похідні білка SARP-1, як описано у WO 02/46225, можуть також застосовуватись у комбінації з остеопротегерином.

Усі способи лікування призначені для одночасного, послідовного або окремого застосування.

Фармацевтичні композиції, що містять одну або декілька з вищезгаданих речовин, разом з остеопротегерином, входять до обсягу цього винаходу.

Незважаючи на те, що на даному етапі не існує способу лікування склеродермії, декілька препаратів або лікарських засобів зараз застосовують для лікування симптомів склеродермії. Такі протисклеродерміїні препарати, які можуть застосовуватись як комбіновані способи лікувального впливу, узагальнені у роботах Лейтона (Leighton) (2001) або Уїглі (Wigley) і Сал (Sule) (2001), які у повному обсязі включено до цього опису шляхом посилання.

Інтерферони відомі, головним чином, завдяки своїм ефектам пригнічення реплікації вірусів та проліферації клітин. Інтерферон- $\gamma$ , наприклад, відіграє важливу роль у підсиленні імунних та запальних реакцій. Інтерферон  $\beta$  (IFN- $\beta$ , інтерферон типу I), як зазначають, відіграє протизапальну роль.

За ще одним додатковим варіантом здійснення цього винаходу, остеопротегерин застосовують у

комбінації з антагоністом TNF. Антагоністи TNF виявляють свою активність декількома шляхами. По-перше, антагоністи можуть зв'язувати або секвеструвати саму молекулу TNF з достатньою спорідненістю та специфічністю з частковою або значною нейтралізацією антигенної детермінанти або антигенних детермінант TNF, відповідних за зв'язування рецептора TNF (у подальшому їх називають "секвеструвальними антагоністами"). Секвеструвальним антагоністом може бути, наприклад, антитіло, спрямоване проти TNF.

За альтернативним варіантом, антагоністи TNF можуть пригнічувати шлях передачі сигналу TNF, активований поверхневим рецептором клітини після зв'язування TNF (у подальшому їх називають "антагоністами передачі сигналу"). Антагоністи TNF легко ідентифікуються і оцінюються шляхом звичайного відбору кандидатів за їх впливом на активність нативного TNF на сприйнятливій лінії клітин *in vitro*, наприклад, В-клітини людини, у яких TNF викликає проліферацію і секрецію імунoglobulinу. Для проведення аналізу застосовують лікарську форму TNF з різними розведеннями можливого антагоніста, наприклад, у межах від 0,1-кратної до 100-кратної мольної кількості TNF, що застосовується для аналізу, і контролі без TNF або лише з агоністом (Туччі (Тиссі) та ін., 1992).

Секвеструвальні антагоністи є антагоністами TNF, яким віддається перевага для застосування за цим винаходом. Серед секвеструвальних антагоністів перевага віддається тим поліпептидам, що зв'язують TNF із високою спорідненістю і мають низьку імуногенність. Особливу перевагу віддають розчинним молекулам рецептора TNF і антитілам, що нейтралізують TNF. Придатними для цього винаходу є, наприклад, розчинні форми TNF-RI (p55) і TNF-RII (p75). До числа антагоністів, яким віддається більша перевага, за цим винаходом належать "скорочені" форми цих рецепторів, що містять позаклітинні домени рецепторів або їхні функціональні частини. "Скорочені" розчинні рецептори TNF типу I і типу II описані, наприклад, у EP 914431.

"Скорочені" форми рецепторів TNF є розчинними, і їх виявляють у сечі і сироватці у вигляді білків (приблизно, 30кДа або 40кДа) пригнічувального зв'язування TNF, які називають TBPI і TBPII, відповідно (Енглман (Engelmann) та ін., 1990). Перевагу за цим винаходом віддають одночасному, послідовному або окремому застосуванню остеопротегерину з антагоністом TNF та/або інтерфероном.

За цим винаходом TBPI і TBPII є такими, яким віддається перевага, антагоністами TNF, призначеними для застосування у комбінації з остеопротегерином. За цим винаходом можуть застосовуватись також похідні, фрагменти, ділянки і біологічно активні частини рецепторних молекул, які функціонально нагадують рецепторні молекули. Такий біологічно активний еквівалент або похідну рецепторної молекули називають частиною поліпептиду або послідовністю, що кодує рецепторну молекулу, яка має достатній розмір і є здатною до зв'язування TNF із такою спорідненістю, що взаємодія з мембранним рецептором TNF пригнічується або блокується.

За додатковим варіантом здійснення, якому віддають перевагу, людським розчинним TNF-RI (TBPI) є антагоніст TNF, призначений для застосування за цим винаходом. Природні і рекомбінантні розчинні молекули рецепторів TNF і способи їх продукування були описані у EP 308378, EP 398327 і EP 433900.

У той час як вигідним може бути блокування TNF- $\alpha$  на початкових стадіях захворювання, обговорювалось, що на пізніших стадіях сам TNF може чинити благотворну дію на склеродермію (Абрахам (Abraham) та ін., 2000). Таким чином, цей винахід додатково має відношення до комбінації остеопротегерину і TNF для лікування або запобігання склеродермії, зокрема, на пізніх стадіях хвороби. За цим винаходом можуть застосовуватись TNF- $\alpha$  або TNF- $\beta$ .

Цей винахід додатково має відношення до фармацевтичної композиції, що містить остеопротегерин, факультативно разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними носіями, розріджувачами або наповнювачами, для лікування та/або запобігання фіброзного захворювання, зокрема, склеродермії. Згадана фармацевтична композиція може додатково містити будь-який з вищевказаних додаткових компонентів, зокрема, інтерферон, TBP або інгібітор циклооксигенази.

Фармацевтична композиція за цим винаходом може також містити вектор, до складу якого входить молекула нуклеїнової кислоти за цим винаходом або клітина, що експресує остеопротегерин.

Активні інгредієнти фармацевтичного засобу, тобто поліпептиди, нуклеїнові кислоти або клітини за цим винаходом чи їх комбінації, а також комбінації речовин, згаданих вище, можуть вводитись індивіду різнорізними шляхами. Шляхами введення є внутрішньошкірний, черезшкірний (наприклад, у пролонгованих лікарських формах), внутрішньом'язовий, внутрішньоочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий і назальний шляхи. Може застосовуватись будь-який інший терапевтично ефективний шлях введення, наприклад, абсорбування через епітеліальні чи ендотеліальні тканини або засобами генотерапії, де пацієнту вводять молекулу ДНК, що кодує активний агент (наприклад, за допомогою вектора), завдяки чому активний агент експресується і секритується *in vivo*. На додаток до цього, білок (білки) за цим винаходом може (можуть) вводитись разом з іншими компонентами біологічно активних агентів, наприклад, фармацевтично прийнятних поверхнево-активних речовин, наповнювачів, носіїв, розріджувачів і розчинників.

Визначення "фармацевтично прийнятний" означає будь-який носій, який не перешкоджає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і який не є токсичним для хазяїна, якому він вводиться. Наприклад, для парентерального введення, активний білок(-ки) може (можуть) вводитись до складу дозованої лікарської форми для ін'єкцій у таких розчинниках, як фізіологічний розчин, розчин декстрази, сироватковий альбумін і розчин Рінгера-Локка.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення активний білок(-ки) може (можуть) вводитись до складу розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним розчинником (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрази) і домішками, що підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стійкість (наприклад, консерванти і буферні розчини). Лікарську форму стерилізують традиційними способами.

Біодоступність активного білка(-ів) за цим винаходом може також поліпшуватись завдяки застосуванню процедур кон'югації, що підвищує час півжиття молекули у людському тілі, наприклад, шляхом зв'язування

молекули з поліетиленгліколем, як описано у міжнародній заявці WO 92/13095.

Терапевтично ефективна кількість активного білка(-ів) буде залежати від багатьох перемінних, у тому числі типу рецептора, спорідненості речовини за цим винаходом до її рецептора, будь-якої залишкової цитотоксичної активності, яка демонструється згаданою речовиною, шляху введення, клінічного стану пацієнта.

"Терапевтично ефективною кількістю" речовини за цим винаходом є така кількість, наслідком введення якої є благотворний вплив на розвиток або прогресування хвороби *in vivo*. Доза (разова або багаторазова), введена індивіду, буде змінюватись у залежності від цілого ряду факторів, у тому числі фармакокінетичних властивостей OPG, шляху введення, стану і характеристик (стать, вік, маса тіла, стан здоров'я, розміри) пацієнта, ступеня розвитку симптомів, одночасних методів лікування, частоти лікування і необхідного ефекту. Регулювання і маніпулювання встановленими діапазонами доз знаходяться у межах здатності фахівців у цій галузі.

Необхідна доза поліпептиду за цим винаходом буде змінюватись від приблизно 0,0001мг/кг до 100мг/кг або від приблизно 0,01мг/кг до 10мг/кг, або від приблизно 0,1мг/кг до 5мг/кг, або від приблизно 1мг/кг до 3мг/кг, хоча, як вказувалось вище, це буде залежати від цілого ряду терапевтичних міркувань. Лікарський засіб за цим винаходом може вводитись щоденно, через день або тричі на тиждень.

Добові дози вводять, як правило, у вигляді невеликих доз лікарського засобу, що повторюються через певні проміжки часу або у вигляді пролонгованої лікарської форми, ефективною для одержання необхідних результатів. Друге або подальші введення можуть здійснюватись у дозі, яка залишається такою самою, меншою ніж або більшою ніж початкова або попередня доза, введена індивіду. Друге або подальше введення може здійснюватись під час або до початку хвороби.

