

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

**2003 - 1855**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **30.11.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.12.2000 17.08.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/00126771 2001/01118888**

(33) Země priority: **EP EP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.09.2003**

(Věstník č. 9/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/EP01/13992**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/046225**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>:

**C 07 K 14/52**

**C 12 N 15/63**

**C 12 N 15/19**

**A 61 K 38/19**

**A 61 P 19/04**

(71) Přihlašovatel:

APPLIED RESEARCH SYSTEMS ARS HOLDING N.  
V., Curacao, AN;

(72) Původce:

Plater-Zyberk Christine, Carouge, CH;  
Power Christine, Thoiry, FR;  
Colinge Jacques, Neydens, FR;

(74) Zástupce:

Korejzová Zdeňka JUDr., Spálená 29, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Použití SARP-1 pro léčbu a/nebo prevenci  
onemocnění sklerodermie**

(57) Anotace:

Použití proteinu SARP-1 pro přípravu léčebného prostředku  
pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště  
systemické sklerózy.

Použití SARP-1 pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie

### Oblast techniky

Vynález spadá do oblasti týkající se onemocnění sklerodermie. Popisuje se použití SARP-1 při léčbě a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy.

### Dosavadní stav techniky

Sklerodermie je onemocnění pojivové tkáně charakterizované fibrózou kůže a vnitřních orgánů, což vede k selhání orgánů a k úmrtí (popisuje se v publikaci Black et al., 1998, Clementsand Furst, 1996). Sklerodermie vykazuje spektrum projevů a různých terapeutických aspektů. Jsou to lokalizovaná sklerodermie, systemická skleróza, poruchy podobné onemocnění sklerodermie a sklerodermie bez kožních projevů (popisuje se v publikaci Smith, Textbook of the Autoimmune Diseases, Edited by Lahita, Chiorazzi and Reeves, LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia 2000). Zatímco lokalizovaná sklerodermie je vzácně se vyskytující kožní onemocnění spojené s fibrózou a s projevy, které se vyskytují pouze na kůži, systémická skleróza je multisystémové onemocnění, které zahrnuje vnitřní orgány i kůži. Systémická skleróza může být difúzní nebo omezená. Omezená systémická skleróza se také nazývá CREST (kalcinóza, Raynaudova ezofageální dysfunkce, sklerodactyly, teleangiectazie). Poruchy podobné onemocnění sklerodermie jsou pravděpodobně spojeny s působením znečištěného prostředí. V případě onemocnění bez kožních projevů jsou poškozeny vnitřní orgány a kůže zůstává beze změn.

Hlavním projevem onemocnění sklerodermie a zvláště pak systemické sklerózy je nadměrná syntéza a ukládání kolagenu,

dysfunkce endotelia, spazmus, stlačení a obliterace způsobené fibrózou.

Sklerodermie je vzácně vyskytující onemocnění se stabilním výskytem přibližně 19 případů na jeden milión osob. Příčina onemocnění není známa, je však důležitá genetická dispozice. Abnormality zahrnují autoimunitu a změny endoteliálních buněk a funkce fibroblastů. Systemická skleróza je pravděpodobně nejvážnější autoimunitní onemocnění s 50 % úmrtností v průběhu 5-ti let od stanovení diagnózy (Silman A.J. (1991) Mortality from scleroderma in England and Wales 1968-1975. Ann. Rheu. Dis. 50, 95-96).

V případě diagnózy je důležitým klinickým parametrem zbytnění kůže úměrné metakarpofalangeálním kloubům. Raynaudův jev je častý, ve většině případů je skoro univerzálním jevem onemocnění sklerodermie. Projevuje se změnou barvy kůže po působení chladu. Příznaky Raynaudova onemocnění je ischemie a zbytnění kůže.

Do iniciace, vážnosti a postupu onemocnění se podílí několik probíhajících biologických procesů a zahrnují vaskulární dysfunkci, aktivaci a poškození endoteliálních buněk a hromadění leukocytů, produkci auto-protilátek a neřízenou fibrotickou odezvu, která může vést ke smrti (popisuje se v publikaci Clements P.J. and Furst D.E. (1996), Systemic Sclerosis, Williams and Williams, Baltimore). Fibroblasty mají důležitou úlohu při patogenezi uvedeného onemocnění. Primárně se fibroblasty získaly z pacientů, kteří trpí onemocněním sklerodermie a vykazují řadu charakteristických vlastností onemocnění in vivo. Je nutné zmínit zesílenou syntézu a ukládání do extrabuněčné matrice zvláště kolagenu a fibronektinu, a změněný růstový faktor a produkci cytokinu, jako je TGF $\beta$  a CTGF (popisuje se

v publikaci Strehlow D and Korn J. (1998), Biology of the scleroderma fibroblast. Curr. Opin. Rheumatol. 10, 572-578 a LeRoy E.C. (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts in vitro. J. Clin. Invest. 54, 880-889).

Neexistuje léčba onemocnění sklerodermie. Nový, ale velmi nebezpečný způsob léčby, je transplantace autologních kmenových buněk (popisuje se v publikaci Martini, Maccario, Ravelli et al., Arthritis Rheum. 1999, 42, 807-811). V současné době neexistuje způsob léčby onemocnění sklerodermie cílený na fibrotický proces (popisuje se v publikaci Wigley F.M. and Boling C.L. (2000), The treatment of scleroderma. 2. 276-292).

Identifikace genů spojených s onemocněním a jeho postupem může vést k vývoji účinné strategie v různých stádiích léčby.

SARP-1 (vyučovaný protein 1 spojený s apoptózou) je členem rodiny vylučovaných proteinů známých jako vylučované kadeřavé příbuzné proteiny založené na jejich homologii s oblastí bohatou na cystein (oblast CRD), která se nachází u rodiny sedmi transmembránových receptorů (popisuje se v publikaci Rattner A., Hsieh J-C., Smallwood P.M., Gilbert D.J., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nathans J. (1997). A family of secreted proteins contain homology to the cysteine rich ligand binding domain of frizzles receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 2859-2863). Kadeřavé geny se původně identifikovaly v mikroorganismu drosophila a řídí polaritu tkáně (popisuje se v publikaci Adler P.N., Charlton J and Vinson C. (1987) Dev Genet. 8, 99-119). Kadeřavé proteiny jsou receptory pro vysoce konzervativní rodinu Wnt obsahující alespoň 16 vylučovaných signálních molekul, které regulují během embryogeneze interakce buňka-buňka (popisuje se v publikaci Smalley M.J. and Dale T.C. (1999) Wnt signalling

in mammalian cancer. Cancer and Metastasis Rev. 18, 215-230).  
Proniknutí do mechanismů působení Wnt vyšlo z několika systémů: genetika mikroorganismu *Drosophila* a *C. elegans*, biochemie probíhající v buněčné kultuře a exprese ektopického genu v embryích organismu *xenopus*. Řada genů Wnt byla u myši mutována, což vede k vývoji velmi specifických vývojových defektů. Signalizační dráha Wnt, která vzniká interakcí Wnt s kadeřavými proteiny, je zprostředkována několika složkami, které se střídají v cytoplazmě, a potlačují aktivitu komplexu, který mění multiprotein  $\beta$ -katenin, což umožňuje vytvořit cytosolický  $\beta$ -katenin, který pak vstupuje do jádra a tvoří komplex s TCF, přičemž dochází k aktivaci transkripce cílových genů Wnt (popisuje se v publikaci Miller J.R., Hocking A.M., Brown J.D. and Moon R.T. (1999) Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ $\beta$ -katenin and Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways. Oncogene 18, 7860-7872, Kuhl et al., 2000).

Wnt interakce se mohou upravit pomocí omezené exprese odlišných vazebných proteinů Wnt, vylučovaných kadeřavých proteinů (sFRP). SFRP jsou schopny vázat Wnt prostřednictvím N-terminální oblasti CRD. Mohou proto oddělit Wnt od jeho receptorů a tím antagonizovat jeho účinky (popisuje se v publikaci Bafico B.A., Gazit A., Pramila T., Finch P.W. Yaniv A. and Aaronson S.A. (1999) Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signalling. J. Biol. Chem. 274, 16180-16187).

SARP-1 se může nazývat několika alternativními jmény, jako je SDF-5, PRO697, ATG-1622, HLHDY31, SFRP-2. Část proteinu nebo protein plné délky a/nebo sekvence nukleové kyseliny myšího nebo lidského SARP-1 se popisují v několika patentových přihláškách například WO 98/35043, WO 98/13 493, EP 0 879 887, WO 99/46 281).

Co se týká funkce, vylučované kadeřavé proteiny (SFRP) působí jako rozpustné modulátory signalizace Wnt tím, že soutěží s kadeřavými receptory vázanými na membránu o navázání vylučovaných ligandů Wnt. Bez ohledu na SARP-1, známé lidské proteiny z této rodiny obsahují SARP-2 (SFRP-1) a SARP-3 (SFRP-5). Uvádí se, že myší SARP-1 a lidský SARP-2 a 3 mají schopnost tvořit buňky citlivější vůči apoptóze nebo inhibovat odezvu na apoptózu (popisuje se v publikaci Melkonyan H.S., Chang W.C., Shapiro J.P., Mahadevappa M., Fitzpatrick P.A., Kiefer M.C., Tomei L.D. and Umansky S.R. (1997) SARP: family of secreted apoptosis-related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13696-13641). Když se exprimují v buněčné linii adenokarcinomu prsu, myší SARP-1 a lidský SARP-2 vykazují opačné účinky na citlivost buněk vůči pro-apoptickým stimulům. Zatímco buňky obsahující SARP-1 vykazují vyšší rezistenci, buňky exprimující SARP-2 se staly citlivějšími vůči apoptóze vyvolané nádorovým nekrotickým faktorem a ceramidem. Expres SARP-1 nebo SARP-2 upravená vnitrobuněčným množstvím  $\beta$ -kateninu, což je indikátor signalizační transdukce zprostředkované Wnt, naznačují, že SARP interferuje s Wnt-kadeřavou signalizační dráhou (popisuje se v publikaci Melkonyan H.S., Chang W.C., Shapiro J.P., Mahadevappa M., Fitzpatrick P.A., Kiefer M.C., Tomei L.D. and Umansky S.R. (1997) SARP: family of secreted apoptosis-related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13696-13641).

Analýza Northernovým přenosem ukázala, že geny SARP vykazují rozdílné paterny exprese (popisuje se v publikaci Leimeister C., Bach A., Gessler M., Mech, Dev. 1998 Jul., 75(1-2):29-42). SARP-1 existuje v několika lidských tkáních jako transkript ve velikosti 2,2 a 1,3 kb, přičemž nejvyšší koncentrace jsou v tlustém a tenkém střevě. V publikaci Chang, J.T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G., Campochiaro,

P.A., Zack, D.J.: Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. Hum. Molec. Genet. 8: 575-583, 1999 se uvádí, že SARP-1 nebo SFRP-2 se silně a s výhodou exprimuje v bovinní sítnici prostřednictvím vnitřní jaderné vrstvy. V sítnici se SARP-3 nebo SFRP-5 specificky exprimuje v sítnicovém pigmentovém epitelu.

Pomocí analýzy hybridů somatických buněk (popisuje se v publikaci Melkonyan H.S., Chang W.C., Shapiro J.P., Mahadevappa M., Fitzpatrick P.A., Kiefer M.C., Tomei L.D. and Umansky S.R. (1997) SARP: family of secreted apoptosis-related proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13696-13641) se mapoval gen SARP-1 v lidském chromozomu 4. V publikaci Chang, J.T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G., Campochiaro, P.A., Zack, D.J.: Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. Hum. Molec. Genet. 8: 575-583, 1999 se v mapě chromozomu uvádí poloha 4q31.3, která se zjistila radiační analýzou hybridů.

Také existuje důkaz, že změněná exprese SARP-1 se vztahuje ke zhoubnému bujení (popisuje se v patentovém dokumentu WO 98/13 493).

#### Podstata vynálezu

Vynález popisuje výhodný účinek SARP-1 v existujícím zvířecím modelu sklerodermie.

První předmětná věc vynálezu je použití SARP-1 při přípravě léčivého prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie a zvláště systemické sklerózy. Druhou

předmětnou věcí vynálezu je použití buňky exprimující SARP-1 nebo expresivní vektor obsahující kódující sekvenci SARP-1 při přípravě léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy. Dále vynález popisuje farmaceutické prostředky obsahující SARP-1 a metody léčby zahrnující aplikaci SARP-1 do lidského těla.

V souladu s vynálezem se zjistilo, že exprese vylučovaného proteinu SARP-1 je podstatně nižší u porušených fibroblastů získaných z pacientů trpících onemocněním sklerodermie ve srovnání s kontrolními buňkami. K identifikaci rozdílně exprimovaných genů ve fibroblastech kůže izolovaných z fibrotických lézí získaných z pacientů trpících onemocněním sklerodermie se použila technologie mikroerej DNA genů na filtru. Výsledky se porovnaly s výsledky získanými u fibroblastů izolovaných z klinicky nezměněných oblastí kůže získaných ze stejných pacientů. Exprese proteinu SARP-1 se ve fibroblastech získaných z lézí u 5 ze 7 testovaných pacientů zeslabila. Navíc analýza RT-PCR celkové RNA izolované z celé biopsie abnormální kůže získané z pacientů trpících onemocněním sklerodermie indikovala nižší množství mRNA SARP-1 ve srovnání s klinicky normální kontrolní biopsie, která se získala ze stejného anatomického místa člověka stejného věku a pohlaví.

Na podporu shora uvedených výsledků statistická metoda porovnávající sílu exprese všech genů získaných technologií genová filtrační mikroerej ukázala, že zeslabení exprese proteinu SARP-1 je s 95 % pravděpodobností spojena s fibrotickými lézemi pacientů, což naznačuje spojení s klinickým postupem onemocnění.

Pozitivní účinek proteinu SARP-1 v případě onemocnění sklerodermie se potvrdil v dobře připraveném myším modelu



onemocnění sklerodermie, v modelu plicní fibrózy vyvolané bleomycinem. V tomto modelu aplikace buněk exprimujících SARP-1 podstatně redukuje plicní fibrózu.

Vynález proto popisuje použití látky, která se váže na receptor lidského proteinu SARP-1 a iniciuje signalizaci, nebo látky, která stimuluje uvolnění nebo zesiluje aktivitu endogenního proteinu SARP-1, pro výrobě léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie. Uvedenou látkou může být samotný zralý protein SARP-1 nebo libovolný fragment proteinu SARP-1, který se váže na receptor proteinu SARP-1 a iniciuje signalizaci prostřednictvím uvedeného receptoru, stejně jako libovolný další agonista receptoru SARP-1, jako jsou agonistické protilátky určené proti receptoru SARP-1 nebo jeho specifické chemické agonisty.

Receptor pro protein SARP-1 je wnt-protein, který se zdánlivě váže na kadeřavou oblast proteinu SARP-1 bohatou na cystein (frz) (popisuje se v publikaci Lin K., Wang S, Julius MA, Kitajewski J., Moos M., Jr., Luyten FP, Proc. Natl. Acad. Sci USA 1997 Oct. 14, 94 (21): 11196-200). Látka podle vynálezu může proto být fragmentem proteinu SARP-1, který obsahuje jeho kadeřavou oblast bohatou na cystein.

Látka používaná pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie se vybrala ze skupiny zahrnující:

- a) zralý protein SARP-1
- b) polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 2,
- c) polypeptid obsahující aminokyseliny 21 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- d) polypeptid obsahující aminokyseliny 24 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,

- e) polypeptid obsahující aminokyseliny 25 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- f) polypeptid obsahující aminokyseliny 26 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- g) polypeptid obsahující aminokyseliny 27 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- h) polypeptid obsahující aminokyseliny 28 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- i) polypeptid obsahující aminokyseliny 37 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- j) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), kde aminokyselinová sekvence vykazuje alespoň 40 % nebo 50 % nebo 60 % nebo 70 % nebo 80 % nebo 90 % shody s alespoň jednou ze sekvencí popsaných v odstavci a) až i),
- k) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), který je kódován sekvencí DNA, jenž hybridizuje s doplňkem přirozené sekvence DNA, která kóduje libovolný polypeptid popsaný v odstavci a) až i) za středně přísných podmínek nebo za velmi přísných podmínek.
- l) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), kde libovolné změny v aminokyselinové sekvenci jsou konzervativní aminokyselinové substituce aminokyselinových sekvencí v sekvencích popsaných v odstavcích a) až i),
- m) sůl nebo izoforma, fúzovaný protein, funkční derivát, aktivní frakce nebo cirkulárně permutovaný derivát polypeptidu popsaného v odstavci a) až l).

cdNA lidského proteinu SARP-1 v plné délce se klonovala. Sekvence je znázorněna na obrázku č. 5, stejně jako sekvence SEQ ID NO: 1, která je uvedena na příloženém seznamu sekvencí. Odpovídající aminokyselinová sekvence je zobrazena na obrázku č. 5 a sekvence označená SEQ ID NO: 2 je uvedena na příloženém seznamu sekvencí. Jak se popisuje v příkladech uvedených dále v textu, zjistilo se, že N-konec proteinu SARP-1 je vysoce

heterogenní. Předpokládá se, že signální peptid SARP-1 překlene aminokyseliny 25 až 295 ze sekvence SEQ ID NO: 2 nebo aminokyseliny 21 až 295. N-terminální sekvence čištěného rekombinantního lidského proteinu SARP-1 exprimovaného v buňkách HEK 293 ukázala další N-terminální vedoucí sekvence zralého proteinu SARP-1, která začíná aminokyselinami 24, 25, 26, 27, 28 nebo 37 sekvence označené SEQ ID NO: 2.

Termín „SARP-1“ znamená libovolnou nebo všechny látky popsané shora v textu v odstavci a) až m).

Termín „léčba a/nebo prevence“ znamená libovolné atenuaci, zeslabení nebo částečnou, podstatnou nebo úplnou prevenci nebo blokování vytvoření, vývoje, postupu onemocnění nebo blokování postupu libovolného jednoho z vážných symptomů nebo všech symptomů spojených s onemocněním.

Termín onemocnění „sklerodermie“ zahrnuje uvedené onemocnění v libovolné klasifikaci a definici, stejně jako jeden nebo více symptomů onemocnění sklerodermie, jak se popisuje v úvodu. Uvedený termín dále zahrnuje onemocnění, které je spojené s onemocněním sklerodermie, jako se popisuje v publikaci Smith, Textbook of the Autoimmune Diseases, Edited by Lahita, Chiorazzi and Reeves, LippincottWilliams and Wilkins, Philadelphia 2000.

