

PŘÍHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

2002 - 903

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

C 07 K 14/00

C 07 K 14/705

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **13.09.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.09.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/394832**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17.07.2002**
(Věstník č. 7/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/25035**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO01/19855**

(71) Přihlašovatel:

**AMERICAN HOME PRODUCTS CORPORATION,
Madison, NJ, US;**

(72) Původce:

Bodine Peter V. N., Havertown, PA, US;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutický prostředek s obsahem
sekrenovaných proteinů příbuzných s proteiny
frizzled**

(57) Anotace:

Farmaceutické prostředky a způsoby jejich použití při řízení aktivit SFRP při tvorbě kostí u savců. SFRP jsou sekrenované receptory pro proteiny Wnt, které jsou důležité polypeptidové růstové faktory regulující základní biologické procesy jako je polarita tkání, embryonální vývoj a tumorigeneze. SFRP byl izolován v buňkách lidských osteoblastů a identifikován jako SFRP-1 (známý jako SARP 2), a bylo ukázáno, že je regulován v buňkách hOB osteogenními prostředky v závislosti na diferenciaci a reguluje délku života osteoblastů/preosteocytů.

CZ 2002 - 903 A3

Farmaceutický prostředek s obsahem sekrenovaných proteinů příbuzných s proteiny frizzled

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká prostředků a způsobů regulace
5 aktivity při tvorbě kostí. Předkládaný vynález se zvláště týká způsobů
a farmaceutických prostředků pro regulaci aktivity při tvorbě kostí
pomocí sekrenovaných proteinů příbuzných s proteiny frizzled
(secreted frizzled related protein, SFRP), odvozených od buněčné linie
osteoblastů, jejich částí, stejně jako protilátek a nukleových kyselin
10 včetně kódujících řetězců na jejich základě.

Dosavadní stav techniky

Téma regulace tvorby kostí a onemocnění souvisejících s kostmi
se v poslední době dostává stále větší pozornosti, například v oblasti
15 onemocnění žen, kde se výzkum zvláště soustředil na onemocnění
související s kostmi, osteoporózu. V průběhu života dochází k trvalému
remodelování skeletální kosti. Při tomto remodelování existuje křehká
rovnováha mezi tvorbou kostí prostřednictvím osteoblastů a následnou
resorpcí kostí působením osteoklastů.

20 Jako normální součást procesu stárnutí podléhá kostní matrice
různým strukturním změnám, jejichž povaha stále ještě není zcela
objasněna. Většina studií týkajících se změn v lidské kosti
souvisejících s věkem byla zaměřena na objasnění kostních změn na
morfologické úrovni nebo kvantitativním porovnávání rychlosti kostního
25 úbytku. Identifikace mechanismů, které se účastní onemocnění kostí,
je klíčová pro porozumění fyziologii kostí a onemocněním kostí. Byla
identifikována a klonována celá řada genů a skupin genů a jimi
kódovaných polypeptidů, které se účastní regulace kostních buněk,

avšak jejich funkce nebyly úplně objasněny v důsledku komplexnosti biochemických pochodů při tvorbě kostí.

Skupina genů Wnt

5 Jednou skupinou genů a jimi kódovaných proteinů, které mají důležitou úlohu při regulaci vývoje buněk, je skupina glykoproteinů Wnt. Proteiny Wnt jsou proteiny ze skupiny růstových faktorů, která je tvořena více než tuctem strukturně příbuzných molekul, které se účastní regulace a základních biologických procesů jako je apoptóza,
10 embryogeneze, organogeneze, morfogeneze a tumorigeneze (souhrnný článek viz Nusse a Varmus, 1992, Cell 69: 1073 - 1087). Tyto polypeptidy mají více funkcí a mají podobné biologické účinky jako jiné sekreční proteiny jako je transformující růstový faktor (TGF)- β , růstové faktory fibroblastů (FGF), nervový růstový faktor (NGF)
15 a proteiny morfogeneze kostí (BMP). Jeden protein ze skupiny růstového faktoru Wnt nazývaný Wnt-x je preferenčně exprimován v kostní tkáni a buňkách odvozených od kostí, a zdá se, že se účastní při zachovávání fenotypu zralých osteoblastů (buněk tvořících kosti) (PTC/US 94/1408; WO 95/17416).

20

Skupina proteinů frizzled

Některé studie ukazují na to, že určité proteiny Wnt interagují se skupinou proteinů nazývaných „frizzled“, které působí jako receptory pro proteiny Wnt nebo jako složky komplexu receptoru Wnt (souhrn viz
25 Moon a další, 1997, Cell 88: 725 - 728 a Barth a další, 1997, Curr. Opin. Cell Biol. 9: 683 - 690). Proteiny frizzled obsahují aminokoncovou signální sekvenci pro sekreci, doménu bohatou na cystein (CRD), o které se předpokládá, že se váže na Wnt, sedm domnělých transmembránových domén, které napodobují receptor
30 vázaný na G-protein a cytoplasmatický karboxylový konec.

Objev prvního sekrenovaného proteinu příbuzného s proteiny frizzled (SFRP) byl ohlášen autory Hoang a další, 1996, J. Biol. Chem. 271: 26131 - 26237. Tento protein, který byl nazván „Frzb“ (od „frizzled motif in bone development“), byl vyčištěn a klonován z
5 extraktů hovězí kloubní chrupavky na základě své schopnosti stimulovat chondrogenní aktivitu in vivo u krys. Byl také klonován homolog bovinního genu. Na rozdíl od proteinů frizzled však Frzb neobsahoval zakroucenou (serpentine) transmembránovou doménu. Zdálo se tedy, že nový člen skupiny frizzled je sekrenovaný receptor
10 pro Wnt. Frzb cDNA kódovala protein o délce 325 aminokyselin/36 000 Da a byla převážně exprimována kostře končetin. Nejvyšší míra exprese byla zaznamenána u vyvíjejících se dlouhých kostí a odpovídala epifyzálním chondroblastům; exprese potom klesala a vymizela směrem k centrům osifikace.

15 Poslední studie ukazují, že proteiny SFRP se účastní při apoptóze, a některé SFRP tedy byly identifikovány jako „SARP“, tj. sekrenované proteiny související s apoptózou. V poslední době byly také identifikovány další látky ze skupiny SFRP, u kterých bylo ukázáno, že mají antagonistické účinky na působení Wnt.
20 V současnosti je známo alespoň pět lidských genů SFRP/SARP: SFRP-1/FrZA/FRP-1/SARP-2, SFRP-2/SDF-5/SARP-1, SFRP-3/Frzb/Fritz, SFRP-4 a SFRP-5/SARP-3 (Leimeister a další, 1998, Mechanisms of Development 75: 29 - 42, sekvence z této reference jsou zahrnuty). I když přesná úloha, kterou hrají proteiny SARP/SFRP
25 při apoptóze není dosud jasná, zdá se, že tyto proteiny buď potlačují nebo zesilují naprogramovaný proces smrti buněk.

Souhrnem lze tedy říci, že existuje velká potřeba definitivní identifikace cílů pro léčení onemocnění kostí včetně poruch kostní resorpce jako je osteoporóza, a identifikace regulace tvorby kostí
30 u lidí.

Podstata vynálezu

Podle předkládaného vynálezu se poskytují způsoby a farmaceutické prostředky pro regulaci aktivity při tvorbě kostí (bone-forming activity) u savců, které zahrnují sekrenované proteiny příbuzné s proteiny frizzled (secreted frizzled related protein, SFRP) nebo jejich regulačními proteiny. Další prostředky podle předkládaného vynálezu využívají protilátek vytvořených z těchto proteinů nebo jejich částí, a alternativně mohou používat nukleové kyseliny kódující tyto proteiny nebo jejich části včetně pozitivních (antisense) řetězců. Ve výhodném provedení pochází SFRP z buněk lidských osteoblastů. Aktivity při tvorbě kostí regulované prostředkem podle předkládaného vynálezu zahrnují regulaci růstu kostí a hustoty kostí. SFRP má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID No. 2, která se získává expresí polynukleotidové sekvence uvedené v SEQ ID No. 1. V nejvýhodnějším provedení je SFRP protein SFRP-1 (SEQ ID No. 2).

V dalším provedení zahrnují způsoby podle předkládaného vynálezu metody pro léčení onemocnění kostí u savců, zvláště u lidí, jejichž součástí jsou kroky podávání výše popsaného farmaceutického prostředku. Způsoby léčení onemocnění kostí jako takové zahrnují bez omezení poruchy ze skupiny (a) poruchy tvorby kostí, (b) poruchy resorpce kostí a (c) poruchy hustoty kostí.

V dalším provedení vynálezu je onemocněním kostí degenerativní onemocnění kostí, kde toto degenerativní onemocnění kostí je zvoleno ze skupiny neurodegenerativních, myodegenerativních a osteodegenerativních poruch. Osteodegenerativní onemocnění je zvoleno ze skupiny osteopenie, osteoartritidy a osteoporózy.

V dalším provedení zahrnuje vynález způsoby identifikace testovaných sloučenin regulujících aktivitu SFRP. Při tomto způsobu se testují sloučeniny regulující aktivitu při tvorbě kostí u savce nejprve inkubací vzorku obsahujícího SFRP v testovacím médiu obsahujícím testovanou sloučeninu. Dalším krokem je zjištění aktivity SFRP,

přičemž zvýšení aktivity související se samotným SFRP ukazuje, že sloučenina je aktivátorem SFRP, a snížení aktivity ukazuje, že sloučenina je inhibítozem SFRP.

V dalším provedení zahrnuje vynález způsoby modulace přenosu signálů podmíněného Wnt (Wnt-mediated signaling) v buňce, které zahrnují uvedení buňky do styku s SFRP popsáným výše, kde dochází k řízení aktivity Wnt.

Předkládaný vynález se také týká způsobu umožnění tvorby nebo opravy kostí v kultuře kostních buněk, který zahrnuje izolaci buněk z kostní kultury, zavedení rekombinantního konstrukt u exprimujícího SFRP se sekvencí aminokyselin uvedenou v SEQ ID No. 2, a navrácení uvedených buněk do kostní kultury. Konstrukt s výhodou exprimuje kódující sekvenci nukleové kyseliny, jejíž sekvence kóduje veškerý protein nebo část proteinu SFRP.

Další provedení se týká polynukleotidové sondy schopné hybridizovat s polynukleotidem, který má sekvenci nukleové kyseliny uvedenou v SEQ ID No. 1. Tato sonda se používá při způsobu diagnózy pro detekci polynukleotidu SFRP ve vzorku odvozeném ze savčího hostitele, který zahrnuje detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti SFRP ve vzorku.

Podrobný popis vynálezu

Předkládaný vynález se týká genu, jehož exprese je řízena osteogenně účinnými látkami nebo látkami vytvářejícími kosti ve třech rozdílných buněčných liniích lidských osteoblastů (hOB) in vitro. V jednom provedení předkládaného vynálezu je exprese tohoto genu zvyšována v průběhu diferenciac e hOB, což ukazuje, že se může účastnit procesu tvorby kostí. Analýza sekvence DNA ukázala, že tento genový fragment sdílel významnou sekvenční identitu s myší cDNA nazývanou sekrenovaný protein příbuzný s proteiny frizzled

(SFRP-1) (Rattner a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2859 - 2863). Následné klonování cDNA a další analýza sekvence ukázaly, že tento gen, který je označován jako hOB SFRP byl identický s lidským FRP-1/SARP-2 (Finch a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6770 - 6775; Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641). Charakterizace hOB SFRP předpokládá jeho použití jako nového cíle pro léky proti osteoporóze a jako nového prostředku pro systematické prohledávání s cílem identifikovat anabolické kostní látky.

10

Definice

Termín „tvorba kostí“ je proces syntézy a mineralizace kostí. Tento proces moduluje buňka nazývaná osteoblast.

Termín „růst kostí“ je proces expanze skeletu. Tento proces probíhá jedním ze dvou způsobů: (1) intramembránová tvorba kosti pochází přímo z mezenchymálních buněk nebo buněk kostní dřeně; (2) podélná neboli endichinduální tvorba kosti se vyskytuje tam, kde se kost oddělí od chrupavky.

Termín „osteogeneze“ je synonymum s termínem tvorba kostí definovaným výše.

Termíny „sekrenované proteiny příbuzné s proteiny frizzled“ nebo „SFRP“ označují sekrenovaný receptor signální biochemické cesty Wnt, který má řadu vlastností, které umožňují jeho použití jako nástroj pro studium růstu buněk a jejich diferenciaci. Skupina genů podobných frizzled kóduje proteiny buněčné membrány, které mají transmembránové domény s neznámými funkcemi.

Termíny „sekrenovaný protein související s apoptózou“ nebo „SARP“ jsou synonyma pro termíny „sekrenované proteiny příbuzné s proteiny frizzled“ nebo „SFRP“ definované výše.

Termíny „proteiny“, „peptidy“ a „polypeptidy“ se používají zaměnitelně a mají zahrnovat čištěné a rekombinantně produkované molekuly SFRP obsahující aminokyseliny lineárně vázané peptidovými vazbami. Aminokyseliny podle tohoto vynálezu mohou být ve formě L nebo D, pokud se zachová biologická aktivita polypeptidu. Proteiny SFRP podle předkládaného vynálezu mohou také zahrnovat proteiny, které jsou posttranslačně modifikovány reakcemi zahrnujícími glykosylaci, acetylaci a fosforylaci. Tyto polypeptidy také zahrnují analohy, alely a alelické varianty, které mohou obsahovat aminokyselinové deriváty a neaminokyselinové skupiny, které neovlivňují biologickou nebo funkční účinnost proteinu SFRP v porovnání s proteinem standardního typu nebo proteinem, který se vyskytuje v přírodě. Termín aminokyselina označuje jak aminokyseliny vyskytující se v přírodě a jejich deriváty, jako je TyrMe a PheCl, stejně jako jiné skupiny charakterizované přítomností jak dostupné karboxylové skupiny, tak i aminové skupiny. Neaminokyselinové skupiny, které mohou být v těchto polypeptidech obsaženy, zahrnují například struktury napodobující aminokyseliny. Napodobující struktury jsou takové struktury, které mají v podstatě stejné prostorové uspořádání funkčních skupin jako aminokyseliny, ale nemají nutně obě aminové a karboxylové skupiny charakteristické pro aminokyseliny.

„Muteiny“ jsou proteiny nebo polypeptidy SFRP, které mají menší změny aminokyselinové sekvence způsobené například místně specifickou mutagenezí nebo jinými manipulacemi; chybami v transkripci nebo translaci; nebo které se připravují synteticky podle určitého rozumově odůvodněného návrhu. Tyto menší změny vedou k aminokyselinovým sekvencím, ve kterých je biologická aktivita proteinu nebo polypeptidu ve srovnání s polypeptidem nebo proteinem standardního typu nebo vyskytujícího se v přírodě změněna. Mezi příklady muteinů patří zde popisovaný SFRP-1 SEQ ID No. 2.

Jak se zde používá, termín „hydrofobní“ má zahrnovat ty aminokyseliny, deriváty aminokyselin, látky napodobující

aminokyseliny a chemické skupiny, které jsou nepolární. Mezi hydrofobní aminokyseliny patří Phe, Val, Trp, Ile a Leu. Jak se zde používá, termín „kladně nabitá aminokyselina“ označuje ty aminokyseliny, deriváty aminokyselin, látky napodobující aminokyseliny a chemické skupiny, které jsou kladně nabitě. Mezi kladně nabitě aminokyseliny patří například Lys, Arg a His.

„Čištěný“, jestliže se týká proteinu nebo polypeptidu SFRP, je protein odlišitelný od přirozených nebo v přírodě se vyskytujících proteinů nebo polypeptidů, protože existuje ve vyčištěném stavu. Tyto „vyčištěné“ proteiny nebo polypeptidy SFRP nebo jakékoli jejich zamýšlené varianty, jak se zde popisují, mají znamenat, že sloučenina nebo molekula je v podstatě prostá kontaminujících příměsí, které se normálně vyskytují spolu se sloučeninou v jejím nativním nebo přirozeném prostředí. Termíny „v podstatě čistý“ a „izolovaný“ nejsou míněny tak, aby vylučovaly směsi polynukleotidů nebo polypeptidů s látkami, které nejsou asociovány s polynukleotidy nebo polypeptidy v přírodě.

„Nativní“ polypeptidy, proteiny nebo molekuly nukleových kyselin SFRP označují SFRP izolované ze zdroje vyskytujícího se v přírodě nebo „standardního typu“.

„Prostředek“ má znamenat kombinaci účinné látky, tj. SFRP podle předkládaného vynálezu, a další sloučeniny nebo prostředku, inertního (například detekovatelná látka nebo značka) nebo aktivního, jako je adjuvans.

„Farmaceutický prostředek“ má zahrnovat kombinaci SFRP, zvláště SFRP-1 jako účinné látky s nosičem, inertním nebo aktivním, který upraví prostředek do vhodné formy pro diagnostické nebo terapeutické použití *in vitro*, *in vivo* nebo *ex vivo*.

Jak se zde používá, termín „farmaceuticky přijatelný nosič“ zahrnuje jakýkoli ze standardních farmaceutických nosičů, jako je fyziologický roztok s fosfátovým pufrem, voda a emulze, jako je

emulze typu olej ve vodě nebo voda v oleji, a různé typy smáčedel. Prostředky také mohou obsahovat stabilizátory a ochranné látky. Příklady nosičů, stabilizátorů a pomocných látek je možno nalézt v publikaci Martin, Remington's Pharm. Sci. 15. vydání (Mack Publ. co., Easton, 1975).