Цей винахід додатково має відношення до способу лікування та/або запобігання фіброзних захворювань, зокрема, склеродермії, що включає введення пацієнту, який потребує цього, ефективною кількістю речовини за цим винаходом, факультативно разом із фармацевтично прийнятним носієм. За цим винаходом, за альтернативним варіантом або додатково, може вводитись клітина, що продукує остеопротегерин або молекула нуклеїнової кислоти за цим винаходом, яка факультативно входить до складу вектора експресії.

Вектор експресії може вводитись системно. За варіантом, якому віддають перевагу, вектор експресії вводять внутрішньом'язовою ін'єкцією. Додатковим шляхом введення, якому віддають перевагу, є інгаляція, зокрема, якщо до патологічного хворобливого процесу залучено фіброз легень. Місцеве введення вектора експресії, що містить послідовності OPG або поліпептид OPG за цим винаходом, є додатковим шляхом введення, якому віддають перевагу, зокрема, якщо уражена шкіра.

Цей винахід додатково має відношення до способу одержання фармацевтичної композиції, що включає змішування ефективною кількістю остеопротегерину з фармацевтично прийнятним носієм, і до способу лікування та/або запобігання артрити, що включає введення хазяїну, який цього потребує, ефективною пригнічувальною кількістю остеопротегерину.

Усі посилання, згадані у цьому описі, у тому числі журнальні статті або реферати, опубліковані або неопубліковані американські або зарубіжні заявки на патент, видані американські або зарубіжні патенти або будь-які інші посилання, включаються до цього опису у повному обсязі шляхом посилання, у тому числі усі дані, таблиці, фігури і текст, наведені у згаданих посиланнях. На додаток до цього посилання, які згадуються у посиланнях, згаданих у цьому описі, також включаються до цього опису у повному обсязі шляхом посилання.

Посилання на стадії відомих методів, стадії традиційних методів, відомі методи або традиційні методи у жодному разі не є визнанням того, що будь-який аспект, опис або варіант здійснення цього винаходу розкривається, описується або пропонується відповідним відомим рівнем техніки.

Попередній опис конкретних варіантів здійснення винаходу настільки повно розкриває загальну природу винаходу, що інші можуть, шляхом застосування знань, що знаходяться у межах навичок цієї галузі (з включенням вмісту посилань, згаданих у цьому описі), легко модифікувати та/або пристосувати для різноманітних варіантів застосування, без непотрібного експериментування, такі специфічні варіанти здійснення без відходження від загальної концепції цього винаходу. Таким чином, подібні варіанти пристосування та модифікацій знаходяться у межах діапазону еквівалентів розкритих варіантів здійснення, побудованих на описі та методиках, поданих у цьому описі. Слід розуміти, що фразеологія або термінологія цього опису призначена для цілей опису, а не обмеження, завдяки чому термінологія або фразеологія цього опису повинна інтерпретуватись досвідченим фахівцем у світлі наведеного опису і методик, у поєднанні зі знаннями пересічного фахівця у цій галузі.

Після наведення опису винаходу, його буде набагато легше зрозуміти шляхом посилання на подальші приклади, що наводяться з метою ілюстрування і не призначені для обмеження цього винаходу.

Приклади

Методи

Зразки, відібрані від пацієнтів

Пункційні біопсії (2мм<sup>3</sup>) патологічно зміненої і непошкодженої шкіри (як правило, шкіра передпліччя) були одержані від дев'яти пацієнтів, підібраних за віком та статтю, з дифузним шкірним прогресуючим системним склерозом (SSc). Усі пацієнти задовольняли критеріям Американського коледжу ревматолога щодо діагнозу SSc.

Культири фібробластів

Фібробласти одержали з біопсій шляхом *in vitro* культивування, як описувалось раніше (Абрахам (Abraham) та ін., 1991). Стисло, біопсії нарізали на шматки і вносили до стерильних пластикових чашок або колб. Через 15хв висушування при кімнатній температурі біопсійні шматки прилипали до пластикових чашок Петрі, після чого культивувались у середовищі для вирощування фібробластів (FGM), до складу якого входило модифіковане за способом Дульбекко середовище Ігла (DMEM), що містило 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 2мМ розчин L-глутаміну, 1мМ розчин пірувату натрію, 100Од/мл пеніциліну, 100мкг/мл стрептоміцину, 50мкг/мл гентаміцину і 2,5мкг/мл амфотерицину В. Після 2-3 тижнів інкубування у зволоженій атмосфері 5%

CO<sub>2</sub> у повітрі, фібробласти, що вирости у культурі, відділяли шляхом короткочасної трипсинізації і повторно культивували у FGM без гентаміцину і амфотерицину В. У експериментах фібробласти застосовувались між пасажами 2 і 5. Фенотип фібробластів було підтверджено за їхньою типовою морфологією у моношарі і об'ємних культурах колагену у гелі.

#### Виділення РНК

Загальну РНК виділяли зі злитих склеродермійних фібробластів на ранніх стадіях пасажування із застосуванням тризолу (Life Technologies) за методикою виробника. Кінцевий осад РНК ресуспендували у стерильній воді, обробленій діетилпірокарбонатом (DEPC) із концентрацією 1 мг/мл і зберігали при температурі -80°C.

#### Синтез зондів кДНК

Два міліграми загальної РНК змішували з 1,3мкл цитокін-специфічних праймерів (R&D systems, номер за каталогом GAC11) і інкубували при температурі 70°C впродовж 2хв у еппендорфівських пробірках. Потім пробірки охолоджували до температури 50°C впродовж 2хв, після чого додавали реакційну суміш, що містила 2мкл 5× реакційного буфера (250мМ розчин трис-НСІ, рН 8,3, 375мМ розчин КСІ і 15мМ розчин MgCl<sub>2</sub>), 1мкл 10× суміші dNTP (дезоксинуклеозид-5'-трифосфат) (5мМ розчин dGTP (дезоксигуанозин-5'-трифосфат), 5мМ розчин dCTP (дезоксцитидин-5'-трифосфат) і 5мМ розчин dTTP (дезокситимидин-5'-трифосфат)), 3,5мкл α<sup>32</sup>P-dATP (дезоксіденозин-5'-трифосфат, 3000Кі/ммоль, Amersham, номер за каталогом PB10204), 0,5мкл DTT (дитіотреїтол, 100мМ) і 1мкл суперскрипту II (Life Technologies)). Реакційну суміш перемішували впродовж нетривалого періоду часу шляхом піпетування і інкубували при температурі 50°C впродовж 25хв. Реакцію припиняли додаванням 1мкл 0,1М розчину EDTA (етилендіамінтетраоцтова кислота, рН 8,0), що містив 1мг/мл глікогену. Після цього мічену кДНК очищали від дезоксинуклеотидів, які не вступили до реакції, на колонці Chromaspin-200 DEPC-H<sub>2</sub>O (Clontech) за інструкціями виробника. Фракції, що містили кДНК, ідентифікували за допомогою лічильника Черенкова. Пікову фракцію (за нормальних умов, фракція 2 із загального числа 6 зібраних фракцій) обробляли 0,1 об'єму 1М розчину NaOH, що містив 1мМ розчин EDTA, впродовж 20хв при температурі 70°C для гідролізу РНК, після чого нейтралізували рівним об'ємом 1М розчину NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, що містив 2,5мг людської Cot-I ДНК (Life Technologies), впродовж 20хв при температурі 70°C. Після цього підданий термічній обробці нейтралізований зонд кДНК додавали безпосередньо до гібридаційної суміші.

#### Гібридація на комплектах мікрофільтрів

Комплекти гібридаційних мікрофільтрів (комплект для експресії людських цитокінів, R&D systems, номер за каталогом GA001) піддавали попередній гібридації при температурі 68°C впродовж 2год у 5мл розчину Express Hybridization (Clontech), що містив 0,5мг/мл ДНК молочка лососевих (Life Technologies) у ролер-флаконах у гібридаційній шафі Hybaid (MWG Biotech). Через 2год розчин для попередньої гібридації замінювали на свіжий гібридаційний розчин, що містив препарат зонда кДНК із питомою активністю від 0,25×10<sup>6</sup> імпульсів/хв до 1×10<sup>6</sup> імпульсів/хв. Гібридацію здійснювали впродовж 16-20год при температурі 68°C. Після гібридації фільтри промивали 4 рази сумішшю 2×SSC/1% SDS при температурі 68°C впродовж 20хв на змив і двічі сумішшю 0,1×SSC/0,5% SDS впродовж 15хв на змив. Після цього фільтри герметизували плівкою Saran (Saran wrap™) і експонували на люмінесцентному екрані візуального спостереження із запам'ятовуванням типу K (Biorad) впродовж різних періодів часу (від 4год до 4 днів) при кімнатній температурі.

#### Аналіз зображень

Екрани візуального спостереження сканували із роздільною здатністю 50мкм за допомогою люмінесцентного блока формування зображень Biorad Personal FX phosphorimager. Одержаний 16 бітовий цифровий файл переводили у формат TIF, і зображення аналізували із застосуванням програми Aaguvision (Imaging Research Inc.). Для кожного зразка ми визначали інтенсивність мінімального елемента зображення подвійних відбитків 384 генів на фільтрі. Фоновий сигнал віднімали, і одержували середню інтенсивність мінімального елемента зображення для кожної пари плям на комплекті фільтрів (=рівень експресії).