Termín onemocnění „sklerodermie“ zahrnuje další fibrotická onemocnění, jako je cirhóza jater, intersticiální pulmonární fibróza, Dupuytrenova kontraktura, keloidy a jiné abnormality spojené s hojením ran a jizev, pooperační adheze a reaktivní fibróza, jako je chronické selhání srdce zvláště po infarktu myokardu. Vynález popisuje použití proteinu SARP-1 při výrobě léčebného prostředku vhodného pro léčbu a/nebo prevenci fibrotického onemocnění, jako jsou ta uvedená shora v textu.

Další onemocnění nebo poruchy, které je možné léčit proteinem SARP-1, zahrnují onemocnění týkající se hojení ran, zvláště hojení ran na plicích, která zahrnují chronické záněty plic a hlavně fibrózu nebo zjizvení povrchu plic. Poruchy zahrnující zánět plic zahrnují například idiopatickou pulmonární fibrózu, sarkoidózu, bronchopulmonární dysplázii, ibroproliferativní ARDS, stejně jako pulmonární projevy nebo systémové onemocnění, jako je revmatická artritida (popisuje se v publikaci Krein, P.M., Huang, Y and Winston B.W. (2001). Expert. Opin. Ther. Patents 11(7): 1065-1079).

Termín onemocnění „sklerodermie“ se s výhodou týká lokalizované, generalizované, omezené a difúzní sklerodermie, stejně jako překrývajících se syndromům.

Onemocnění lokalizovaná sklerodermie působí na kůži, ale může také ovlivňovat svaly a kosti, neovlivňuje však vnitřní orgány. Lokalizovaná sklerodermie je relativně slabá a může se vztahovat k onemocnění generalizovaná sklerodermie z hlediska podobných superficiálních symptomů, které je možné spatřit na biopsiích kůže pod mikroskopem.

Onemocnění generalizovaná sklerodermie zahrnuje několik typů symptomů nebo skupin symptomů, jako je CREST, omezený a difúzní. Generalizovaná sklerodermie je také známa jako systemická skleróza. Můžeme ji také nazývat progresivní systemickou sklerózou nebo rodinná progresivní systemická skleróza. Generalizovaná sklerodermie může například působit na kůži, krevní žíly a/nebo vnitřní orgány. Když působí na kůži, může způsobovat tvrdnutí kůže, nejběžněji na rukou a/nebo na obličeji. Když působí na krevní cévy, může způsobit Raynaudovu nemoc. Nejzávažnější formy systemické sklerózy působí na vnitřní orgány a může způsobit invaliditu nebo dokonce

smrt. Mimo jiné, systemická skleróza zahrnuje onemocnění sklerodermie plic, sklerodermie sítnice, srdeční projevy, oslabení svalů zahrnující svalovou únavu a omezený CREST, gastrointestinální dysmotilitu a spazma a abnormality v centrálním, periferním a autonomním nervovém systému. S ohledem na abnormality nervového systému nejběžnější je syndrom karpálního tunelu následovaný trigeminální neuralgií.

Omezená sklerodermie může být omezeno na ruce, ačkoli může také postihnout tvář a krk.

Difúzní sklerodermie zahrnuje napínání kůže a také se objevuje na zápěstí (nebo na lokti). Existuje několik subkategorií difúzní systemické sklerózy, jako je sklerodermie bez kožních projevů, při které dochází k fibróze vnitřních orgánů, ale nedochází k tvrdnutí kůže. Další subkategorií je rodinná progresivní systemická skleróza, což je řídce se vyskytující forma objevující se v rodinách.

Překrývající se symptomy se vyskytují v případě, že pacient trpící onemocněním sklerodermie také trpí dalším autoimunitním onemocněním (jako je lupénka, revmatická artritida atd.). Tak tomu je například u difúzní sklerodermie, která se kryje s lupénkou. Symptomy sklerodermie mohou také být součástí onemocnění pojivové tkáně (MCTD) nebo onemocnění nediferencované pojivové tkáně (UCTD).

Termín „SARP-1“ znamená protein obsahující všechny nebo část sekvence označené SEQ ID NO: 2 (lidská sekvence) nebo SEQ ID NO: 5 (myší sekvence), která se uvádí na seznamu sekvencí bez ohledu na označení takového proteinu, který se také označuje jako SDF-5, PRO697, ATG-1622, HLHDY31, SFRP-2 nebo FRP-2, stejně jako sole, izoformy, muteiny, aktivní frakce, funkční deriváty a cirkulárně permutované deriváty.

Termín „SARP-1“ znamená zralý protein, kterému chybí signální peptid. Předpokládá se, že signální peptid obsahuje prvních 20 nebo prvních 23, 24, 25, 26, 27 nebo 36 aminokyselin proteinu SARP-1, jak se definuje v sekvenci SEQ ID NO: 2, což znamená, že zralý protein bude dále obsahovat aminokyseliny 21 až 295 nebo 24, 25, 26, 27, 28 nebo 37 až 295 sekvence označené SEQ ID NO: 2.

Jak zobrazuje obrázek č. 6, lidská aminokyselinová sekvence SARP-1 je vysoce homologní s myší sekvencí (označenou SEQ ID NO: 5). Proto myší SARP-1 se může také použít podle vynálezu, stejně jako proteiny získané z jiných živočišných druhů, pokud existuje dostatečně vysoká shoda mezi proteiny, což umožňuje proteinu vykazovat biologickou aktivitu aniž se vyvolává u člověka podstatná imunitní odezva.

Termín „SARP-1“ dále znamená libovolný fragment, část, oblast nebo subdoménu sekvence SEQ ID NO: 2 nebo 5, která vykazuje požadovanou aktivitu u onemocnění sklerodermie. Proteinové fragmenty nebo jedna nebo více oblastí proteinu se mohou použít podle vynálezu, pokud vykazují libovolný výhodný účinek na onemocnění sklerodermie. Výhodný účinek, který je alespoň srovnatelný s proteinem plné délky. Výhodný účinek se také může měřit jedním z in vitro nebo in vivo testů popsanych v příkladech dále v textu nebo v libovolném jiném testu, který může demonstrovat účinek onemocnění sklerodermie. Protein SARP-1 obsahuje například kadeřavou oblast bohatou na cystein a oblast podobnou netrinu, která se také nazývá modul NTR, která je homologní s tkáňovými inhibitory metaloproteinázy (TIMP) (popisuje se v publikaci Banyai L., and Patthy L., (1999). The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of

metalloproteases. Protein Sci. 8, 1636-1642). Proto fragment obsahující kadeřavou oblast proteinu SARP-1 nebo fragment obsahující modul NTR jsou výhodné fragmenty podle vynálezu.

Protein SARP-1 se může vyskytovat přirozeně, to znamená, že je přirozený protein, nebo se může vyskytovat jako rekombinantní protein. Rekombinantní produkce se provádí v eukaryontních buňkách, jako jsou buňky kvasinek nebo buňky CHO, v lidských fibroblastech nebo v buněčných liniích. Uvedený protein se může dále produkovat v prokaryontních buňkách, jako jsou E. coli.

Protein SARP-1 je glykosylovaný na jednom nebo více místech. Může také být neglykosylovaný, v závislosti na daných potřebách a zdroji produkce nebo izolace proteinu.

Termín „sůl“ znamená sole karboxylových skupin a kyselé adiční sole aminoskupin molekuly SARP-1 nebo jejich analogů. Sole karboxylové skupiny se mohou také tvořit způsobem známým v oboru a zahrnují anorganické sole, například sole sodíku, vápníku, amoniaku, železa nebo zinku a podobně, a sole organických bazí, jako jsou ty tvořené například s aminy, jako je trietanolamin, arginin nebo lyzin, piperidin, prokain a podobně. Adiční sole kyselin zahrnují například sole minerálních kyselin, jako je například kyselina chlorovodíková nebo sírová a sole organických kyselin, jako je například kyselina octová nebo šťavelová. Libovolné takové sole si ponechávají biologickou aktivitu proteinu SARP-1 podle vynálezu, což znamená, že mají pozitivní účinek na onemocnění sklerodermie.

Izoformy nebo varianty sestřihu proteinu SARP-1 se mohou také použít podle vynálezu, pokud jsou schopny inhibovat postup a/nebo symptomy onemocnění sklerodermie. Zjistilo se,

že dva transkripty o velikosti 1,3 kb a 2,2 kb diferenciálně exprimované v lidských tkáních mohou například reprezentovat různé izoformy proteinu SARP-1, které se mohou použít podle vynálezu.

Termín „muteiny“ jsou analogy proteinu SARP-1, kde jeden nebo více aminokyselinových zbytků přirozeného proteinu SARP-1 je nahrazen různými aminokyselinovými zbytky nebo se tyto zbytky odstranily nebo jeden nebo více aminokyselinových zbytků se přidalo do přirozené sekvence proteinu SARP-1, které mají s výhodou alespoň stejnou aktivitu jako protein SARP-1 divokého typu nebo dokonce má daleko silnější aktivitu. Tyto muteiny se připravily známou syntézou a/nebo místně řízenou mutagenezí nebo libovolnou jinou známou metodou.

Libovolný takový mutein vykazuje s výhodou sekvenci aminokyselin, která je dostatečně podobná sekvenci proteinu SARP-1, jak se popisuje v sekvenci označené SEQ ID NO: 2, aby vykazovala alespoň dostatečně podobnou aktivitu proteinu SARP-1. Aktivita mutantu proteinu SARP-1 se může testovat způsobem, který je dobře znám v boru, a také je možné částečně využít testy, které se popisují dále v textu. Měření síly syntézy kolagenu (příklad 7) ve fibroblastech je vhodný test pro odhad aktivity muteinů SARP-1.

Muteiny v souladu s vynálezem zahrnují proteiny kódované nukleovou kyselinou, jako je DNA nebo RNA, které hybridizují s DNA nebo RNA kódující protein SARP-1 podle vynálezu za přísných podmínek. Termín „přísné podmínky“ znamená podmínky hybridizace a následné podmínky promývání, které se v oboru běžně nazývají „přísné“ (popisuje se v publikaci Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992) a Sambrook, J. C., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Molecular Cloning: A Laboratory



Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

Příklady přísných podmínek bez omezení zahrnují teplotu promývání pohybující se 12 až 20°C pod vypočítanou teplotou tání hybridu, 2x koncentrovaný SSC a 0,5 % SDS po dobu 5 minut, 2x koncentrovaný SSC a 0,1 % SDS po dobu 15 minut, 0,1x koncentrovaný SSC a 0,5% SDS při teplotě 37 °C po dobu 30 až 60 minut a pak 0,1x koncentrovaný a 0,5 % SDS při teplotě 68 °C po dobu 30 až 60 minut. V oboru je dobře známo, že přísnost podmínek také závisí na délce sekvencí DNA, oligonukleotidových sondách (jako je 10 až 40 bazí) nebo smíchaných oligonukleotidových sondách. Jestliže se používá směs sond, je výhodné při promývání použít chlorid tetrametylamonný (TMAC) místo SSC (popisuje se v publikaci Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Interscience, N.Y., §§6.3 and 6.4 (1987, 1992)). Libovolný takový mutein má s výhodou sekvenci aminokyselin dostatečně podobnou sekvenci proteinu SARP-1, která vykazuje dostatečně podobnou nebo dokonce lepší biologickou aktivitu jako protein SARP-1.

Jedna jednoduše měřitelná aktivita proteinu SARP-1 je jeho schopnost zeslabit syntézu kolagenu. Test pro měření této aktivity se popisuje v příkladu 6 dále v textu. Pokud mutein vykazuje aktivitu redukce kolagenu, může se uvažovat, že má podstatně podobnou aktivitu jako protein SARP-1. Může se stanovit, zda libovolný daný mutein má alespoň podstatně stejnou aktivitu jako protein SARP-1 za použití experimentu, který se například popisuje v příkladu 7.

Ve výhodném provedení vynálezu libovolný takový mutein má alespoň 40 % shodu nebo homologii se sekvencí označenou SEQ ID NO: 2 uvedené v seznamu sekvencí. Výhodněji vykazuje alespoň

50 %, alespoň 60 %, alespoň 70 %, alespoň 80 % nebo nejvýhodněji alespoň 90 % shodu nebo homologii.

Shoda odráží vztah mezi dvěma nebo více polypeptidovými sekvencemi nebo dvěma nebo více polynukleotidovými sekvencemi stanovenými porovnáním sekvencí. V obecném případě shoda označuje přesnou shodu nukleotidu vůči nukleotidu nebo aminokyselinovou sekvenci vůči aminokyselinové sekvenci nebo shodu dvou polynukleotidů nebo dvou polypeptidových sekvencí po celé délce sekvencí, které se porovnávají.

V případě sekvencí, které nevykazují přesnou shodu, se může stanovit „procento shody“. V obecném případě se dvě porovnávané sekvence uspořádají za vzniku maximální korelace mezi sekvencemi. Uspořádání může zahrnovat „mezery“ buď v jedné nebo obou sekvencích, aby se zvýšil stupeň uspořádání. Procento shody se může stanovit po celé délce sekvence v případě každé porovnávané sekvence (komplexní uspořádání), což je zvláště vhodné pro sekvence se stejnou nebo velmi podobnou délkou nebo v případě kratších definovaných délek (lokální uspořádání), které je více vhodné pro sekvence délek, které nejsou stejné.

Způsoby porovnání shody a homologie dvou nebo více sekvencí jsou dobře známy v oboru. Tak například programy dostupné v Wisconsin Sequence Analysis Package, verze 9.1 (popisuje se v publikaci Devereux J., et al., Nucleic Acids research , 12, 387-395, 1984), jako jsou programy BESTFIT a GAP, se mohou použít ke stanovení procenta shody mezi dvěma polynukleotidy a procenta homologie mezi dvěma polypeptidovými sekvencemi. Program BESTFIT využívá algoritmus „lokální homologie“ (popisuje se v publikaci Smith and Waterman, J. Mol. Biol. 147, 195-197, 1981, Advances in Applied Mathematics, 2, 482-489, 1981) a zjišťuje nejlepší jedinou

oblast podobnosti mezi dvěma sekvencemi. V oboru jsou známy další programy vhodné pro stanovení shody a/nebo podobnosti sekvencí. Je to například rodina programů BLAST (popisuje v publikaci Altschul, S.F., et al., J. Mol. Biol. 215, 403-410, 1990 a Altschul, S. F., et al., Nucleic Acids Res., 25: 389-3402, 1997). Tento program je možné najít na domácí stránce NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)). Dále se používá program FASTA (popisuje se v publikaci Pearson, W.R., Methods in Enzymology, 183, 63-99, 1990 a Pearson, W. R. and Lipman D. J., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85, 2444-2448, 1988).

Muteiny proteinu SARP-1, které se mohou použít v souladu s vynálezem, nebo nukleové kyseliny, které je kódují, zahrnují konečnou množinu podstatně odpovídajících sekvencí jako substituční peptidy nebo polynukleotidy, které se mohou získat rutinním způsobem, aniž jsou nutné další experimenty.

Výhodné změny muteinů v souladu s vynálezem jsou známy jako „konzervativní“ substituce“. Konzervativní substituce aminokyselin polypeptidů nebo proteinů SARP-1 mohou zahrnovat synonymní aminokyseliny ve skupině, která má dostatečně podobné fyzikálně chemické vlastnosti. Substituce mezi členy skupiny budou chránit biologickou funkci molekuly (popisuje se v publikaci Grantham (1974), Science, 185, 862-864). Je zřejmé, že začlenění a delece aminokyselin se může také provést ve shora definovaných sekvencích aniž se změní jejich funkce, zvláště, jestliže začlenění nebo delece zahrnují pouze několik aminokyselin, například méně než třicet a s výhodou méně než deset a neodstraňují nebo nahrazují aminokyseliny, které jsou nutné k vytvoření funkčního uspořádání, například cysteinové zbytky. Vynález dále popisuje proteiny a muteiny produkované uvedeným způsobem delece a/nebo inserce.

Skupiny synonymních aminokyselin jsou s výhodou ty definované v tabulce č. I. Skupiny synonymních aminokyselin jsou výhodněji ty definované v tabulce č. II a skupiny synonymních aminokyselin jsou nejvýhodněji ty definované v tabulce č. III.

Tabulka č. I: Výhodné skupiny synonymních aminokyselin

| aminokyselina | synonymní skupina                 |
|---------------|-----------------------------------|
| 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                               |

Tabulka č. II: Výhodnější skupiny synonymních aminokyselin

| aminokyselina | synonymní skupina  |
|---------------|--------------------|
| 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                     |

Tabulka č. III: Nejvýhodnější skupiny synonymních aminokyselin

| aminokyselina | synonymní skupina |
|---------------|-------------------|
|---------------|-------------------|

|     |               |
|-----|---------------|
| 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

Příklady produkce aminokyselinových substitucí v proteinu, který se může použít při získání muteinů polypeptidů nebo proteinů SARP-1 vhodné pro použití podle vynálezu zahrnuje libovolný známý postup, jako jsou patentové dokumenty USA č. 4 956 314, 4 588 585 a 4 737 462 (Mark et al.), 5 116 943 (Koths, et al., ) 4 965 195 (Namen et al.), 4 879 111 (Chong et al.,) a 5 017 691 (Lee et al.,) a proteiny se substituovaným lyzinem přítomným v patentovém dokumentu USA č. 4 904 584 (Shaw et al.,).

Termín „fúzovaný protein“ znamená polypeptid obsahující protein SARP-1 nebo jeho mutein fúzovaný s libovolným proteinem, který například vykazuje dlouhou dobu zdržení v tělních tekutinách. Vynález popisuje fúzní proteiny obsahující celý protein SARP-1 nebo jeho funkční část fúzovaný s celým proteinem nebo s jeho částí, která je schopna zlepšit biologickou aktivitu molekul, jako je poločas rozpadu v lidském těle. Ve výhodném provedení vynálezu fúzní proteiny obsahují imunoglobulinovou fúzi (Ig). Velmi výhodné jsou fúzní proteiny obsahující celý protein SARP-1 nebo jeho část fúzovanou s celým imunoglobulinem nebo s jeho částí. Uvedené fúzní proteiny mohou být monomerní nebo multimerní, heteromultimerní nebo homomultimerní. Fúzní protein s výhodou obsahuje konstantní oblast imunoglobulinu, zvláště část imunoglobulinu označenou Fc. Výhodné je provedení vynálezu, kde imunoglobulin je izoforma IgG1 nebo IgG2.