Termín „nukleová kyselina“, tak jak se týká zde popisovaného SFRP, znamená jednořetězcovou a dvouřetězcovou DNA, cDNA, DNA odvozenou z genomu a RNA stejně jako pozitivní a negativní řetězec nukleové kyseliny, které jsou vzájemně komplementární, včetně protismyslné (antisense) RNA. „Molekula nukleové kyseliny“ je termín používaný zaměnitelně s termínem „polynukleotid“, kde každý z těchto termínů označuje polymerní formu nukleotidů jakékoli délky, buď ribonukleotidy nebo deoxyribonukleotidy, nebo jejich analogy. Zahrnuje také známé typy modifikací, například značky známé v oboru (například Sambrook a další (1989) dále), metylace, „čepičky“, substituce jednoho nebo více přírodně se vyskytujících nukleotidů za analog, mezinukleotidové modifikace jako jsou například modifikace s nenabitými vazbami (například methylkarbamát atd.), modifikace obsahující navázané skupiny, jako jsou například proteiny (včetně například nukleáz, toxinů, protilátek, signálních peptidů atd.), modifikace s interkalačními látkami (například akridin, psoralen atd.), modifikace obsahující látky tvořící cheláty (například kovy, radioaktivní kovy, bor, oxidační kovy atd.), modifikace obsahující alkylační činidla, modifikované vazby (například alfa anomerní nukleové kyseliny atd.) stejně jako nemodifikované formy polynukleotidů. Polynukleotid může být chemicky nebo biochemicky modifikován nebo může obsahovat nukleotidové báze, které se nevyskytují v přírodě nebo jsou derivatizovány. Nukleotidy mohou být komplementární s mRNA kódující polypeptidy. Tyto komplementární nukleotidy zahrnují bez omezení nukleotidy schopné tvořit trojitě šroubovice a protismyslné (antisense) nukleotidy. Rekombinantní polynukleotidy obsahující sekvence, které se jinak nevyskytují v přírodě, jsou tímto vynálezem

poskytovány také, stejně jako změny polypeptidových sekvencí standardního typu, včetně bez omezení změn způsobených delecí, inzercí, substitucí jednoho nebo více nukleotidů nebo fúzí k jiným polynukleotidovým sekvencím.

5 O polynukleotidu SFRP se uvádí, že „kóduje“ polypeptid SFRP, jestliže může být ve svém nativním stavu nebo jestliže je manipulován metodami známými odborníkům v oboru přepsán, a/nebo přeložen pro vytvoření polypeptidu nebo zralého proteinu. Termín polynukleotid bude tedy zahrnovat navíc ke kódujícím sekvencím sekvence potřebné
10 pro zpracování a další sekvence, které nekódují aminokyseliny zralého proteinu. O pozitivním (anti-sense) řetězci takového polynukleotidu je také možno říci, že kóduje tuto sekvenci.

Termín „rekombinantní“ polynukleotid nebo DNA označuje polynukleotid, který se připravuje kombinací dvou jinak oddělených
15 částí sekvence za pomoci umělé manipulace s izolovanými segmenty DNA metodami genetického inženýrství nebo chemickou syntézou. Přitom je možno vzájemně spojit segmenty DNA s požadovanou funkcí za vytvoření požadované kombinace funkcí.

Termín „analog“ DNA, RNA nebo polynukleotidu SFRP označuje
20 makromolekulu; která napodobuje v přírodě se vyskytující polynukleotidy z hlediska formy a/nebo funkce (zvláště ve schopnosti zapojit se do sekvence specifické vodíkové vazby na páry bází na komplementární polynukleotidové sekvenci), ale která se odlišuje od DNA nebo RNA například v tom, že obsahuje neobvyklou nebo
25 v přírodě se nevyskytující bázi nebo pozměněnou kostru, viz například Uhlmann a další (1990), Chemical Reviews 90: 543 - 584.

Termín „izolovaný“, jestliže se vztahuje k molekule nukleové kyseliny SFRP, znamená oddělený od jiných buněčných složek, které jsou normálně intracelulárně asociovány s DNA nebo RNA SFRP
30 nativního nebo standardního typu.

„Hybridizace“ označuje hybridizační reakce, které mohou být prováděny za podmínek rozdílné „stringentnosti“. Podmínky, které zvyšují stringentnost hybridizační reakce jsou široce známé a publikované v oboru, viz například Sambrook a další, výše. Příklady příslušných podmínek zahrnují (v pořadí podle zvyšující se stringentnosti): inkubační teploty 25 °C, 37 °C, 50 °C a 68 °C; koncentrace pufru 10 x SSC, 6 x SSC, 1 x SSC, 0,1 x SSC (kde SSC je 0,15 M NaCl a 15 mM citrátový pufr) a jeho ekvivalenty s použitím jiných pufrů; koncentrace formamidu 0 %, 25 %, 50 % a 75 %, inkubační doby od 5 min do 24 hodin a promývání po stoupající dobu, se zvyšující se frakvencí nebo klesajícími koncentracemi pufru.

„T_m“ je teplota ve stupních Celsia, při které je za podmínek experimentu 50 % polynukleotidového duplexu vytvořeného z komplementárních řetězců navázaného vodíkovými vazbami v antiparalelním směru párováním bází podle Watsona a Cricka, disociováno do jednotlivých řetězců. T_m je možno předpovědět použitím standardního vzorce, například:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log [Na^+] + 0,41 (\% G/C) - 0,61 (\% F) - 600/L$$

kde Na⁺ je koncentrace kationtu (obvykle sodíkového iontu) v mol/l; (% G/C) je počet zbytků G a C jako procento z celkových zbytků v duplexu; (% F) je koncentrace formamidu v roztoku (hmotn./obj.); a L je počet nukleotidů v každém řetězci duplexu.

Termín „stabilní duplex“ polynukleotidů nebo „stabilní komplex“ vytvořený mezi jakýmkoli dvěma nebo více složkami při biochemické reakci označuje duplex nebo komplex, který má dostatečnou životnost, aby přetrval mezi vytvořením duplexu nebo komplexu a jeho následnou detekcí. Duplex nebo komplex musí být schopen vydržet jakékoli existující podmínky nebo podmínky, které se vytvoří mezi okamžikem vytvoření a okamžikem detekce. Tyto podmínky jsou závislé na testu nebo reakci, které se provádějí. Podmínky zasahující

do uspořádání, které mohou popřípadě nastat a které mohou rozložit duplex nebo komplex, zahrnují praní, zahřívání, přidávání dalších složek roztoků nebo rozpouštědel do reakční směsi (jako jsou denaturační činidla) a soutěžení s dalšími prvky reakce. Stabilní duplexy nebo komplexy mohou být ireverzibilní nebo reverzibilní, ale musí splňovat další požadavky této definice. Přechodný komplex se tedy může vytvořit v reakční směsi, ale nevytvoří stabilní komplex, jestliže spontánně nebo v důsledku nově zavedené podmínky nebo manipulace před detekcí disociuje.

Jestliže se vytvoří stabilní duplexy v antiparalelní konfiguraci mezi dvěma jednořetězcovými polynukleotidy, zvláště za podmínek vysoké stringentnosti, řetězce jsou v podstatě „komplementární“. Dvořetězcový polynukleotid může být „komplementární“ s jiným polynukleotidem, jestliže se může vytvořit stabilní duplex mezi jedním z řetězců prvního polynukleotidu a druhého polynukleotidu. Komplementární sekvence předpovězená ze sekvence jednořetězcového polynukleotidu je optimální sekvence standardních polynukleotidů, u které se očekává, že vytvoří vodíkovou vazbu s jednořetězcovým polynukleotidem podle obecně přijímaných pravidel párování bází.

Termín „negativní“ (sense) a „pozitivní“ (antisense) řetězec, jestliže se používá ve stejné souvislosti, označuje jednořetězcové polynukleotidy SFRP, které jsou vzájemně komplementární. Může jít o protější řetězec dvořetězcového polynukleotidu, nebo může být jeden řetězec předpovězen ze druhého podle obecně přijímaných pravidel párování bází. Pokud není specifikováno nebo ze souvislosti nevyplývá jinak, označení jednoho nebo druhého řetězce jako „negativního“ nebo „pozitivního“ je arbitrární.

Lineární sekvence nukleotidů SFRP je „identická“ s jinou lineární sekvencí, jestliže je v obou sekvencích stejné pořadí nukleotidů, a nedochází k substituci, delecí nebo podstatné (material) substituci.

Je třeba rozumět, že purinové a pyrimidinové dusíkaté báze s podobnými strukturami mohou být funkčně ekvivalentní z hlediska párování bází podle Watsona a Cricka; a vzájemné substituce podobných dusíkatých bází, zvláště uracilu a thyminu, nebo
5 modifikace dusíkatých bází například methylací, nevytváří podstatnou substituci. RNA a DNA polynukleotidy mají identické sekvence, jestliže sekvence pro RNA odráží pořadí dusíkatých bází v polyribonukleotidu, sekvence DNA odráží pořadí dusíkatých bází v polydeoxyribonukleotidu a tyto dvě sekvence splňují další požadavky
10 této definice. Jestliže je alespoň jedna ze sekvencí degenerovaný oligonukleotid obsahující nejednoznačný zbytek, dvě sekvence jsou identické, jestliže alespoň jedna z alternativních forem degenerovaného oligonukleotidu je identická se sekvencí, se kterou se porovnává. Například AYAAA (SEQ ID No. 3) je identická s ATAAA
15 (SEQ ID No. 4), jestliže AYAAA (SEQ ID No. 5) je směs ATAAA (SEQ ID No. 6) a ACAAA (SEQ ID No. 7).

Jestliže se provádí porovnání mezi polynukleotidy, rozumí se, že se snadno vytvářejí komplementární řetězce, a zvolí se nebo předpoví se negativní nebo pozitivní řetězec, který maximalizuje stupeň identity
20 mezi porovnávanými polynukleotidy. Například jestliže jsou jeden nebo oba polynukleotidy, které se porovnávají dvojřetězcové, sekvence jsou identické, jestliže je jeden řetězec prvního polynukleotidu identický s jedním řetězcem druhého polynukleotidu. Podobně, jestliže se polynukleotidová sonda označuje jako identická se svým cílem, rozumí se,
25 že jde o komplementární řetězec k cílovému řetězci, který se účastní při hybridizační reakci mezi sondou a cílem.

Lineární sekvence nukleotidů je „v podstatě identická“ nebo „ekvivalentní“ k jiné lineární sekvenci, jestliže jsou obě sekvence schopné hybridizovat za vytvoření duplexů se stejným
30 komplementárním polynukleotidem. Mělo by být zřejmé, i když to není vždy explicitně uvedeno, že jestliže přihlašovatelé uvádějí specifickou molekulu nukleové kyseliny, jsou zahrnuty také její ekvivalenty.

Sekvence, které hybridizují za podmínek vyšší stringentnosti, jsou výhodnější. Rozumí se, že hybridizační reakce mohou zahrnovat inserce, delece a substituce nukleotidové sekvence. Lineární sekvence nukleotidů mohou být tedy v podstatě identické, jestliže některý
5 z nukleotidových zbytků přesně neodpovídá nebo nesouhlasí. Sekvence, které odpovídají nebo souhlasí těsněji se zde popisovaným vynálezem, jsou výhodnější. Obecně je polynukleotidová oblast o délce přibližně 25 zbytků v podstatě identická s jinou oblastí, jestliže sekvence mají identitu alespoň přibližně 80 %; výhodněji jestliže mají
10 identitu alespoň přibližně 90 %; ještě výhodněji jestliže mají identitu alespoň přibližně 95 %; a ještě výhodněji, jestliže jsou sekvence 100% identické. Polynukleotidová oblast obsahující 40 zbytků nebo více bude v podstatě identická s jinou oblastí po uspořádání homologních částí, jestliže mají sekvence identitu alespoň přibližně 75 %;
15 výhodněji, jestliže mají identitu alespoň přibližně 80 %; ještě výhodněji, jestliže mají identitu alespoň přibližně 85 %; ještě výhodněji, jestliže mají identitu alespoň přibližně 90 % a ještě výhodněji, jestliže jsou sekvence 100% identické.

Při zjišťování, zda jsou polynukleotidové sekvence v podstatě
20 identické, je zvláště výhodná sekvence, která si zachovává funkčnost polynukleotidu, se kterým se srovnává. Funkčnost může být zjišťována různými parametry. Například jestliže se má polynukleotid používat při reakcích, které zahrnují hybridizaci s jiným polynukleotidem, potom jsou výhodné sekvence takové, které hybridizují se stejným cílem za
25 podobných podmínek. Obecně platí, že T_m duplexu DNA klesá o přibližně 10 °C na každý jednocentní pokles v identitě sekvence pro duplex o délce 200 nebo více zbytků; nebo o přibližně 50 °C pro duplexy o délce méně než 40 zbytků, v závislosti na poloze nestejných zbytků (viz například Meinkoth a další). V podstatě identické nebo
30 ekvivalentní sekvence o délce přibližně 100 zbytků budou tvořit obecně stabilní duplex s každou další případnou komplementární sekvencí při přibližně 20 °C nižší teplotě než je T_m ; s výhodou budou

tvorit stabilní duplex při přibližně 15 °C nebo nižší teplotě, výhodněji budou tvorit stabilní duplex při teplotě přibližně 10 °C nebo nižší teplotě, ještě výhodněji budou tvorit stabilní duplex při teplotě přibližně 5 °C nebo nižší teplotě; a ještě výhodněji budou tvorit stabilní duplex při teplotě přibližně T_m . V dalším příkladu, jestliže je polypeptid kódovaný polynukleotidem důležitou částí jeho funkčnosti, potom jsou výhodné sekvence takové sekvence, které kódují identické nebo v podstatě identické polypeptidy. Odlišnosti v nukleotidech, které způsobí konzervativní substituci aminokyseliny, jsou výhodné proti rozdílům, které způsobí nekonzervativní substituci aminokyselin, rozdíly v nukleotidech, které nemění sekvenci aminokyselin jsou výhodnější, zatímco identické nukleotidy jsou ještě výhodnější. Inzerce nebo delece v polynukleotidu, které vedou k inzercím nebo delecím v polypeptidu, jsou výhodnější proti změnám, které vedou ke změně kódujících oblastí ve směru translace mimo čtecí rámec; polynukleotidové sekvence neobsahující žádné inzerce nebo delece jsou ještě výhodnější. Relativní důležitost hybridizačních vlastností a kódované polypeptidové sekvence polynukleotidu závisí na použití vynálezu.

Polynukleotid má stejné vlastnosti nebo je ekvivalentem jiného polynukleotidu, jestliže jsou oba schopny vytvořit stabilní duplex s určitým třetím nukleotidem za podobných podmínek maximální stringentnosti. S výhodou také polynukleotidy navíc k podobným hybridizačním vlastnostem kódují v podstatě identické polypeptidy.

„Konzervované“ zbytky polynukleotidové sekvence jsou takové zbytky, které se vyskytují nezměněné ve stejné poloze u dvou nebo více příbuzných porovnávaných sekvencí. Zbytky, které jsou relativně konzervované, jsou takové zbytky, které jsou konzervované mezi příbuznějšími sekvencemi než zbytky, které se objevují kdekoli v sekvencích.

„Příbuzné“ polynukleotidy jsou polynukleotidy, které sdílejí podstatnou část identických zbytků.

Jak se zde používá, „degenerovaná“ oligonukleotidová sekvence je navržená sekvence odvozená od alespoň dvou příbuzných
5 původních polynukleotidových sekvencí následujícím způsobem: zbytky, které jsou konzervované ve výchozích sekvencích, jsou v degenerované sekvenci zachovány, zatímco zbytky, které nejsou ve výchozích sekvencích konzervované, mohou být poskytnuty v degenerované sekvenci v několika alternativách. Například
10 degenerovaná sekvence AYASA (SEQ ID No. 8) může být vytvořena z výchozích sekvencí ATACA (SEQ ID No. 9) a ACAGA (SEQ ID No. 10), kde Y je C nebo T a S je C nebo G. Y a S jsou příklady „nejednoznačných“ zbytků. Degenerovaný segment je segment polynukleotidu obsahující degenerovanou sekvenci.

15 Rozumí se, že syntetický oligonukleotid obsahující degenerovanou sekvenci je ve skutečnosti směs úzce příbuzných oligonukleotidů sdílejících identickou sekvenci kromě nejednoznačných poloh. Takový oligonukleotid se obvykle syntetizuje jako směs všech možných kombinací nukleotidů v nejednoznačných
20 polohách. Každý z oligonukleotidů ve směsi se označuje jako „alternativní forma“.

„Fragment“ nebo „inzerť“ polynukleotidu, jak se zde používá, znamená obecně podoblast formy s úplnou délkou, ale může být také zahrnuta plná délka polynukleotidu.

25 Rozdílné polynukleotidy si vzájemně „odpovídají“, jestliže je jeden zcela odvozen od druhého. Například mRNA odpovídá genu, ze kterého je přepsána. cDNA odpovídá RNA, ze které byla vytvořena, například reakcí reverzní transkripce nebo chemickou syntézou DNA na základě znalosti sekvence RNA. cDNA také odpovídá genu, který
30 kóduje RNA. Polynukleotidy si také vzájemně „odpovídají“, jestliže

slouží podobné funkci, jako je kódování příbuzného polypeptidu u různých druhů, kmenů nebo variant, které se porovnávají.

Termín „sonda“, jestliže se používá v souvislosti s manipulací s polynukleotidem SFRP označuje oligonukleotid, který je poskytován
5 jako reakční činidlo pro detekci cíle potenciálně přítomného ve sledovaném vzorku, s využitím hybridizace s cílem. Sonda bude obvykle obsahovat značku nebo prostředek, pomocí kterého může být značka navázána, buď před nebo po hybridizační reakci. Mezi vhodné značky bez omezení patří radioisotopy, fluorochromy,
10 chemiluminiscenční sloučeniny, barviva a proteiny včetně enzymů.

„Primer“ je oligonukleotid, obecně s volnou skupinou 3'-OH, který se váže na cíl potenciálně přítomný ve sledovaném vzorku pomocí hybridizace s cílem, a následně podporuje polymeraci polynukleotidu komplementárního s cílem.

15 Procesy produkce replikovaných kopií stejného polynukleotidu, jako je PCR nebo klonování genů, se souhrnně označují v předkládané přihlášce jako „amplifikace“ nebo „replikace“. Například jednořetězcová nebo dvojřetězcová DNA může být replikována za vytvoření další DNA se stejnou sekvencí. RNA může být replikována
20 například RNA polymerázou řízenou RNA nebo reverzní transkripcí DNA a potom provedením PCR. V tomto naposledy uvedeném případě má amplifikovaná kopie DNA identickou sekvenci jako DNA.