Підтвердження результатів гібридації на комплектах мікрофільтрів за допомогою аналізу засобами зворотних транскриптів полімеразної ланцюгової реакції (РНК-ПЛР)

Один мікрограм загальної РНК зразка кожного пацієнта піддавали зворотній транскрипції із застосуванням оліго(dT)-праймера (Promega) у 20 мкл реакційної суміші, що містила 1мМ розчин MgCl<sub>2</sub>, 10мМ розчин трис-НСІ, 50мМ розчин КСІ, 0,1% розчин тритону X-100, 1мМ розчин кожного з dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0,5 одиниці інгібітора рекомбінантної араназинрибонуклеази (Promega) і 15 одиниць зворотної транскриптази AMV (Promega). Реакційну суміш інкубували при температурі 42°C впродовж 60хв, нагрівали при температурі 95°C впродовж 5хв, після чого розбавляли до 200мкл стерильною водою. Розведення реакційної суміші зворотної транскриптази після цього піддавали аналізу засобами полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) у масштабі реального часу на апараті Taqman (PE Applied Biosystems 7700) із застосуванням пар специфічних праймерів, розроблених для остеопротегерину із застосуванням програми Primer Express (PE Applied Biosystems), згідно номеру доступу до бази даних, представленого виробником комплектів гібридаційних мікрофільтрів: остеопротегерин-112F 5' CTG CGC GCT CGT GTT TCT (Послідовність №5) і остеопротегерин-185R 5' AAT GAA GGT ACT TTG GAG GAA ACG (Послідовність №6). Результати нормалізували до експресії обов'язкового гена гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогенази (GAPDH) у кожному зразку і представляли як перебудови складок, визначені шляхом ділення значення експресії аномального зразка пацієнта на відповідний нормальний зразок пацієнта.

#### Клонування повної кодувальної послідовності кДНК людського остеопротегерину

Після цього кодувальну послідовність непроцесованої кДНК OPG клонували засобами РНК-ПЛР із застосуванням представлених далі праймерів, основу яких становить послідовність кДНК, доступна з бази даних EMBL (номер доступу U94332): OPG F 5' CGG GAT CCG CCA CCA TGA ACA AGT TGC TGT GCT (Послідовність №7) і OPG R 5' AAG CTC GAG TTA TAA GCA GCT TAT TTT (50 пмоль кожного), у 50мкл реакційної суміші, що містила 0,3мМ розчин дезоксинуклеозид-5'-трифосфатів, 1мМ розчин MgSO<sub>4</sub>, 5мкл матричної кДНК нормальних людських шкірних (крайня плоть) фібробластів (одержаної, як описувалось

вище), 5мкл 10×Pfx ампліфікаційного буфера (Life Technologies) і 1мкл ДНК-полімерази Platinum Pfc (Life Technologies). Реакційну суміш нагрівали при температурі 94°C впродовж 2хв, після чого піддавали 35 циклам ПЛР таким чином: 94°C впродовж 15с, 55°C впродовж 30с і 68°C впродовж 1хв. Продукти ампліфікації аналізували у 1% агарозному гелі у їх буфері TAE (Life Technologies), і продукти ПЛР, що пересувались із передбаченою молекулярною масою (1205 п.н.), очищали у лунках із гелем із застосуванням набору Wizard PCR purification kit (Promega).

100нг ДНК, очищеної у лунках із гелем, розщеплювали рестриктазами BamHI і XhoI (Pharmacia) за умов, вказаних у інструкціях виробника, повторно очищали, як описувалось вище, і зшивали з BamHI/XhoI-розщепленою плазмідною pcDNA3.1(+) (Invitrogen) із застосуванням T4 ДНК-лігази (New England Biolabs) за стандартним методом молекулярної біології. Продукти зшивання переносили до штаму E.coli TOP 10 F' (Invitrogen) шляхом електропорації із застосуванням пристрою для імпульсного мічення Biorad Gene Pulser. Плазмідну ДНК виділяли з 5мл культур, що були вирощені з одержаних колоній, і піддавали автоматизованому аналізу послідовностей на секвенаторі Applied Biosystems 3700 із застосуванням праймерів T7 і pcDNA3.1AS (Invitrogen) для підтвердження послідовності OPG.

Виявлення остеопротегерину у білкових екстрактах, виділених з патологічно змінених і нормальних шкірних фібробластів

Патологічно змінені і нормальні фібробласти стадії початкового пасажування від пацієнтів, що страждали на склеродермію, і контрольних суб'єктів, культивовані, як описувалось вище, збирали шляхом обробки клітинних моношарів PBS (забуферений фосфатом фізіологічний розчин), що містив 1мМ розчин EDTA, впродовж 5хв при температурі 37°C. Відокремлені клітини виділяли центрифугуванням, ресуспендували у 50мкл PBS і обробляли 50мкл буфера для зразка (20% SDS, 0,2% бромфенолового синього, 50% гліцерину, 1М розчин трис-буфера, рН 6,8), заморожували при температурі -80°C, після чого відтаювали. Вміст білка визначали із застосуванням набору BCA (Pierce) за методикою виробника. Приблизно 10мкг білка обробляли 0,1 об'єму DTT (дитіотреїтолу) і піддавали електрофорезу у поліакриламідному гелі у присутності додецилсульфату натрію (4-12%) (Novex) за інструкціями виробника. Після цього білкові смуги переносили на нітроцелюлозні мембрани за допомогою апарату Novex wetblot apparatus при 30В впродовж 1год. Потім мембрани блокували впродовж ночі при температурі 4°C у PBS, що містив 5% знежиреного молочного порошку, після чого промивали у PBST (забуферений фосфатом фізіологічний розчин+Твін 20). Мембрани інкубували з основним антитілом (R&D systems, анти-OPG моноклональне антитіло, номер за каталогом MAB8051) з концентрацією 0,5мкг/мл у PBST/1% BSA впродовж 1год при кімнатній температурі зі збовтуванням. Через 1год мембрани екстенсивно промивали PBST перед інкубуванням із вторинним антитілом (антимишача пероксидаза з хрому, Sigma) у розведенні 1/3000 у PBST/1% BSA. Мембрани, врешті-решт, екстенсивно промивали перед проявленням і візуалізацією із застосуванням реактивів ECL і Hyperfilm™ від фірми Amersham.

ELISA для визначення колагену типу I у супернатантах культур клітин фібробластів, оброблених рекомбінантним OPG або після трансфекції вектора OPG/pcDNA3.1

Інтенсивність синтезу колагену визначали *in vitro* у культивованих людських фібробластах із застосуванням системи захоплення ELISA, як описано Ши-вен та ін. (Ши-вен (Shi-wen) та ін., 1997). Стисло, людські шкірні фібробласти лінії AG1518 (закуплені від ATCC (Американська колекція типових культур)) підтримували у середовищі DMEM, що містило 5% FCS і 2мМ розчин глютаміну (Life Technologies). Клітини збирали шляхом трипсинізації і висівали із 70% злиттям на 48-лункових культуральних планшетах (Falcon) у живильному середовищі, що містило 5% сироватки, після чого, через 8год, переносили до безсироваткового середовища. Через 24год середовище видаляли і замінювали на свіже безсироваткове середовище, що містило 50мкМ розчин L-аскорбату (Wako Pure Chemical Industries), і підвищували концентрації людського рекомбінантного остеопротегерину (OPG-Fc, закуплений від фірми R&D systems). Через 16год до середовища додавали TGFβ1 (PeproTech) до кінцевої концентрації 2нг/мл, і через 24год середовище видаляли, центрифугували для видалення клітинних залишків, розбавляли і піддавали ELISA для визначення колагену типу I, як описується нижче.

Інтенсивність синтезу колагену визначали також у культурі первинних людських фібробластів (клітини ОВНС) після трансфекції кДНК OPG (pcDNA3.1-OPG) або після псевдотрансфекції (лише вектор pcDNA3.1) таким чином: клітини ОВНС збирали шляхом трипсинізації і висівали із 50% злиттям на 48-лункових культуральних планшетах у повному живильному середовищі. Плазмідні трансфікували до клітин ОВНС за допомогою реактиву для трансфекції Fugene V (Roche) за інструкціями виробника. Через 5год після трансфекції середовище міняли на свіже безсироваткове середовище, що містило L-аскорбат (впродовж ночі), після чого впродовж 24год здійснювали обробку TGFβ1 (10нг/мл), як описувалось вище.

Планшети MaxiSorp (Nunc) сенсibiliзували впродовж ночі при температурі 4°C 5мкг/мл козячого антилюдського колагену типу I (Southern Biotechnology Associates Inc.) у PBS (рН 7,4). Розчин антитіла після цього видаляли, і планшети блокували PBS-1% BSA впродовж 1год при кімнатній температурі. Потім планшети 4 рази промивали PBS/0,05% Твін 20 (PBST). Випробуванню піддавали потрійні зразки 100мкл кондиціонованого середовища. Зразки інкубували впродовж 2год при кімнатній температурі (RT), потім промивали 4×PBST. Після цього зразки інкубували з біотинізованим козячим антитілом (розведення 1:2000) проти людського колагену типу I (Southern Biotechnology Associates Inc.) впродовж 1год при кімнатній температурі, потім промивали 4×PBST. Після цього зразки інкубували з антитілом, кон'югованим із пероксидазою з хрому (НKP)-стрептавідином (Zymed) (розведення 1:4000) впродовж 1год при кімнатній температурі зі збовтуванням. І, врешті-решт, зразки промивали 4×PBST. Додавали субстрат OPD (Sigma, номер за каталогом P9187) і витримували впродовж 10хв для розвитку забарвлення. Реакцію припиняли 20% сумішшю H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, і планшети зчитували при 496нм на багатомітковому лічильнику Victor<sup>2</sup> (Wallac). Результати нормалізували за кількістю клітин із застосуванням набору для аналізу проліферації клітин CyQuant (C-7026) від фірми Molecular Probes.