Protein SARP-1 se také může fúzovat s jiným proteinem, polypeptidem nebo podobně, například s imunoglobulinem nebo s jeho fragmentem. Fúze může být přímá nebo prostřednictvím

krátkého linkerového peptidu, který může obsahovat pouze 1 až 3 aminokyselinové zbytky nebo může být delší a může obsahovat například 13 aminokyselinových zbytků. Uvedeným linkerem může být tripeptid sekvence E-F-M (Glu-Phe-Met) například linkerová sekvence obsahující 13 aminokyselin Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gln-Phe-Met, které jsou zavedeny mezi sekvenci SARP-1 a sekvenci imunoglobulinu.

Termín „funkční deriváty“ znamená deriváty proteinu SARP-1 a jejich muteiny a fúzované proteiny, které se mohou připravit z funkčních skupin, jenž se vyskytují jako vedlejší řetězce nebo N-terminální nebo C-terminální skupiny. Tyto deriváty je možné využít v souladu s vynálezem pokud jsou farmaceuticky přijatelné, což znamená, že neporušují aktivitu proteinu, která je alespoň podstatně podobná aktivitě proteinu SARP-1 a nepropůjčují prostředku, který je obsahuje, toxické vlastnosti. Ve výhodném provedení vynálezu funkční derivát obsahuje alespoň jednu část zachycenou na jedné nebo více funkčních skupin, které se objevují jako jeden nebo více vedlejších řetězců na aminokyselinových zbytcích.

Vedlejší řetězce polyetylenglykolu (PEG) jsou velmi výhodné části. Vedlejší řetězce PEG mohou maskovat antigenní místa a prodlužovat dobu zdržení v tělních tekutinách. Jiné deriváty zahrnují alifatické estery karboxylových skupin, amidy karboxylových skupin vznikající reakcí s amoniakem nebo s primárním nebo sekundárním aminem, N-acylové deriváty volných aminoskupin aminokyselinových zbytků tvořených acylovými částmi (například alkanoylové nebo karbocyklické aroylové skupiny) nebo O-acylové deriváty volných hydroxylových skupin (jako jsou například serylové nebo threonylové zbytky) tvořené s acylovými částmi.

Termín „aktivní frakce“ proteinu SARP-1 a jeho muteiny a fúzované proteiny zahrnují libovolný fragment nebo prekurzor polypeptidového řetězce samotné molekuly proteinu nebo společně s asociovanými molekulami nebo s navázanými zbytky. Mohou to být například cukerné nebo fosforečnanové zbytky nebo agregáty molekuly proteinu nebo samotné cukerné zbytky, které udílejí uvedeným aktivním frakcím alespoň částečně podobnou aktivitu jako vykazuje protein SARP-1.

Vynález dále zahrnuje použití molekuly nukleové kyseliny při výrobě léčebného prostředku vhodného pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, kde molekula nukleové kyseliny obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny obsahující:

- a) zralý protein SARP-1
- b) polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 2,
- c) polypeptid obsahující aminokyseliny 21 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- d) polypeptid obsahující aminokyseliny 24 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- e) polypeptid obsahující aminokyseliny 25 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- f) polypeptid obsahující aminokyseliny 26 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- g) polypeptid obsahující aminokyseliny 27 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- h) polypeptid obsahující aminokyseliny 28 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- i) polypeptid obsahující aminokyseliny 37 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
- j) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), kde aminokyselinová sekvence vykazuje alespoň 40 % nebo



50 % nebo 60 % nebo 70 % nebo 80 % nebo 90 % shody s alespoň jednou ze sekvencí popsaných v odstavci a) až i).

k) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), který je kódován sekvencí DNA, jenž hybridizuje s doplňkem přirozené sekvence DNA, která kóduje libovolný polypeptid popsaný v odstavci a) až i) za středně přísných podmínek nebo za velmi přísných podmínek.

l) mutein libovolného polypeptidu popsaného v odstavci a) až i), kde libovolné změny v aminokyselinové sekvenci jsou konzervativní aminokyselinové substituce aminokyselinových sekvencí v sekvencích popsaných v odstavcích a) až i),

m) sůl nebo izoforma, fúzovaný protein, funkční derivát, aktivní frakce nebo cirkulárně permutovaný derivát polypeptidu popsaného v odstavci a) až l). Vynález dále popisuje použití uvedených molekul nukleové kyseliny při léčbě a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.

V souladu s vynálezem se může také protein SARP-1 aplikovat do lidského těla ve formě vektoru, který obsahuje uvedenou molekulu nukleové kyseliny. Vynález dále popisuje použití léčebného prostředku při léčbě a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie. Vektor je s výhodou expresivní vektor obsahující promotor operativně spojený s celou sekvencí kódující protein SARP-1 nebo s její částí. V dalším výhodném provedení vynálezu je vektor vektorem genové terapie. Vektory genové terapie jsou známy v oboru, většina z nich jsou vektory odvozené z virů, jako je adenovirové nebo lentivirové vektory.

Protein SARP-1 se také může aplikovat do lidského těla ve formě buňky produkující a/nebo vylučující SARP-1. Vynález dále popisuje použití buňky exprimující protein SARP-1 vhodný pro přípravu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie. To znamená buněčnou terapii při léčbě a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie. Buňka může přirozeně produkovat protein SARP-1 a/nebo v případě transfekované buňky

může produkovat rekombinantní SARP-1. Výhodné jsou buňky exprimující a vylučující vysoké množství proteinu, jako jsou buňky s nadměrnou expresí vykazující vysoký počet kopií expresivního vektoru, který obsahuje molekulu nukleové kyseliny kódující protein SARP-1.

Vzhledem k tomu, že fibroblasty reprezentují mechanismus fibrózy, jsou nejvhodnějšími buňkami pro léčbu fibrózy a sklerodermie. Proto je možné s výhodou použít fibroblasty exprimující SARP-1 v souladu s vynálezem.

Vynález dále popisuje buňku obsahující vektor, který zahrnuje molekulu nukleové kyseliny kódující celý protein SARP-1 nebo jeho část, který je vhodný pro přípravu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie. Vynález popisuje buňku, která se geneticky upravila a produkuje polypeptid podle vynálezu.

Použití expresivního vektoru při vyvolání a/nebo zesílení endogenní produkce proteinu SARP-1 v buňce, která v normálním případě uvedený protein neexprimuje. Vynález popisuje použití technologie známé jako aktivace endogenního genu (EGA) při produkci požadovaného proteinu.

Generalizovaná skleróza je jedna z nejvážnějších onemocnění při sklerodermii, které často vede k invaliditě a k úmrtí. Další výhodné provedení vynálezu se vztahuje ke generalizované skleróze, která je indikace onemocnění sklerodermie a je charakterizováno hlavně zahrnutím vnitřních orgánů, jak se popisuje shora v textu.

Vynález popisuje několik kombinací léčby. Proto léčebné prostředky podle vynálezu s výhodou obsahují

- interferon, zvláště interferon- $\beta$ ,

- antagonistu nádorového nekrotického faktoru (TNF), zvláště TBPI a/nebo TBPII
- další činidla působící proti sklerodermii,
- činidlo působící proti sklerodermii vybrané ze skupiny obsahující inhibitory ACE, činidla blokující vápníkový kanál, inhibitory protonových pump, NSAID, COX-inhibitory, kortikosteroidy, tetracyklin, pentoxyfilin, bucilamin, geranylgeranylové transferázové inhibitory, roterlin, prolyl-4-hydroxylázové inhibitory, c-proteinázové inhibitory, lyzyl-oxidázové inhibitory, relaxin, halofuginon, prostaglandiny, prostacykliny, endotelin-1, oxid dusnatý, inhibitory angiotenzinu II a antioxidanty.

Všechny způsoby léčby jsou určeny pro současné, postupné nebo oddělené použití.

Ačkoli v současné době neexistuje žádná léčba onemocnění sklerodermie, několik činidel nebo způsobů léčby je možné použít při léčbě symptomů onemocnění sklerodermie. Taková činidla proti sklerodermii, která se mohou použít jako kombinovaná terapie podle vynálezu, se popisují v publikaci Leighton, C. Drugs 2001 61(3), 419-427 nebo Wigley F.M. and Sule S.D. (2001) Expert Opinions on Investigational Drugs 10(1) 31-48.

Je známo, že interferony působí převážně jako inhibitory virové replikace a buněčné proliferace. Interferon- $\gamma$  má například důležitou úlohu při podpoře imunitní a zánětlivé odezvy. Je známo, že interferon  $\beta$  (IFN- $\beta$ , interferon typu I) má protizánětlivou úlohu.

V dalším provedení vynálezu se protein SARP-1 používá v kombinaci s antagonistou TNF. Antagonisté TNF působí

několika způsoby. Antagonisté se mohou vázat na samotnou molekulu TNF s dostatečnou afinitou a specifitou a mohou částečně nebo podstatně neutralizovat epitop TNF nebo epitopy odpovědné za navázání TNF na receptor (nazývají se „maskovací antagonisté“). Maskovacími antagonisty mohou být například protilátka určená proti TNF.

V jiném případě antagonisté TNF mohou inhibovat signalizační dráhu TNF aktivovanou receptorem na buněčném povrchu po navázání TNF (nazývají se „signalizační antagonisté“). Antagonisté TNF se jednoduše identifikují a hodnotí se na základě rutinního testování kandidátů. Zkoumá se jejich účinek na aktivitu přirozeného TNF na citlivé buněčné linie in vitro. Jsou to například lidské buňky B, kde TNF způsobuje proliferaci a vylučování imunoglobulinu. Test zahrnuje tvorbu TNF při různých ředěních antagonisty. Jako například 0,1 až 100 násobné ředění molárního množství TNF používané v testu, přičemž kontroly neobsahují TNF nebo pouze antagonistu (popisuje se v publikaci Tucci et al., 1992).

Jako maskovací antagonisté s výhodou slouží antagonisté TNF, které se používají podle vynálezu. Mezi maskovacími antagonisty patří ty polypeptidy, kteří se váží na TNF s vysokou afinitou a vykazují nízkou imunogeničnost. Zvláště se preferují molekuly rozpustných receptorů TNF a neutralizační protilátky vůči TNF. Rozpustné formy TNF-RI(p55) a TNF-RII(p75) je možné použít podle vynálezu. Zkrácené formy uvedených receptorů, které obsahují extrabuněčné oblasti receptorů nebo jejich funkční části jsou zvláště výhodnými antagonisty podle vynálezu. Zkrácená forma rozpustného receptoru TNF typ I a typ II se popisuje například v patentovém dokumentu EP 914431.

Zkrácené formy receptorů TNF jsou rozpustné a je možné je detekovat v moči a v séru ve formě proteinů, které inhibují navázání TNF o molekulové hmotnosti 30 000 nebo 40 000 a které se nazývají TBPI respektive TBPII (Engelmann et al., 1990). Je výhodné simultánní, postupné nebo oddělené použití proteinu SARP-1 s antagonistou TNF a/nebo interferonu podle vynálezu.

TBPI a TBPII jsou výhodní antagonisté TNF, které je možné použít v kombinaci s proteinem SARP-1. Deriváty, fragmenty, oblasti a biologicky aktivní části molekul receptorů se funkcí podobají molekulám receptoru, které je možné použít podle vynálezu. Takový biologicky aktivní ekvivalent nebo derivát molekuly receptoru referuje o části polypeptidu nebo o sekvenci kódující molekulu receptoru, která vykazuje dostatečnou velikost a je schopna se vázat na TNF s takovou afinitou, že interakce se inhibuje nebo blokuje receptor TNF vázaný na membránu.

V dalším provedení vynálezu lidský rozpustný TNF-RI (TBPI) je antagonist TNF, který se používá podle vynálezu. Přirozené a rekombinantní molekuly rozpustných receptorů TNF a způsoby jejich produkce se popisují v dokumentech Evropského patentu EP 308 378, EP 398 327 a EP 433 900.

Zatímco může být výhodné blokovat TNF- $\alpha$  v ranném stádiu onemocnění, což je diskutovatelné v pozdějších fázích, samotné TNF může mít pozitivní účinek na onemocnění sklerodermie (popisuje se v publikaci Abraham D.J., Shiwen X., Black C. M., Sa S., Xu Y., Leask A., J. Biol. Chem. 2000 May 19, 275 (20): 15220-5). Vynález dále popisuje kombinaci proteinu SARP-1 a TNF- $\alpha$ , která se používá při léčbě nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště v pokročilých stádiích onemocnění.

V oboru jsou známy inhibitory COX. Specifické inhibitory COX-2 se například popisují v patentovém dokumentu WO 01/00229.

Vynález dále popisuje farmaceutický přípravek obsahující protein SARP-1 dohromady s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, ředidly nebo pomocnými látkami, které jsou vhodné pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy. Farmaceutický prostředek může dále obsahovat libovolný další shora v textu popsané složky a zvláště interferon, TBP nebo inhibitor COX.

Farmaceutický prostředek podle vynálezu může také obsahovat vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny podle vynálezu nebo buňku exprimující SARP-1.

Aktivní složky farmaceutických prostředků, to znamená polypeptidy, nukleové kyseliny nebo buňky podle vynálezu nebo jejich kombinace stejně jako kombinace shora popsanych látek, se mohou aplikovat jedinci různými způsoby. Způsoby aplikace zahrnují intradermální, transdermální (například v pomalu se uvolňujících přípravcích), intramuskulární, intraperitoneální, intravenózní, subkutánní, orální, epidurální, topické a intranasální způsob. Může se použít libovolný další terapeuticky účinný způsob aplikace, jako je například absorpce epiteliální nebo endoteliální tkání nebo použitím genové terapie, kdy se pacientovi zavede molekula DNA kódující aktivní činidlo (například pomocí vektoru), přičemž se in vivo exprimuje nebo vylučuje aktivní činidlo. Navíc, protein(y) podle vynálezu se mohou aplikovat spolu s jinými složkami biologicky aktivních činidel, jako jsou farmaceuticky přijatelné povrchově aktivní činidla, nosiče, ředidla a pomocné látky.

Termín „farmaceuticky přijatelný“ znamená libovolný nosič, který neinterferuje s účinností biologické aktivity aktivní složky a není toxický vůči hostiteli, kterému se aplikuje. V případě například parenterální aplikace se mohou aktivní proteiny připravit v jednotkové dávce, která je vhodná pro aplikaci injekcí ve vehiklech jako je fyziologický roztok, roztok dextrózy, sérový albumin a Ringerův roztok.

V případě parenterální (například intravenózní, subkutánní, intramuskulární) aplikace se mohou aktivní proteiny připravit jako roztok, suspenze, emulze nebo lyofilizovaný prášek ve vztahu s farmaceuticky přijatelnou parenterální pomocnou látkou (jako je například voda, fyziologický roztok, roztok dextrózy) a aditiva, která udržují izotonicitu (jako je například manitol) nebo chemickou stabilitu (jako je například konzervační činidlo a pufrý). Přípravek se sterilizuje běžně používaným způsobem.

Biologická dostupnost aktivních proteinů podle vynálezu se může také zlepšit za použití konjugačních postupů, které prodlužují poločas rozpadu molekuly v lidském těle. Takovým postupem může být například navázání molekuly na polyetylenglykol, jak se popisuje v patentové přihlášce PCT WO 92/13095.

Terapeuticky účinné množství aktivních proteinů bude funkcí řady proměnných, které zahrnují typ receptoru, afinitu látky podle vynálezu vůči jejímu receptoru, jakoukoliv její zbytkovou cytotoxickou aktivitu, způsob aplikace, klinický stav pacienta.

Termín „terapeuticky účinné množství“ je takové množství, že v případě, když se aplikuje látka podle vynálezu, dochází k aktivaci receptoru proteinu SARP-1 nebo k deaktivaci ligandu

stimulujícímu receptor in vivo. Jedinci aplikovaná dávka, ve formě jediné dávky nebo více dávek, bude kolísat v závislosti na různých faktorech, které zahrnují farmakokinetické vlastnosti proteinu SARP-1, způsob aplikace, stav pacienta a charakteristiky (pohlaví, věk, tělesnou hmotnost, zdraví, výšku), rozsah symptomů, souběžnou léčbu, frekvenci léčby a požadovaný účinek. Odborník je schopen určit a upravit rozmezí dávky.

Požadovaná dávka polypeptidu podle vynálezu bude kolísat od 0,0001 do 100 mg/kg nebo přibližně 0,01 až 10 mg/kg nebo přibližně 0,1 až 0,5 mg/kg nebo přibližně 1 až 3 mg/kg, ačkoliv, jak se popisuje shora v textu, volbě dávky se věnuje velká pozornost.

Denní dávky jsou obvykle aplikovány v rozdělených dávkách nebo ve formě nepřerušovaného uvolňování, což je účinné při získání požadovaného výsledku. Druhá nebo následná aplikace se může provést v dávce, která je stejná jako počáteční nebo předchozí dávka aplikovaná jedinci, nebo může být nižší nebo vyšší. Druhá nebo následná aplikace se může aplikovat během onemocnění nebo dříve než dojde k onemocnění.

Vynález dále popisuje způsob léčby a/nebo prevence onemocnění sklerodermie, zvláště generalizované sklerózy, které zahrnuje aplikaci pacientovi, který to potřebuje, účinné množství polypeptidu podle vynálezu. Polypeptid se může aplikovat spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem. V jiném případě se může aplikovat buňka produkující protein SARP-1 nebo se podle vynálezu může aplikovat molekula nukleové kyseliny podle vynálezu obsažená v expresivním vektoru.

Expresivní vektor se může aplikovat systémově. Expresivní vektor se může aplikovat intramuskulární injekcí. Dále



výhodným způsobem aplikace je inhalace, zvláště v případě, je-li zahrnuta mezi nemoci fibróza plic.

Vynález dále popisuje způsob přípravy farmaceutického prostředku, který obsahuje směs účinného množství proteinu SARP-1 s farmaceuticky přijatelným nosičem a způsob léčby a/nebo prevence artritidy, který zahrnuje aplikaci hostiteli, který to potřebuje, účinného množství proteinu SARP-1.

Všechny zde citované odkazy, které zahrnují články nebo abstrakty nebo nepublikované americké nebo cizí patentové přihlášky nebo publikované americké nebo cizí patenty zahrnují zde uvedená data, tabulky, obrázky a texty.

Následující popis specifických provedení vynálezu zcela ukazují obecnou podstatu vynálezu.