„Polymerázová řetězová reakce“ (PCR) je reakce, při které se vytvářejí replikované kopie cílového polynukleotidu použitím jednoho
25 nebo více primerů a katalyzátoru polymerace jako je reverzní transkriptáza nebo DNA polymeráza, a zvláště teplotně stabilního polymerázového enzymu. PCR obecně zahrnuje opakované provádění tří kroků: „teplotní hybridizace“ (annealing), při které se upraví teplota tak, že oligonukleotidové primery mohou vytvořit duplex
30 s amplifikovaným polynukleotidem; „prodlužování“ (elongace), při kterém se teplota upraví tak, že oligonukleotidy, které vytvořily duplex,

se prodlužují působením DNA polymerázy při použití polynukleotidu, se kterým byl vytvořen duplex, jako templátu; a „tání“ (melting), při kterém se teplota upraví tak, že polynukleotid a prodloužené oligonukleotidy disociují. Cyklus se potom opakuje, dokud se nezíská požadované množství amplifikovaného polynukleotidu. Způsoby provádění PCR se popisují v US patentech No. 4,683,195, Mullis a 4,683,202, Mullis a další.

Prvky uvnitř genu zahrnují bez omezení promotorové oblasti, zesilující oblasti, oblasti pro vazbu represoru, místa iniciace transkripce, vazebná místa pro ribosom, místa iniciace translace, oblasti kódující protein, introny a exony, a místa ukončení (terminace) transkripce a translace. „Pozitivní“ (antisense) kopie určitého polynukleotidu označuje komplementární sekvenci, která je schopná vázat se vodíkovými vazbami na tento polynukleotid, a může být tedy schopna modulovat expresi tohoto polynukleotidu. Patří sem DNA, RNA nebo jejich analogy, včetně analogů se změněnými kostrami, jak se popisuje výše. Polynukleotid, na který se pozitivní kopie váže, může být v jednořetězcové nebo ve dvouřetězcové formě.

Jak se zde používá, termín „operativně navázaný“ znamená, že molekula DNA je umístěna vzhledem k nezbytným řídícím sekvencím, například promotoru nebo zesilující sekvenci takovým způsobem, že promotor bude řídit transkripci RNA z molekuly DNA stabilním nebo přechodným způsobem.

„Vektor“ znamená samostatně se replikující molekulu nukleové kyseliny, která přenáší vloženou molekulu nukleové kyseliny do a/nebo mezi hostitelské buňky. Tento termín má zahrnovat vektory, které fungují primárně pro replikaci nukleové kyseliny a expresní vektory, které fungují pro transkripci a/nebo translaci DNA nebo RNA. Jsou zahrnuty také vektory, které poskytují více než jednu z výše uvedených funkcí.

„Hostitelská buňka“ má zahrnovat jakoukoli individuální buňku nebo buněčnou kulturu, která může být nebo byla příjemcem vektoru nebo do které byly zavedeny exogenní molekuly nukleových kyselin a/nebo proteiny. Má také zahrnovat potomstvo jediné buňky, přičemž
5 toto potomstvo nemusí být nezbytně zcela identické (z hlediska morfologie nebo genomové nebo veškeré DNA) s původní rodičovskou buňkou v důsledku přirozených, náhodných nebo řízených mutací.

„Protilátka“ je molekula imunoglobulinu schopná vazby na antigen. Jak se zde používá, tento termín zahrnuje nejen intaktní
10 molekuly imunoglobulinu, ale také antiidiotypické protilátky, mutanty, fragmenty, fúzní proteiny, humanizované proteiny a modifikace molekuly imunoglobulinu, která obsahuje rozpoznávací místo pro antigen s požadovanou specificitou.

„Komplex protilátky“ je kombinace protilátky (jak bylo definováno
15 výše) a jejího vazebného partnera nebo ligandu.

„Vhodná buňka“ pro účely předkládaného vynálezu je taková buňka, která zahrnuje bez omezení buňku exprimující SFRP, například buňku kostní dřeně, s výhodou buňku hOB.

„Biologický ekvivalent“ molekuly nukleové kyseliny je zde
20 definován jako molekula, která je v podstatě identická s referenční molekulou nukleové kyseliny. Fragment referenční molekuly nukleové kyseliny je jedním příkladem biologického ekvivalentu.

„Biologický ekvivalent“ polypeptidu nebo proteinu SFRP je polypeptid nebo protein, který si zachovává stejné vlastnosti jako
25 referenční protein nebo polypeptid. Zahrnuje také fragmenty referenčního proteinu nebo polypeptidu.

Proteiny a polypeptidy SFRP mohou být také získány chemickou syntézou použitím komerčně dostupného automatického syntezátoru peptidů, jako jsou přístroje vyráběné firmou Applied Biosystems, Inc.,
30 Model 430A nebo 431A, Foster City, CA a aminokyselinové sekvence

poskytnuté v SEQ ID No. 2. Syntetizovaný protein nebo polypeptid může být srážen a dále čištěn, například kapalinovou chromatografií s vysokou účinností (HPLC). Předkládaný vynález tedy také poskytuje způsob chemické syntézy proteinů podle vynálezu poskytnutím
5 sekvence proteinu (například SEQ ID No. 2) a reakčních činidel, jako jsou aminokyseliny a enzymy, a vzájemným navázáním aminokyselin ve správné orientaci a lineární sekvenci.

Proteiny a polypeptidy mohou být alternativně získány známými rekombinačními metodami, jak se například popisuje v Sambrook
10 a další, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. vydání (Cold Spring Harbor Laboratory (1989), s použitím například systémů hostitelských buněk a vektorů popisovaných výše a uváděných jako příklady dále. Předkládaný vynález dále poskytuje způsob výroby SFRP, jeho analogu, muteinu nebo fragmentu, pěstováním hostitelské
15 buňky obsahující molekulu nukleové kyseliny kódující požadovaný protein, kde tato nukleová kyselina je operativně navázána na promotor transkripce RNA. Požadovaný protein může být do hostitelské buňky zaveden použitím genového konstrukt, který obsahuje promotor a terminační sekvenci pro sekvenci nukleové
20 kyseliny požadovaného proteinu. Hostitelská buňka se pěstuje za vhodných podmínek, takže dochází k transkripci a translaci nukleové kyseliny na protein. V dalším provedení se protein dále čistí.

Proteiny podle předkládaného vynálezu mohou být také kombinovány s různými nosiči v kapalně fázi, jako jsou sterilní nebo
25 vodné roztoky, farmaceuticky přijatelné nosiče, suspenze a emulze. Příklady nevodných rozpouštědel zahrnují propylethylenglykol, polyethylethylenglykol a rostlinné oleje. Při použití pro přípravu protilátek mohou také nosiče zahrnovat adjuvans, které je použitelné pro nespecifické posílení specifické imunitní odpovědi. Odborník v oboru
30 může snadno určit, zda je adjuvans nutné, a vybrat vhodnou látku. Pouze pro účely ilustrace však mezi vhodná adjuvans patří bez

omezení Freundovo kompletní a nekompletní adjuvans, minerální soli a polynukleotidy.

Léčebná využití proteinů SFRP/SARP

5 Ačkoli skupina genů SFRP/SARP byla objevena pouze nedávno, a stále zbývá získat mnoho poznatků o její biologii, pro tyto proteiny nicméně existuje několik potenciálních terapeutických použití. Protože se předpokládá funkce proteinů Wnt jako protoonkogenů, proteiny SFRP/SARP mohou sloužit jako látky potlačující tumory pro jejich
10 schopnost antagonizovat aktivitu Wnt. Tyto proteiny mohou být také použity při regeneraci tkání. Protože například FrzB-1 stimuloval ektopickou chondrogenní aktivitu in vivo, mohl by být použit pro urychlení hojení fraktur nebo uzdravování kloubů po náhradě kyčle a kolena (patentová přihláška WO 98/16641 A1). Konečně, protože se
15 zdá, že proteiny SFRP/SARP řídí apoptózu, tyto proteiny by také mohly být použity pro léčení celé řady degenerativních onemocnění včetně neurodegenerace, myodegenerace a osteodegenerace.

Farmaceutické prostředky

20 Předkládaný vynález také poskytuje prostředky obsahující kterýkoli z výše uvedených proteinů, muteinů, fragmentů, protilátek, molekuly nukleových kyselin kódující tyto proteiny, muteiny, protilátky nebo jejich fragmenty, stejně jako vektory a hostitelské buňky, které exprimují tyto molekuly nukleových kyselin, a přijatelný pevný nebo
25 kapalný nosný pufr nebo ředivo. Používá se účinné množství jedné nebo více účinných složek, které dostačuje pro vytvoření požadovaného regulačního účinku na aktivitu při tvorbě kostí nebo aktivitu při apoptóze. Účinné množství může být určeno na základě běžných křivek vyjadřujících závislost odpovědi na dávce pro
30 požadovanou aktivitu. Jestliže se prostředky používají farmaceuticky,

kombinují se pro diagnostické a terapeutické použití s „farmaceuticky přijatelným nosičem“. Vytvoření takových prostředků je odborníkům v oboru dobře známé. Farmaceutické prostředky podle vynálezu mohou obsahovat jednu nebo více dalších účinných složek, a s výhodou obsahují farmaceuticky přijatelný nosič. Může být poskytnuta další účinná složka, aby spolupůsobila v kombinaci s aktivní složkou založenou na jednom nebo více proteinech SFRP jak je popsáno výše. V alternativních provedeních se přidává další účinná látka proto, že působí na stejné onemocnění nebo poruchu jako látky SFRP, ale odlišným mechanismem působení než účinné látky založené na SFRP, nebo může další účinná látka působit na další onemocnění nebo poruchy, kterými člověk nebo zvíře trpí. Mezi vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče a/nebo řediva patří všechna běžná rozpouštědla, disperzní prostředí, plniva, pevné nosiče, vodné roztoky, povlaky, antibakteriální a antifungální látky, látky upravující isotonický stav a zpožďující absorpci apod. Termín „farmaceuticky přijatelný nosič“ označuje nosič, který u pacientů, jimž se podává, nezpůsobuje alergickou reakci nebo jiný nežádoucí efekt. Mezi vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče patří například jedna nebo více látek ze skupiny voda, fyziologický roztok, fyziologický roztok s fosfátovým pufrem, dextróza, glycerol, ethanol apod., stejně jako jejich kombinace. Farmaceuticky přijatelné nosiče mohou dále obsahovat menší množství pomocných látek jako jsou smáčedla nebo emulgátory, ochranné látky nebo pufry, které zvyšují skladovatelnost prostředku nebo účinnost jedno nebo více účinných složek prostředku. Použití těchto prostředků a látek pro farmaceuticky účinné látky je v oboru dobře známé. Kromě případů, kdy není kterýkoli běžné médium nebo prostředek kompatibilní s účinnou složkou, se předpokládá použití těchto látek v imunogenních prostředcích podle předkládaného vynálezu.

Tyto prostředky mohou být také použity pro výrobu farmaceutických prostředků pro diagnózu a léčení patologických stavů

souvisejících s neurodegenerativními poruchami (tj. Huntingtonova choroba, Alzheimerova choroba, poranění míchy), myodegenerativními poruchami (tj. svalová dystrofie, myasthenia gravis, myotonické myopatie) a osteodegenerativními poruchami (tj. osteoporóza).

5 V některých provedeních se v prostředku pro léčení kteréhokoli z výše uvedených stavů nebo poruch používají protilátky, které vážou veškerý nebo část proteinu SFRP. Polyklonální a monoklonální protilátky mohou být připraveny běžnými způsoby. Obecně se připraví protilátka proti sekvenci aminokyselin, která je (a) specifická pro protein nebo

10 proteiny SFRP, a (b) pravděpodobně také antigenní. Odborník v oboru může zvolit sekvenci specifickou pro protein SFRP provedením analýzy sekvence a použitím jakýchkoli běžných programů pro uspořádání a porovnání sekvencí. Aminokyselinová sekvence, která je na jednom nebo více koncích, s výhodou na obou koncích hydrofilní,

15 je obecně pro vytváření protilátek výhodná. Navíc k použití aminokyselin, které jsou hydrofilní, jsou výhodná provedení hydrofilních aminokyselin také bázecká (nekyselá). Je také možno použít jakoukoli aminokyselinu, která zvyšuje antigenicitu. Například v centrální části sekvence se často používají proliny. Antigenicita

20 může být měřena zvýšením nebo snížením množství protilátky, která se vytvoří jestliže se vytvářejí protilátky proti počáteční testovací sekvenci, kterou je specifický protein nebo proteiny SFRP. V některých provedeních podle předkládaného vynálezu se vyvolá vznik protilátky proti sekvenci obsahující alespoň osm za sebou následujících

25 aminokyselin proteinu nebo proteinů SFRP, a s výhodou proti sekvenci obsahující alespoň 10 za sebou následujících aminokyselin proteinu nebo proteinů SFRP. V dalších výhodných provedeních se vytvoří protilátka proti aminokyselinové sekvenci obsahující přibližně 15 až přibližně 30 aminokyselin. Ve výhodných provedeních se vytvoří

30 protilátka proti sekvenci obsahující aminokyseliny 217 až 231 proteinu SFRP SEQ ID No. 2 nebo variantám této sekvence.

Prostředky podle předkládaného vynálezu mohou být podávány jednotlivci v případě potřeby dosažení růstu nervů, svalů, chrupavky a kostí řadou způsobů, včetně bez omezení intravenózního, subkutánního, intramuskulárního, intratekálního, intrakraniálního a topického. Prostředek může být podáván přímo do orgánu nebo buněk orgánu metodami *in vivo* nebo *ex vivo*.

Tyto prostředky mohou být rozpustné nebo mohou být ve formě mikročástic nebo mohou být zahrnuty do mikrokuliček nebo mikrováčků, včetně micel a liposomů.

Průmyslová využitelnost

Výše popisované prostředky poskytují součásti testu pro screening účinných látek a farmaceutických prostředků, které mají agonistické nebo antagonistické účinky na receptor Wnt ve vhodné buňce.

Předpokládá se také, že polynukleotidy SFRP podle vynálezu budou použitelné jako diagnostické látky pro detekci genetických abnormalit souvisejících s geny kódujícími SFRP nebo s jedním nebo více geny, které se účastní při signální biochemické cestě Wnt. Tyto genetické abnormality zahrnují bodové mutace, delece nebo inserce nukleotidů. Kterýkoli z několika postupů genetického screeningu může být upraven pro použití se sondami podle předkládaného vynálezu včetně analýzy polymorfismu délky restrikčního fragmentu (restriction fragment length polymorphism, RFLP), ligázové řetězové reakce nebo PCR. Mutace v tomto genu naznačují možnost zvýšení rizika vývojových abnormalit.

Jak bude podrobněji popsáno dále, proteiny a jejich fragmenty jsou použitelné v bezbuněčném i buněčném testovacím systému *in vitro* pro screening na účinné látky a farmaceutické sloučeniny, které buď inhibují nebo zesilují biochemickou cestu receptoru Wnt

a apoptózu a pro testování možných způsobů léčení onemocnění souvisejících s touto biochemickou cestou, například onemocnění tvorby kostí, karcinogeneze a kardiovaskulárních onemocnění. Je také možno modulovat embryogenezi.

5 Testy pro screening léčiv mohou být používány pro identifikaci aktivátorů nebo inhibitorů proteinu SFRP. Například zvýšení růstu chrupavky v přítomnosti léčiva v porovnání se samotným SFRP může ukazovat na aktivaci SFRP, zatímco pokles může naznačovat inhibici aktivity SFRP.

10 Způsoby podle předkládaného vynálezu je možno provádět screening celé řady sloučenin. Patří sem peptidy, makromolekuly, malé molekuly, chemické látky a biologické směsi. Těmito sloučeninami mohou být biologické, syntetické, organické nebo anorganické sloučeniny.

15 V rámci předkládaného vynálezu se pro přípravu diagnostických testů používají vhodné buňky pro expresi proteinů SFRP nebo pro přípravu diagnostických kitů založených na nukleotidech. Buňky mohou být vyráběny nebo odvozeny od kvasinek, bakterií, hub nebo virů. Ve výhodných provedeních jsou buňkami buňky hOB, zvláště
20 nová imortalizovaná preosteocytická buněčná linie označovaná jako hOB-01-C1-PS-09 (uložená ve sbírce American Type Culture Collection in Manassas, Va, pod označením PTA-785) a buňky osteoblastů s identifikačními vlastnostmi buněk hOB-01-C1-PS-09, stejně jako buňky osteoblastů připravené z těchto buněk, například
25 jejich potomci. Označení imortalizovaný se týká v podstatě kontinuální a permanentně udržované buněčné kultury v podstatě s neomezenou schopností buněčného dělení. To znamená, že buňky mohou být kultivovány v podstatě donekonečna, tj. alespoň přibližně 6 měsíců za
30 podmínek rychlého růstu, s výhodou mnohem déle za podmínek pomalejšího růstu, a mohou být rychle a kontinuálně rozmnožovány použitím rutinních technik kultivace buněk. Jinými slovy, buňky podle

předkládaného vynálezu mohou být kultivovány po alespoň 100, 150 nebo 200 zdvojení populace. Tyto buňky poskytují komplement proteinů charakteristický pro normální lidské osteoblastické buňky a jsou schopny osteoblastické diferenciaci. Mohou být použity ve studiích kultivace buněk pro zjišťování citlivosti osteoblastických buněk na různé látky, jako jsou hormony, cytokiny a růstové faktory, nebo při tkáňové terapii. Tyto buňky jsou postsenescentní subklon buněčné linie hOB-O1-C1, jak bylo dříve popsáno v Bodine a další, 1996, Endocrinology 137: 4592 - 4604.