Аналіз промотору CTGF-SEAP

CTGF (фактор росту сполучної тканини)-SEAP (секретована лужна фосфатаза) промоторно-репортерна плазмідна була сконструйована за допомогою ПЛР, яку здійснили з олігонуклеотидами 5'-ATCTCGAGGGCCACTCGTCCCTTGTCC (Послідовність №9) і 5'-ATAAGCTTGGAGTCGCACTGGCTGTCTCC (Послідовність №10) для ампліфікації промоторної ділянки (788 п.н.) гена людського CTGF. Продукт ампліфікації, очищений у лунках із гелем, піддавали субклонуванню у основній плазміді pSEAP2 (Clontech).

Фібробласти NIH 3T3 (ATCC) висівали у колби T-75 і котрансфікували плазмідами: 5мкг CTGF-SEAP і 1мкг pcDNA3.1 (Invitrogen). Клітини відбирали на 800мкг/мл G418 (Sigma).

Були встановлені клони зі стабільно інтегрованою CTGF-SEAP промоторно-репортерною плазмідною. Вони були піддані аналізу і найбільш чутливий вибрали для розробки аналізу на клітинній основі.

Клітини цього клону (CTGF-SEAP) висівали з густиною 10000 клітин/лунку на 96-лункові планшети у DMEM, що містило 0,5% FCS. Наступного дня додавали свіже середовище з/без різних концентрацій TGF $\beta$  і OPG (остеопротегерин) і клітини додатково інкубували впродовж 72год перед збиранням супернатантів для аналізу SEAP.

Експресію SEAP визначали за методикою виробника (набір фірми Clontech).

Дослідження *in vivo*

Фіброз легень у мишей-самців (20-25г) індукували шляхом інтратрахеального введення розчину блеоміцину (0,075МОД) у фізіологічному розчині у 1 день. Мишей розподілили на 3 окремі групи по 10 тварин. Одна група щоденно одержувала підшкірні ін'єкції OPG у дозі 5мг/кг (у фізіологічному розчині). Друга група щоденно одержувала OPG підшкірно (0,5мг/кг). Третя група щоденно одержувала фізіологічний розчин (підшкірно). До складу четвертої групи входили підібрані за віком та статтю миші, які раніше у досліді не використовувались і обробці не піддавались. Масу тіла визначали щоденно, і усі миші були умертвлені на 12 день. Окремі частки легень виділяли для визначення вмісту гідроксипроліну (Сміт (Smith) та ін., 1994) або фіксували формаліном і заливали парафіном для гістологічних досліджень. Зрізи легень забарвлювали трихромом або пікро сирус червоним для виявлення колагену (Бенкрофт (Bancroft) і Стівенс (Stevens)), і у балах оцінювали відношення фіброз/легені.

Напівкількісний аналіз мРНК OPG засобами зворотних транскриптів полімеразної ланцюгової реакції (РНК-ПЛР) у фібробластах пацієнтів, що страждають на склеродермію, оброблених галофугіноном *in vitro*

Патологічно змінені і непошкоджені фібробласти підтримували у культурі, як описувалось вище. Клітинні моношари (70% злиття) обробляли галофугіноном ( $10^{-8}$ М) (Collgard Pharmaceuticals) впродовж 12год. Після періоду обробки клітини збирали, і загальну РНК виділяли із застосуванням тризолу. Після цього один мікрограм загальної РНК піддавали аналізу засобами зворотних транскриптів полімеразної ланцюгової реакції, як описувалось вище, із застосуванням праймерів ПЛР, специфічних для остеопротегерину (OPG 740F 5' ACG CCT AAC TGG CTT AGT GT (Послідовність №11) і OPG 1280R 5' CTG ATT GGA CCT GGT TAC CT (Послідовність №12)). Після 30 циклів ПЛР, продукти реакції піддавали електрофорезу у 1% агарозному гелі, забарвленому етидію бромідом, фотографували і аналізували за допомогою програми Kodak ID Digital Science. Пряме секвенування екстрагованої у лунках з гелем ДНК підтвердило, що продукти ПЛР, які пересувались із передбаченою молекулярною масою, являли собою остеопротегерин. Як контроль забруднення геномної ДНК, ПЛР здійснювали на реакційних сумішах ревертази, що містили придатну РНК, але без ревертази. Реакційні суміші ревертази також ампліфікували за допомогою GAPDH-специфічних праймерів ПЛР як позитивний контроль для визначення цілісності і кількості вихідної РНК у початковій реакційній суміші.

Активність промотору колагену  $\alpha 2$  типу I

Фібробласти мишачого зародка (клітини лінії  $\pi$ S3) підтримували у середовищі DMEM-F12, що містило 2% FCS і 2мМ розчин глутаміну. Клітини збирали шляхом трипсинізації і висівали із 50% злиттям на 48-лункових культуральних планшетах. Наступного дня клітини у безсироватковому середовищі трансфікували вектором pGL3 (Promega), який містив промотор колагену  $\pi 2$  типу I (3,5 т.п.н.), зв'язаний із кДНК люциферази (яка була люб'язно надана др. Девідом Абрахамом (David Abraham) із Royal Free Hospital, London, England), із застосуванням реактиву Eugene V (Roche) за інструкцією виробника. Після 5год трансфекції клітини переносили до свіжого середовища, яке містило 2% FCS, і обробляли лише галофугіноном ( $10^{-10}$ М), лише TGF $\beta$ 1 (5нг/мл) або HF ( $10^{-8}$ М)+TGF $\beta$ 1 (5нг/мл) впродовж 12год у присутності 0нг/мл, 1нг/мл, 10нг/мл або 100нг/мл рекомбінантного людського остеопротегерину. Після періоду обробки клітини переносили до повного середовища, що містило 2% FCS і 2мМ розчин глутаміну, і активність люциферази визначали через 48год у кожній лунці за допомогою аналітичної системи Bright-Glo, яка була закуплена від фірми Promega. Результати подані у вигляді відносних одиниць люмінесценції; результати були нормалізовані до кількості клітин/лунку, яку визначали у паралельному експерименті за допомогою набору Cyquant (Molecular Probes).

Приклад 1: мРНК остеопротегерину значно супресується у патологічно змінених фібробластах, порівняно з непошкодженими фібробластами

Аналізу шляхом гібридизації на комплектах мікрофільтрів піддавали зразки нормальних і патологічних фібробластів від 6 пацієнтів, що страждали на склеродермію. Середній рівень експресії остеопротегерину (OPG) зображено на Фіг.1а і для кожного пацієнта на Фіг.1б.

Результати, які одержали на комплектах мікрофільтрів, були додатково підтверджені ПЛР-аналізом у масштабі реального часу зразків РНК, виділених від 9 пацієнтів із застосуванням OPG-специфічних праймерів ПЛР. Результати зображені на Фіг.2; вони виражені як перебудова складки за рівнем експресії (патологічно змінені, поділені на непошкоджені). У 7 з 9 перевірених пацієнтів спостерігалась щонайменше двократна супресія OPG у патологічно змінених фібробластах, порівняно з непошкодженими фібробластами, виділеними від того самого пацієнта.

Різниця експресії, що спостерігається між непошкодженими і патологічно зміненими фібробластами одного і того самого пацієнта, навряд чи обумовлюються різними умовами культивування між двома популяціями, оскільки експресія мРНК OPG у первинних культурах нормальних людських шкірних фібробластів суттєво при пасажуванні клітин не змінюється (дані не представлені). На додаток до цього, аналіз РНК-ПЛР у масштабі

реального часу загальної РНК, виділеної з цілих біопсійних зразків патологічної шкіри від пацієнтів, що страждають на склеродермію, показав низькі рівні мРНК остеопротегерину, порівняно з анатомічно відповідними ділянками шкіри від того самого пацієнта, що мають нормальний вигляд (Фіг.3).

Приклад 2: OPG супресується на білковому рівні у патологічно змінених фібробластах, порівняно з непошкодженими фібробластами від пацієнтів, що страждають на склеродермію

З метою визначення, чи супресія мРНК остеопротегерину відображає зміну білка остеопротегерину, вміст OPG підібраних за анатомічною ділянкою нормальних і патологічно змінених фібробластів шкіри підібраних за віком та статтю суб'єктів визначали засобами вестерн-блот-аналізу із застосуванням анти-людських остеопротегеринових моноклональних антитіл. Результати показані на Фіг.4. Остеопротегериновий мономер і димер чітко виявлялись у 3/4 нормальних фібробластів і слабо експресувались у 1 зразку нормальних фібробластів. У патологічно змінених фібробластів мономерна смуга була слабо виражена в усіх чотирьох випробуваних зразках. Рекombінантно експресований гібридний білок OPG-Fc служив як позитивний контроль для забарвлення.

Приклад 3: Клонування людського OPG

З метою визначення характеристик активності OPG *in vitro* та *in vivo*. повну кодувальну послідовність кДНК клонували засобами РНК-ПЛР із застосуванням праймерів, побудованих на опублікованій послідовності OPG, які фланкували передбачувані стартовий кодон і стоп-кодон. Аналіз послідовності одержаних клонів кДНК OPG (у pcDNA3.1) показав 100% ідентичність на нуклеотидному рівні з послідовністю OPG, опублікованою Морінага та ін. (Морінага (Morinaga) та ін., 1998). Вони, однак, відрізнялись на 1 амінокислоту від послідовності, опублікованої Сімонет (Simonet) та ін. (1997) (Дивись Послідовність №2 і Послідовність №4).