#### Přehled obrázků na výkrese

Na obrázku č. 1 je znázorněna exprese mRNA SARP-1 v normálních a nemocí ovlivněných fibroblastech získaných ze sedmi pacientů trpících onemocněním sklerodermie, jak se stanovilo genovou filtrační analýzou. Průměrná síla exprese pro každou třídu vzorků (normální nebo abnormální) je dána v části obrázku A) a střední hodnota se uvádí v části B).

NA obrázku č. 2 je znázorněn poměr exprese mRNA SARP-1 v poškozených/normálních fibroblastech (malý počet pasáží, méně než 5 pasáží) získaných od 8 pacientů trpících onemocněním sklerodermie stanovených pomocí PCR.

Obrázek č. 3 zobrazuje analýzu exprese mRNA SARP-1 v normálních lidských dermálních fibroblastech (NHDF) vzhledem k expresi mRNA GAPDH.

Obrázek č. 4 zobrazuje analýzi PCR exprese mRNA SARP-1 v klinickém vzorku biopsie normální kůže (n=6) ve srovnání se vzorky biopsie abnormální kůže od pacientů trpících onemocněním sklerodermie (n=2). Hodnoty jsou vztaženy k GAPDH.

Obrázky č. 5A a B na sebe navazují a zobrazují nukleotidovou sekvenci a dedukovanou aminokyselinovou sekvenci cDNA SARP-1. Předpokládaná místa štěpení v případě signálního peptidu jsou označena šípkami.

Obrázek č. 6 zobrazuje uspořádání aminokyselinových sekvencí lidského a myšího SARP-1. Zbytky obou sekvencí, které nejsou shodné jsou zvýrazněny.

Obrázek č. 7 zobrazuje sílu apoptózy v buňkách transfekovaných SARP-1 a v kontrolních buňkách transfekce ve srovnání s kontrolami. Symbol \*\*\* značí statisticky podstatné snížení.

Obrázek č. 8 zobrazuje účinek léčby SARP-1 na celkovou aktivitu MMP-1 v upraveném médiu, které se získalo z kultur lidských dermálních fibroblastů. Fibroblasty se získaly z poškozené tkáně (A, D, F) nebo ze zdravých jedinců (B, C) nebo z nepoškozených oblastí pacienta trpícího onemocněním sklerodermie (E).

Obrázek č. 9 zobrazuje účinek společné transfekce SARP-1 na aktivitu promotoru kolagene v nestimulovaných buňkách NIH3T3 a ve stejných buňkách stimulovaných TGF $\beta$ . Část A) zobrazuje luminiscenční jednotky měřené v reportním testu, část B) zobrazuje procento luminiscence s ohledem na kontrolu.

Obrázek č. 10 zobrazuje fibrózu v plicích v modelu fibrózy plic vyvolané bleomycinem. Obrázek zobrazuje skóre měřené u myši, kterým se aplikoval prostředek, buňky transfekované SARP-1, buňky falešně tranfekované nebo anti-TGF terapie. Symbol \*\*\* značí statisticky podstatné snížení.

### Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Protein SARP-1 se diferenciálně exprimuje v kožních fibroblastech získaných z pacientů trpících onemocněním sklerodermie

#### Metody

##### Vzorky pacientů

Z kůže pacientů ve věku devíti let stejného pohlaví s lézemi nebo bez lézí se odebrala biopsie o velikosti 2 mm<sup>3</sup> (obvykle z předkožky). Tito pacienti trpí kožní systemickou sklerózou (Ssc). Všichni pacienti splňují kritéria instituce „American Coollege of Rheumatology“ v případě diagnózy generalizované sklerózy.

##### Kultury fibroblastů

Fibroblasty se získaly in vitro kultivací z biopsií, jak se popisuje shora v textu ((popisuje se v publikaci Abraham D., Lúpoli 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). Biopsie se nařezaly na kousky a umístily se do sterilních plastových misek a kultivačních nádob. Po 15 minutách sušení při teplotě místnosti se kousky biopsií přichytily na plast nádob pro kultivaci tkáňových kultur a pak se kultivovaly v kultivačním médiu vhodném pro

kultivaci fibroblastů (FGM), které obsahuje Dulbekovo upravené Eagle médium (DMEM), které obsahuje 10 % fetálního telecího séra (FCS), 2 mM L-glutamin, 1 mM pyruvát sodný, 100 jednotek penicilinu v jednom mililitru roztoku, 100 µg streptomycinu v jednom mililitru roztoku, 50 µg gentamicinu v jednom mililitru roztoku a 2,5 µg amfotericinu B v jednom mililitru roztoku. Po 2 až 3 týdnech inkubace v humidifikované atmosféře obsahující ve vzduchu 5 % CO<sub>2</sub> se pomocí trypsinu fibroblasty odpojily ze stěn kultivačních nádob a znovu se kultivovaly v FGM bez přítomnosti gentamicinu a amfotericinu B. V experimentech se fibroblasty používají mezi pasážemi 2 a 5. Fenotyp fibroblastů se potvrdil na základě jejich typické morfologie v monovrstvě a v trojrozměrných kolagenových gelových kulturách.

#### Izolace RNA

Z časných pasáží konfluentních fibroblastů získaných od pacientů trpících onemocněním sklerodermie nebo z primárních kultur (pasáž 1 až 3) normálních lidských kožních (předkožka) fibroblastů (získaných od firmy Promocell) se izolovala za použití přípravku Triazol (získáno od firmy Life Technologies) podle protokolu výrobce. Konečný pelet RNA se resuspendoval ve sterilní vodě ošetřené DEPC v koncentraci 1 µg/ml a roztok RNA se uchovával při teplotě -80 °C.

#### Syntéza sond cDNA

Celková RNA v množství 2 µg se smíchala s 1,3 µl primerů specifických pro cytokin (systém R&D, kat. č. GAC11) a směs se inkubovala při teplotě 70 °C po dobu 2 minut ve zkumavkách Eppendorf o objemu 0,5 ml. Zkumavky se pak chladily na teplotu 50 °C po dobu 2 minuty a pak se ke směsi přidala směs obsahující 2 µl 5x koncentrovaného reakčního pufru (250 mM

Tris-HCl, hodnota pH je 8,3, 375 mM KCl a 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 µl 10x koncentrované směsi DNTP (5 mM dGTP, 5 mM dCTP a 5 mM dTTP), 3,5 µl α<sup>32</sup>P-dATP(3 000 Ci/mmol), od firmy Amersham kat. č. PB 10204), 0,5 µl DTT (100 mM) a 1 µl plazmidu Superscript II (od firmy Life Technologies). Reakční směs se promíchala pipetou a inkubovala se po dobu 25 minut při teplotě 50 °C. Reakce se zastavila přidáním 1 µl 0,1 M EDTA s hodnotou pH 8,0, který obsahuje 1 mg/ml kolagenu. Ze značené cDNA se pak odstranily volné deoxynukleotidy za použití kolony Chromaspin-200 DEPC-H<sub>2</sub>O (od firmy Clontech) podle instrukcí výrobce. Frakce obsahující cDNA se identifikovaly metodou podle Czerenkova. Frakce charakterizované píkem (v normálním případě 2 frakce z celkového počtu 6 shromážděných) se ošetřily 0,1 objemem 1 M NaOH, který obsahuje 1 mM EDTA po dobu 20 minut při teplotě 70 °C, přičemž dochází k hydrolýze RNA a pak se směs neutralizovala stejným objemem 1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> obsahujícím 2,5 µg DNA lidského Cot-1 (od firmy Life Technologies) po dobu 20 minut při teplotě 70 °C. Teplem ošetřená neutralizovaná sonda cDNA se pak může přidat přímo do hybridizační směsi.

#### Hybridizace s mikrosouborem genů na filtru

Mikrosoubory genů na filtru (test exprese lidských cytokinů, systémy R&D, kat. č. GA001) se předem hybridizovaly při teplotě 68°C po dobu 2 hodin v 5 ml hybridizačního roztoku (od firmy Clontech), který obsahuje 0,5 µg/ml DNA spermatu lososa(od firmy Life Technologies) v míchaných nádobách a v hybridizační peci Hybaid (MWG Biotech). Po této době se hybridizační roztok nahradil čerstvým hybridizačním roztokem, který obsahuje sondu cDNA se specifickou aktivitou 0,25 až 1x10<sup>6</sup> cpm/ml. Hybridizace probíhala po dobu 16 až 20 hodin při teplotě 68°C. Po hybridizaci se filtry 4 krát promyly 2x koncentrovaným roztokem SSC s 1% SDS při teplotě 68 °C po dobu 20 minut a dvakrát 0,1x koncentrovaným roztokem SSC s 0,5 %

SDS po dobu 15 minut. Filtry se pak zatahly do fólie Saran wrap<sup>TM</sup> a exponovaly se na uchovávající fosforovou zobrazovací membránu typu K (od firmy Biorad) po různě dlouhou dobu (od 4 hodin do 4 dní) při teplotě místnosti.

#### Zobrazovací analýza

Zobrazovací membrána se skenovala při rozlišení 50  $\mu\text{m}$  za použití zařízení pro zobrazování Biorad Personal FX phosphoimager. Výsledný digitální soubor o velikosti 16 bitů se převedl na formát TIF a zobrazení se analyzovalo za použití softwaru Arrayvision (získaného od firmy Imaging Research Inc.). U každého vzorku se stanovila intenzita 384 genů nanesených ve dvojím provedení na filtr, která se vyjádřila v jednotce pixel. Odečetl se signál pozadí a vyjádřila se průměrná intezita pro každý pár naneseného genu v pixelech (což odpovídá síle exprese).

Potvrzení výsledků získaných v mikrotestu v případě vybraných genů pomocí RT-PCR

Celková RNA získaná z každého vzorku pacienta v množství 1  $\mu\text{g}$  se podrobila reverzní transkripci za použití primeru oligodT (od firmy Promega) v objemu reakce 20  $\mu\text{l}$ , který obsahuje 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 0,1 % Triton X-100, 1 mM každého z dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0,5 jednotek rekombinantního inhibitoru ribonukleázy RNasinu (od firmy Promega) a 15 jednotek reverzní transkriptázy AMV (od firmy Promega). Reakční směs se inkubovala při teplotě 42 °C po dobu 60 minut, zahřála se na teplotu 95°C po dobu 5 minut, pak se ředila 200  $\mu\text{l}$  sterilní vody. Ředěné reverzní transkriptázové reakce se pak podrobily analýze PCR na podle Taqmana (PE Applied Biosystems 7700) za použití specifických párů primerů navržených pro každý gen za použití softwaru Primer Express

(PE Applied Biosystems) založeném na přístupovém čísle v databázi daného výrobcem genového filtru. Výsledky se přizpůsobily expresi genu glycerylaldehyd-3-fosfátové dehydrogenázy (GAPDH) v každém vzorku a vyjádřila se jako změny získané dělením hodnoty exprese získané u vzorku abnormálních pacientů hodnotou získanou u vzorku odpovídajícího normálního pacienta.

Statistická metoda pro předpovídání genů spojených s onemocněním sklerodermie

Statistická metoda po předpovídání genů spojených s onemocněním sklerodermie se provádí analýzou a způsobem odhadu, který se popisuje v publikaci Golub T.R., Slonim D.K., Tamayo P., Huard C., Gaasenbeek M., Mesirov J.P., Coller H., Loh M.L., Downing J. R., Caligiuri M.A., Bloomfield C.D., Lander E.S. (1999), Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Science 286, 531-7.

## Výsledky

Analýza použitím genového mikrosouboru na filtru se provedla u vzorků z normálních a abnormálních fibroblastů získaných ze sedmi pacientů trpících onemocněním sklerodermie. Hodnota průměrné síly exprese cDNA SARP-1 pro každý vzorek pacienta je zobrazena na obrázku č. 1 A, přičemž průměrná exprese je zobrazena na obrázku č. 1B. Průměrná a střední hodnota se podstatně liší mezi normálními a abnormálními buňkami. Normální síla exprese SARP-1 je vyšší než síla exprese u abnormálních vzorků. Střední hodnoty se většinou používají v případě vzorků pacientů, přičemž minimalizují účinek velkých rozdílů v jedné skupině. Abnormální fibroblasty

exprimují podstatně nižší množství mRNA SARP-1 ve srovnání s normálními fibroblasty u 5 testovaných pacientů ze sedmi.

Výsledky získané v mikrotestech se dále potvrdily analýzou PCR vzorků pacientů za použití primerů PCR specifických pro SARP-1. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 2 a exprimují se jako změny v síle exprese (hodnota získaná pro abnormální fibroblasty děleno hodnotou získanou pro normální fibroblasty). V případě 6 z 8 testovaných pacientů se exprese SARP-1 snížila alespoň dvakrát u fibroblastů postižených onemocněním ve srovnání s normálními fibroblasty získanými ze stejného pacienta. V případě dvou zbývajících pacientů je síla exprese u normálních a abnormálních fibroblastů srovnatelná.

Rozdíly v expresi pozorované mezi normálními a abnormálními fibroblasty, které pocházejí ze stejného pacienta nejsou způsobeny rozdílem podmínek kultivace mezi dvěmi populacemi, protože exprese mRNA SARP-1 v primárních kulturách normálních lidských kožních fibroblastů se pasážováním buněk podstatně nemění (zobrazeno na obrázku č. 3). Navíc analýza RT-PCR celkové RNA izolované z celé biopsie abnormální kůže získané z pacientů trpících onemocněním sklerodermie stanovila nižší množství mRNA SARP-1 ve srovnání s klinicky normálními biopsiemi, které pocházejí ze stejného místa pacienta stejného věku a pohlaví (zobrazeno na obrázku č. 4).

Vedle toho snížení exprese SARP-1 je z 95 % spojena s postupem onemocnění sklerodermie, což se prokázalo použitím statistických metod.

## Závěr

Výsledky popsané shora v textu zobrazují, že v nemocné tkáni získané z pacientů trpících onemocněním sklerodermie



existuje nedostatek proteinu SARP-1 ve srovnání se zdravou tkání, což ukazuje, že dosažení normálního množství SARP-1 může být nápomocné léčbě onemocnění. Tak protein SARP-1 může být součástí nové léčby za účelem dosažení částečné nebo úplné inhibice onemocnění nebo odstranění alespoň jednoho nebo více symptomů onemocnění sklerodermie nebo v případě inhibice postupu onemocnění.

Příklad 2: Klonování celé sekvence kódující cDNA lidského proteinu SARP-1

#### Materiály a metody

Postupné vyhledávání programem BLAST se provedlo v případě lidské dbEST (veřejná databáze EST), která začíná s částečnou kódující sekvencí SARP-1 (přístupové číslo EMBL: AF017986) a relevantní EST se vybraly za použití ENTREZ na adrese <http://www.ncbi.nlm.gov/Web/Search/index.html>. Následující EST se pak sestavily spolu se sekvencí AF017986 za vzniku konvenční celé kódující sekvence proteinu SARP-1: AW580647, AW608301, AA976403 a W92531.

Celá délka cDNA sekvence kódující SARP-1 se pak klonovala pomocí PCR s reverzní transkriptázou za použití následujících primerů založených na konvenční sekvenci získané shora v textu SARP-1F 5' GCC AAG CTT CCC ACG ATG CTG CAG GGC CCT (sekvence označená SEQ ID NO: 3) a SARP-1R 5' GCG CTC GAG CTA GCA CTG CAG CTT GCG GAT (sekvence označená SEQ ID NO: 4). V reakční směsi obsahující 0,3 mM dNTP, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 5 µl templátové cDNA získané z normálních lidských kožních fibroblastů (předkožka) (cDNA se připravila způsobem popsáným shora v textu), 5 µl 10x koncentrovaného amplifikačního pufru Pfx (od firmy Life Technologies) a 1 µl DNA polymerázy Platinum Pfx (získané od firmy Life Technologies) se každý primer vyskytoval

v koncentraci 50 pmol. Reakční směs se pak zahřála na teplotu 94 °C po dobu 2 minut, pak proběhlo 35 cyklů PCR za podmínek: teplota 94°C po dobu 15 sekund, teplota 55°C po dobu 30 sekund a teplota 68°C po dobu 1 minuty. Amplifikační produkty se analyzovaly na 1% agarózovém gelu v 1x koncentrovaném pufru TAE (získáno od firmy Life Technologies) a produkty PCR migrující na základě předpokládané molekulové hmotnosti (906 bp) se izolovaly z gelu za použití PCR čistící sady Wizard (od firmy Promega).

DNA izolovaná z gelu v množství 100 ng se štěpila restrikními enzymy HindIII a XhoI (od firmy Pharmacia) za podmínek popsaných výrobcem. Po štěpení se směs přečistila způsobem popsaným shora v textu a ligovala se do plazmidu pcDNA3.1(+) (od firmy Invitrogen) štěpeného restrikními enzymy HindIII/XhoI za použití DNA ligáza T4 (New England Biolabs) způsoby standardní molekulové biologie. Produkty ligace se transformovaly do kmene mikroorganismu E. coli TOP 10 F' (od firmy Invitrogen) elektroporací za použití genového pulzaru od firmy Biorad. Plazmidová DNA se izolovala z 5 ml kultury získané z výsledných kolonií a provedla se automatizovaná sekvenční analýza pomocí sekvenátoru Applied Biosystems 3700 za použití T7 a primerů pcDNA3.1AS (Invitrogen), aby se potvrdila přítomnost sekvence SARP-1.

## Výsledky

Za účelem charakterizovat aktivitu proteinu SARP-1 in vitro a in vivo, se klonovala celá sekvence kódující cDNA. Částečná sekvence cDNA lidského proteinu SARP-1 (EMBL přístupové číslo: AF017986) se použila k identifikaci překryvů EST ve veřejné databázi dbEST za použití programu BLAST. Celá sekvence kódující cDNA se sestavila z následující sekvence s přístupovým číslem AF017986 AW580647, AW608301, AA976403, a

W92531. Sekvence DNA plné délky a dedukovaná aminokyselinová sekvence proteinu SARP-1 je zobrazena na obrázku č. 5A a B (A a B by se měly číst bez přerušení). Sekvence kódující cDNA proteinu SARP-1 se klonovala pomocí PCR s reverzní transkriptázou za použití primerů, které lemují předpokládaný počáteční kodon a stop kodon. Analýza sekvence výsledných klonů cDNA proteinu SARP-1 vykazuje identitu 93 % na úrovni nukleotidu s publikovanou sekvencí myšího proteinu SARP-1 (popisuje se v publikaci Melkonyan H.S., Chang W.C., Shapiro J.P., Mahadevappa M., Fitzpatrick P.A., Kiefer M.C., Tomei L.D. and Umansky S.R. (1997) SARP: family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13696-13641) a 95 % se stejnou myší sekvencí, ale na úrovni aminokyseliny. Porovnání lidské a myší aminokyselinové sekvence je zobrazeno na obrázku č. 6. Předpokládána proteinová sekvence obsahuje 295 aminokyselin, přičemž předpokládaný signální peptid tvoří 20 nebo 24 aminokyselin. Odhad se provedl za použití programů SIGNALASE (popisuje se v publikaci Von Heijne G. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690) nebo SIGNALP (značeno šipkami na obrázku č. 5A). Rozdílné aminokyseliny mezi lidskou a myší sekvencí jsou na obrázku č. 6 zvýrazněny a nacházejí se v N-terminálním signálním peptidu (4 aminokyseliny) a v sekvenci zralého proteinu (2 aminokyseliny).