Protože proteiny SFRP jsou, jak se zde uvádí, nové cíle pro léčiva na osteoporózu, některá provedení se týkají exprese genů nebo nukleových kyselin, které kódují celý nebo část alespoň jednoho proteinu SFRP. Exprese těchto nukleových kyselin nebo genů v buněčných liniích lidských osteoblastů (hOB) koreluje s urychlenou smrtí buněk a apoptózou. Buňky hOB-01-C1-PS-09 podle předkládaného vynálezu jsou zvláště výhodné ve srovnání s jinými buňkami hOB proto, že tyto buňky typu „-09“ jsou dospělé buňky osteoblastů. Navíc jsou tyto buňky osteocytické (tj. zralé buňky) ve srovnání s jinými buňkami hOB, které jsou často osteoblastické. Navíc exprimují buňky hOB-01-C1-PS-09 velmi nízké hladiny mRNA pro FRP-1/SARP-2. Z toho vyplývá, že buněčná linie hOB-01-C1-PS-09 bude v modelu in vitro jedinečná pro studium účinků znovuzavedení a nadměrné exprese FRP-1/SARP-2. Další důležitou vlastností buněk hOB-01-C1-PS-09 je to, že mohou být použity pro studie jak přechodné, tak i stabilní transfekce. Některé z mnoha výhod těchto buněk proti rodičovským buňkám hOB-01-C1 jsou: buňky hOB-01-C1-PS-09 jsou skutečně nesmrtelné, dělí se dva až třikrát rychleji při 34 °C a stále si zachovávají mnoho z preosteocytických vlastností rodičovských buněk.

Buňky hOB-01-C1-PS-09 budou použitelné pro vytvoření stabilních buněčných linií s nadměrnou expresí potenciálních cílů pro léčiva proti osteoporóze. Tyto stabilní buněčné linie budou potom

cenné pro charakterizaci těchto cílů pro léčiva stejně jako pro vývoj vysoce výkonných metod screeningu a testů pro identifikaci sloučenin, které je řídí.

5 Přehled obrázků na výkresech

Obr. 1 ukazuje výsledky pro osteogenní fragment RADE, které vedly k objevení cDNA lidského, osteoblasty (hOB) sekrenovaného proteinu příbuzného s proteiny frizzled (SFRP). Obr. ukazuje autoradiogramy gelů z metody differential-display PCR (DD-PCR) z experimentů prováděných se třemi buněčnými liniemi hOB (hOB-03-C5, hOB-03-CE6 a hOB-01-C1) ve třech různých stupních diferenciaci (stupeň proliferace, stupeň maturace a preosteocytický stupeň). Šipka ukazuje na fragment genu hOB SFRP o délce 276 párů bází (bp) (tj. fragment RADE), který je vzestupně regulován působením PGE_2 v buňkách hOB-03-C5 a hOB-03-CE6, ale sestupně regulován působením $\text{TGF-}\beta 1$ v buňkách hOB-01-C1. Je také vidět, že buňky hOB-01-C1 exprimují vysoké základní hladiny tohoto genu. Hledání programem basic local alignment search tool (BLAST) tohoto genového fragmentu ve veřejných databázích ukázalo, že tato cDNA byla homologní s geny myšího SFRP-1 a hovězího FrzA.

Obr. 2 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z buněk hOB-03-C5 po působení kontroly, PTH, PGE_2 a TGF-B1 po dobu 24 hod. Při tomto experimentu byly jako sondy použity jak vyříznutý genový fragment hOB SFRP RADE, tak cDNA klonované glyceraldehydfosfátdehydrogenázy (GAPDH). Šipka ukazuje na hOB SFRP mRNA (~ 4,4 kb), která je úplně vzestupně regulována působením PGE_2 na buňky.

Obr. 3 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z buněk hOB-03-C5 po působení kontroly, PGE_2 a $\text{TGF-}\beta 1$ po dobu 24 hod. Při tomto experimentu byly jako sondy

použity jak klonovaný fragment genu hOB SFRP RADE, tak i klonovaná GAPDH cDNA. I v tomto případě dochází k úplné vzestupné regulaci hOB SFRP mRNA působením PGE₂ na buňky.

Obr. 4 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z buněk hOB-03-CE6 nebo hOB-01-C1 po působení kontroly PTH, PGE₂ a TGF-β1 po dobu 24 hod. Při tomto experimentu byly jako sondy použity jak vyříznutý fragment genu hOB SFRP RADE, tak i cDNA klonované GAPDH. Šipka ukazuje na hOB SFRP mRNA, která je úplně vzestupně regulována působením PGE₂ na buňky hOB-03-CE6, ale je sestupně regulována působením PTH na buňky hOB-01-C1. Je také vidět, že buňky hOB-01-C1 exprimují vysoké základní hladiny mRNA.

Obr. 5 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z buněk hOB-01-C1 po působení kontroly a TGF-β1 po dobu 24 hod. Při tomto experimentu byly jako sondy použity jak cDNA klonovaného hOB SFRP s úplnou délkou (1,1 kb), tak i cDNA klonovaného beta-aktinu. Výsledky ukazují, že hOB SFRP mRNA je sestupně regulována působením TGF-β1 na buňky. Opět je zde vidět, že buňky hOB-01-C1 exprimují vysoké základní hladiny mRNA.

Obr. 6 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z 23 různých lidských tkání. Při tomto experimentu byly jako sondy použity jak vyříznutý fragment genu hOB SFRP RADE, tak i cDNA klonovaného beta-aktinu. Šipka ukazuje na hOB SFRP mRNA, která je ve velké míře exprimována v srdci a ledvině, mírně exprimována v placentě a děloze a s nízkou hladinou exprimována v mozku, pankreatu a jiných tkáních, ale není exprimována v thymu a lymfocytech.

Obr. 7 ukazuje autoradiogram northernového přenosu polyA+ RNA izolované z buněk SaOS-2 podobných osteoblastům lidského osteosarkomu a kultur explantátů normálních lidských osteoblastů (hOB) po působení kontroly, PTH, PGE₂ a TGF-β1 24 hod. Při tomto

experimentu byly jako sondy použity jak cDNA klonovaného SFRP hOB, tak cDNA klonovaného GAPDH. Výsledky ukazují, že buňky SaSO-2 exprimují nízké základní hladiny hOB SFRP mRNA, které nejsou regulovány těmito prostředky. Naopak buňky hOB exprimují střední hladiny této mRNA, která je vzestupně regulována působením PGE₂. TaqMan kvantitativní analýza RT-PCR buněk hOB po působení PGE₂ ukázala, že působením PGE₂ došlo k desetinásobné vzestupné regulaci SFRP mRNA.

Obr. 8 ukazuje autoradiogram Southernova přenosu produktů PCR s reverzní transkriptázou (RT)-PCR z celkové RNA izolované buď z lidské placenty nebo buněk hOB-03-CE6, po působení kontrolou nebo PGE₂ 24 hod. RT-PCR byla prováděna s oligonukleotidovými primery, které byly specifické pro lidský FRP-1/SARP-2, a Southernův přenos byl hybridizován s vnitřní oligonukleotidovou sondou specifickou pro lidský FRP-1/SARP-2. Očekávaná velikost pro tento produkt RT-PCR byla 1,1 kb. Výsledky ukazují, že (podle očekávání) placenta exprimuje mRNA FRP-1/SARP-2, a že působením PGE₂ na buňky hOB-03-CE6 dochází k silné vzestupné regulaci exprese této mRNA.

Obr. 9 ukazuje výsledky experimentů buněčné viability u buněk hOB-03-C5, hOB-03-CE6 a hOB-01-C1 s použitím přístroje Coulter cell counter. Výsledky jsou vyjádřeny jako procenta vzhledem ke kontrole v den nula (tj. ~ 200 000 buněk na jamku v šestijamkové destičce). Výsledky tohoto experimentu ukazují, že buňky hOB-03-C5 pomalu proliferují při 39 °C v médiu s obsahem séra, zatímco u buněk hOB-03-CE6 dojde k zastavení dělení, ale jsou životaschopné, šestý den inkubace. Naopak u buněk hOB-01-C1 dochází k urychlené smrti buněk, což je v korelaci s vysokou základní expresí hOB SFRP mRNA v těchto buňkách.

Obr. 10 ukazuje výsledky pro experiment s buněčnou viabilitou s buňkami hOB-03-C5 (část A), hOB-03-CE6 (část B) a hOB-01-C1

(část C) prováděný na přístroji Coulter cell counter. Pro tyto experimenty se na buňky působilo buď kontrolou nebo PGE_2 (části A a B) nebo kontrolou $\text{TGF-}\beta 1$ (část C) v bezsérovém médiu při 39°C 3 nebo 6 dnů. Výsledky jsou vyjádřeny jako procento vzhledem ke kontrole v den 0 (tj. $\sim 200\,000$ buněk/jamku v šestijamkové destičce).
Výsledky v tomto experimentu ukazují, že viabilita buněk hOB klesá v bezsérovém médiu s časem. Navíc je pro buňky hOB-03-C5 a hOB-03-CE6 rychlost poklesu zvyšována působením PGE_2 . Tato zvýšená rychlost smrti buněk je v korelaci se vzestupnou regulací hladin mRNA hOB SFRP v těchto buňkách po působení PGE_2 . Naopak působení $\text{TGF-}\beta 1$ na buňky hOB-01-C1, které sestupně reguluje hladiny mRNA hOB SFRP, životaschopnost zvyšuje.

Obr. 11 ukazuje, že působení PGE_2 na buňky hOB-03-C5 indukuje apoptózu neboli naprogramovanou smrt buněk. Apoptóza byla měřena průtokovou cytometrií s použitím anexinu V-FITC. Část A ukazuje, že počet životaschopných buněk, které se nebarví ani anexinem V, ani propidiumjodidem (barvivo pro nekrotické buňky), klesá se stoupajícími koncentracemi PGE_2 . Naopak část B ukazuje, že počet apoptotických buněk, které se barví anexinem V, ale nikoli propidiumjodidem, stoupá se zvyšujícími se koncentracemi PGE_2 . Podobně část C ukazuje, že počet nekrotických buněk, které se barví jak anexinem B, tak i propidiumjodidem, stoupá se stoupajícími koncentracemi PGE_2 .

Obr. 12 ukazuje výsledky dalšího experimentu s životaschopností (viabilitou) buněk s buňkami hOB-03-C5 (část A) a buňkami hOB-03-CE6 (část B) použitím přístroje Coulter cell counter. Tyto experimenty byly prováděny podobným způsobem jako experiment znázorněný na obr. 10. U tohoto experimentu byly však buňky společně ošetřeny buď kontrolním vehikulem (tj. 0,1% ethanol) nebo PGE_2 v nepřítomnosti negativních (sense) (kontrolních) nebo pozitivních (antisense) fosforothioátových oligonukleotidů zaměřených na místo iniciace pro lidský SARP-2. Výsledky jsou uvedeny jako

procento vzhledem ke kontrole v den 0 (tj. přibližně 200 000 buněk na jamku v šestijamkové destičce) nebo jako procento vzhledem ke kontrole ošetřené vehikulem. Výsledky tohoto experimentu ukazují, že společné ošetření buněk hOB kódujícím oligonukleotidem pro SARP-2 odvrátí schopnost PGE_2 zvyšovat rychlost smrti buněk, přičemž společné ošetření pozitivním (kontrolním) oligonukleotidem na tento proces nemá žádný vliv.

Obr. 13 ukazuje výsledky experimentu s viabilitou buněk hOB-01-C1-PS-09 s použitím přístroje Coulter cell counter (část A). Pro tyto experimenty byly buňky stabilně transfekovány buď savčím expresním plasmidem hOB SFRP cDNA (tj. SFRP-1/FRP-1/SARP-2) nebo prázdným vektorem (tj. pcDNA3.1). Výsledky jsou vyjádřeny jako procento kontrolních buněk v den 0. Výsledky tohoto experimentu ukazují, že nadměrná exprese hOB SFRP/SFRP-1/FRP-1/SARP-2 buňkami hOB zvyšuje rychlost smrti buněk při porovnání s prázdným vektorem, který na tento proces nemá žádný vliv. Část B ukazuje výsledky northernové hybridizace polyA⁺ RNA izolované buď z buněk s prázdným vektorem (V) nebo buněk s nadměrnou expresí SARP-2 (S). Tato analýza ukazuje, že buňky SARP-2 exprimují podstatně více mRNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2 než buňky s vektorem.

Obr. 14 ukazuje výsledky dalšího experimentu s viabilitou buněk prováděného s buňkami hOB-01-C1-PS-09 exprimujícími prázdný vektor (pcDNA3.1) a subklonu buněk (SARP-2 klon #1) s nadměrnou expresí SFRP-1/FRP-1/SARP-2. Část A ukazuje výsledky kvantitativní RT-PCR analýzy TaqMan RNA izolované z buněk. Tato analýza ukazuje, že buňky SARP-2 klon #1 exprimují 50 až 60 x více mRNA lidského SFRP-1/FRP-1/SARP-2 než buňky exprimující prázdný vektor. Podobně, jak je ukázáno v části B, buňky SARP-2 klon #1 hynou třikrát větší rychlostí než kontrolní buňky s prázdným vektorem, při použití přístroje Coulter cell counter pro měření počtu buněk.

Obr. 15 je autoradiogram westernového přenosu extraktů celých buněk izolovaných z buněk hOB-03-CE6 ošetřených buď kontrolou nebo PGE_2 po dobu 24 hodin. Imunologický přenos byl testován pomocí sondy monoklonální protilátky proti β -kateninu, který má molekulovou hmotnost 92 000. Výsledky ukazují, že působením PGE_2 na buňky hOB se dosáhne snižující regulace hladin β -kateninu, což je v souladu s antagonismem signální biochemické cesty Wnt prostřednictvím SFRP/SFRP-1/FRP-1/SARP-2 buněk hOB.

Obr. 16 ukazuje výsledky experimentu s přechodnou transfekcí na buňkách hOB-01-C1-PS-09 (část A) a hOB-02-C1-PS-02 (část B). Výsledky ukazují, že transfekce buď lidskými (h) nebo krysími (r) SARP-2 nebo lidskými Frzb-1 expresními plasmidy snižuje přenos signálů Wnt (při porovnání s kontrolou prázdného vektoru pcDNA3.1) v buňkách hOB, jak je měřeno testem na reporterový gen s TCF-luciferázou. Tento test je autentické měření přenosu signálů Wnt a aktivity β -kateninu v jádře.

Obr. 17 shrnuje příklad screeningu na anabolické kostní účinné látky s použitím buněk hOB a SFRP/SFRP-1/FRP-1/SARP-2 hOB. Tento průzkum by identifikoval sloučeniny, které řídí funkci SFRP-1/FRP-1/SARP-2.

Obr. 18 znázorňuje příklad vysoce výkonného screeningu (HTS) na sloučeniny, které inhibují funkci SFRP-1/FRP-1/SARP-2 v osteoblastech/osteocytech. Výsledky ukazují, že buňky hOB-01-C1-PS-09 s nadměrnou expresí SFRP-1/FRP-1/SARP-2 (buňky SARP-2 #1) hynou rychleji než buňky exprimující prázdný vektor (pcDNA3.1), při použití fluorescenčního testu na DNA CyQuant. Navíc blokuje anti-peptidové antisérum proti SFRP-1/FRP-1/SARP-2 (SARP-2 AS) smrt buněk způsobenou nadměrnou expresí tohoto genu.

Obr. 19 znázorňuje strategii, která byla použita pro vytvoření SFRP-1/SARP-2 knock-out myši. Exon 1 myšního genu SFRP-1/SARP-2, který kóduje celou oblast bohatou na cystein (cysteine-rich domain,

CRD) byl nahrazen expresní kazetou pro β -galaktosidázu a rezistenci na neomycin.

Obr. 20 znázorňuje northernový přenos polyA⁺ RNA izolované ze samičích a samčích ledvin získaných z myší standardního typu (wild-type, WT) a SFRP-1 knock-out (KO). Tento přenos ukazuje, že ledviny standardního typu exprimují vysoké hladiny mRNA pro SFRP-1 (4,4 kb), zatímco ledviny KO tento gen neexprimují.

Obr. 21 ukazuje výsledky analýzy mikropočítačovou tomografií (micro-CT) stehenní kosti získané od samců (část A) a samic (část B) myší standardního typu (+/+) a SFRP-1 knock-out (-/-). Při porovnání s kontrolními myšmi +/+ údaje ukazují, že myši -/- mají při použití této metody zlepšené parametry z hlediska tvorby kostí (tj. BV/TV, Tb. Th., Conn. Den., Tb. N. & Tb. Sp.).

Obr. 22 je soubor grafů ukazujících (A) buněčnou proliferaci buněk hOB, (B) schopnost/zvýšení jako reakci na ošetření vitaminem D₃ pro zvýšení aktivity alkalické fosfatázy při 39 °C u buněk hOB, a (C) neschopnost vitaminu D₃ indukovat sekreci osteokalcinu z buněk hOB při 34 °C, jak je podrobně popsáno v příkladu A.

Obr. 23 znázorňuje výsledky z příkladu 1 týkající se exprese mRNA receptoru PTH-1; v tomto případě inkubace buněk hOB po dobu 48 hod při 39 °C zvyšuje ustálené koncentrace mRNA pro receptor PTH-1 sedminásobně v porovnání s buňkami udržovanými při teplotě 34 °C.

Obr. 24 ukazuje výsledky z příkladu A týkající se vlivu na koncentraci intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) jako odpověď na zvýšení koncentrací PTH-1-34 v buňkách hOB.

Obr. 25 je graf, který znázorňuje účinek syntetického glukokortikoidu dexamethasonu na buňky hOB, kdy dochází ke zvýšení aktivity alkalické fosfatázy, jak je podrobně popsáno v příkladu A.

Obr. 26 ukazuje výsledky z experimentů týkajících se vlivu mechanosenzorické stimulace preosteocytických buněk hOB s použitím jednotky Flexerall Strain Unit.

5 Příklady provedení vynálezu

Předkládaný vynález se dále popisuje na následujících příkladech. Tyto příklady se poskytují výlučně pro ilustraci vynálezu na konkrétních provedeních. Tyto příklady, i když ilustrují některé konkrétní aspekty vynálezu, nemají nijak omezovat rozsah vynálezu.

10

Příklad A: Vytvoření a analýza buněk hOB

Buňky hOB-01-C1 jsou podmíněčně transformovanou buněčnou linií odvozenou z dospělé lidské kosti, která si přesně zachovává preosteocytický fenotyp. Tyto buňky byly transformovány velkým T-antigenem citlivým na teplotu (*tsA* 209) a jestliže je mutanta T-antigenu aktivní, proliferují při permissivní teplotě 34 °C; buňky však zastavují dělení při nepermissivní teplotě (≥ 37 °C), jestliže je mutanta T-antigenu neaktivní. I když jsou buňky hOB-01-C1 první buněčnou linií osteocytů, která byla vytvořena a která je vhodná pro výzkumné účely, pro objevování léků mají některé nevýhody. Stejně jako jiné lidské buněčné linie transformovaná velkým T-antigenem SV-40 podléhají buňky hOB-01-C1 krizi a hynou po 15 až 20 pasážích v kultuře. I když jsou tedy tyto buněčné linie často označovány jako „nesmrtelné“, ve skutečnosti mají pouze „prodloužený život“. Buňky hOB-01-C1 také pomalu proliferují v kultuře při 34 °C s dobou zdvojení přibližně jednou za pět až šest dnů. Aby byly odstraněny některé z těchto nevýhod, byla vytvořena buněčná linie hOB-01-C1-PS-09.