Приклад 4: Ефект на OPG синтезу колагену типу I у лінії клітин людських шкірних фібробластів

Фібробласти, культивовані у присутності L-аскорбату, секретували колаген до культурального середовища, що забезпечувало можливість виявлення колагену засобами ELISA. Людські фібробласти активують синтез колагену у відповідь на стимуляцію профіброзним цитокином TGFβ1. Ми досліджували ефект рекombінантного остеопротегерину (гібридний білок остеопротегерин-Fc) на індукований TGFβ1 синтез колагену у фібробластів лінії AG1518C. Остеопротегерин, який додавали до культур фібробластів перед обробкою TGFβ1, пригнічував опосередковане TGFβ1 підвищення синтезу колагену дозозалежним чином (Фіг.5). У разі проведення експерименту у присутності нейтралізуючих анти-OPG моноклональних антитіл, вплив на синтез колагену не спостерігався. Подібним чином, введення лише анти-OPG за відсутності рекombінантного OPG не мало впливу на синтез колагену, що дозволяє зробити припущення про те, що зменшення синтезу колагену, яке спостерігалось, було специфічним ефектом OPG.

Подібний ефект на синтез колагену спостерігався у разі трансфекції первинних людських фібробластів (OBHC) плазмідною, що містила повну кодувальну послідовність OPG (pcDNA3.1/OPG). У OBHC, трансфікованих плазмідною OPG, не спостерігалось підвищення синтезу колагену у відповідь на стимуляцію TGFβ1, у протилежність до псевдотрансфікованих (пустий вектор pcDNA3.1) OBHC (Фіг.6).

Приклад 5: Обробка OPG значно зменшує як основну, так і індуковану TGFβ1 активність промотору колагену альфа 2 типу I у фібробластах мишачих зародків

З метою визначення, чи обумовлювалось зменшення синтезу колагену OPG впливом на активність промотору колагену, ми досліджували ефект обробки OPG на фібробласти мишачих зародків, які трансфікувались плазмідною, яка містила кДНК репортерного гена, люциферази, під контролем ділянки (3,5 т.п.н.) промотору колагену α2 типу I. Наслідком стимуляції промотору колагену у цій генно-інженерній конструкції була транскрипційна активація гена люциферази, активність якого може визначатись аналізом люмінесценції у присутності його субстрату, люциферину світляків.

Обробка OPG (від 1нг/мл до 100нг/мл) значно зменшувала основний рівень активності промотору колагену (Фіг.7A, контроль). Після стимуляції TGFβ1 спостерігалось щонайменше 2-кратне підвищення активності промотору колагену (Фіг.7A, TGFβ1). Активність могла бути значно зниженою у разі, коли клітини одночасно оброблялись OPG у дозі 100нг/мл (P<0,05).

Повідомлялось, що рослинний алкалоїд галофугінон є специфічним інгібітором синтезу колагену типу I (Грано (Granot) та ін., 1993). У разі обробки фібробластів низькими концентраціями галофугінону ( $10^{-10}$ М), ми спостерігали дозозалежне зменшення активності промотору колагену з підвищенням концентрацій остеопротегерину (від 1нг/мл до 100нг/мл), яке було високозначущим при найбільшій перевіреній дозі OPG (100нг/мл, P<0,01) (Фіг.7A, HF). Галофугінон може пригнічувати індуковану TGFβ1 активність промотору колагену (Макгаха (McGaha) та ін., 2002). OPG також був здатним до посилення ефектів галофугінону шляхом пригнічення індукованого TGFβ1 підвищення активності промотору колагену дозозалежним чином. Цей ефект був високозначущим при 100нг/мл OPG (P<0,01). Активність промотору колагену при цій концентрації майже поверталась до основних рівнів (Фіг.7, HF+TGFβ1).

Приклад 6: Опосередкована TGFβ трансактивація Фактора росту сполучної тканини нейтралізується OPG

Фактор росту сполучної тканини (CTGF), збагачений цистеїном білок (38кДа), стимулює продукування елементів позаклітинного матриксу фібробластами. Як повідомлялось, надекспресія CTGF спостерігалась у багатьох фіброзних людських тканинах, у тому числі легенях, шкірі, печінці, нирках і кровоносних судинах. *In vitro*. TGFβ активує транскрипцію гена CTGF у фібробластах людських легень. Промоторно-репортерний ген CTGF конструювали із застосуванням секретованої лужної фосфатази (SEAP) у ролі репортерного гена, експресія якого може вимірюватись у кондиціонованому середовищі замість клітинного екстракту.

Клітини, що експресують CTGF-SEAP репортерний ген, інкубували з TGFβ і з 0,46мкг/мл, 1,4мкг/мл або 4,6мкг/мл OPG. Результати цього експерименту зображено на Фіг.7B. Інкубування з OPG пригнічувало індуковану TGFβ експресію CTGF, що додатково вказує на протифіброзну активність OPG.

Приклад 7: Експресія мРНК OPG у фібробластах пацієнтів, які страждають на склеродермію, що оброблялись галофугіноном

Механізм, який забезпечує здатність галофугінону до супресії синтезу колагену у фібробластах, повністю не встановлено. Ми досліджували вплив галофугінону на експресію мРНК OPG у парних патологічно змінених



і непошкоджених фібробластів від пацієнтів, що страждають на склеродермію, засобами РНК-ПЛР.

Експресія мРНК OPG сильно активується (щонайменше втричі) як у патологічно змінених, так і у непошкоджених фібробластів в усіх перевірених зразках (3 нормальні і 2 патологічні) у разі визначення через 12 год після обробки галофугіноном ( $10^{-8}$ М) (Фіг.8). Цікаво те, що при проведенні експериментів із гібридизаційним аналізом на комплектах мікрофільтрів, OPG був одним із найбільш активованих генів при обробці фібробластів галофугіноном (дані не наведені).

Приклад 8: Введення OPG *in vivo* захищає проти індукованого блеоміцином фіброзу легень у мишей

Наслідком одноразового інтратрахеального введення блеоміцину мишам лінії C57BL/6 є швидке виникнення (впродовж 14 днів) фіброзу легень, який характеризується підвищеним відкладенням колагену у інтерстиції легень (Хатторі (Hattori) та ін., 2000). З метою визначення, чи може введення OPG мати будь-який захисний ефект проти розвитку фіброзу або дійсно зменшити тяжкість хвороби, ми досліджували ефект щоденних ін'єкцій OPG на мишах, які піддавались обробці блеоміцином.

Блеоміцин вводили шляхом одноразової інтратрахеальної інстиляції 3 групам з 10 мишей. Введення OPG шляхом підшкірних ін'єкцій розпочинали через день після обробки блеоміцином. Одна група одержували високу дозу (5мг/кг), друга група одержували меншу дозу (0,5мг/кг). Контрольним мишам щоденно підшкірно вводили фізіологічний розчин. Для порівняння, до експерименту включили четверту групу мишей, до складу якої входили підібрані за віком та статтю тварини, що не піддавались жодній обробці (миші, які раніше у досліді не використовувались).

Тварини, оброблені блеоміцином, негайно захворіли. Це викликає швидку втрату ваги і може призвести до смерті, у протилежність до необроблених тварин, які залишались здоровими і демонстрували нормальний приріст ваги (Фіг.9А). У мишей, які були оброблені низькою дозою OPG, спостерігали втрату ваги, порівняну з контрольними тваринами. У цій групі, як видавалось, був також підвищений рівень смертності (Фіг.9В). Миші, які одержали високу дозу OPG, харчувались набагато краще. Зменшення маси тіла спостерігалось лише впродовж перших 5 днів обробки. У цій групі також реєструється низький рівень смертності (<10%).

Усіх мишей, що залишились живими, умертвляли через 12 днів після обробки блеоміцином. Гістологічний аналіз легень показав, що у тварин, які одержали високу дозу OPG, фіброзом була уражена значно менша площа поверхні легень, порівняно з контрольними тваринами, у яких фіброзні пошкодження вкривали приблизно 70% поверхні легень (Фіг.10А). Миші, які одержали високу дозу OPG, також демонстрували значно менший, порівняно з контрольними мишами, вміст гідроксипроліну у легенях ( $P < 0,05$ ). Вміст гідроксипроліну у цих мишей був порівняним із вмістом, що спостерігався у мишей, які обробці не піддавались (група тварин, які раніше у досліді не використовувались, Фіг.10В). Зменшений вміст гідроксипроліну спостерігався також у мишей, які одержали низьку дозу OPG, хоча цей показник не досягав рівня статистичної значущості унаслідок невеликої кількості тварин, які вижили у цій групі. Вміст гідроксипроліну є критерієм відкладення колагену. Наведені результати вказують на те, що наслідком обробки OPG є ефективне зменшення відкладення колагену у легенях.