Sekvence označená SEQ ID NO: 1 zobrazená v seznamu sekvencí obsahuje kódující řetězec cDNA lidského SARP-1 a sekvence označená SARP-1 obsahuje aminokyselinovou sekvenci lidského proteinu SARP-1. Myší aminokyselinová sekvence je zobrazena v sekvenci označené SEQ ID NO: 5 v seznamu sekvencí.

Příklad 3: N-terminální sekvence lidského proteinu SARP-1

Předpokládaný signální peptid SARP-1 obsahuje 20 nebo 24 aminokyselin (zobrazeno na obrázku č. 5). Za účelem ověřit správný N-konec zralého proteinu SARP-1 se rekombinantní protein SARP-1 obsahující konec tvořený 6 histidinovými zbytky exprimoval v buňkách HEK-293 a čistil se na koloně s chelátem niklu. Čištěný protein migruje jako pruh o molekulové hmotnosti 32 000 v SDS-PAGE, což odpovídá molekulové hmotnosti měřené MS, která je 34 313.

N-terminální sekvence čištěného rekombinantního proteinu se získaly za použití pulzního proteinového sekvenátoru ve vodní fázi Applied Biosystems model 494 a on-line fenylthiohydantionového analyzátoru aminokyselin model 148 C (popisuje se v publikaci Maundruell et al., 1997). Čištěný protein SARP-1 se štěpil inkubací přes noc při teplotě 37 °C v 90 µl 100 mM Tris-HCl s hodnotou pH 8,5, přičemž reakční směs obsahuje 1M močovinu, 20 mM metylamin, 1 mM dithiotreitol a 5 µg trypsinu (od firmy Boehringer Mannheim, stupeň čistoty vhodný pro sekvenování). Peptidy se oddělily HPLC s reverzní fází (Hewlett Packard HP1090) na koloně Brownlee C18 (rozměry kolony jsou 220 x 2,1 mm). Peptidy se eluovaly pomocí acetonitrilového gradientu (v 0,1 % kyselině trifluorooctové), který se pohybuje v koncentraci od 0 do 55 %, po dobu 60 minut. Pak následuje vymývání 55 až 70 % gradientem po dobu 5 minut. Shromáždily se eluční frakce a a sekvenovaly se fosfopeptidy značené radioaktivním <sup>33</sup>P identifikované pomocí scintilační spektrometrie metodou Edmanovi degradace za použití pulzního proteinového sekvenátoru ve vodní fázi Applied Biosystems model 494 a on-line fenylthiohydantionového analyzátoru aminokyselin model 148 C.

Sekvence GLFLFGQPDFSYK se získaly tandemovou hmotnostní spektrometrií redukováného a alkylovaného proteinu štěpeného trypsinem. Analýzy se provedly hmotnostním spektrometrem Q-TOF

(Micromass UK Limited, Manchester, UK) vybaveném nanosprejovým zdrojem železa, jak se popisuje v publikaci Cavalli V, Vilbois F, Corti M, Marcote MJ, Tamura K, Karin M, Arkinstall S, Gruenberg J. *Mol Cell* 2001 Feb;7(2):421-32. Jeden mikrogram čištěného proteinu se rozdělil pomocí 10 % SDS-PAGE. Pruhy proteinu se vyřizly z gelu barveného stříbrem a štěpily se v gelu trypsinem (popisuje se v publikaci Shevchenko A., Wilm M., Vorm O. and Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68:850-858). Směs extrahovaného peptidu se analyzovala tandemovým hmotnostním spektrometrickým sekvenováním (popisuje se v publikaci 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) za použití hmotnostního spektrometru Q-TOF (od firmy Micromass, Manchester, UK) vybaveného nanoelektrosprejovým zdrojem železa.

## Výsledky

Teoretická N-terminální sekvence nezralého proteinu SARP-1 je následující

|                                                             |    |    |    |    |     |
|-------------------------------------------------------------|----|----|----|----|-----|
| 1                                                           | 10 | 20 | 30 | 40 | ... |
| MLQGPGSLLL LFLASHCCLG SARGLFLEFGQ PDFSYKRSNC KPIPANLQLC ... |    |    |    |    |     |

Poloha druhého předpokládaného místa signálního štěpení je mezi zbytky 24 a 25 (G a L).

V provedeném sekvenačním experimentu se zjistila podstatná heterogenita N-konce proteinu SARP-1.

V jednom experimentu se zjistily dvě hlavní sekvence, přičemž jedna začíná FGQPD, to znamená že začíná

aminokyselinou 28 sekvence SEQ ID NO: 2, a druhá začíná LFGQPD, to znamená, že začíná aminokyselinou 27 sekvence SEQ ID NO: 2.

Avšak vedle odlišných izolovaných 4 sekvencí se zjistily sekvence

|            |                            |
|------------|----------------------------|
| LFLFGQPDFS | (začíná aminokyselinou 25) |
| FLFGQPDFS  | (začíná aminokyselinou 26) |
| LFGQPD     | (začíná aminokyselinou 27) |
| FGQPD      | (začíná aminokyselinou 28) |

Existuje také jiná sekvence začínající aminokyselinou 37: RSNCKPIPAN. Tato sekvence vznikla štěpením po lyzinovém zbytku (štěpení podobné štěpení trypsinem).

Jiný experiment odhalil sekvenci začínající v poloze 24: GLFLFGQPDFSYSK.

Zdá se, že N-konec sekvence je velmi heterogenní, což může být způsobeno endopeptidázovou nebo proteázovou aktivitou, kterou vykazuje protein SARP-1. Zralý protein SARP-1 se může vyskytovat v několika různých variantách s odlišným N-koncem.

Příklad 4: Transfekce proteinu SARP-1 vyvolává apoptózu in vitro

## Metody

Fibroblastové buněčné linie (myší buňky NIH3T3 a lidské buňky AG1518) a primární fibroblastové kultury (pasáž 1 až 5 normálních lidských dermálních fibroblastů) (firma Promocell) se transfekovala plazmidem pcDNA3.1, který obsahuje sekvenci

kódující cDNA proteinu SARP-1, nebo samotným plazmidem (samotný vektor se transfekoval jako kontrola) za použití transfekčních činidel Geneporter 2 (od firmy Gene Therapy Sstems, San Diego) nebo Eugene 6 (od firmy Life Technologies) podle protokolu výrobce. Apoptóza se měřila 24 hodin po transfekci za použití kitu pro provedení testu apoptózy s 96 prohlubněmi TiterTasc od firmy R&D systems a buňky se počítaly za použití barviva CyQuant (molekulové sondy) podle instrukcí výrobce.

## Výsledky

Za účelem odhadnout účinek proteinu SARP-1 na fibroblasty se buněčná linie fibroblastů transfekovala cDNA SARP-1 a odhadl se rozsah apoptózy. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 7. Apoptóza v buňkách transfekovaných SARP-1 se podstatně redukovala ( $P=0,0009$ ) ve srovnání s negativní kontrolou (transfekce samotným plazmidem pcDNA3.1), což naznačuje, že lidský protein SARP-1 vykazuje aktivitu podobnou aktivitě, kterou vykazuje její myší homolog. U buněk, které nebyly tranfekovány, se stanovila základní síla apoptózy. Buňky NIH3T3 ošetřené nukleázou sloužily jako pozitivní kontrola. Odstavec označený „neznačený“ zobrazuje barvení pozadí a ošetření nukleázou, označeno „ošetřeno nukleázou“ slouží jako pozitivní kontrola.

### Příklad 5: Účinek proteinu SARP-1 na produkci TGFβ1

TGFβ1 je profybotický cytokin, který je při onemocnění sklerodermie pozitivně regulován a je spojován s patogenezí onemocnění sklerodermie (popisuje se v publikaci Kawakami T., Ihn H., Xu W., Smith E., LeRoy C. and Trojanowska M (1998) Increased expression of TGF beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta

signalling to scleroderma phenotype. J. Invest. Dermatol. 10, 47-51). Za účelem zjištění, zda protein SARP-1 negativně reguluje nebo inhibuje produkci TGF $\beta$ 1 nebo jeho vylučování fibroblasty, je možné do kultury fibroblastů zavést protein SARP-1 ve formě čištěného proteinu. V jiném případě cDNA proteinu SARP-1 obsahující expresivní vektor se může transfekovat do buněk za vzniku dostatečného množství proteinu SARP-1 v buněčné kultuře. Jiná možnost je přidat kultivační médium z buněk exprimujících protein SARP-1, které se zahustí, aby se dosáhlo dostatečného množství proteinu SARP-1. V tomto experimentu je možné použít fibroblastové buněčné linie nebo primární fibroblasty získané ze zdravých nebo nemocných jedinců nebo z normálních nebo z nemocí postižených částí kůže pacienta trpícího onemocněním sklerodermie.

Množství TGF $\beta$ 1 se může stanovit testem ELISA v upraveném médiu získaném z kultivovaných buněk za použití systému ELISA Quantikine pro TGF $\beta$ 1 od firmy R&D systems (kat. č. DB100).

Příklad 6: Účinek aplikace proteinu SARP-1 na aktivitu MMP-1 u lidských fibroblastů in vitro

#### Metody

cDNA lidského proteinu SARP-1 obsahující na 3'-konci kódující sekvenci pro značku obsahující 6x zbytek His se subklonovala do bakulovirového transferového vektoru pDEST Fastbac. Protein SARP-1 obsahující na C-konci značku tvořenou 6-ti zbytky His se produkoval v hmyzích buňkách Sf5 s rekombinantním bakulovirem a čistil se afinitní chromatografií Ni-NTA.

Lidské fibroblasty pocházející z kůže, která obsahuje nebo neobsahuje léze, pacientů trpících onemocněním sklerodermie



nebo z normálních subjektů s nízkým počtem pasáží (2 až 5) se ošetřovala rekombinantním proteinem SARP-1 v koncentraci 0, 100 nebo 1 000 ng/ml po dobu 24 hodin. Shromáždilo se upravené kultivační médium a buněčný odpad se odstranil centrifugací při 1 200 otáčkách za minutu po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Aktivita MMP-1 se měřila v neředěném kultivačním médiu za použití MMP-1 fluorokinového kitu (získaného od firmy R&D systems) podle protokolu výrobce. Ve stejných vzorcích se také měřila aktivita MMP-9.

### Výsledky

MMP-1 je odpovědný za degradaci kolagenu typu I, což indikuje, že snížení aktivity MMP-1 se podílí na jednom z defektů při onemocnění sklerodermie, který zahrnuje nadměrné ukládání kolagenu.

Kožní fibroblasty získané z pacientů trpících onemocněním sklerodermie zesílily expresi MMP-1 na úrovni množství mRNA i proteinu na rozdíl od normálních kožních fibroblastů a fibroblastů z kůže bez lézí izolovaných ze stejného pacienta. Ačkoliv celkové množství aktivního MMP-1 u pacientů podstatně kolísá, fibroblasty ošetřené proteinem SARP-1 vykazují vyšší aktivitu MMP-1 ve srovnání s fibroblasty, které se neošetřily proteinem SARP-1, což se týká abnormálních fibroblastů získaných z pacientů trpících onemocněním sklerodermie (zobrazeno na obrázku č. 8A, D, F) stejně jako fibroblastů získaných ze zdravé kůže pacientů trpících onemocněním sklerodermie (zobrazeno na obrázku č. 8E) a fibroblastů získaných od klinicky normálních kontrolních jedinců (zobrazeno na obrázku č. 8B a C). Výsledky jsou průměry třech stanovení. Na rozdíl od MMP-1 v případě aktivity MMP-9 se nepozoroval žádný účinek proteinu SARP-1 (data nejsou zobrazena).

## Příklad 7: Transfekce cDNA SARP-1 snižuje aktivitu promotoru kolagenu typ 1 $\alpha$ 2 ve fibroblastech NIH3T3

### Materiály a metody

Buňky NIH3T3 udržované v kultivačním médiu DMEM obsahující 2 mM glutamin, 100 jednotek/ml směsi penicilin-streptomycin a 10 % FCS se nanosly na destičky obsahující 96 prohlubní s průhledným dnem a s bílými postraními stěnami, které vyhovují podmínkám kultivace tkáňových kultur (Wallac), tak, aby se dosáhlo 50 % konfluentnosti. Příští den se buňky společně transfekovaly vektorem pcDNA3.1 SARP-1 a pGL3 (od firmy Promega), který obsahuje kolagenový promotor o velikosti 3,5 kb a luciferázový reportní gen (který se získal od Dr. Davida Abrahama, Royal Free Hospital), za použití transfekčního činidla Genepor<sup>®</sup> podle instrukcí výrobce. 30 hodin po transfekci se přidal TGF $\beta$  (získaný od R&D systems, v koncentraci 5 ng/ml). O 24 až 36 hodin později se měřila přímo v každé prohlubni za použití testu Bright-Glo získaného od firmy Promega luciferázová aktivita.

### Výsledky

Za účelem zhodnocení, zda existuje vztah mezi nadměrnou expresí proteinu SARP-1 a syntézou kolagenu, se testoval účinek transfekce cDNA proteinu SARP-1 na aktivitu promotoru kolagenu ve fibroblastech NIH3T3 transfekovaných reportní konstrukcí luciferázy a promotorem Coll $\alpha$ 2.

Společná transfekce cDNA proteinu SARP-1 s reportním plazmidem a promotorem kolagenu ukázala, že protein SARP-1 je schopen potlačit základní aktivitu promotoru kolagenu, ale také zvýšenou aktivitu promotoru kolagenu vyvolanou TGF $\beta$

(zobrazeno na obrázku č. 9). Tyto výsledky naznačují, že genový produkt SARP-1 se může podílet na regulaci aktivity promotoru kolagenu in vitro buď přímo nebo nepřímo prostřednictvím signálních jevů zprostředkovaných proteinem SARP-1.

Další způsob testování účinku SARP-1 na ukládání kolagenu a/nebo jeho syntézy a/nebo vylučování ve fibroblastech je přidání čištěného proteinu SARP-1 do fibroblastových kultur. V jiném případě se mohou expresivní vektory obsahující cDNA SARP-1 transfekovat do fibroblastů za účelem dosažení dostatečně vysoké koncentrace proteinu SARP-1 v buněčné kultuře.

Jinou možností je přidat do kultury fibroblastů kultivační médium získané z kultivace buněk exprimujících protein SARP-1, které se zahustí, aby se získala dostatečně vysoká koncentrace proteinu SARP-1. V tomto experimentu je možné použít fibroblastové buněčné linie nebo primární fibroblasty získané ze zdravých nebo nemocných jedinců nebo z normální nebo nemocí zasažené části kůže pacienta trpícího onemocněním sklerodermie.

Syntéza kolagenu se měří in vitro v kultivovaných lidských fibroblastech za použití záchytového systému ELISA (protilátky se získaly od firmy Southern Biotechnology Associates Inc.), jak se popisuje v publikaci 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.

Příklad 8: Lidské kožní fibroblasty nadměrně exprimující protein SARP-1 nebo ošetřené rekombinantním lidským

proteinem SARP-1 vykazují změněnou expresi mRNA genů spojovaných s patologií onemocnění sklerodermie

## Materiály a metody

Normální lidské kožní (z předkožky) fibroblasty se udržovaly v médiu vhodném pro kultivaci fibroblastů (od firmy Promocell). Fibroblasty se ošetřily rekombinantním lidským proteinem SARP-1 v koncentraci 100 ng/ml po dobu 4 nebo 24 hodin v přítomnosti nebo absenci lidského TGFβ1. Buňky se shromáždily po aplikaci proteinu SARP-1 a izolovala se celková RNA za použití činidla Trizol™ (od firmy Life Technologies) podle instrukcí výrobce. Sonda cDNA značená <sup>32</sup>P-dATP se připravila z RNA, jak se popisuje shora v textu a hybridizovala se s DNA lidských cytokinů obsaženou v mikrosouboru genů na filtrech firmy R&D systems, jak se popisuje shora v textu.

## Výsledky

Ačkoliv protein SARP-1 se na začátku popisoval jako protein spojený s apoptózou, jeho přesná funkce není známa. Za účelem získat informace o úloze proteinu SARP-1 při onemocnění sklerodermie, se měřil účinek ošetření lidských kožních fibroblastů, které se předem ošetřily TGFβ a které napodobují sklerodermový fenotyp, na expresi genů fibroblastů.

Tabulka č. IV zobrazuje mRNA ovlivněnou ošetřením fibroblastů rekombinantním proteinem SARP-1 po předchozí stimulaci po dobu 4 hodin s TGFα, které se použily k napodobení sklerodermového fenotypu. Buňky se ošetřovaly proteinem SARP-1 po dobu 24 hodin. Za těchto podmínek TGFα a FGF 5 byly regulovány negativně. Pozorovala se zvýšená exprese endoglinu, což je protein vázající se na TGFβ1, a zvýšená

exprese furinu, což je proteáza spojená s aktivací matricových metaloproteáz. Jiná mRNA, u které se pozorovala negativní regulace, byla TARC. Tento chemokin je spojován s přesunem T buněk, které se vyskytují v kůži, do zánětlivých míst. Je proto možné, že aplikace proteinu SARP-1 může mít protizánětlivé účinky. Pozorovala se také pozitivní regulace podjednotky mRNA TNFR1. Signifikance tohoto pozorování není jasná, protože ve vědecké literatuře se objevuje rozpor, zda TNF má patogenní nebo ochranný účinek při onemocnění sklerodermie.