Buňky hOB-01-C1-PS-09 byly vytvořeny pasážováním rodičovské buněčné linie hOB-01-C1 za bod krize (tj. pasáže 15 až 20) až do přerušení proliferace (pasáže 20 až 25). Postsenescentní buňky

30

byly potom expandovány v kultuře a subklonovány. Klony byly charakterizovány použitím reverzní polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) pro analýzu pro měření míry exprese mRNA receptoru parathyroidního hormonu (PTH)-1. Buňky hOB-01-C1-PS-09 byly vybrány pro další charakterizaci, protože tento klon exprimoval nejvyšší hladinu mRNA receptoru PTH-1 při teplotě 39 °C. Tato buněčná linie prošla v průběhu postupu klonování a expanze přibližně 20 až 25 zdvojeními populace a potom byla pasážována více než padesátkrát. Tato buněčná linie může být pasážována několikasetkrát. Buňky hOB-01-C1-PS-09 jsou tedy skutečně nesmrtelnou buněčnou linií.

Stejně jako u rodičovské buněčné linie hOB-01-C1 netvoří buňky hOB-01-C1-PS-09 monovrstevné kultury a ponechávají na miskách pro tkáňové kultivace volné prostory. Zdá se také, že buňky vytvářejí v průběhu dlouhých buněčných procesů kontakty mezi jednotlivými buňkami. Z analýzy elektronovou mikroskopií je zřejmé, že buňky mají prstovité buněčné výběžky, které připomínají preosteocyty, a tyto výběžky vytvářejí přemostění prázdných míst, jestliže přijdou do styku se sousedními buňkami. Stejně jako u rodičovské buněčné linie exprimují také buňky hOB-01-C1-PS-09 podle imunocytochemického stanovení velký T-antigen *tsA* 209.

Na rozdíl od rodičovské buněčné linie hOB-01-C1 prolifерují buňky hOB-01-C1-PS-09 při permisivní teplotě dva až třikrát rychleji s dobou zdvojení jednou za dva až tři dny (obr. 22A). Stejně jako u rodičovských buněk však dojde u buněk hOB-01-C1-PS-09 k zastavení dělení při nepermisivní teplotě (obr. 22A). Toto pozorování ukazuje, že ačkoli buňky prošly přes bod krize a staly se nesmrtelné, stále pro prolifерaci vyžadují aktivní T-antigen. Navíc, stejně jako u rodičovské buněčné linie, vyžadují buňky hOB-01-C1-PS-09 pro projevení zesíleného osteocytického fenotypu inaktivaci T-antigenu. Dvěma důležitými markery osteocytické vazby jsou alkalická fosfatáza a osteokalcin. Jak je ukázáno v obr. 22B, schopnost vitaminu D₃

zesilovat aktivitu alkalické fosfatázy se zvýší přibližně čtyřnásobně, jestliže se buňky inkubují při 39 °C. Navíc, jak je znázorněno na obr. 22C, vitamin D₃ není schopen indukovat sekreci osteokalcinu z buněk při 34 °C.

5 Bylo však zjištěno, že sekosteroid zesiluje produkci tohoto proteinu specifického pro kostní matrici 11 x, jestliže se buňky inkubují při 39 °C. Je třeba zdůraznit, že základní hladiny exprese alkalické fosfatázy a sekrece osteokalcinu buňkami hOB-01-C1-PS-09 jsou podobné rodičovské buněčné linii. Buňky hOB-01-C1-PS-09 tedy jak
10 morfologicky, tak biochemicky napodobují rodičovské buňky hOB-01-C1, a jsou proto spolehlivým modelem in vitro pro studium biologie lidských preosteocytů.

Jak je uvedeno výše, buněčná linie hOB-01-C1-PS-09 byla vybrána pro další charakterizaci na základě vysoké exprese mRNA
15 receptoru PTH-1. Jak je ukázáno na obr. 23, inkubace buněk 48 hod při 39 °C zvyšuje rovnovážné hladiny mRNA pro receptor PTH-1 sedminásobně při porovnání s buňkami udržovanými při teplotě 34 °C. Protože exprese receptoru PTH-1 je markerem diferenciaci osteoblast/osteocyt, je to další důkaz, že buňky mají při nepermissivní
20 teplotě výraznější osteocytový fenotyp. V souladu s touto zesílenou expresí receptoru PTH-1 vytváří předinkubace buněk hOB-01-C1-PS-09 po dobu 48 hod při 39 °C s následným ošetřením stoupajícími koncentracemi lidského PTH 1-34 (hPTH 1-34) po dobu 10 min při 37 °C v závislosti na dávce pěti až šestnásobné zvýšení hladin
25 intracelulárního cyklického adenosinmonofosfátu (cAMP) (obr. 24). Naopak předinkubace těchto buněk při 34 °C nevede k následnému zvýšení koncentrací cAMP působením hPTH 1-34. Jak exprese receptoru pTH-1, tak i odpověď na něj, jsou tedy po inaktivaci T-antigenu tsA-209 zesíleny. Jedním možným využitím tohoto testu na
30 cAMP by byla schopnost charakterizovat aktivity analogů PTH nebo látek napodobujících PTH v důležité cílové buňce za podmínek, kdy jsou hladiny exprese receptoru PTH-1 dramaticky změněny.

Navíc k vitaminu D₃ a PTH odpovídají buňky hOB-01-C1-PS-09 také na další látky s účinkem na kosti: například glukokortikoidy a transformující růstový faktor (TGF)-β1. Působení syntetického glukokortikoidu dexamethasonu na buňky zesiluje aktivitu alkalické fosfatázy při 34 °C přibližně dvojnásobně (obr. 25) a tento efekt se opět zesiluje, jestliže se buňky inkubují při 39 °C. Podobně působení rekombinantního lidského (rh) TGF-β1 na buňky při 39 °C vede v závislosti na dávce k poklesu sekrece hepatocytového růstového faktoru (HGF). Bylo ukázáno, že HGF působí jako chemotaktický faktor pro osteoklasty, a může tedy hrát úlohu při regulaci kostní resorpce.

Důležitou vlastností osteocytů je schopnost reagovat na mechanosenzorickou stimulaci, ke které například dochází při cvičení s hmotnostní zátěží. Jednou metodou pro simulaci tohoto stimulujícího účinku in vitro je použití přístroje Flexercell Strain Unit (Flexcell International, Hillsborough, NC). Pro tento experiment znázorněný na obr. 26 byly buňky hOB-01-C1-PS-09 zaočkovány na šestijamkové misky pro tkáňové kultivace potažené kolagenem BioFlex type I a inkubovány při 34 °C 24 hod. Buňky byly potom předinkubovány v bezsérovém médiu buď při 34 °C nebo 39 °C dalších 24 hod a potom vystaveny fyziologicky odpovídajícímu namáhání (3400 μE, 2 Hz, 7200 cyklů) při 37 °C na přístroji FX-3000 Flexercell Strain Unit. Po působení napětí byly buňky inkubovány 4,5 hod a v tomto čase bylo kondicionované médium odděleno a analyzováno na přítomnost oxidu dusnatého (NO). Již dříve se uvádělo, že mechanosenzorická stimulace nebo střížné namáhání krysích a kuřecích osteoblastů a osteocytů in vitro stimuluje produkci NO. Jak je ukázáno na obr. 26, mechanosenzorická stimulace (tj. „Flex“) buněk hOB-01-C1-PS-09 zesiluje produkci NO 10 až 18 x. Tyto údaje tedy ukazují, že tato buněčná linie bude použitelná v modelu in vitro pro studium molekulárních mechanismů mechanosenzorické stimulace.

Další experimenty ukazují, že buňky hOB-01-C1-PS-09 mohou být použity pro studie jak přechodné, tak i stabilní transfekce. Tato buněčná linie může být transfekována použitím lipofekčního činidla Tfx-20 (Promega, Madison, WI). Při tomto experimentu se buňky
5 zaočkují do 24-jamkových misek pro tkáňovou kultivaci při různých hustotách a potom se transfekují 0,25 µg/jamku expresními plasmidy β-galaktosidázy a luciferázy (celkové množství DNAS = 0,5 µg/jamku. Po 48 hod inkubace při 34 °C nebo 39 °C se buněčné lyzáty testují na aktivitu β-galaktosidázy a luciferázy. Z těchto experimentů byly získány
10 výsledky, že hladiny exprese buď β-galaktosidázy nebo luciferázy stoupají se stoupajícím počtem buněk. Navíc jestliže se exprese luciferázy normalizuje na expresi β-galaktosidázy s cílem zjišťovat účinnost transfekce, hladina exprese luciferázy je dva až třikrát vyšší, jestliže se buňky inkubují při 34 °C. Protože exprese luciferázy je pod
15 řízením promotoru SV-40, toto pozorování je v souladu s inaktivací T-antigenu tsA 209 při 39 °C. Protože jsou tyto buňky jak nesmrtelné, tak schopné transfekce, mohou být použity pro vývoj buněčných linií se stabilně zvýšenou expresí na pozadí lidských preosteocytů.

20 Příklad 1: Izolace SFRP

Genový fragment hOB SFRP byl identifikován metodou RADE (rychlá analýza diferenciální exprese), jak se popisuje v Shiue 1997, Drug Develop. Res. 41: 142 - 159, který se jako celek zařazuje odkazem. Pro izolaci a identifikaci SFRP byly použity tři buněčné linie
25 hOB (hOB-03-C5, hOB-03-CE6 a hOB-01-C1), reprezentující tři odlišné stupně diferenciace (proliferační, zralé (maturní) a preosteocytické). Buněčné linie hOB byly vytvořeny a kultivovány jak bylo popsáno výše (Bodine a další, 1996, J. Bone Miner. Res. 11: 806 - 819; Bodine a další, 1996, Endocrinology 137: 4592 - 4604; Bodine a
30 další, 1997, J. Cell Biochem. 65: 368 - 387). Tyto buněčné linie byly imortalizovány teplotně citlivým velkým T-antigenem opičího viru

(SV)40 a vykazovaly transformovaný fenotyp při permissivní teplotě (34 °C), jestliže byl mutantní T-antigen aktivní. Na rozdíl od buněk osteosarkomu (Stein a Lian, 1993, Endocrine Rev. 14: 424 - 442) však buněčné linie hOB odpovídaly vztahu proliferace/diferenciace při nepermissivní teplotě (více než 37 °C), jestliže je mutantní T-antigen inaktivován. Buněčné linie byly zaočkovány do misek o průměru 150 mm na hustotu ~ 40 000 buněk/cm² s růstovým médiem (D-MEM/F-12 s obsahem 10 % (obj.) teplem inaktivovaného fetálního bovinního séra (FBS), 1% (obj.) penicilinu-streptomycinu a 2 mM GlutaMAX-1) a inkubovány přes noc při 34 °C. Další den bylo médium odstraněno, buňky byly opláchnuty fyziologickým roztokem s fosfátovým pufrem (PBS), do misek bylo přidáno 20 ml bezsérového média (bez fenolčervení, D-MEM/F-12, Gibco/BRL, s obsahem 0,25% (hmotn./obj.) bovinního sérového albuminu (BSA, Pentex crystallized, Bayer), 1 % (obj.) penicilinu-streptomycinu a 2 mM GlutaMAX-1, 50 mM askorbát-2-fosfátu (Wako) a 10 nM menadionbisulfitu sodného (vitamin K₃) a misky byly inkubovány při 39 °C 24 hod. Další den bylo médium odstraněno a na buňky bylo působeno při 39 °C dalších 24 hod 20 ml čerstvého bezsérového média obsahujícího buď vehikulum (kontrola), 8 nM lidský parathyroidní hormon 1-34 (PTH), 100 nM prostaglandin E₂ (PGE₂) nebo 0,1 nM lidský transformující růstový faktor - β 1 (TGF- β 1). PTH, PGE₂ a TGF β 1 jsou známé osteogenní prostředky (Whitfield a Morley 1995, Trends Pharmaceut. Sci. 16: 382 - 386; Jee a Ma 1997, Bone 21: 297 - 304; Centrella a další 1994, Endocrine Rev. 15: 27 - 39). Po tomto působení byly misky opláchnuty PBS a celková buněčná RNA byla izolována z neošetřených a ošetřených buněk použitím materiálu TRizol podle instrukcí výrobce (GibcoBRL). Potom byly vzorky izolované RNA zpracovány metodou RADE jako výše; regulované genové fragmenty byly identifikovány, klonovány a sekvenovány. Tyto experimenty ukázaly celkem 82 genů s odlišnou expresí. U genových fragmentů získaných metodou RADE bylo provedeno prohledávání veřejných databází programem BLAST

(basic local alignment search tool); jeden z genových fragmentů měl vysokou homologii s myším SFRP-1. Tento genový fragment byl metodou RADE identifikován použitím následujícího páru primerů: 5'-AAGCTTTTTTTTTTTTA-3' (HT11A)3' konec (reverzní primer) a 5'-AAGCTTGATTGCC-3' (H-AP1)5' konec (dopředný primer), kde tyto
5 sekvence jsou označeny jako SEQ ID No. 11, popřípadě SEQ ID No. 12. Exprese a regulace genového fragmentu s homologií s myší cDNA pro SFRP-1 byla potvrzena analýzou northernovým přenosem.

10 Příklad 2: Charakterizace hOB SFRP

Obr. 1 znázorňuje souhrn výsledků RADE. Genový fragment hOB SFRP (označený šipkami) byl silně regulován pro zesílení exprese prostřednictvím PGE_2 v proliferativním stadiu (hOB-03-C5) a stadiu zrání (hOB-03-CE6) buněčných linií hOB a pro zeslabení
15 exprese prostřednictvím $TGF-\beta 1$ v preosteocytické (hOB-01-C1) buněčné linii. Navíc byla základní míra exprese tohoto genu dramaticky zvýšena u preosteocytických buněk, což ukazuje, že exprese genu hOB SFRP je propojena s procesem diferenciací osteoblastů.

20

Příklad 3: Analýza sekvence genového fragmentu hOB SFRP

Genový fragment hOB SFRP identifikovaný v příkladu 1 výše obsahující 276 párů bází (bp) byl klonován, sekvenován a dále byly prohledávány veřejné databáze metodou BLAST. Tento průzkum
25 odhalil, že tento gen je homologní s dvěma dalšími dříve identifikovanými cDNA. Porovnání sekvencí ukázalo, že genový fragment hOB SFRP má 77% identitu sekvence s 3'-koncem myšího genu SFRP-1 (GeneBank™ Accession #U88566; Rattner a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2859 - 2863). Genový fragment hOB
30 SFRP také vykazoval významnou homologii (87 %) s 3'-koncem

příbuzné bovinní cDNA nazvané protein A příbuzný s proteinem frizzled (FrzA, GeneBank™Accession #U85945). Navíc byl fragment genu hOB SFRP velmi homologní s alespoň třemi sekvencemi EST lidského klonu TM010 (GeneBank™Accession #U54715), lidským
5 tumorovým supresorem CA11 (GeneBank™Accession #U69122) a lidským EST mozku novorozence (GeneBank™Accession #H16753, H16861).

Příklad 4: Regulace hOB SFRP osteogenními látkami

10 Pro potvrzení regulace exprese genu hOB SFRP různými osteogenně účinnými látkami (tj. fragment DNA identifikovaný v příkladu 1 výše) bylo na buněčné linie hOB působeno PTH, PGE₂ a TGF-β1 a RNA byla potom izolována northernovými hybridizacemi. Výsledky jsou ukázány v obr. 2 až 5. Tyto experimenty byly prováděny
15 následovně. Buněčné linie hOB byly zaočkovány do 150 mm misek a zpracovány podle popisu v příkladu 1 s tím rozdílem, že polyA⁺ RNA byla izolována z celkové buněčné RNA použitím souprav Oligotex mRNA maxi kits podle doporučení výrobce (Qiagen). Analýza northernovým přenosem byla prováděna použitím buď vyříznutého
20 genového fragmentu RADE hOB SFRP, klonovaného genového fragmentu hOB SFRP nebo klonované úplné cDNA hOB SFRP jako sondy značené ³²P (jak je popsáno v Bodine a další 1996, J. Bone Miner. Res. 11: 806 - 819, který je zařazen odkazem. Každá z těchto sond detekovala v buňkách hOB mRNA o velikosti 4,4 až 4,6 kb.
25 Exprese mRNA hOB SFRP byla normalizována buď na mRNA glyceraldehydfosfátdehydrogenázy (GAPDH) nebo mRNA beta-aktinu s použitím odpovídajících sond ³²P-DNA. Působení 100 nM PGE₂ na proliferační stupeň buněk hOB-03-C5 po dobu 24 hod maximálně zesílilo expresi mRNA velikosti přibližně 4,6 kb (obr. 2), což potvrzuje
30 řízení tohoto genu prostřednictvím PGE₂. Jestliže byl jako sonda použit klonovaný genový fragment hOB SFRP, byla v buňkách

ošetřených PGE₂ pozorována převážně mRNA o velikosti přibližně 4,4 kb, což potvrzuje, že tato mRNA je skutečně gen SFRP (obr. 3). Tato mRNA velikostí odpovídá transkriptu pro lidský gen FRP-1/SARP-2 (Finch a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6770 - 6775; 5 Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641). Analýza northernovým přenosem také potvrdila zesílenou expresi mRNA hOB SFRP v maturačním stadiu buněk hOB-03-CE6 ošetřených PGE₂ (obr. 4). Navíc byla u preosteocytických buněk hOB-01-C1 zvýšena základní exprese tohoto genu. Tato základní exprese 10 byla o 35 % potlačena působením 8 nM PTH. Navíc zvýšilo působení PGE₂ na buňky hOB-03-CE6 maturačního stadia expresi SFRP na úroveň, která byla exprimována v podstatě preosteocytickými buňkami, což ukazuje, že regulace ke zvýšení exprese SFRP prostřednictvím PGE₂ v osteoblastických buňkách souvisí se zesílením buněčné 15 diferenciaci. Konečně působení 100 pM TGF-β1 na preosteocytické buňky hOB-01-C1 po dobu 24 hod potlačilo hladiny mRNA hOB SFRP o 80 % (obr. 5).