#### Посилання

1. Abraham D., Lupoli S., McWhirter A., Plater-Zyberk C., Piela T.H., Korn J.H., Olsen I. and Black C. (1991) Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 34, 1164-1172.
2. Abraham D.J., Shiwen X., Black C.M., Sa S., Xu Y., Leask A. J. *Biol. Chem.* 2000 May 19; 275(20): 15220-5.
3. Altschul S.R et al., *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410, 1990.
4. Altschul S. *Fet al Nucleic Acids Res.*, 25: 389-3402, 1997.
5. Bancroft J.D. and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone, England.
6. Black C.M and Denton C.P. (1998) Systemic sclerosis and related disorders. In "Oxford textbook of Rheumatology" (P.G. Maddison, D.A. Isenberg, P. Woo and D.N. Glass, Eds.) pp.771-789, Oxford Univ. Press, New York.
7. Clements P.J. and Furst D.E. (1996) "Systemic Sclerosis" Williams and Williams, Baltimore.
8. Devereux J. et al., *Nucleic Acids Res.*, 12, 387-395, 1984.
9. Engelmann H., Novick D. and Wallach D., 1990, *J. Biol. Chem.* 265, 1531-1536.
10. Granot I., Halevy O., Hurwitz S., Pines M. (1993) Halofuginone: an inhibitor of collagen type I synthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 1156, 107-112.
11. Grantham (1974), *Science*, 185, 862-864.
12. Hattori N., Degen J.L., Sisson T.H., Liu H., Moore B.B., Pandrangi R.G., Simon R.H. and Drew A.F. (2000) Bleomycin induced pulmonary fibrosis in fibrinogen null mice. *J. Clin. Invest.* 106, 1341-135.
13. Kostenuik P.J., Shalhoub V. *Curr. Pharm. Des.* 2001 May; 7(8): 613-35.
14. Krein P.M., Huang Y. and Winston B.W. (2001). *Expert Opin. Ther. Patents* 11(7): 1065-1079.
15. Leighton C *Drugs* 2001 61(3), 419-427.
16. LeRoy E.C. (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 54. 880-889.
17. Martini, Maccario, Ravelli et al., *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 807-811.
18. McGaha T.L., Phelps R.G., Spiera H., Bona C (2002) Halofuginone, an Inhibitor of Type-I Collagen Synthesis and Skin Sclerosis, Blocks Transforming-Growth-Factor-beta-Mediated Smad3 Activation in Fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 118, 461-70.
19. Min H., Morony S., Sarosi L, Dunstan C.R., Capparelli C. et al. (2000) Osteoprotegerin reverses osteoporosis by inhibiting endosteal osteoclasts and prevents vascular calcification by blocking a process resembling osteoclastogenesis. *J. Exp. Med.* 192, 463-474.
20. Morinaga T., Nagakawa N., Yasuda H., Tsuda E. and Higashi K. (1998) Cloning and characterization of the gene encoding human osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor. *Eur. J. Biochem.* 254, 685-691.
21. Pearson W.R. *Methods in Enzymology.* 183, 63-99, 1990.
22. Pearson W.R. and Lipman D.J., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448, 1988.
23. Silman A.J. (1991) Mortality from scleroderma in England and Wales 1968-1975. *Ann. Rheu. Dis.* 50, 95-96.

24. Simonet W.S., Lacey D., Dunstan C.R., Kelley M., et al. (1997) Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89, 309-319.
25. Shi-wen X., Denton C.P., McWhirter A., Bou-Gharios G., Abraham D.J., du Bois R.M. and Black C.M. (1997) Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated collagen type I biosynthesis. *Arthritis Rheum.* 40, 1237-1244.
26. Shi-Wen X., Denton C.P., McWhirter A., Bou-Gharios G., Abraham D.J., du Bois R.M., Black C.M. (1997) Scleroderma lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated type I collagen biosynthesis. *Arthritis Rheum.* 40, 1237-1244.
27. Smith and Waterman. *J. Mol. Biol.*, 147, 195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981.
28. Smith R.E., Strieter R.M., Phan S.H., Lukacs N.W., Huffhagle G.B., Wilke C.A., Burdick M.D., Lincoln P., Evanoff H. and Kunkel S.L. (1994) Production and function of murine macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  in bleomycin induced lung injury. *J. Immunol.* 153, 4704.
29. Smith, *Textbook of the Autoimmune Diseases*, Edited by Lahita, Chiorazzi and Reeves, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2000.
30. Strehlow D. and Korn J. (1998) Biology of the scleroderma fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10, 572-578.
31. Tucci A., James H., Chicheportiche R., Bonnefoy J.Y., Dayer J.M., and Zubler R.H., 1992, *J. Immunol.* 148, 2778-2784.
32. Von Heijne G. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.
33. Wigley F.M. and Sule S.D. (2001) *Expert Opinions on Investigational Drugs* 10(1) 31-48.
34. Wigley F.M. and Boling C.L. (2000) The treatment of scleroderma. 2, 276-292.
35. Wilm M., Shevchenko A., Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T. and Mann M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379: 466-469.
36. Yasuda H., Shima N., Nagakawa N., Mochizuki S., Yano K. et al. (1998) Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139, 1329-1337.

#### ЛІСТИНГ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Еплайд Рісърч Системз ЕРС Холдінг Н.В.

<120> Застосування остеопротегерину для лікування та/або запобігання  
фіброзного захворювання