V jednom odděleném experimentu (data nejsou uvedena) se zkoumala regulace genů ve fibroblastech izolovaných z pacientů trpících onemocněním sklerodermie v porovnání se zdravými kontrolními fibroblasty. Zjistilo se, že regulované geny uvedené v tabulce č. IV jsou regulované ve vzorcích zasažených onemocněním sklerodermie. Tyto geny, které jsou pozitivně regulovány v případě fibroblastů zasažených onemocněním sklerodermie, jsou negativně regulovány po expresi proteinu SARP-1 ve shora uvedeném modelu a ty geny, které jsou negativně regulované, byly ve shora popsaném modelu pozitivně regulovány po expresi proteinu SARP-1, což ukazuje, že protein SARP-1 může mít pozitivní účinek na léčbu onemocnění sklerodermie.

Tabulka č. IV

| poměr* | ošetřeno TGFβ | ošetřeno TGFβ a<br>SARP-1 | gen      |
|--------|---------------|---------------------------|----------|
| -1,6   | 1 346         | 830                       | FGF-5    |
| -2,7   | 788           | 297                       | andoglin |
| 3,3    | 157           | 515                       | TNFR1    |
| 3,3    | 128           | 428                       | furin    |
| -4,6   | 275           | 60                        | TGFα     |

|      |     |    |      |
|------|-----|----|------|
| -4,7 | 164 | 34 | TARC |
|------|-----|----|------|

\*poměr SARP-1/slepé stanovení reprezentuje poměr ošetřeno TGF $\alpha$ +SARP-1/samotným TGF $\alpha$ .

Zobrazené výsledky jsou založeny na dvou nezávislých experimentech.

Příklad 9: Odhad účinků SARP-1 in vivo v myším modelu onemocnění

Poškození plic vyvolané bleomycinem je přijatelný model onemocnění sklerodermie. Onemocnění je vyvolané intratracheální aplikací bleomycinu (popisuje se v publikaci 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). U takto ošetřených myší se vyvine na plicích zánětlivá odezva (maximálně do 7 dní). Pak následuje fibróza, jejíž vrchol nastává okolo 14 dní po vyvolání. Tento model se použil pro odhad účinku aplikace proteinu SARP-1 in vivo na vývoj fibrózy plic. Za účelem produkce proteinu SARP-1 in vivo se použil systém zavádění buněk (jsou to buňky NIH3T3 transfekované cDNA SARP-1 celé délky).

Metody

Léčba zvířat

Fibróza plic se vyvolala u myší (tělesná hmotnost 20 až 25 g) intratracheální aplikací bleomycinu (0,075 IU) ve fyziologickém roztoku v den 1. Myši se rozdělily do čtyř oddělených skupin, kdy každá zahrnuje 10 jedinců. Jedné skupině se aplikovalo i.p. injekcí  $10^6$  buněk NIH3T3 transfekovaných SARP-1/cDNA3.1. Druhé skupině se aplikovalo  $10^6$  buněk NIH3T3 transfekovaných pouze vektorem pcDNA3.1. Třetí

skupině se aplikovalo 250 µg protilátek proti TGFβ (Anti Pan TGFβ, od firmy Sigma, kat.č. T9429) a myším v poslední skupině se aplikoval fyziologický roztok. Všechny myši se usmrtily v den 14 a plíce se uložily do formalinu a zalily se parafinem za účelem histologického zkoumání. Sekce plic se barvily trichromem nebo pikro-siriusovou červení v případě zviditelnění kolagenu (popisuje se v publikaci Bancroft J.D. and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques. Churchill Livingstone, England) a hodnotil se rozsah fibrózy plic.

#### Transfekce buněk NIH3T3

Buňky NIH3T3 se tranfekovaly SARP-1/pcDNA3:1 nebo pcDNA3.1 za použití činidla Geneporter 2, jak se popisuje dříve v textu. 24 hodin po transfekci se odstranilo kultivační médium a buňky se ošetřily fyziologickým roztokem pufrovaným fosforečnanem (PBS), který obsahuje 1 mM EDTA po dobu 5 minut při teplotě 37 °C. Buňky se jemně uvolnily od stěny škrabkou (od firmy Costar), centrifugovaly se po dobu 5 minut při teplotě 4 °C a znovu se resuspendovaly ve fyziologickém roztoku odpovídajícím čistotě injekčního použití v koncentraci 10<sup>7</sup> buněk v jednom mililitru.

#### Výsledky

##### Protein SARP-1 chrání proti fibróze plic vyvolané bleomycinem

U zvířat, kterým se aplikoval samotný bleomycin nebo slepě transfekované buňky NIH3T3, se vyvinula podstatná fibróza plic (není publikováno). Uvažuje se, že TGFβ1 je jedno z klíčových činidel, které jsou odpovědné za patologické změny vedoucí k fibróze. Už dříve se ukázalo, že polyklonální protilátky proti TGFβ1 chrání proti vývoji fibrózy plic, když se aplikují

jako profylakce (popisuje se v publikaci Yamamoto T.S., Takagawa L., Katayama I. and Nishioka K. (1999) Anti-sclerotic effect of transforming growth factor- $\beta$  antibody in a mouse model of bleomycin induced scleroderma. Clin Immunol. 92, 6) a také redukuje fibrózu kůže v modelu GVHD onemocnění sklerodermie (popisuje se v publikaci McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC J. Immunol. 163(10) 5693 (1999)). Z toho důvodu se uvedené protilátky v popsáných experimentech použily jako pozitivní kontrola. U myší, které se ošetřily proti TGF $\beta$  se nevyvinula rozsáhlá fibróza plic. Avšak u myší, kterým se aplikovaly buňky transfekované SARP-1, se znatelně snížil počet fibrotických lézí na plicích ve srovnání s myši ošetřenými samotným bleomycinem nebo slepě transfekovanými buňkami. Účinek byl srovnatelný nebo dokonce lepší s účinkem dosaženým při léčbě proti TGF $\beta$  (data nejsou zobrazeny).

Histologická analýza plic ukazuje, že zvířata, kterým se aplikoval protein SARP-1 vykazují skoro normální morfologii plic s trochou zánětlivého infiltrátu a většinou s normální alveolární architekturou. Tato morfologie se podobá morfologii zvířat ošetřených proti TGF $\beta$  a je v ostrém kontrastu s normální morfologií, kterou je možné vidět u na plicích zvířat ošetřených slepě transfekovanými buňkami nebo u zvířat, která nejsou dále léčena. V těchto dvou skupinách se alveolární prostor naplnil buněčným infiltrátem a ukládá se kolagen (není zobrazeno).

Množství fibrotických lézí na plicích v různých experimentálních skupinách je znázorněno na obrázku č. 10. Myši ošetřené proteinem SARP-1 vykazují podstatně nižší počet lézí ve srovnání s myši ošetřenými fyziologickým roztokem nebo protilátkami proti TGF $\beta$ .



Aplikace bleomycinu může vést ke zvýšené úmrtnosti. Vedle ochranných účinků proteinu SARP-1 vůči fibróze plic je nutné také zmínit, že léčbu přežil větší počet myší (8 z 10 myší) ve srovnání s myšmi, kterým se aplikoval fyziologický roztok (6 z 10 myší), a s myšmi, kterým se aplikovala léčba proti TGF $\beta$  (4 myši z 10) a s myšmi ošetřenými slepě transfekovanými buňkami (3 myši z 10). Proto léčba proteinem SARP-1 dokonce chrání před smrtí, což naznačuje, že léčba proteinem SARP-1 je jasně vhodnější ve srovnání s anti-TGF $\beta$  léčbou při uvedeném uspořádání testu.

V tomto in vivo modelu onemocnění sklerodermie se demonstrovaly výhodné účinky proteinu SARP-1.

Za účelem testování účinku proteinu SARP-1 se mohou použít další modely in vivo, jako je myší model sklerodermatozní štěp versus onemocnění hostitele (Scl GVHD). Tento model vykazuje důležité rysy onemocnění sklerodermie, které zahrnují zbytnění kůže, fibrózu plic a pozitivní regulaci mRNA kožního kolagenu, kterému předchází infiltrace monocytů, a pozitivní regulaci mRNA kožního TGF $\beta$ 1. Model se popisuje v publikaci McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC J. Immunol. 163(10) 5693 (1999)).

Příklad 10: Systémové zavádění SARP-1 intramuskulární injekcí DNA expresivního plazmidu

Za účelem demonstrovat ochranou úlohu SARP-1 při onemocnění sklerodermie, se myši transfekovaly in vivo plazmidem, který kóduje cDNA myšího SARP-1, a porovnávají se s myšmi transfekovanými samotným plazmidem, přičemž slouží jako kontroly.

Plazmidy se zavedly injekcí do obou holeních kraniálních svalů myši, kterým se aplikovala anestezie (popisuje se v publikaci Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. Circulation 1997;95:1760-3 a Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Dellere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96:4262-7). Transkutánní elektrické impulzy (8 elektrických pulzů o intenzitě 200 V/cm, doba trvání 20 milisekund při frekvenci 2 Hz) se zavedly pomocí elektropulzátoru PS-15 za použití dvou ocelových destičkových elektrod umístěných 4,2 až 5,3 mm od každého místa končetiny.

Pak u zvířat transfekovaných SARP-1 a slepě transfekovaných zvířat vzniká fibróza plic vyvolaná bleomycinem, jak se popisuje dříve v textu, a vyvíjí se také onemocnění sklerodermie.

## Seznam sekvencí

## (2) Informace o SEQ ID NO: 1:

## (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 912 párů bází

(B) TYP: nukleová kyselina

(C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová

(D) TOPOLOGIE: lineární

## (ii) DRUH MOLEKULY: DNA

## (vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

## (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 1:

gccaaagcttc ccacgatgct gcagggccct ggctcgctgc tgctgctctt cctcgctcgc  
60

cactgctgcc tgggctcggc gcgcgggctc ttcctctttg gccagcccca cttctcctac  
120

aagcgcagca attgcaagcc catcccgccc aacctgcagc tgtgccacgg catcgaatac  
180

cagaacatgc ggctgcccac cctgctgggc cacgagacca tgaaggaggt gctggagcag  
240

gccggcgctt ggatcccgct ggtcatgaag cagtgccacc cggacaccaa gaagttcctg  
300

tgctcgctct tcgccccgt ctgcctcgat gacctagacg agaccatcca gccatgccac  
360

tcgctctgcg tgcaggtgaa ggaccgctgc gcccgggtca tgtccgcctt cggcttcccc  
420

tggcccgaca tgcttgagtg cgaccgtttc cccaggaca acgaccttg catccccctc  
480

gctagcagcg accacctct gccagccacc gaggaagctc caaaggatat tgaagcctgc  
540

aaaaataaaa atgatgatga caacgacata atggaaacgc tttgtaaaaa tgattttgca  
600

ctgaaaataa aagtgaagga gataacctac atcaaccgag ataccaaat catcctggag  
660

accaagagca agaccattta caagctgaac ggtgtgtccg aaagggacct gaagaaatcg  
720  
gtgctgtggc tcaaagacag cttgcagtgc acctgtgagg agatgaacga catcaacgag  
780  
ccctatctgg tcatgggaca gaaacagggg. ggggagctgg tgatcacctc ggtgaagcgg  
840  
tggcagaagg ggcagagaga gttcaagcgc atctcccgca gcatccgcaa gctgcagtgc  
900  
tagctcgagc gc  
912

(2) Informace o SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

(A) DÉLKA: 295 aminokyselinových zbytků

(B) TYP: aminokyselinová

(C) DRUH ŘETĚZCE:

(D) TOPOLOGIE:

(ii) DRUH MOLEKULY: protein

(vi) PUVODNÍ ZDROJ:

(A) ORGANIZMUS: Homo sapiens

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 2:

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His  
1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp  
20 25 30

Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln  
35 40 45

Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu  
50 55 60

Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile  
65 70 75 80

Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys  
85 90 95

Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln  
100 105 110

Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val  
 115 120 125

Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg  
 130 135 140

Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His  
 145 150 155 160

Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys  
 165 170 175

Asn Lys Asn Asp Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn  
 180 185 190

Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg  
 195 200 205

Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu  
 210 215 220

Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys  
 225 230 235 240

Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro  
 245 250 255

Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser  
 260 265 270

Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg  
 275 280 285

Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys  
 290 295

## (2) Informace o SEQ ID NO: 3:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 30 párů bazí
  - (B) TYP: nukleová kyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (vi) PUVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 3:

gccaaagcttc ccacgatgct gcagggccct  
30

## (2) Informace o SEQ ID NO: 4:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 30 párů bazí
  - (B) TYP: nukleová kyselina
  - (C) DRUH ŘETĚZCE: jednořetězcová
  - (D) TOPOLOGIE: lineární
- (ii) DRUH MOLEKULY: DNA
- (vi) PUVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: Homo sapiens
- (xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 4:

gcgctcgagc tagcactgca gcttgcggat  
30

## (2) Informace o SEQ ID NO: 5:

- (i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:
  - (A) DÉLKA: 295 aminokyselinových zbytků
  - (B) TYP: aminokyselinová
  - (C) DRUH ŘETĚZCE:
  - (D) TOPOLOGIE:
- (ii) DRUH MOLEKULY: protein
- (vi) PUVODNÍ ZDROJ:
  - (A) ORGANIZMUS: Mus musculus

(xi) Popis sekvence: SEQ ID NO: 5:

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Pro | Arg | Gly | Pro | Ala | Ser | Leu | Leu | Leu | Leu | Val | Leu | Ala | Ser | His | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Cys | Cys | Leu | Gly | Ser | Ala | Arg | Gly | Leu | Phe | Leu | Phe | Gly | Gln | Pro | Asp | 20  | 25  | 30  |     |
| Phe | Ser | Tyr | Lys | Arg | Ser | Asn | Cys | Lys | Pro | Ile | Pro | Ala | Asn | Leu | Gln | 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Cys | His | Gly | Ile | Glu | Tyr | Gln | Asn | Met | Arg | Leu | Pro | Asn | Leu | Leu | 50  | 55  | 60  |     |
| Gly | His | Glu | Thr | Met | Lys | Glu | Val | Leu | Glu | Gln | Ala | Gly | Ala | Trp | Ile | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Pro | Leu | Val | Met | Lys | Gln | Cys | His | Pro | Asp | Thr | Lys | Lys | Phe | Leu | Cys | 85  | 90  | 95  |     |
| Ser | Leu | Phe | Ala | Pro | Val | Cys | Leu | Asp | Asp | Leu | Asp | Glu | Thr | Ile | Gln | 100 | 105 | 110 |     |
| Pro | Cys | His | Ser | Leu | Cys | Val | Gln | Val | Lys | Asp | Arg | Cys | Ala | Pro | Val | 115 | 120 | 125 |     |
| Met | Ser | Ala | Phe | Gly | Phe | Pro | Trp | Pro | Asp | Met | Leu | Glu | Cys | Asp | Arg | 130 | 135 | 140 |     |
| Phe | Pro | Gln | Asp | Asn | Asp | Leu | Cys | Ile | Pro | Leu | Ala | Ser | Ser | Asp | His | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Leu | Leu | Pro | Ala | Thr | Glu | Glu | Ala | Pro | Lys | Val | Cys | Glu | Ala | Cys | Lys | 165 | 170 | 175 |     |
| Thr | Lys | Asn | Glu | Asp | Asp | Asn | Asp | Ile | Met | Glu | Thr | Leu | Cys | Lys | Asn | 180 | 185 | 190 |     |
| Asp | Phe | Ala | Leu | Lys | Ile | Lys | Val | Lys | Glu | Ile | Thr | Tyr | Ile | Asn | Arg | 195 | 200 | 205 |     |
| Asp | Thr | Lys | Ile | Ile | Leu | Glu | Thr | Lys | Ser | Lys | Thr | Ile | Tyr | Lys | Leu | 210 | 215 | 220 |     |
| Asn | Gly | Val | Ser | Glu | Arg | Asp | Leu | Lys | Lys | Ser | Val | Leu | Trp | Leu | Lys | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Asp | Ser | Leu | Gln | Cys | Thr | Cys | Glu | Glu | Met | Asn | Asp | Ile | Asn | Ala | Pro | 245 | 250 | 255 |     |
| Tyr | Leu | Val | Met | Gly | Gln | Lys | Gln | Gly | Gly | Glu | Leu | Val | Ile | Thr | Ser |     |     |     |     |

[illegible]



## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Použití látky, která se váže na receptor lidského SARP-1 a tím iniciuje jeho signalizaci, nebo látky, která stimuluje uvolnění nebo zesiluje aktivitu endogenního SARP-1, při výrobě léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
2. Použití látky vybrané ze skupiny obsahující:
  - a) zralý protein SARP-1
  - b) polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 2,
  - c) polypeptid obsahující aminokyseliny 21 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - d) polypeptid obsahující aminokyseliny 24 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - e) polypeptid obsahující aminokyseliny 25 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - f) polypeptid obsahující aminokyseliny 26 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - g) polypeptid obsahující aminokyseliny 27 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - h) polypeptid obsahující aminokyseliny 28 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - i) polypeptid obsahující aminokyseliny 37 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,
  - j) mutein popsany v libovolném odstavci a) až i), kde aminokyselinová sekvence vykazuje alespoň 40 % nebo 50 % nebo 60 % nebo 70 % nebo 80 % nebo 90 % shodu s alespoň jednou sekvencí uvedenou v odstavci a) až i),
  - k) mutein popsany v libovolném odstavci a) až i), který je kódován sekvencí DNA, která hybridizuje s úplnou přirozenou sekvencí DNA uvedenou v odstavci a) až i) za středně přísných podmínek nebo za velmi přísných podmínek,

- 1) mutein popsaný v libovolném odstavci a) až i), kde libovolné změny v aminokyselinové sekvenci jsou konzervativní aminokyselinové substituce aminokyselinových sekvencí uvedených v odstavci a) až i),
- m) sůl nebo izoforma, fúzovaný protein, funkční derivát, aktivní frakce nebo cirkulárně permutovaný derivát libovolné látky popsané v odstavci a) až l),  
při výrobě léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde látka je glykosylovaná v jednom nebo více míst.
4. Použití podle libovolného z předchozích nároků, kde fúzovaný protein obsahuje fúzi imunoglobulinu (Ig).
5. Použití podle libovolného z nároků 2 až 4, kde funkční derivát obsahuje alespoň jednu část zachycenou na jedné nebo více funkčních skupinách, které se vyskytují jako jeden nebo více vedlejších řetězců na aminokyselinových zbytcích.
6. Použití podle nároku 5, kde uvedenou částí je polyetylenová část.
7. Použití molekuly nukleové kyseliny při výrobě léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, kde molekula nukleové kyseliny obsahuje sekvenci nukleové kyseliny kódující polypeptid obsahující aminokyselinovou sekvenci vybranou ze skupiny obsahující
- a) zralý protein SARP-1
- b) polypeptid obsahující sekvenci SEQ ID NO: 2,
- c) polypeptid obsahující aminokyseliny 21 až 295 sekvence SEQ ID NO: 2,

- d) polypeptid obsahující aminokyseliny 24 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- e) polypeptid obsahující aminokyseliny 25 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- f) polypeptid obsahující aminokyseliny 26 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- g) polypeptid obsahující aminokyseliny 27 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- h) polypeptid obsahující aminokyseliny 28 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- i) polypeptid obsahující aminokyseliny 37 až 295 sekvence SEQ  
ID NO: 2,
- j) mutein popsany v libovolném odstavci a) až i), kde  
aminokyselinová sekvence vykazuje alespoň 40 % nebo 50 %  
nebo 60 % nebo 70 % nebo 80 % nebo 90 % shody s alespoň  
jednou sekvencí uvedenou v odstavci a) až i),
- k) mutein popsany v libovolném odstavci a) až i), který je  
kódován sekvencí DNA, která hybridizuje s úplnou přirozenou  
sekvencí DNA uvedenou v odstavci a) až i) za středně  
přísných nebo za velmi přísných podmínek,
- l) mutein popsany v libovolném odstavci a) až i), kde libovolné  
změny v aminokyselinové sekvenci jsou konzervativní  
aminokyselinové substituce aminokyselinových sekvencí  
uvedených v odstavci a) až j),
- m) izoforma, fúzovaný protein nebo aktivní frakce libovolné  
látky popsané v odstavci a) až l).