Pro potvrzení, že hladiny mRNA hOB SFRP se mění se zvyšující se buněčnou diferenciací byla izolována celková RNA z 20 preosteoblastických buněk hOB-03-C5, zralých osteoblastických buněk hOB-03-CE6, preosteocytických buněk hOB-01-C1 a zralých osteocytických buněk hOB-05-T1. Bazální koncentrace mRNA sSFRP byly potom měřeny metodou TaqMan quantitative RT-PCR. Při porovnání s buňkami hOB-03-C5 se základní hladiny mRNA SFRP 25 zvýšily v buňkách hOB-03-CE6 přibližně čtyřnásobně a v buňkách hOB-01-C1 přibližně 23 násobně. Na druhé straně hladiny mRNA SFRP se snížily na přibližně 0,5 násobek v buňkách hOB-05-T1. Zdá se tedy, že z buněk osteoblastické linie exprimuje nejvyšší hladiny mRNA hOB SFRP preosteocyt.

Příklad 5: Kinetika exprese hOB SFRP

Proliferativní buňky hOB-03-C5 byly zaočkovány do misek o průměru 150 mm a bylo na ně působeno zvyšujícími se koncentracemi PGE_2 po dobu 24 hodin nebo 100 nM PGE_2 po různou dobu, jak je popsáno v příkladu 1. Analýza polyA+ RNA northernovým přenosem byla prováděna s vyříznutým genovým fragmentem RADE hOB SFRP 276 bp nebo klonovaným genovým fragmentem hOB SFRP velikosti 1,1 kb jako sondou značenou ^{32}P . Působení zvyšujících se koncentrací PGE_2 na proliferační stadium buněk hOB-03-C5 zvyšovalo expresi mRNA hOB SFRP v závislosti na dávce s hodnotou EC_{50} přibližně 8 nM. Podobně působení zvyšujících koncentrací PGE_2 na zralé buňky hOB-03-CE6 zvyšovalo hladiny mRNA hOB SFRP v závislosti na dávce, ačkoli hodnota EC_{50} pro PGE_2 pro tuto odpověď byla přibližně 10 x vyšší než u buněk hOB-03-C5.

Působení 100 nM PGE_2 na buňky hOB-03-C5 po dobu 2 až 24 hod zesílilo expresi mRNA hOB SFRP v závislosti na čase. Podstatné zesílení exprese genu SFRP bylo pozorováno po 2 až 4 hod působení, a rovnovážné hladiny mRNA stále stoupaly až do 24 hod po přidání PGE_2 ke kultivačnímu médiu pro buňky. Tyto výsledky ukazují, že SFRP může být pro působení PGE_2 na buňky hOB genem s pozdní reakcí, a může jít pravděpodobně o sekundární kontrolu dalšího genového produktu. Podobné výsledky byly také získány se zralými buňkami hOB-03-CE6, ačkoli míra zvýšení exprese mRNA hOB SFRP nebyla tak vysoká jako u buněk hOB-03-C5.

Podobně buňky hOB-01-C1 byly zaočkovány do misek o průměru 100 mm a bylo na ně působeno po dobu 24 hod stoupajícími koncentracemi $\text{TGF-}\beta 1$. Z buněk byla potom izolována celková RNA a mRNA hOB SFRP byla měřena metodou TaqMan quantitative RT-PCR. $\text{TGF-}\beta 1$ potlačoval expresi genu SFRP o přibližně 70 % v závislosti na dávce, přičemž hodnota IC_{50} byla přibližně 4 pM.

Navíc k PGE₂, působení interleukinu (IL)-1 β , kyseliny 9-cis-retinové a kyseliny all-trans-retinové na buňky hOB-03-C5 i na buňky hOB-03-CE6 rovněž zvyšuje hladiny mRNA hOB SFRP. Naopak stejně jako u TGF- β 1, působení PTH, proteinu morfogeneze kostí (BMP)-2, růstového faktoru podobného inzulinu (IGF)-I, 17 β -estradiolu (17 β -E₂), vitaminu D₃ (VD₃), dexamethasonu (Dex) nebo fetálního bovinního séra (FBS) na různé buněčné linie hOB potlačuje expresi mRNA hOB SFRP. Je možno shrnout, že existuje dobrá (i když ne dokonalá) korelace mezi schopnostmi těchto různých látek buď zvyšovat nebo snižovat expresi hOB SFRP a jejich schopností buď zvyšovat nebo potlačovat apoptózu osteoblastů/osteocytů (viz například Manolagas 2000, Endocrine Reviews 21. 115 - 137).

Příklad 6: Distribuce hOB SFRP ve tkáních

Pro zjištění tkáňové distribuce pro expresi genu hOB SFRP bylo testováno větší množství poly(A) + RNA northernových přenosů lidských tkání (získaných od firmy Clontech) vyříznutým genovým fragmentem RADE hOB SFRP jak bylo popsáno v příkladu 4. Jestliže byl pro testování polyA+ RNA northernových přenosů použit fragment RADE, v několika tkáních byl exprimován transkript o velikosti přibližně 4,4 kb (obr. 6). Když byly tyto tkáně normalizovány na β -aktin, exprese SFRP byla seřazena následujícím způsobem:

Ledvina > srdce > placenta > játra = kosterní sval = žaludek = štítná žláza > nadledvina = varle = děloha = tenké střevo = pankreas = mozek > průdušnice = mícha = prostata = tlusté střevo > slezina > plíce = lymfatická uzlina = kostní dřeň.

Žádná exprese nebyla pozorována v thymu a lymfocytech periferní krve. Tento obraz exprese je podobný lidskému genu FRP-1/SARP-2 (Finch a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6770 -

6775; Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641).

Příklad 7: Distribuce SFRP v buněčných liniích osteoblastů

5 Navíc k buňčným liniím hOB, ze kterých byl SFRP původně identifikován, byly na přítomnost genu vyšetřovány další modely in vitro lidských osteoblastů. Buňky lidského osteosarkomu SaOS-2 podobné osteoblastům byly získány ze sbírky American Type-Culture Collection (ATCC) a byly kultivovány při 37 °C v médiu McCoy's 5A
10 Modified medium s obsahem 10% FBS, 1% (obj./obj.) penicilinu/streptomycinu a 2 mM GlutaMAX-1. Podobně byly z kostních řezů připraveny kultury normálních lidských osteoblastů (hOB), jak bylo popsáno výše (Bodine a další, 1996, J. Bone Miner. Res. 11: 806 - 819, který se zařazuje odkazem). Buňky byly potom zaočkovány do
15 misek o průměru 150 mm a ošetřovány jak bylo popsáno v příkladech 1 a 4 s tím rozdílem, že buňky byly inkubovány při 37 °C namísto 39 °C. Analýza poly(A) + RNA northernovými přenosy byla prováděna s použitím klonovaného genového fragmentu 1,1 kb hOB SFRP jako ³²P značky. Buňky SaOS-2 exprimovaly relativně nízké základní
20 hladiny SFRP mRNA, které nebyly regulovány působením PTH, PGE₂ nebo TGF-β1 (obr. 7). Bylo obtížné kvantifikovat expresi tohoto genu v uvedených buňkách, protože míra exprese byla nízká. Naopak normální buňky hOB exprimovaly vyšší základní hladiny SFRP mRNA a zdálo se, že působení 100 nM PGE₂ po dobu 24 hod na buňky mírně
25 zvyšovalo rovnovážné hladiny této mRNA (přibližně 1,3 násobně). Kvantitativní analýza RT-PCR TaqMan těchto vzorků RNA ukázala, že PGE₂ zvýšila hladiny SFRP v buňkách hOB 10 x. Pro nízkou míru základní exprese v buňkách osteosarkomu nemusí být tyto buňky uspokojivým modelem in vitro pro studium regulace genu SFRP.
30 Protože tento gen je exprimován a regulován v kulturách normálních lidských osteoblastů prostřednictvím PGE₂, je ověřené použití

buněčných linií hOB popisovaných v předkládaném vynálezu jako modelů osteoblastů in vitro. Analýzou northernovým přenosem a RT-PCR celkové RNA izolované z lidských obřích buněk kostního tumoru se nepodařilo detekovat expresi hOB SFRP mRNA v této tkáni. Tyto
5 výsledky ukazují, že buňky podobné osteoklastům nemusí tento gen exprimovat.

Příklad 8: Izolace úplné cDNA pro hOB SFRP

Protože klonovaný genový fragment hOB SFRP z RADE byl
10 identický s několika lidskými sekvencemi EST, byla provedena analýza databáze EST s cílem sestavit úplnou cDNA pro gen hOB. Tato analýza ukázala, že hOB SFRP byl ve skutečnosti známý lidský gen, FRP-1 (nazývaný také sekrenovaný protein-2 související s apoptózou nebo SARP-2). Na základě této analýzy a pozorování, že myší gen
15 SFRP je zdánlivě homologní s lidským genem FRP-1 a lidským genem SARP-2 (Rattner a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 2859 - 2863; Finch a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6770 - 6775; Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641), byla navržena strategie založená na RT-PCR pro získání
20 úplné cDNA hOB SFRP o délce 1,1 kb jak z RNA lidské placenty, tak i RNA buněk hOB-03-CE6 ošetřených PEG₂. RT-PCR byla provedena s použitím 1 µg celkové RNA, primerů zahrnujících kódující oblast hFRP-1/SARP-2 (dopředný primer: 5'-GCTGGGGACTGCGCC-
-TTTTGT-3', SEQ ID No. 13; reverzní primer: 5'-CCTGCCCCCGGG-
25 -AGAATCACTTA-3', SEQ ID No. 14), 35 cyklů PCR a soupravy Advantage-GC PCR kit (Clonetech) podle instrukcí výrobce. Pro detekci exprese mRNA byla provedena analýza Southernovým přenosem s produkty RT-PCR s použitím ³²P oligonukleotidové sondy, která specificky hybridizovala s bázemi 501 až 530 kódující oblasti
30 hFRP-1/hSARP-2 (viz Bodine a další, 1997, J. Cell. Biochem. 65: 368 - 387, kde se uvádějí podrobnosti experimentu týkající se RT-PCR

a Southernových hybridizací). Byla izolována úplná cDNA o délce 1,1 kb pro hOB SFRP, jejíž množství bylo zvyšováno působením 100 nM PGE₂ na buňky hOB-03-CE6 po dobu 24 hod (obr. 8). Podobně RT-PCR celkové RNA izolované z buněk hOB-03-C5 ošetřených PGE₂ ukázala cDNA o délce 2,2 kb, která zahrnovala 5'-oblast cDNA hFRP-1/SARP-2 až fragment RADE 276 bp na 3'-konci. Tyto fragmenty cDNA byly klonovány buď do savčího expresního vektoru pcDNA3.1 (Invitrogen) (cDNA 1,1 kb) nebo klonovacího vektoru TA (Invitrogen) (cDNA 2,2 kb) a sekvenovány. Analýza sekvencí cDNA hOB SFRP 1,1 kb (SEQ ID No. 1) a 2,2 kb umožnila sestavení cDNA o délce 2,6 kb, která obsahovala místo zahájení transkripce na 5'-konci a fragment RADE na 3'-konci. Prohledávání veřejných databází programem BLAST s použitím cDNA 1,1 kb ukázalo, že tato cDNA je v podstatě identická s lidským FRP-1/SARP-2. Odvozená aminokyselinová sekvence kódující oblasti SFRP cDNA je ukázána v SEQ ID No. 2. Tato sekvence obsahuje rozdíl v jedné aminokyselině proti zveřejněné sekvenci lidského SARP-2: alanin 174 namísto prolinu v této poloze (Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13541).

20

Příklad 9: Charakterizace apoptotické aktivity hOB

Protože klonovaný úplný gen hOB SFRP byl identický s lidským SFRP-1/FRP-1/SARP-2, byla zkoumána biologická úloha tohoto genu v hOB pro zjištění, zda tento genový produkt řídí viabilitu buněk hOB a přenos signálů Wnt (obr. 9 - 16).

25

Jak je ukázáno v obr. 9, buňky hOB byly zaočkovány na hustotu 200 000 buněk/jamku do šestijamkových misek a inkubovány při 34 °C. Další den byla jedna sada misek opláchnuta PBS, trypsinizována a byl zjištěn základní počet buněk (a střední objem buňky) na přístroji Coulter Multisizer, jak bylo dříve popsáno v Bodine a další, 1996, J. Bone Miner. Res. 11: 806 - 819, který je zařazen

30

odkazem. Druhá souprava misek byla umístěna do nepermissivní teploty 39 °C a počet buněk byl zjišťován o 6 dnů později (v den 3 byla provedena výměna média). Buňky hOB-03-C5, které jsou v proliferačním stadiu diferenciaci osteoblastů, se pomalu dělily při 39 °C, a počet buněk se po šesti dnech zvýšil o 60 až 80 %; tato rychlost dělení buněk byla podobná jako u kultur explantátů normálních buněk hOB (Bodine a další, 1996, Endocrinology 137: 4592 - 4604). Naopak maturační stadium buněk hOB-03-CE6 zastavilo při nepermissivní teplotě dělení a počet buněk zůstal konstantní, zatímco preosteocytické buňky hOB-01-C1 pomalu umíraly při teplotě 39 °C, takže po šesti dnech zůstalo naživu méně než 40 % těchto buněk. Jak bylo uvedeno výše, nadměrná exprese SARP-2 v buňkách karcinomu mléčné žlázy MCF-7 urychlovala rychlost smrti buněk. V souladu s tímto pozorováním, a jak je ukázáno na obr. 1, 4 a 5, základní exprese mRNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2 se dramaticky zvýšila u preosteocytických buněk hOB-01-C1 ve srovnání s proliferačními buněčnými liniemi hOB-03-C5 a maturními hOB-03-CE6.

Hypotéza, že zesílení genové exprese SFRP-1/FRP-1/SARP-2 urychluje smrt buněk hOB, zatímco potlačení exprese genu SFRP-1/FRP-1/SARP-2 smrt buněk potlačí, byla testována v dalším experimentu. Výsledky jsou znázorněny na obr. 10. Buňky hOB-03-C5, hOB-03-CE6 nebo hOB-01-C1 byly zaočkovány do růstového média na koncentraci přibližně 200 000 buněk na jamku do šestijamkových destiček a byly inkubovány při 34 °C přes noc. Další den byly šestijamkové destičky opláchnuty PBS, umístěny do média BSA a buňky byly ponechány při 39 °C v přítomnosti nebo nepřítomnosti buď 100 nM PGE₂ (pro zvýšení ustálených hladin mRNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2; části A a B) nebo 0,01 až 1,0 nM TGF-β1 (pro snížení hladin mRNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2; část C). Inkubace buněk v bezsérovém médiu je běžná metoda pro indukci apoptózy (Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641), a všechny buněčné linie hOB-03-C5, hOB-03-CE6 a hOB-01-

C1 za těchto podmínek zastavily dělení a postupně hynuly. Rychlost úhynu buněk však byla podstatně zvýšena, pokud se na buňky hOB-03-C5 a hOB-03-CE6 působilo PGE_2 , takže po šesti dnech zůstalo naživu o více než 40 % méně buněk. Naopak k působení $\text{TGF-}\beta 1$ na buňky hOB-01-C1 zvýšilo životaschopnost buněk přibližně 5 dvojnásobně v závislosti na dávce. Ošetření těchto buněk PGE_2 nejenom urychlilo smrt buněk, ale omezilo také podstatně střední objem buněk o 10 až 20 %. Toto pozorování bylo v souladu s indukcí apoptózy, o které je známo, že vede ke tvorbě měchýřků v cytoplasmě, 10 úbytku vody a poklesu objemu buněk (Mesner a Kaufman, 1997, Advances in Pharmacology, díl 41, str. 57 - 88). Rovněž v souladu s indukcí apoptózy vedlo působení PGE_2 na buňky hOB-03-C5 ke tvorbě fragmentů DNA asociovaných s histonem. Konečně působení PGE_2 na buňky hOB-03-C5 zvyšovalo vazbu annexinu V (specifický marker pro 15 apoptózu) na buňku při měření průtokovou cytometrií (obr. 11).

Příklad 10: Odvrácení indukce smrti buněk

Odvrácení smrti buněk použitím pozitivního (antisense) oligonukleotidu pro SFRP-1/FRP-1/SARP-2 je ukázáno na obr. 12 na 20 buňkách hOB-03-C5 a hOB-03-CE6. Tyto experimenty byly prováděny podobným způsobem jako experimenty znázorněné na obr. 10. Při těchto experimentech však na buňky společně působilo buď kontrolní vehikulum (tj. 0,1% ethanol) nebo PGE_2 v nepřítomnosti nebo přítomnosti negativních (sense, kontrolních) nebo pozitivních 25 (antisense) fosforothioátových oligonukleotidů zaměřených na iniciační místo lidského SARP-2. Výsledky jsou uvedeny buď jako procenta vzhledem ke kontrole v den 0 (tj. přibližně 200 000 buněk na jamku v šestijamkové destičce) nebo jako procenta vzhledem ke kontrole ošetřené vehikulem. Výsledky tohoto experimentu ukazují, že společné 30 působení pozitivním oligonukleotidem proti SARP-2 na buňky hOB odvrátilo schopnost PGE_2 urychlovat intenzitu smrti buněk, zatímco

současné působení negativního (kontrolního) oligonukleotidu nemělo na tento proces žádný vliv. Navíc společné působení PGE₂ a antipeptidové protilátky proti SARP-2 na buňky blokovalo schopnost PGE₂ indukovat smrt buněk hOB. Sekvence pro negativní a pozitivní oligonukleotidy pro lidský SFRP-1/SARP-2 jsou následující:

Negativní: 5'-GGCATGGGCATCGGGCGC-3' (SEQ ID No. 15)

Pozitivní: 5'-GCGCCCGATGCCCATGCC-3' (SEQ ID No. 16)

Příklad 11: Nadměrná exprese SFRP urychluje smrt buněk hOB

Obr. 13 ukazuje výsledky experimentu s viabilitou buněk hOB-01-C1-PS-09 na přístroji Coulter cell counter. Pro tyto experimenty byly buňky stabilně transfekovány buď cDNA hOB SFRP (tj. SFRP-1/FRP-1/SARP-2) v savčím expresním plasmidu nebo prázdným vektorem (tj. pcDNA3.1 získaným od firmy Invitrogen, Carlsbad, CA). Bylo použito standardních technik klonování (viz Ausubel a další, 1997, Short Protocols in Molecular Biology, 3. vyd., Wiley, New York). Tyto výsledky jsou vyjádřeny jako procenta kontrolních buněk v den 0. Výsledky tohoto experimentu ukazují, že nadměrná exprese SFRP-1/FRP-1/SARP-2 buňkami hOB urychluje smrt buněk při porovnání s prázdným vektorem, který na tento proces nemá žádný vliv. Autoradiogramy northernových přenosů celkové RNA izolované z prázdného vektoru (v) nebo buněk exprimujících SFRP (S) ukázaly, že buňky hOB nadměrně exprimovaly gen SFRP podle očekávání. Navíc ukázala kvantitativní analýza RT-PCR TaqMan, že buňky s nadměrnou expresí SFRP exprimovaly 5 až 6 x více mRNA SFRP než buňky s prázdným vektorem.