<130> WO 550

<150> EP02100364.5

<151> 2002-04-10

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1681

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

ctggagacat ataactgaa cacttgccc tgatgggaa gcagctctgc agggactttt   60
tcagccatct gtaacaatt tcagtggcaa cccgcgaact gtaatccatg aatgggacca   120
cactttacaa gtcacaaagt ctaacttcta gaccaggga ttaatggggg agacagcgaa   180
ccctagagca aagtgcacaa cttctgtcga tagcttgagg ctagtggaaa gacctcgagg   240
aggctactcc agaagttcag cgcgtaggaa gctccgatac caatagccct ttgatgatgg   300
tgggttggt gaagggaaca gtgctccgca aggttatccc tgccccaggc agtccaattt   360

```

tcactctgca gattctctct ggctcttaact accccagata acaaggagtg aatgcagaat 420  
 agcacgggct ttagggccaa tcagacatta gttagaaaaa ttctactac atggtttatg 480  
 taaacttgaa gatgaatgat tgcgaactcc ccgaaaaggg ctcagacaat gccatgcata 540  
 aagaggggcc ctgtaatttg aggtttcaga acccgaaagt aagggtcag gcagccgggt 600  
 acggcggaac ctcacagctt tcgccagcg agaggacaaa ggtctgggac aactccaac 660  
 tgcgtccgga tcttgctgg atcgactct cagggtggag gagacacaag cacagcagct 720  
 gccacgctg tgcccagccc tcccaccgt ggtcccggct gccaggaggc tggccgctgg 780  
 cgggaaggcg ccgggaaacc tcagagcccc gcggagacag cagccgcctt gttctcagc 840  
 ccggtggctt tttttccc tgctctcca ggggacagac accaccgcc caccctcac 900  
 gcccacctc cctgggggat ctttcgcc ccagccctga aagcgtaat cctggagctt 960  
 tctgcacacc cccgaccgc tccccccaa gttctctaaa aaagaaaggt gcaaagtgtg 1020  
 gtccagata gaaaaatgac tgatcaaagg caggcgatac ttctgttg cgggacgcta 1080  
 tatatacgt gatgagcga cgggctgcgg agacgcaccg gagcgtcgc ccagccgccg 1140  
 cctccaagcc cctgaggtt ccggggacca caatgaacaa gttgctgtg tgcgctcg 1200  
 tgtaagtcc ctggccagc cgacgggtgc ccgcccctg gggaggctgc tgccacctg 1260  
 tctccaacc tcccagcga ccgcccggga gaaggctcca ctgctccct cccaggagag 1320  
 gcttgggtt aggtggagc aggaaccgc ttcaagtta tgcatgctt ccctagggt 1380

gtccttttac gctgcaaagt tcctgtgac ttatggaag acagcaagag agagacagac 1440

agcgagagag agggagagag agagagagag aaactgttt gaaagttta gtcattaacc 1500

ttctgtcttc atctcagaat attaacgccc tcaigtatgc catactatct ttgcttaatg 1560

aacttgaact ttattatta gtggcaaaga agtggtcct tagattcaga gtaagttgga 1620

agaagagcgt agtcctctta aaaccattat aattagaata tgacatgata gatttttcta 1680

a 1681

<210> 2

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro

50 55 60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys

65 70 75 80

Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu			
	85	90	95
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr			
	100	105	110
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe			
	115	120	125
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg			
	130	135	140
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys			
145	150	155	160
Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys			
	165	170	175
Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr			
	180	185	190
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg			
	195	200	205
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val			
	210	215	220
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile			
225	230	235	240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu			
	245	250	255

Trp Lys His Gln Asn Lys Asp Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln  
 260 265 270  
 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala  
 275 280 285  
 Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly  
 290 295 300  
 Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn  
 325 330 335  
 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser  
 340 345 350  
 Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr  
 355 360 365  
 Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu  
 370 375 380  
 Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Leu

<210> 3  
 <211> 1356  
 <212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 3

gtatatataa cgtgatgagc gtacgggtgc ggagacgcac cggagcgcgc gccagccgc 60  
cgycccaag cccctgaggt ttccggggac cacaatgaac aagttgctgt gctgcgcgct 120  
cgtgttctg gacatctca ttaagtgac caccaggaa acgttctc caaagtacct 180  
tcattatgac gaagaaacct ctcatcagct gttgtgtgac aaatgtctc ctggtacct 240  
cctaaaaaa cactgtacag caaagtggaa gaccgtgtgc gcccttgcc ctgaccacta 300  
ctacacagac agctggcaca ccagtgacga gtgtctatac tgcagccccg tgtcaagga 360  
gctgcagtac gtcaagcagg agtgcaatcg caccacaac cgcgtgtgcg aatgcaagga 420  
agggcgctac ctgagatag agttctctt gaaacatagg agctccctc ctgatttgg 480  
agtggtgcaa gctggaacc cagagcgaaa tacagtttg aaaagatgc cagatgggtt 540  
cttctcaat gagacgtcat ctaaagcacc ctgtagaaa cacacaaatt gcagtgtctt 600  