8. Použití vektoru, který obsahuje molekulu nukleové kyseliny  
podle nároku 7, pro výrobu léčebného prostředku pro léčbu  
a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.

9. Použití podle nároku 8, kde vektor je expresivní vektor.

10. Použití podle nároku 8 nebo 9, kde vektor je vektorem pro genovou terapii.
11. Použití vektoru vhodného pro vyvolání a/nebo zesílení endogenní produkce polypeptidu podle libovolného z nároků 1 nebo 2 v buňce pro přípravu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
12. Použití buňky obsahující vektor podle libovolného z nároků 8 až 11 pro přípravu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
13. Použití buňky exprimující látku podle libovolného z nároků 1 až 4 pro výrobu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
14. Použití buňky, která se geneticky upravila, aby produkovala polypeptid podle nároku 1 až 4, pro výrobu léčebného prostředku pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie.
15. Použití podle libovolného z nároků 1 až 14, kde onemocnění sklerodermie je systemická skleróza.
16. Použití podle libovolného z nároků 1 až 15, kde léčebný prostředek dále obsahuje interferon pro současné, následné nebo oddělené použití.
17. Použití podle nároku 16, kde interferonem je interferon  $\beta$ .
18. Použití podle libovolného z nároků 1 až 17, kde léčebný prostředek dále obsahuje antagonistu faktoru nekrotizující nádor (TNF) pro současné, následné nebo oddělené použití.

19. Použití podle nároku 18, kde antagonist TNF je TBPI a/nebo TBPII.
20. Použití podle libovolného z nároků 1 až 19, kde léčebný prostředek dále zahrnuje činidlo působící proti onemocnění sklerodermie, pro současné, následné nebo oddělené použití.
21. Použití podle nároku 20, kde činidlo působící proti onemocnění sklerodermie se vybralo ze skupiny zahrnující inhibitory ACE, blokátory vápníkových kanálů, inhibitory protonové pumpy, NSAID, COX-inhibitory, kortikosteroidy, tetracyklin, pentoxifylin, bucillamin, inhibitory geranylgeranylové transferázy, rotterlin, inhibitory prolyl-4-hydroxylázy, inhibitory c-proteinázy, inhibitory lyzyl-oxidázy, relaxin, halofuginon, prostaglandiny, prostacykliny, endotelin-1, oxid dusnatý, inhibitory angiotensinu II a anti-oxidanty.
22. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje vektor obsahující molekulu nukleové kyseliny libovolného z nároků 7 až 11 spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelnými nosiči, ředidly nebo excipienty pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy.
23. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje buňku exprimující polypeptid podle libovolného z nároků 1 až 4 spolu s jedním nebo více farmaceuticky přijatelných nosičů, ředidel nebo excipientů pro léčbu a/nebo prevenci onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy.
24. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e obsahuje látku podle libovolného z nároků 1

až 6 v kombinaci s činidlem, které působí proti onemocnění sklerodermie, vybraným ze skupiny zahrnující inhibitory ACE, blokátory vápníkových kanálů, inhibitory protonové pumpy, NSAID, COX-inhibitory, kortikosteroidy, tetracyklin, pentoxifylin, bucillamin, inhibitory geranylgeranylové transferázy, rotterlin, inhibitory prolyl-4-hydroxylázy, inhibitory c-proteinázy, inhibitory lyzyl-oxidázy, relaxin, halofuginon, prostaglandiny, prostacykliny, endotelin-1, oxid dusnatý, inhibitory angiotensinu II a anti-oxidanty.

25. Způsob léčby a/nebo prevence onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci pacientovi, který to potřebuje, účinného množství látky podle libovolného z nároků 1 až 6 spolu s farmaceuticky přijatelným nosičem.

26. Způsob léčby a/nebo prevence onemocnění sklerodermie, zvláště systemické sklerózy, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje aplikaci pacientovi, který to potřebuje, farmaceutického prostředku podle libovolného z nároků 22 až 24.

27. Způsob podle nároku 25 nebo 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e látka nebo farmaceutický prostředek se aplikuje systémově.

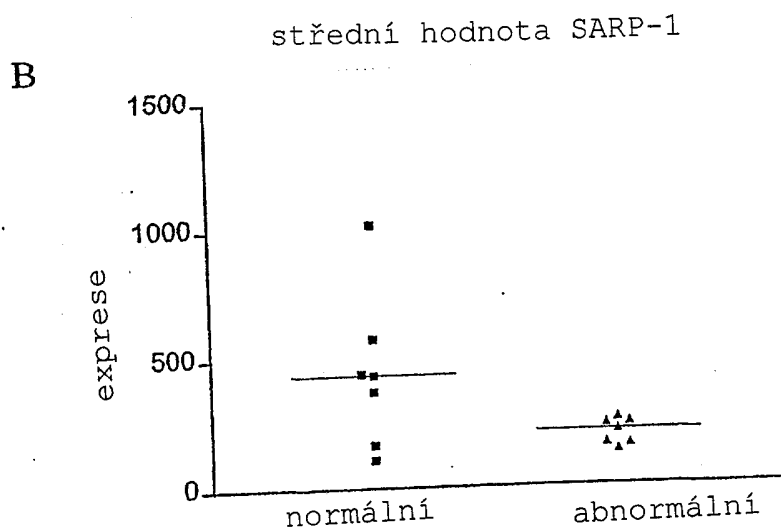
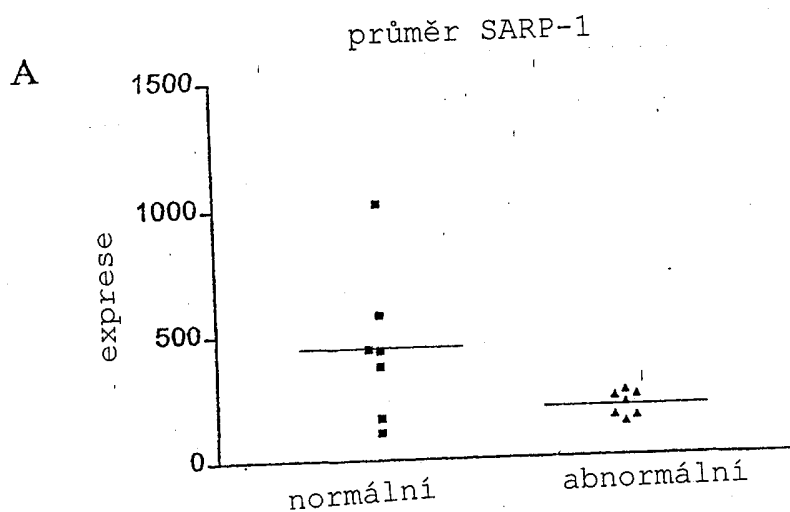
28. Způsob podle libovolného z nároků 25 nebo 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e látka nebo farmaceutický prostředek se aplikuje intramuskulární injekcí.

29. Způsob podle libovolného z nároků 25 nebo 28 v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e látka nebo farmaceutický prostředek se aplikuje inhalací.

02.07.03

PV 2003-1055

1/11



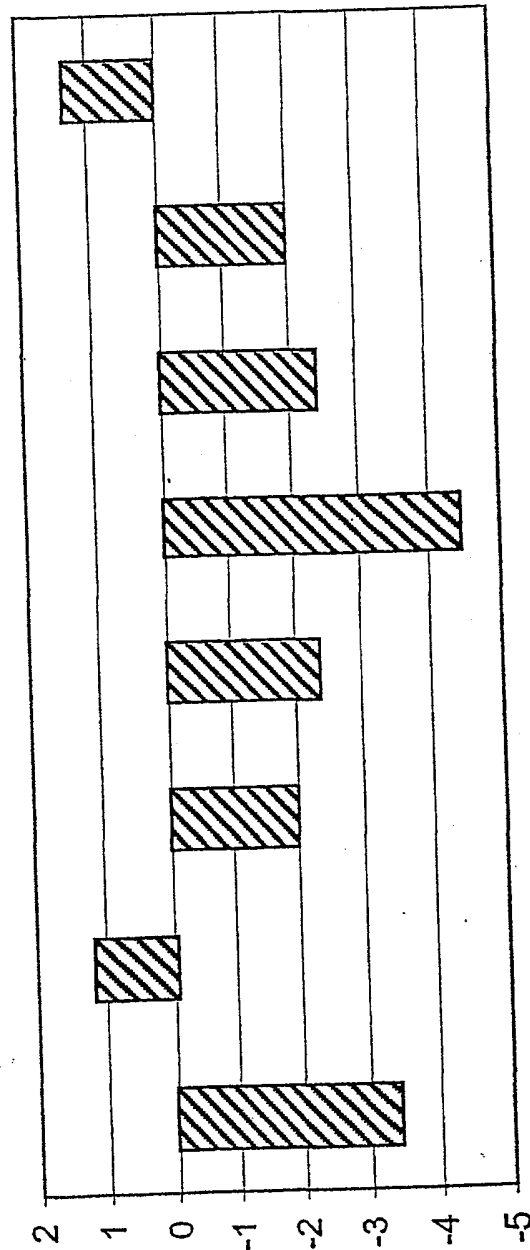
Obr. 1

02.07.03

PV 2003 - 1055

2/11

SARP-1



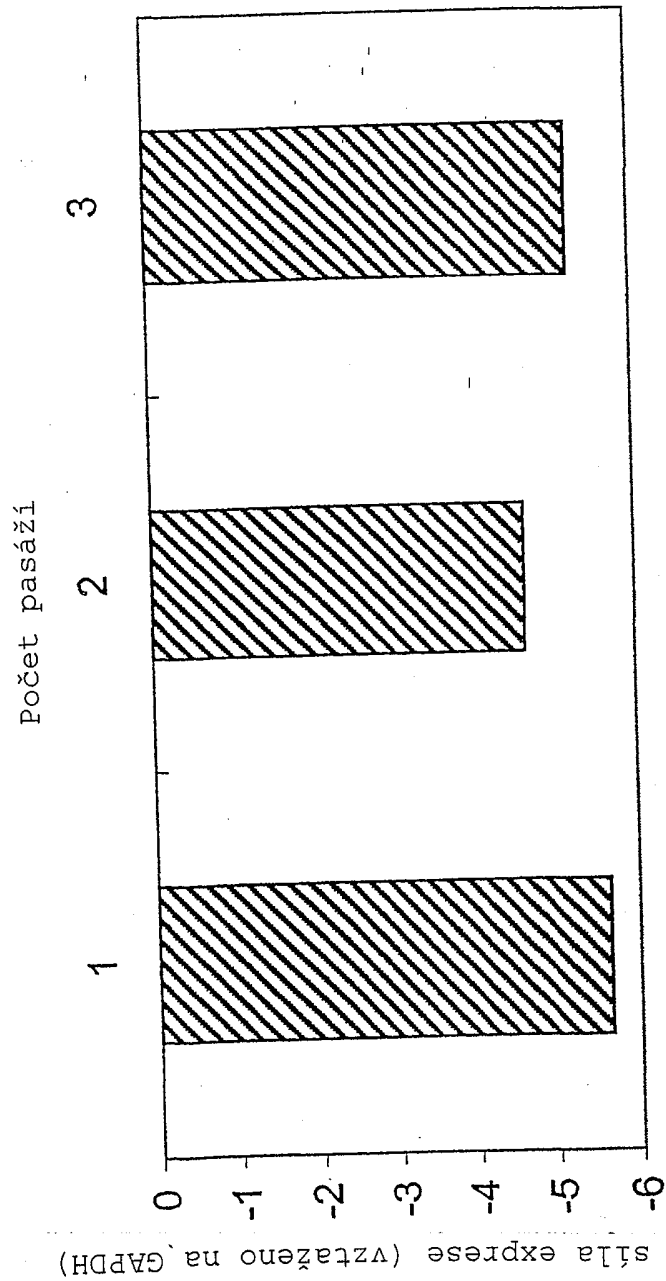
Obr. 2



02.07.03

PV 2003 - 1855

3/11

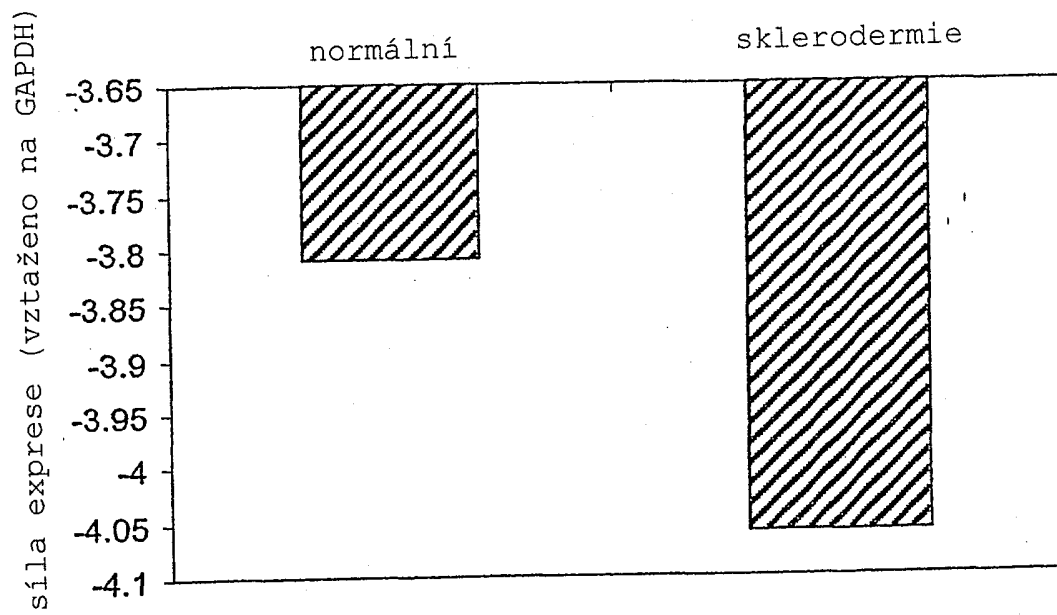


Obr. 3

02.07.03

PV 2003 - 1855

4/11



Obr. 4

00.07.03

PV 2003 - 125

5/11

1 GCCAAGCTTCCCACGATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGCTGCTGCTCTTCTCGCCTCG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 60  
CGGTTCTGAAGGGTGCTACGACGTCCCGGGACCGAGCGACGACGAGAGAAGGAGCGGAGC

a M L Q G P G S L L L L F L A S -

61 CACTGCTGCCTGGGCTCGGCGCGGGGCTCTTCTCTTTGGCCAGCCCGACTTCTCTAC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 120  
GTGACGACGGACCCGAGCCGCGCGCCCGAGAAGGAGAAACCGGTCGGGCTGAAGAGGATG

a H C C L G S A R G L F L F G Q P D F S Y -  
                  ↑                  ↑  
121 AAGCGCAGCAATTGCAAGCCCATCCCGGCCAACCTGCAGCTGTGCCACGGCATCGAATAC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 180  
TTCGCGTCGTTAACGTTTCGGGTAGGGCCGGTTGGACGTCGACACGGTGCCGTAGCTTATG

a K R S N C K P I P A N L Q L C H G I E Y -

181 CAGAACATGCGGCTGCCAACCTGCTGGGCCACGAGACCATGAAGGAGGTGCTGGAGCAG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 240  
GTCTTGTACGCCGACGGGTGGACGACCCGGTGCTCTGGTACTTCTCCACGACCTCGTC

a Q N M R L P N L L G H E T M K E V L E Q -

241 GCCGGCGCTTGGATCCCGCTGGTCATGAAGCAGTGCCACCCGGACACCAAGAAGTTCCTG  
-----+-----+-----+-----+-----+ 300  
CGGCCGCGAACCCTAGGGCGACCACTACTTCGTACGGTGGGCTGTGGTCTTCAAGGAC

a A G A W I P L V M K Q C H P D T K K F L -

301 TGCTCGCTCTTCGCCCCGCTGCTCGCTCGATGACCTAGACGAGACCATCCAGCCATGCCAC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 360  
ACGAGCGAGAAGCGGGGCGAGCGGAGCTACTGGATCTGCTCTGGTAGGTGCGGTACGGTG

a C S L F A P V C L D D L D E T I Q P C H -

361 TCGCTCTGCGTGCAAGTGAAGGACCGCTGCGCCCCGGTCATGTCCGCCTTCGGCTTCCCC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 420  
AGCGAGACGCACGTCCACTTCTGGCGACGCGGGGCCAGTACAGGCGGAAGCCGAAGGGG

a S L C V Q V K D R C A P V M S A F G F P -

421 TGGCCCGACATGCTTGAGTGCACCGTTTCCCCCAGGACAACGACCTTGCATCCCCCTC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 480  
ACCGGGCTGTACGAACCTACGCTGGCAAAGGGGTCCTGTTGCTGGAAACGTAGGGGGAG

a W P D M L E C D R F P Q D N D L C I P L -

481 GCTAGCAGCGACCACTCTGCCAGCCACCGAGGAAGCTCCAAAGGTATGTGAAGCCTGC  
-----+-----+-----+-----+-----+ 540  
CGATCGTCGCTGGTGGAGGACGGTCGGTGGCTCCTTCGAGGTTTCCATACACTTCGGACG

a A S S D H L L P A T E E A P K V C E A C -

Obr. 5A

02.07.03

PV 2003-185

6/11

541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600  
AAAAATAAAAAATGATGATGACAACGACATAATGGAAACGCTTTGTRAAAAATGATTTTGCA  
TTTTTATTTTACTACTACTGTTGCTGTATTACCTTTGCGAAACATTTTACTAAAACGT  
a K N K N D D D N D I M E T L C K N D F A -  
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660  
CTGAAAATAAAAGTGAAGGAGATAACCTACATCAACCGAGATACCAAAATCATCCTGGAG  
GACTTTTATTTTCACTTCCTCTATTGGATGTAGTTGGCTCTATGGTTTTAGTAGGACCTC  
a L K I K V K E I T Y I N R D T K I I L E -  
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720  
ACCAAGAGCAAGACCATTTACAAGCTGAACGGTGTGTCCGAAAGGGACCTGAAGAAATCG  
TGTTTCTCGTTCTGGTAAATGTTTCACTTGCCACACAGGCTTCCCTGGACTTCTTTAGC  
a T K S K T I Y K L N G V S E R D L K K S -  
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780  
GTGCTGTGGCTCAAAGACAGCTTGCACTGCACCTGTGAGGAGATGAACGACATCAACGCG  
CAGGACACCGAGTTTCTGTGCAACGTCACGTGGACACTCCTCTACTGTGTAGTTGCGC  
a V L W L K D S L Q C T C E E M N D I N A -  
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840  
CCCTATCTGGTCATGGGACAGAAACAGGGTGGGGAGCTGGTGATCACCTCGGTGAAGCGG  
GGGATAGACCAGTACCCTGTCTTTGTCCCACCCCTCGACCACTAGTGGAGCCACTTCGCC  
a P Y L V M G Q K Q G G E L V I T S V K R -  
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900  
TGCGAGAAGGGGAGAGAGAGTTCAAGCGCATCTCCCGCAGCATCCGCAAGCTGCAGTGC  
ACCGTCTTCCCCGTCTCTCTCAAGTTCCGCTAGAGGGCGTCGTAGGCGTTTCGACGTCACG  
a W Q K G Q R E F K R I S R S I R K L Q C -  
901 -----+-----+-----+-----+-----+ 912  
TAGCTCGAGCGC  
ATCGAGCTCGCG