Aby bylo možno zlepšit výsledky rychlosti smrti buněk, která byla indukována SFRP-1/FRP-1/SARP-2, buňky hOB-01-C1-PS-09 s nadměrnou expresí byly subklonovány a charakterizovány (obr. 14). Kvantitativní analýza RT-PCR TaqMan ukázala, že jeden subklon

(SARP-2, klon #1) exprimoval 50 až 60 x více SFRP-1/FRP-1/SARP-2 mRNA než buňky exprimující pcDNA3.1 (prázdný vektor). Podobně buňky SARP-2 klon #1 měly značně zvýšenou rychlost umírání ($t_{1/2}$ = 39,2 hod) v médiu BSA při porovnání s buňkami exprimujícími prázdný vektor ($t_{1/2}$ = přibližně 120 hod).

Příklad 12: Vliv hOB SFRP na aktivitu Wnt

Pro zjištění, zda vede zesílení genové exprese SFRP-1/FRP-1/SARP-2 k antagonismu na signální biochemickou cestu Wnt, bylo na buňky hOB-03-CE6 působeno PEG₂ a získané buňky byly testovány monoklonální protilátkou proti β -kateninu. Nadměrná exprese proteinů Wnt v buňkách zesiluje expresi signálního proteinu známého jako β -katenin (přehledný článek viz Moon a další, 1997, Cell 88: 725 - 728; Barth a další, 1997, Curr. Opin. Cell Biol. 9: 683 - 690; a Nusse, 1997, Cell 89: 321 - 323). Navíc snižovala exprese SFRP-1/FRP-1/SARP-2 v buňkách MCF-7 hladiny β -kateninu, což je v souladu s antagonistickým účinkem na aktivitu Wnt (Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641). Proto byly buňky hOB-03-CE6 vysety a ošetřeny PGE₂, jak se popisuje v příkladu 1, s tím rozdílem, že veškerý buněčný protein byl extrahován a byla provedena analýza na β -katenin pomocí westernového přenosu s použitím monoklonální protilátky proti tomuto proteinu (Transduction Laboratories), jak bylo popsáno výše (Bodine a další, 1996, Endocrinology 137: 4592 - 4604; Melkonyan a další, 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 13636 - 13641). V souladu se zvýšením ustálených hladin mRNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2 snížilo ošetření buněk hOB-03-CE6 100 nM PGE₂ po dobu 24 hod hladiny β -kateninu, což ukazuje na antagonistický účinek na aktivitu Wnt (obr. 15). Navíc snížila společná transfekce cDNA SFRP-1/FRP-1/SARP-2 do buněk hOB-01-C1-PS-09 nebo hOB-02-C1-PS-02 expresi TCF-luciferázy, což představuje autentické měření přenosu signálů Wnt a jaderné aktivity β -kateninu

(obr. 16) (např. Bafico a další, 1999, J. Biol. Chem. 274: 16180 - 16187). Jak lidský, tak i krysí SFRP-1/FRP-1/SARP-2, stejně jako lidský Frzb-1/Frzb/Fritz, potlačovaly aktivitu TCF-luciferázy v buňkách hOB. Všechna tato pozorování společně ukazují na to, že protein
5 (proteiny) Wnt prodlužují život lidských osteoblastů in vitro, a že antagonistický účinek na přenos signálů Wnt pomocí SFRP-1/FRP-1/SARP-2 podporuje smrt osteoblastových buněk. Proto může inhibitor funkce SFRP-1/FRP-1/SARP-2 zvýšit přežívání osteoblastů/preosteocytů a proto také zvýšit tvorbu kostí in vivo.

10 Použitím několika metod pro charakterizaci exprese Wnt v buňkách hOB (např. RT-PCR, analýza GeneChip a klonování cDNA) získali autoři vynálezu důkazy, že tyto buněčné linie exprimují v různých intenzitách Wnt-2B/13, -3, -4, -5A, a -11. Všechny z těchto proteinů Wnt by mohly být použity při prodloužení života buněk hOB.
15 Wnt-2B/13 je známý také jako Wnt-x.

Příklad 13: Použití hOB SFRP při metodě screeningu na anabolické prostředky

V předkládaném vynálezu se navrhuje nový příklad screeningu
20 na anabolické kostní prostředky použitím SFRP. Jak je uvedeno na obr. 17, tento příklad screeningu používá buňky hOB a SFRP-1/FRP-1/SARP-2 pro identifikaci sloučenin, které jsou schopny zabránit nebo zpomalit smrt buněk osteoblastů. Tyto sloučeniny působí blokováním schopnosti SFRP-1/FRP-1/SARP-2 urychlovat smrt buněk hOB. Tyto
25 sloučeniny se vážou na SFRP-1/FRP-1/SARP-2 a zabraňují jejich vazbě na protein Wnt, nebo se mohou vázat na Wnt a zabránit jeho vazbě na SFRP-1/FRP-1/SARP-2. Jestliže má SFRP-1/FRP-1/SARP-2 aktivity, které jsou nezávislé na vazbě Wnt (například vazba na receptor na buněčném povrchu), potom by mohly tyto sloučeniny také
30 působit zabráněním této funkci nezávisle na Wnt.

Pro počáteční test příkladu screeningu znázorněného na obr. 17 se sloučeniny inkubují s buněčnou linií hOB a SFRP-1/FRP-1/SARP-2. Tento test by mohl využívat čištěného nebo částečně čištěného proteinu SFRP-1/FRP-1/SARP-2, nebo kondiciovaných médií nebo buněčných extraktů s obsahem SFRP-1/FRP-1/SARP-2. Buněčná linie hOB by mohla být například linie, která přirozeně exprimuje vysoké základní hladiny SFRP-1/FRP-1/SARP-2 (například buňky hOB-01-C1), které přechodně nebo stabilně nadměrně exprimují SFRP-1/FRP-1/SARP-2 (například buňky hOB-01-C1-PS-09), nebo které stabilně nebo přirozeně exprimují SFRP-1/FRP-1/SARP-2 podmíněčným způsobem (například buňky hOB-03-C5 ošetřené PGE₂). Jako měření smrti buněk hOB se při testu stanoví počet buněk (například konverzí barviva MTT nebo MTS nebo fluorescencí CyQuantDNA) nebo apoptóza (například fragmentací DNA nebo vazbou annexinu V). soupravy CyQuant byly získány od firmy Molecular Probes (Eugene, OR).

Příklad vysoce výkonného screeningu (HTS) na inhibitory SFRP-1/FRP-1/SARP-2 je znázorněn na obr. 18. Pro účely tohoto testu byly zaočkovány buď prázdný vektor (pcDNA3.1) nebo buňky hOB-01-C1-PS-09 stabilně nadměrně exprimující SFRP-1/FRP-1/SARP-2 (SARP-2 #1) v množství 5000 buněk na jamku do 96-jamkových destiček do růstového média. Po krátké inkubaci 6 hod při 34 °C byly jamky opláchnuty PBS a inkubovány v médiu BSA při 39 °C 3 dny. Na konci inkubace byly jamky znovu opláchnuty PBS a potom testovány na obsah DNA použitím CyQuant DNA fluorescence assay (Molecular Probes). Při porovnání s buňkami s prázdným vektorem umíraly buňky s nadměrnou expresí SARP-2 při 39 °C rychleji, takže po třech dnech bylo naživu pouze 20 až 30 % buněk. Naopak při inkubaci buněk s prázdným vektorem přežilo 50 až 60 % buněk. Jestliže bylo na buňky s nadměrnou expresí SARP-2 působeno antipeptidovým antisérem (AS) vytvořeným proti aminokyselinám 217 - 231 SFRP-1/FRP-1/SARP-2, po třech dnech bylo naživu 50 až 60 % buněk. To ukazuje,

že inhibice funkce proteinu SFRP-1/FRP-1/SARP-2 zabrání urychlování smrti buněk hOB jeho působením. Při kontrolách nemělo preimunní sérum žádný vliv na buňky s nadměrnou expresí SARP-2, a ani preimunní ani imunní séra neovlivňovala buňky exprimující prázdný vektor.

Sloučeniny, které blokovaly smrt buněk hOB indukovanou SFRP-1/FRP-1/SARP-2, byly potom použity pro další testy in vitro. Tyto testy měří schopnost těchto sloučenin blokovat smrt buněk hOB v závislosti nebo bez závislosti na SFRP-1/FRP-1/SARP-2, a rovněž by určily schopnost a účinnost těchto sloučenin provádět uvedené činnosti. Další testy jsou navrženy pro zjištění selektivity buněk na tyto sloučeniny pro dosažení těchto účinků (například použitím MCF-7 nebo jiných buněk), stejně jako specifity těchto sloučenin pro SFRP-1/FRP-1/SARP-2 ve srovnání s dalšími členy skupiny SFRP/SARP (například FrzB/Fritz, SARP-1 nebo SARP-3). Další testy by také mohly být použity pro zjištění, zda tyto sloučeniny řídí signály ve směru transkripce, které se účastní při apoptóze (například aktivita kaspázy) nebo aktivitě Wnt (například hladiny β -kateninu a funkce zjišťované testem na TCF-luciferázu). Konečně by mohly být sloučeniny, které vykazují vhodné aktivity v uvedených testech in vitro, použity v řadě živočišných modelů pro tvorbu kostí, osteopenii nebo osteoporózu (například krysy nebo myši zbavené vaječníků). Sloučenina, která inhibovala apoptózu osteoblastů/osteocytů by tedy byla vhodnou látkou s anabolickými účinky na kosti prodloužením života těchto buněk, a tím by došlo buď ke zvýšení množství kostní matrice, která se syntetizována a mineralizována, a/nebo udržení integrity kosti.

Je zřejmé, že vynález může být použit při jiných aplikacích než které se konkrétně popisují v předcházejícím popisu a příkladech. Na základě uvedených poznatků je možná řada modifikací a variací předkládaného vynálezu, které proto budou v rámci přiložených nároků.

Příklad 14: Vyvinutí a použití myši bez SFRP-1 (SFRP-1 Knock-Out)

Jak je uvedeno na obr. 13, sloučenina inhibující apoptózu osteoblastů/osteocytů by byla vhodným účinným prostředkem s anabolickým působením na kosti prodloužením života těchto buněk a tím buď zvýšením množství syntetizované a mineralizované kostní matrice, a/nebo udržením integrity kosti. Pro otestování této hypotézy a zjištění, zda SFRP-1/FRP-1/SARP-2 ovlivňuje kostru, byly připraveny SFRP-1^{neg} myši (viz Wattler a další, 1999, BioTechniques 26: 1150 - 1160). Delece genu SFRP-1/FRP-1/SARP-2 z myši by měla podobné účinky jako inhibice jeho funkce pomocí léčiva, a tento způsob dovolí vyhodnotit tento gen/protein jako potenciální cíl léčiva na osteoporózu.

Jak je shrnuto v obr. 19, SFRP-1 knock-out myši byly získány substitucí exonu 1 myšního genu SFRP-1 za expresní kazetu obsahující reporterový gen β -galaktosidázy/gen rezistence na neomycin. Jak je ukázáno na obr. 20, analýza northernovým penosem polyA⁺ RNA izolované buď ze samičích nebo samčích ledvin (věk 16 až 18 týdnů) ukázala vysoké hladiny exprese mRNA SFRP-1 (4,4 kb) u kontrolních myši standardního typu (WT), ale úplnou nepřítomnost genové exprese u knock-out (KO) myši.

Jak je ukázáno na obr. 21, pro charakterizaci trámčité architektury kosti distálního femuru samců a samic kontrolních myši standardního typu (+/+) a knock-out (-/-) byla použita mikropočítačová tomografie (micro-CT) (přehledný článek zabývající se touto technikou viz Genant a další, 1999, Bone 25: 149 - 152 a Odgaard, 1997, Bone 20: 315 - 328). U samců stáří 20 týdnů (část A) měly myši -/- o 31 % větší objem trámčité kosti (BV/TV) a 8% zvýšení tloušťky trámců (Tb.Th.), při srovnání s kontrolními myšmi +/+. U samic stáří 26 až 27 týdnů (část B) bylo u myši -/- pozorováno 91% zvýšení hustoty spojování prostřednictvím trámců (Conn. Den.), a 16% zvýšení počtu trámců (Tb.N.) a 16% snížení mezer mezi trámci (Tb. Sp.) při

porovnání s kontrolními myšmi +/- . Na podporu této hypotézy tedy uvedené výsledky ukazují, že delece genu SFRP u myší vede ke zlepšení parametrů tvorby trámčité kosti (P. J. Meunier, 1995, Bone Histomorphometry, v Osteoporosis: Etiology, Diagnosis and Management, 2. vydání, B. L. Riggs & L. J. Melton III, ed., Lippincott-Raven, Philadelphia, str. 299 - 318).

Zastupuje:

PATENTOVÉ NÁROKY

- 5 1. Farmaceutický prostředek pro regulaci aktivity při tvorbě kostí u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň jednu z následujících složek:
- (i) sekrenovaný protein příbuzný s proteiny frizzled neboli SFRP, nebo jeho regulační část,
- 10 (ii) protilátku vytvořenou z takových proteinů nebo jejich částí,
- (iii) nukleovou kyselinu kódující buď (i) nebo (ii), a
- (iv) pozitivní neboli antisense formu kterékoli z položek odstavce (iii).
- 15 2. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e SFRP je z buněk lidských osteoblastů.
3. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e aktivita při tvorbě kostí je řízení růstu kostí.
- 20 4. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e aktivita při tvorbě kostí je řízení hustoty kostí.
- 25 5. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e SFRP má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID No. 2.

6. Způsob léčení onemocnění kostí u savce, který zahrnuje podávání farmaceutického prostředku podle některého z nároků 1 až 5.
- 5
7. Způsob léčení onemocnění kostí podle nároku 6, kde uvedené onemocnění zahrnuje skupinu (a) poruchy tvorby kostí, (b) poruchu resorpce kostí a (c) poruchu hustoty kostí.
- 10
8. Způsob podle nároku 6, kde onemocněním je degenerativní onemocnění kostí.
- 15
9. Způsob podle nároku 8, kde degenerativní onemocnění kostí je zvoleno ze skupiny neurodegenerativních, myodegenerativních a osteodegenerativních onemocnění.
- 20
10. Způsob podle nároku 9, kde uvedené osteodegenerativní onemocnění je zvoleno ze skupiny osteopenie, osteoartritida a osteoporóza.
- 25
11. Způsob podle nároku 6, kde uvedeným savcem je člověk.
12. Způsob identifikace testovaných sloučenin řídících aktivitu SFRP, kde uvedené sloučeniny řídí aktivitu při tvorbě kostí u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje následující kroky: (a) vzorek obsahující SFRP se inkubuje v testovacím médiu obsahujícím uvedenou testovanou sloučeninu a (b) stanoví se aktivita SFRP, přičemž zvýšení

aktivitu ve srovnání se samostatným SFRP ukazuje, že uvedená sloučenina je aktivátor SFRP, a snížení aktivity ukazuje, že sloučenina je inhibitor SFRP.

- 5 13. Způsob modulace přenosu signálů prostřednictvím Wnt v buňce, který zahrnuje uvedení buňky do styku s SFRP podle některého z nároků 1 až 5, přičemž se řídí aktivita Wnt.
- 10 14. Způsob modulace přenosu signálů zprostředkovaného Wnt podle nároku 13, kde SFRP má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID No. 2.
- 15 15. Způsob umožnění tvorby nebo opravy kostí v kultuře kostních buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje izolaci buněk z kostní kultury, zavedení rekombinantního konstruktu exprimujícího pozitivní neboli antisense sekvenci vzhledem k nukleotidové sekvenci kódující SFRP, který má aminokyselinovou sekvenci uvedenou v SEQ ID No. 2, a navrácení uvedených buněk do kostní kultury.
- 20 16. Polynukleotidová sonda schopná hybridizovat s polynukleotidem se sekvencí nukleové kyseliny uvedenou v SEQ ID No. 1.
- 25 17. Způsob diagnózy pro detekci polynukleotidu SFRP ve vzorku odvozeném ze savčího hostitele, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje detekci přítomnosti nebo nepřítomnosti SFRP ve vzorku s použitím sondy podle nároku 16.