tggtctcctg ctaactcaga aaggaaatgc aacacacgac aacatatgtt ccggaacag 660  
tgaatcaact caaaatgtg gaatagatgt taccctgtgt gaggaggcat tcttcaggtt 720  
tgctgttctt acaaagttta cgcctaactg gcttagtgc ttgtagaca attgcctgg 780  
caccaaagta aacgcagaga gtgtagagag gataaacgg caacacagct cacaagaaca 840  
gactttccag ctgctgaagt tatggaaca taaaacaaa gcccaagata tagtcaagaa 900  
gatcatcaa gatattgacc tctgtgaaa cagcgtgcag cggcacattg gacatgctaa 960

cctcaccttc gacgagcttc gtagcttgat ggaagctta ccgggaaaga aagtgaggagc 1020

agaagacatt gaaaaaacia taaaggcatg caaacccagt gaccagatcc tgaagctgct 1080

cagtttggg cgaataaaaa atggcgacca agacaccttg aagggcctaa tgcacgcact 1140

aaagcactca aagacgtacc actttccaa aactgtcact cagagtctaa agaagacat 1200

caggttcctt cacagcttca caatgtacaa attgtatcag aagttatitt tagaaatgat 1260

aggttaaccag gtccaatcag taaaaataag ctgcttataa ctggaaatgg ccattgagct 1320

gtttcctcac aattggcgag atcccatgga tgataa 1356

<210> 4

<211> 401

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Asn Lys Leu Leu Cys Cys Ala Leu Val Phe Leu Asp Ile Ser Ile

1 5 10 15

Lys Trp Thr Thr Gln Glu Thr Phe Pro Pro Lys Tyr Leu His Tyr Asp

20 25 30

Glu Glu Thr Ser His Gln Leu Leu Cys Asp Lys Cys Pro Pro Gly Thr

35 40 45

Tyr Leu Lys Gln His Cys Thr Ala Lys Trp Lys Thr Val Cys Ala Pro

50 55 60

Cys Pro Asp His Tyr Tyr Thr Asp Ser Trp His Thr Ser Asp Glu Cys



65	70	75	80
Leu Tyr Cys Ser Pro Val Cys Lys Glu Leu Gln Tyr Val Lys Gln Glu			
	85	90	95
Cys Asn Arg Thr His Asn Arg Val Cys Glu Cys Lys Glu Gly Arg Tyr			
	100	105	110
Leu Glu Ile Glu Phe Cys Leu Lys His Arg Ser Cys Pro Pro Gly Phe			
	115	120	125
Gly Val Val Gln Ala Gly Thr Pro Glu Arg Asn Thr Val Cys Lys Arg			
	130	135	140
Cys Pro Asp Gly Phe Phe Ser Asn Glu Thr Ser Ser Lys Ala Pro Cys			
145	150	155	160
Arg Lys His Thr Asn Cys Ser Val Phe Gly Leu Leu Leu Thr Gln Lys			
	165	170	175
Gly Asn Ala Thr His Asp Asn Ile Cys Ser Gly Asn Ser Glu Ser Thr			
	180	185	190
Gln Lys Cys Gly Ile Asp Val Thr Leu Cys Glu Glu Ala Phe Phe Arg			
	195	200	205
Phe Ala Val Pro Thr Lys Phe Thr Pro Asn Trp Leu Ser Val Leu Val			
	210	215	220
Asp Asn Leu Pro Gly Thr Lys Val Asn Ala Glu Ser Val Glu Arg Ile			
225	230	235	240
Lys Arg Gln His Ser Ser Gln Glu Gln Thr Phe Gln Leu Leu Lys Leu			
	245	250	255

Trp Lys His Gln Asn Lys Ala Gln Asp Ile Val Lys Lys Ile Ile Gln  
 260 265 270  
 Asp Ile Asp Leu Cys Glu Asn Ser Val Gln Arg His Ile Gly His Ala  
 275 280 285  
 Asn Leu Thr Phe Glu Gln Leu Arg Ser Leu Met Glu Ser Leu Pro Gly  
 290 295 300  
 Lys Lys Val Gly Ala Glu Asp Ile Glu Lys Thr Ile Lys Ala Cys Lys  
 305 310 315 320  
 Pro Ser Asp Gln Ile Leu Lys Leu Leu Ser Leu Trp Arg Ile Lys Asn  
 325 330 335  
 Gly Asp Gln Asp Thr Leu Lys Gly Leu Met His Ala Leu Lys His Ser  
 340 345 350  
 Lys Thr Tyr His Phe Pro Lys Thr Val Thr Gln Ser Leu Lys Lys Thr  
 355 360 365  
 Ile Arg Phe Leu His Ser Phe Thr Met Tyr Lys Leu Tyr Gln Lys Leu  
 370 375 380  
 Phe Leu Glu Met Ile Gly Asn Gln Val Gln Ser Val Lys Ile Ser Cys  
 385 390 395 400  
 Leu

<210> 5  
 <211> 18  
 <212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 5

ctgcgcgctc gtgtttct

18

<210> 6

<211> 24

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 6

aatgaaggta ctttggagga aacg

24

<210> 7

<211> 33

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 7

cgggatccgc caccatgaac aagttgctgt gct

33

<210> 8

<211> 27

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 8

aagctcgagt tataagcagc ttatfff

27

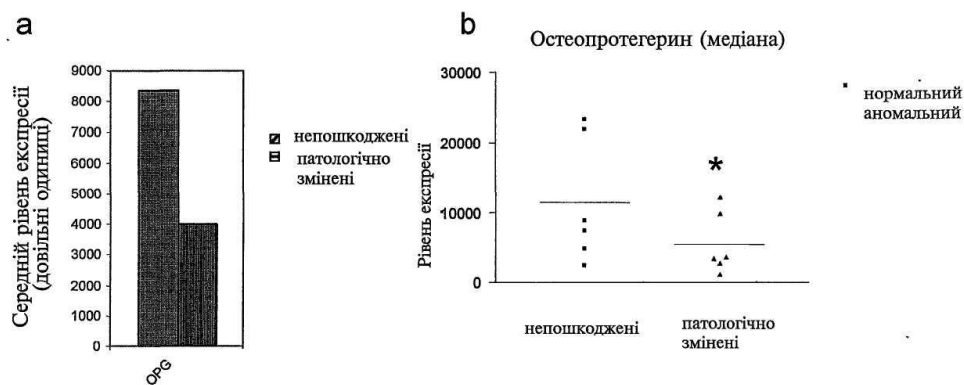
<210> 9

<211> 27

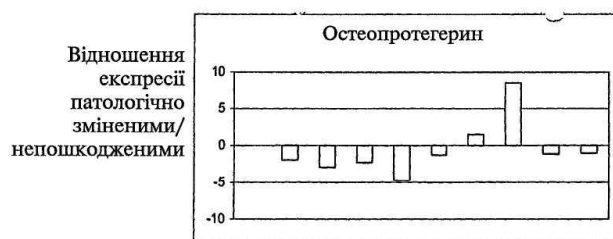
<212> ДНК

<213> homo sapiens

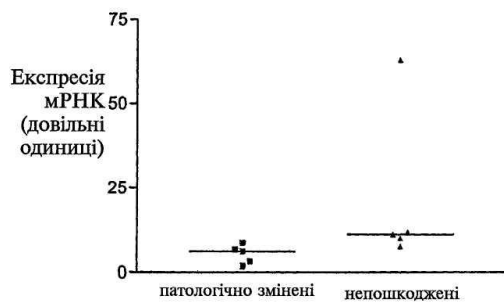
<400> 9	
atctcgaggg ccactcgtcc ctgtgcc	27
<210> 10	
<211> 29	
<212> ДНК	
<213> homo sapiens	
<400> 10	
ataagcttgg agtcgcactg gctgtctcc	29
<210> 11	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> homo sapiens	
<400> 11	
acgcctaact ggcttagtgt	20
<210> 12	
<211> 20	
<212> ДНК	
<213> homo sapiens	
<400> 12	
ctgattggac ctggttacct	20



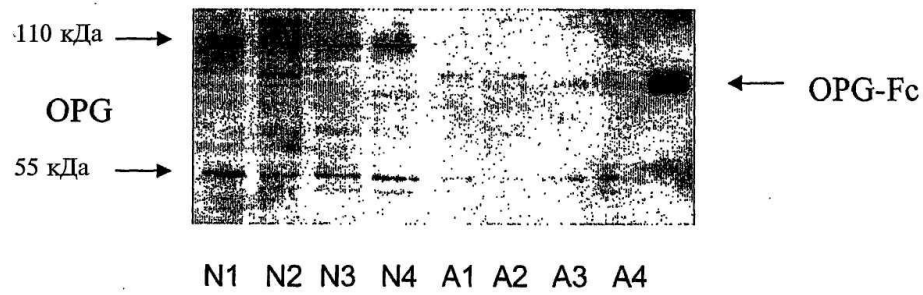
ФІГ. 1



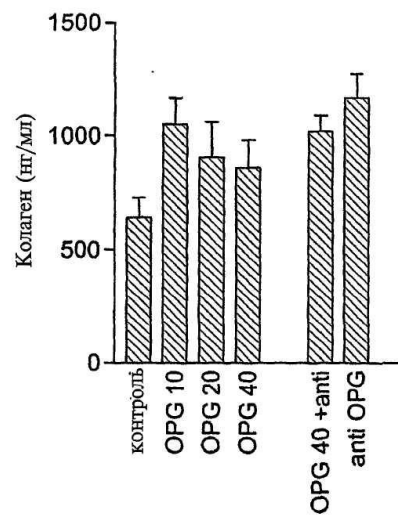
ФІГ. 2



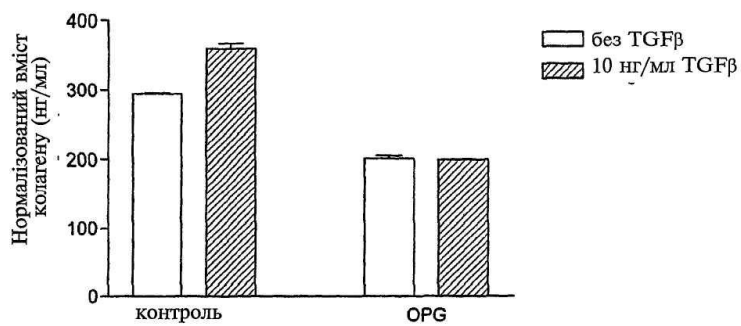
ФІГ. 3



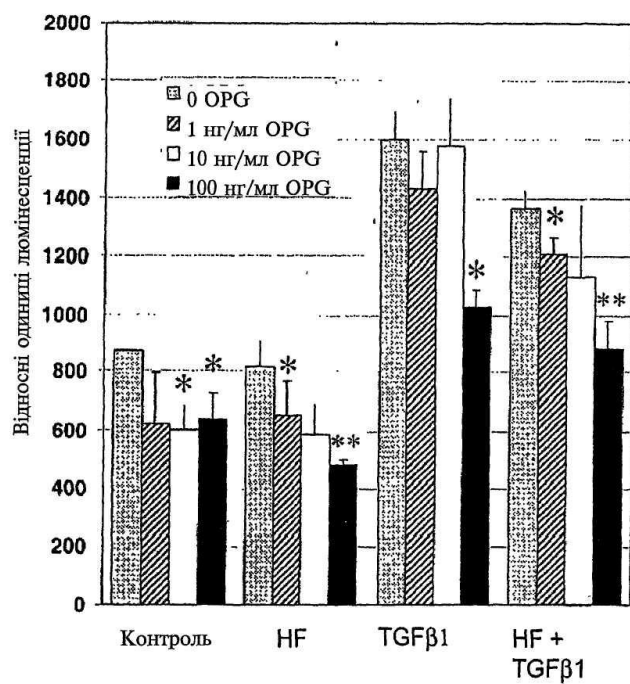
ФІГ. 4



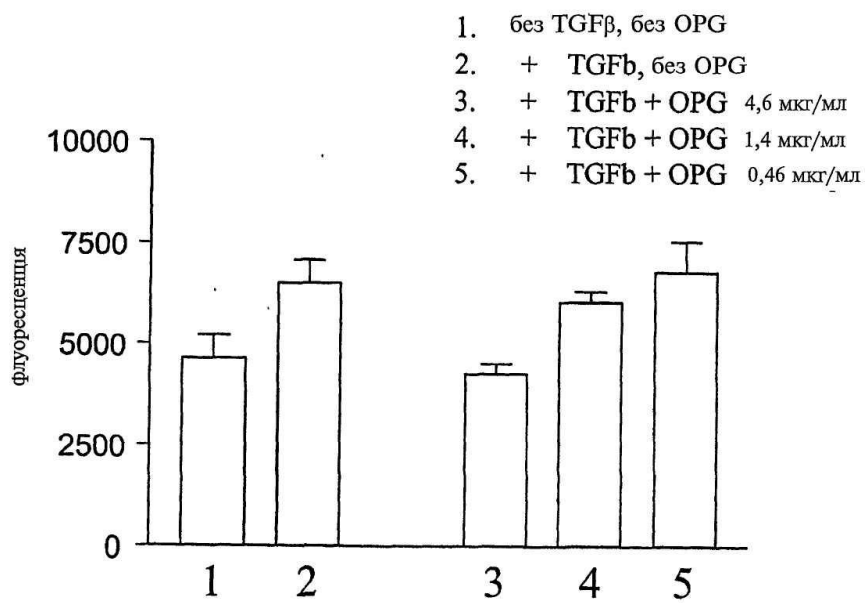
ФІГ. 5



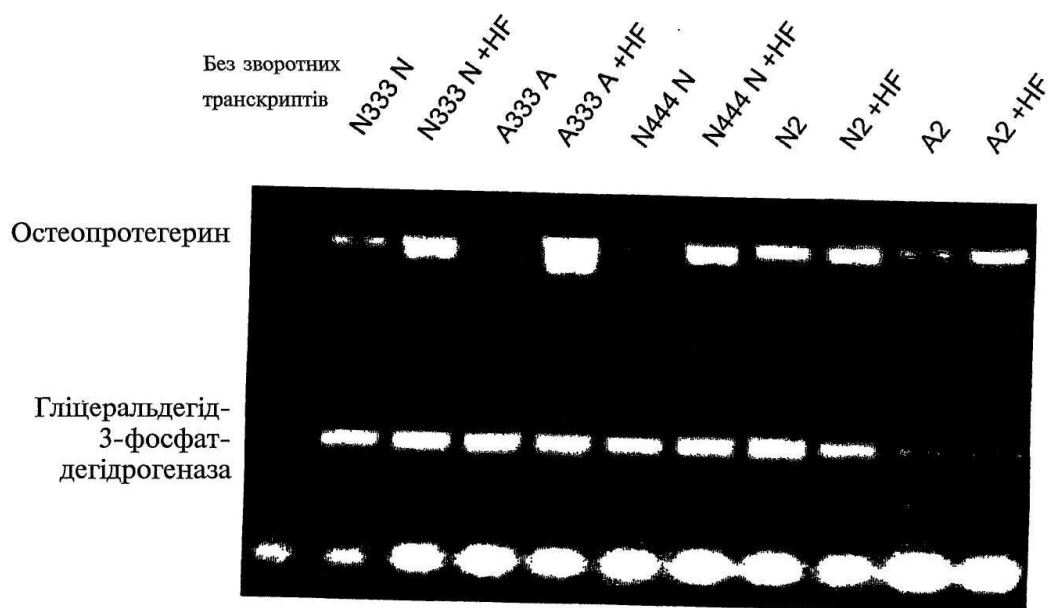
ФІГ. 6



ФІГ. 7А

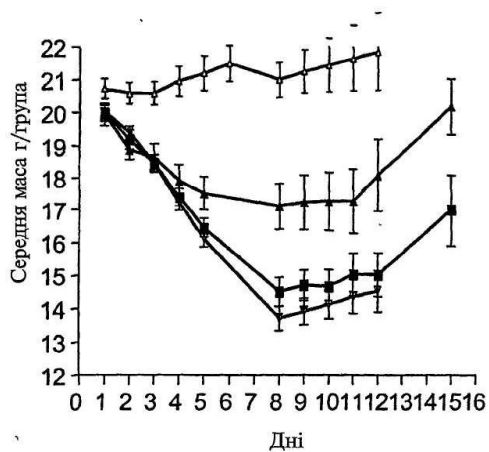


ФІГ. 7В

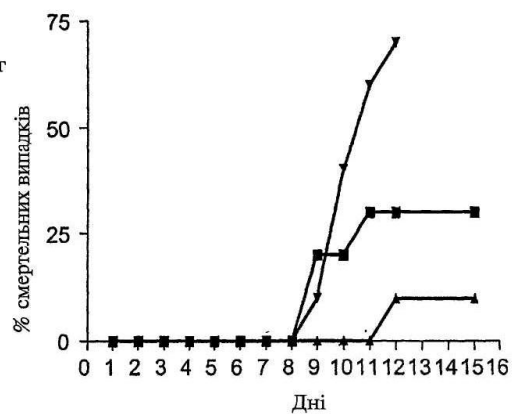


ФІГ. 8

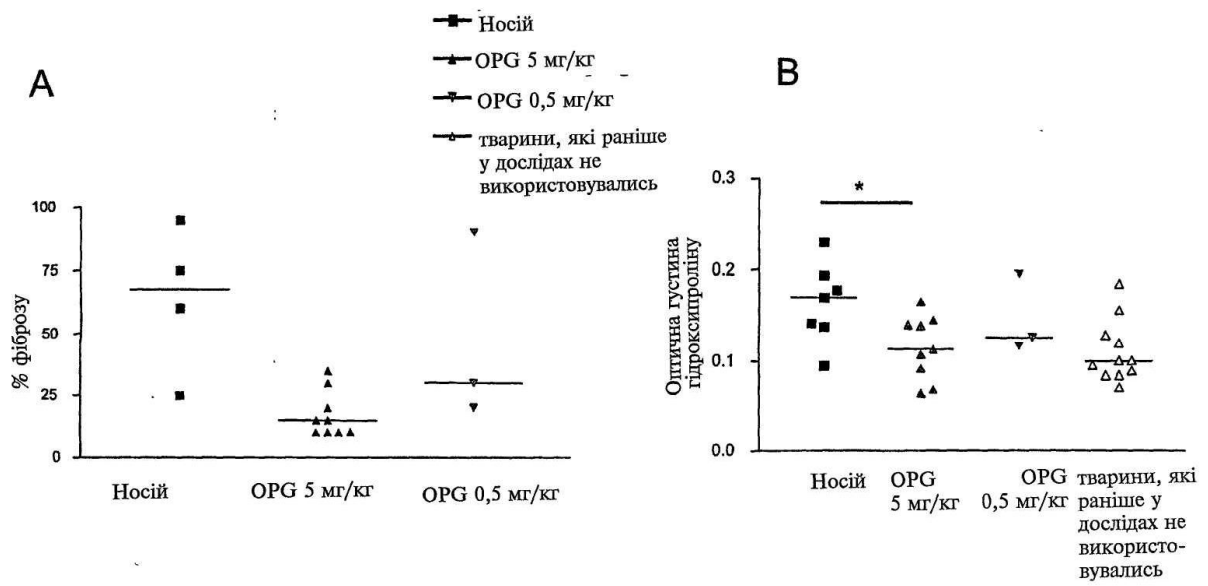
А



В



ФІГ. 9



ФІГ. 10