Obr. 5B

00.07.03

PV 2003-1855

7/11

HUMAN MLQGPGLLLLFLASHCCLGSARGLFLEFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQCHGIEYQNMRL  
MOUSE MERGPASLLLLFLASHCCLGSARGLFLEFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQCHGIEYQNMRL  
\* \* \* \* \*

HUMAN PNLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDLDLDETIQPCHSVCVQ  
MOUSE PNLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDLDLDETIQPCHSVCVQ  
\* \* \* \* \*

HUMAN VKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKNKND  
MOUSE VKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKNKNE  
\* \* \* \* \*

HUMAN DDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIILETKSKTIYKLVGVSEDLKKSIVLWLK  
MOUSE DDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIILETKSKTIYKLVGVSEDLKKSIVLWLK  
\* \* \* \* \*

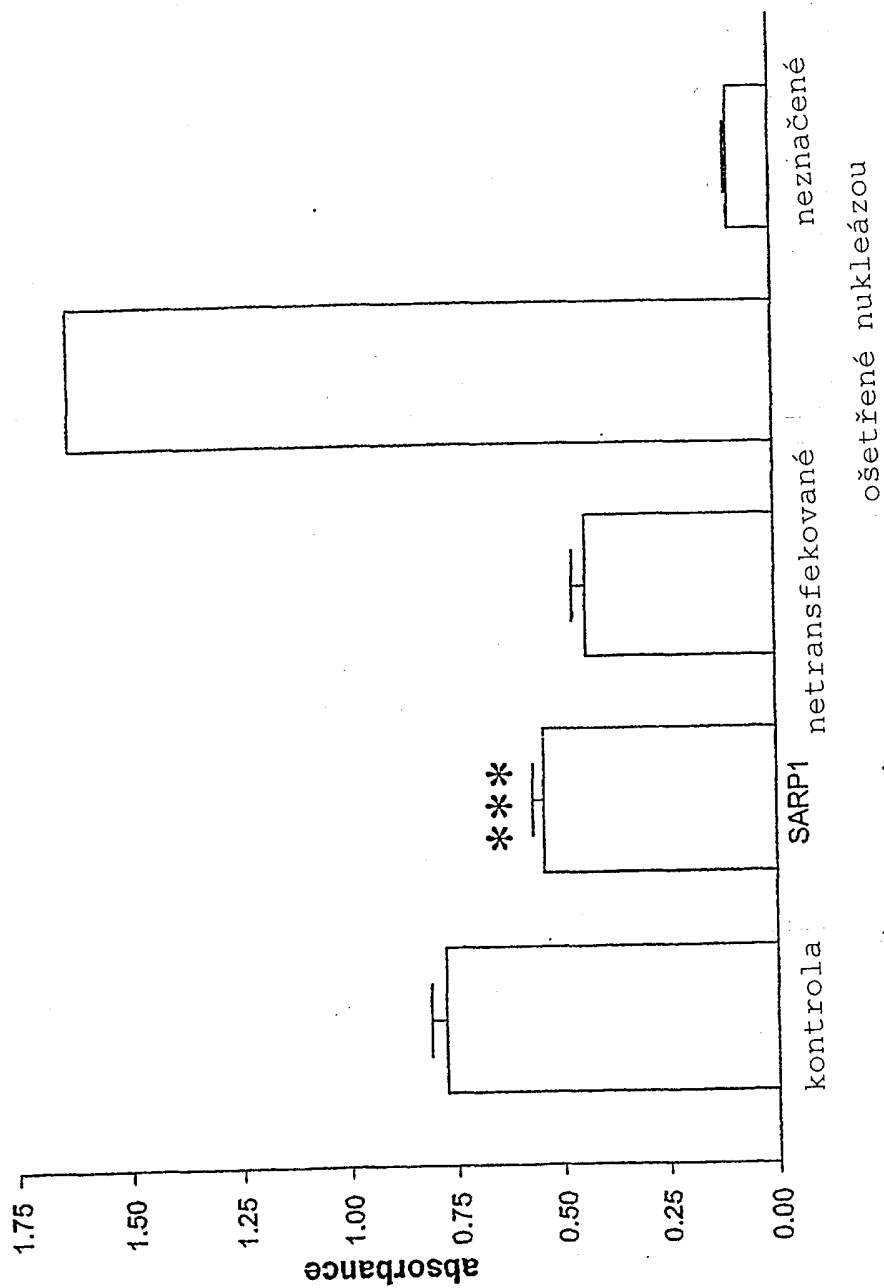
HUMAN DSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGELVITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQ  
MOUSE DSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGELVITSVKRWQKGQREFKRISRSIRKLQ  
\* \* \* \* \*

Opr. 6

00.07.03

PV 2003-1855

8/11

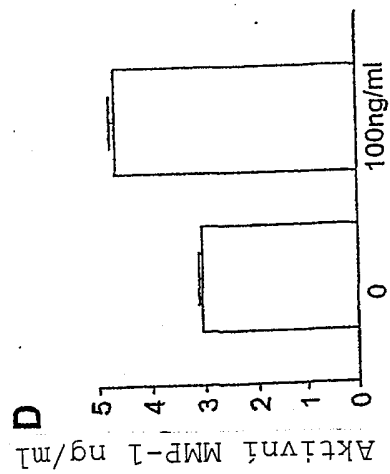
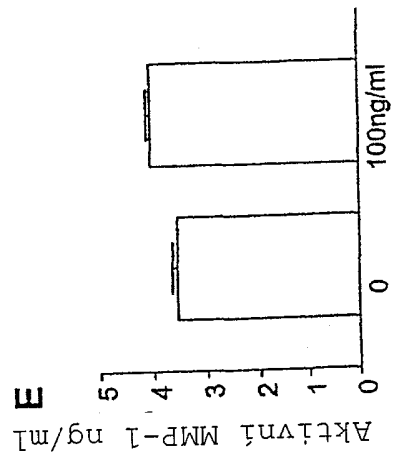
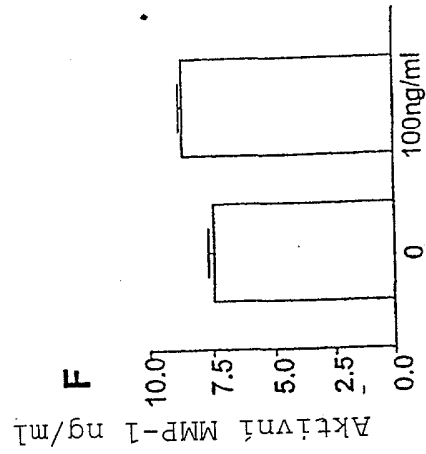
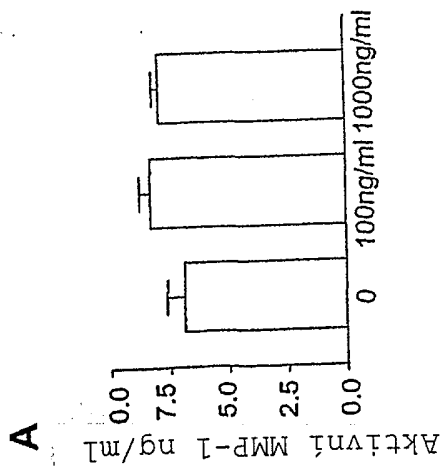
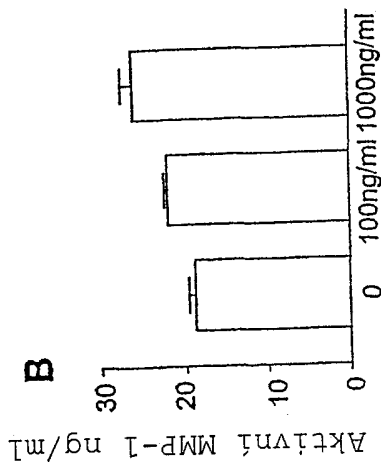
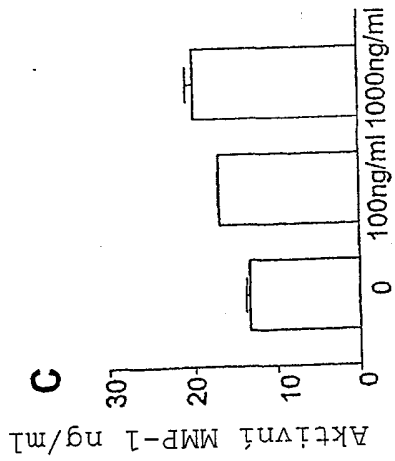


Obr. 7

02.07.03

PV 2003 - 195

9/11

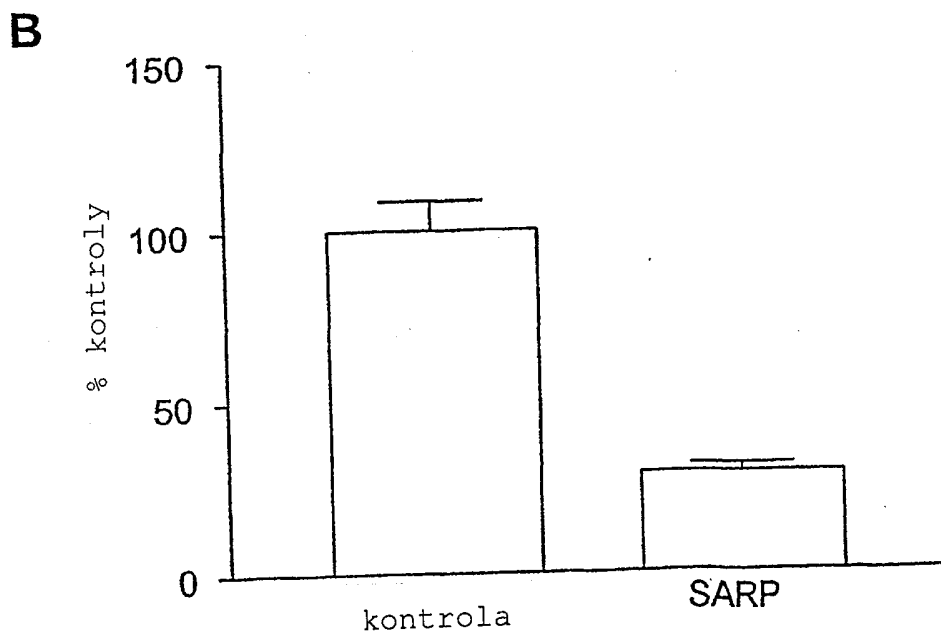
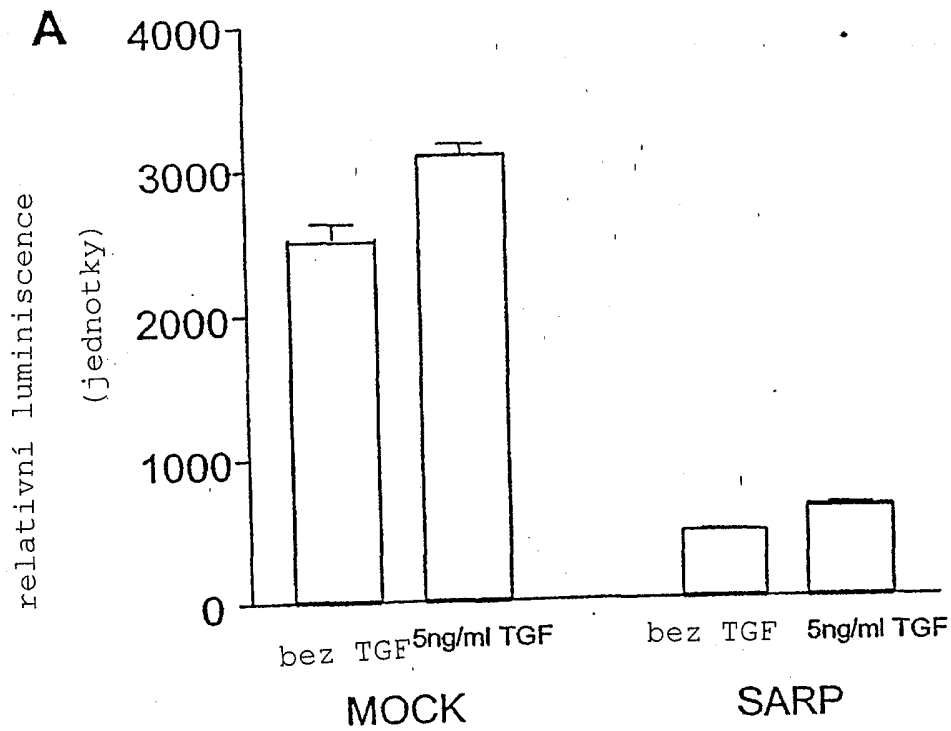


Obr. 8

02.07.03

PV 2003-1855

10/11

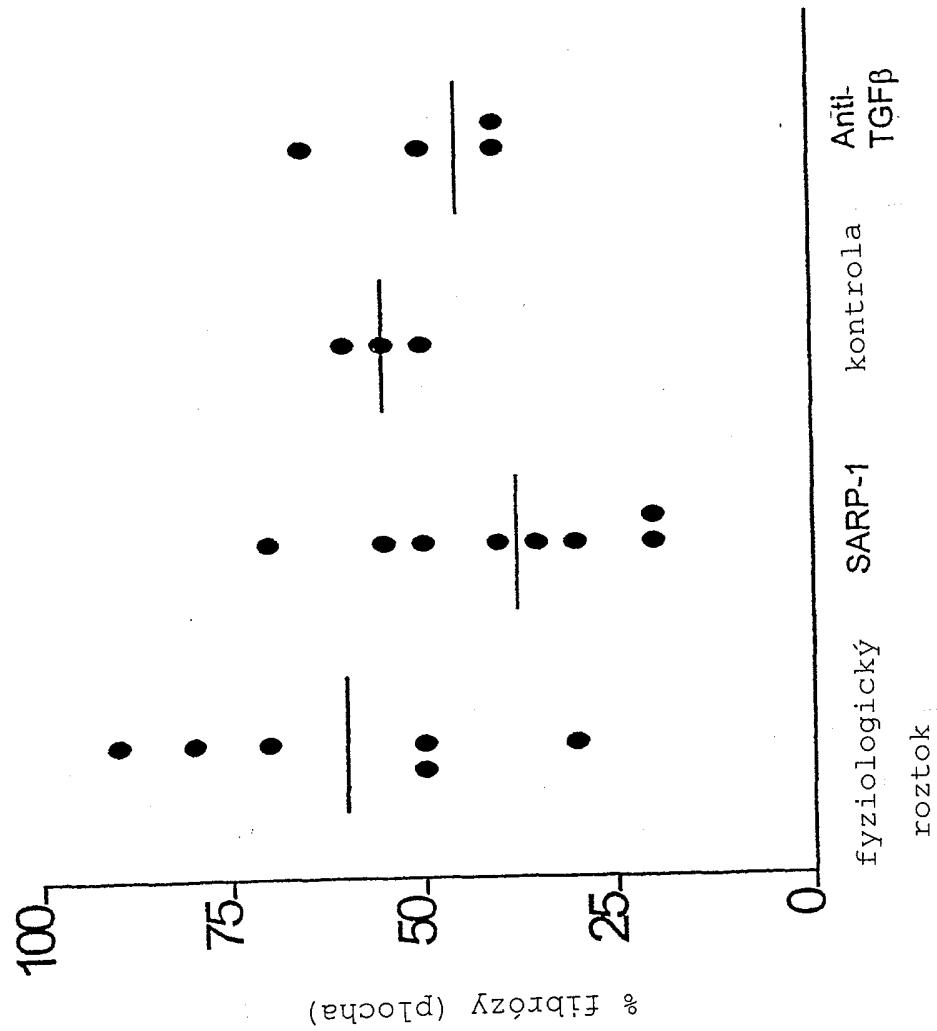




02.07.03

PV 2003 - 1955

11/11



Obr. 10