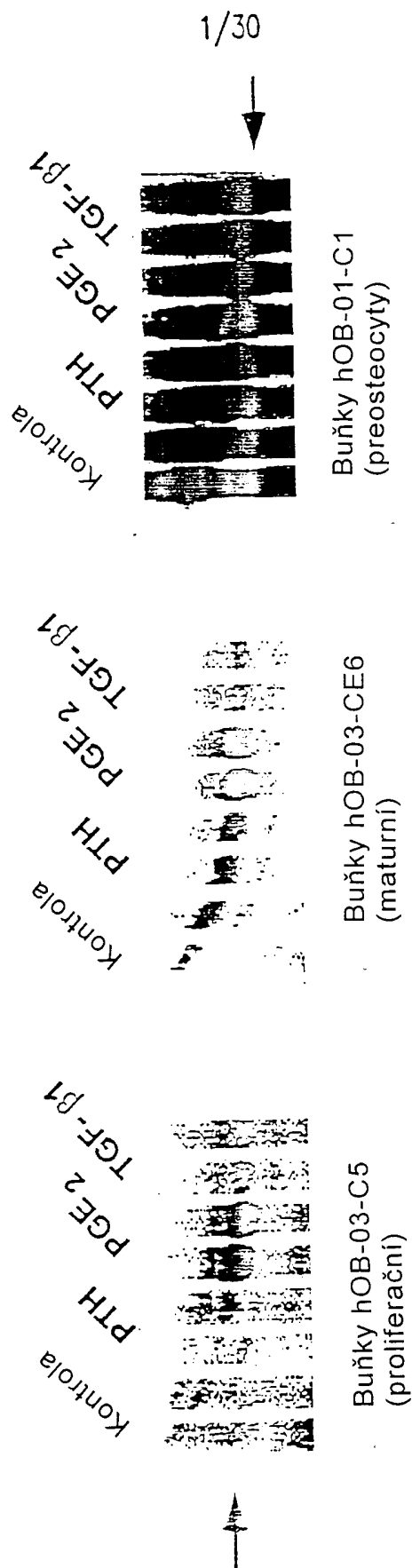
18. Farmaceutický prostředek podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje přijatelný nosič nebo ředivo.
- 5 19. Prostředek pro řízení aktivity při tvorbě kostí u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje alespoň jednu protilátku proti sekrenovanému proteinu příbuznému s proteiny frizzled neboli SFRP, nebo jeho regulační části.
- 10 20. Farmaceutický prostředek podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje přijatelný nosič nebo ředivo.
- 15 21. Farmaceutický prostředek podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e protilátka je proti alespoň osmi za sebou následujícím aminokyselinám proteinu SFRP.
- 20 22. Farmaceutický prostředek podle nároku 19, kde protilátka je proti alespoň 10 za sebou následujícím aminokyselinám proteinu SFRP.
- 25 23. Farmaceutický prostředek podle nároku 19, v y z n a -
- č u j í c í s e t í m , ž e protilátka je proti alespoň
aminokyselinám 217 až 231 proteinu SFRP SEQ ID No. 2.
24. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 1 až 4
a 18 až 21, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e SFRP

má aminokyselinovou sekvenci získanou expresí polynukleotidové sekvence SEQ ID No. 1.

- 5 25. Způsob identifikace testovaných sloučenin řídících aktivitu SFRP, kde tyto sloučeniny řídí aktivitu při tvorbě kostí u savce, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e se (a) porovná aktivita vzorku na zvířeti SFRP^{neg} s aktivitou v nepřítomnosti vzorku, přičemž zvýšení nebo snížení aktivit souvisejících s SFRP ukazuje, že uvedená sloučenina moduluje aktivitu SFRP.
- 10 26. Imortalizovaná buňka lidského osteoblastu, hOB, která exprimuje mutantu velkého T-proteinového antigenu opičího viru 40 citlivou na teplotu, kde buňka proliferuje při teplotě přibližně 34 °C, ale neproliferuje při teplotách vyšších než 15 přibližně 37 °C, jestliže mutanta T-antigenu je aktivní.
27. Buňka hOB podle nároku 26, která exprimuje nukleotidovou sekvenci kódující polynukleotid, který kóduje SFRP nebo jeho fragment.
- 20 28. Buňka hOB podle nároku 26, kde hOB je buňka hOB-01-C1-PS-09 uložená ve sbírce American Type Culture Collection in Manassas, Va, pod depozitním číslem PTA-785, nebo její potomstvo.
- 25 29. Homogenní populace buněk obsahující buňku hOB podle nároku 26.

Zastupuje:

Výsledky pro osteogenní fragment RADE: SFRP
 Řada #1: Kontrola, PTH, PGE₂ a TGF-β1



Analýza sekvence: homologní s myším sekrenovaným proteinem 1
 příbuzným s proteiny frizzled a bovinním FrzA

Obr. 1

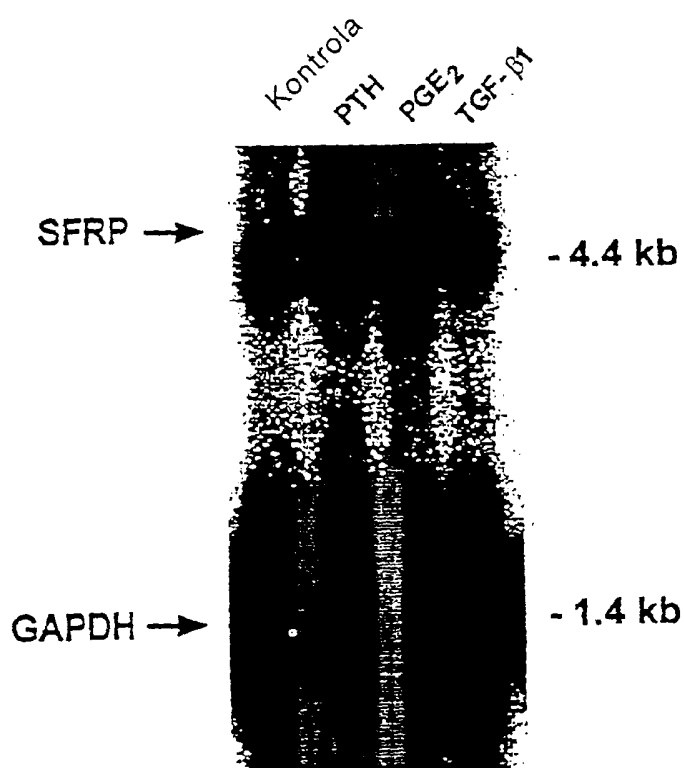
14.05.02
 PV 2002-903
 36/88

14.05.02

2/30

PV 2002-903
36/088

Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
Northernový přenos poly(A)+RNA
(jako sonda byl použit vyříznutý fragment RADE)



Buňky hOB-03-C5
(proliferační)

Obr. 2

14.05.02

3/30

PV 2002-903
36088

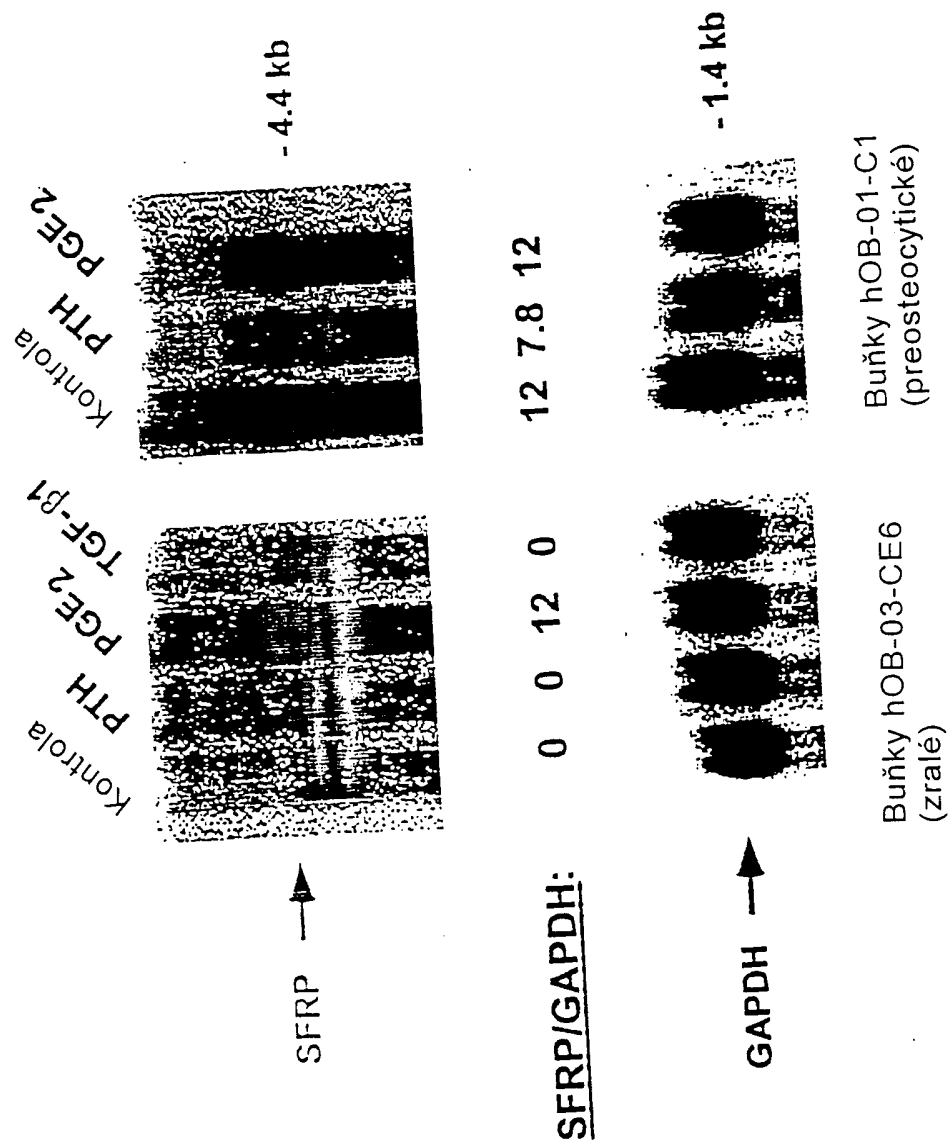
Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
Northernový přenos poly(A)+RNA
(jako sonda byl použit klonovaný fragment RADE)



Buňky hOB-03-C5
(proliferální)

Obr. 3

Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
 Northernový přenos poly(A)+RNA
 (jako sonda byl použit vyříznutý fragment RADE)



Obr. 4

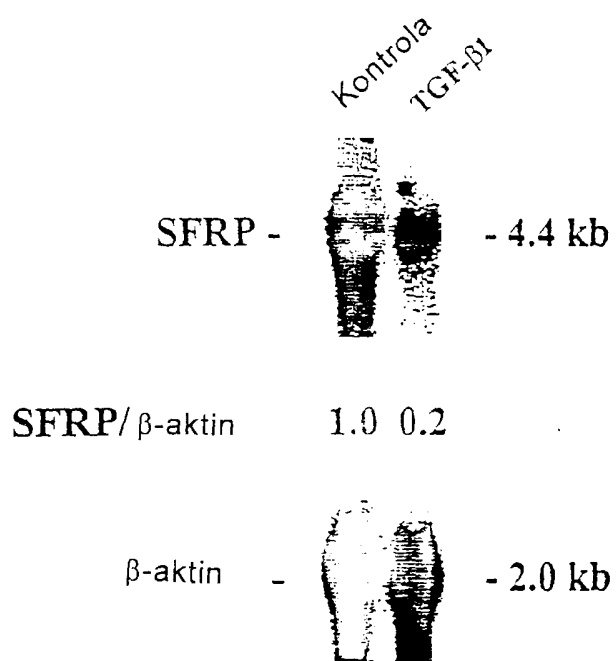
14.05.02

5/30

PV 2002-903

36888

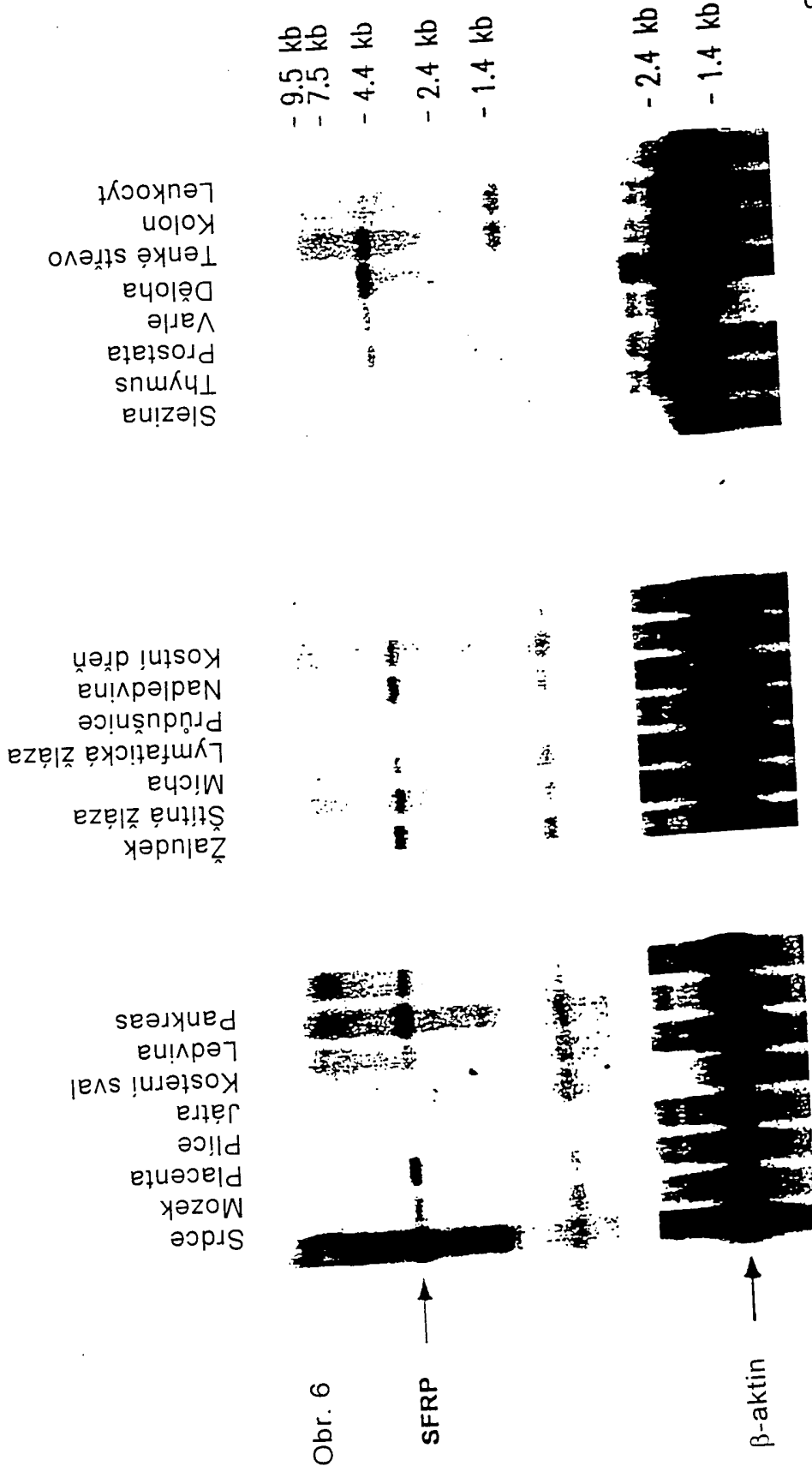
Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
Northernový přenos poly(A)+RNA
(jako sonda byla použita klonovaná 1,1 kb cDNA)



Buňky hOB-01-C1
(preosteocytické)

Obr. 5

Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
 Northernový přenos poly(A)+RNA z většího počtu tkání
 (jako sonda byl použit vyříznutý fragment RADE)



6/30

14.05.02

PV 2002-903

36/88

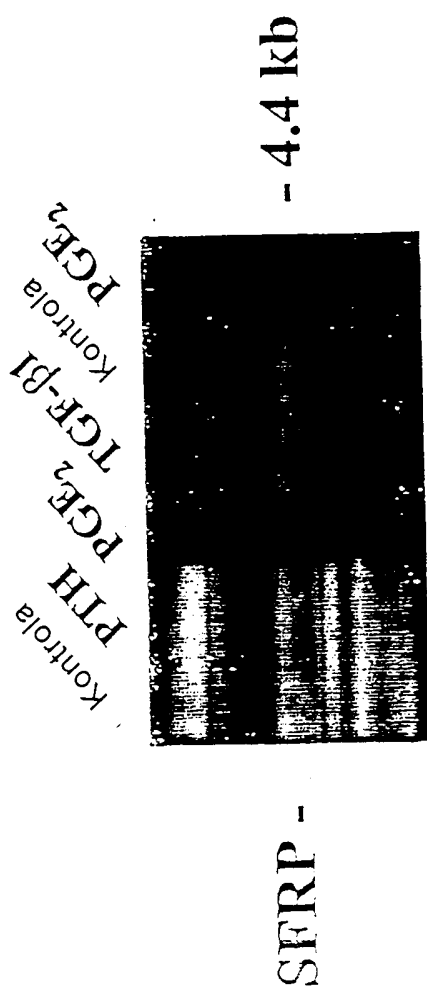
14.03.02

PV 2002 - 903

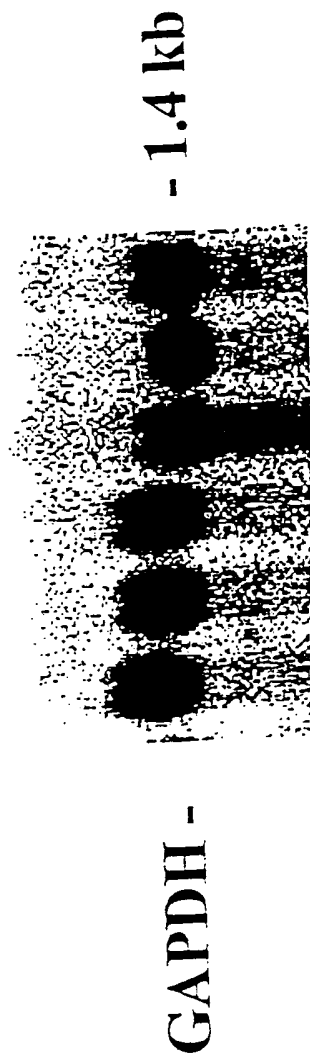
36088

7/30

Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
Northernový přenos poly(A)+RNA
(jako sonda byl použit klonovaný fragment 1,1 kb)



SaOS-2 hOB



Obr. 7

1.0 0.9 0.7 0.9 1.0 1.3

SFRP/GAPDH:

14.05.02

PV 2002 - 903

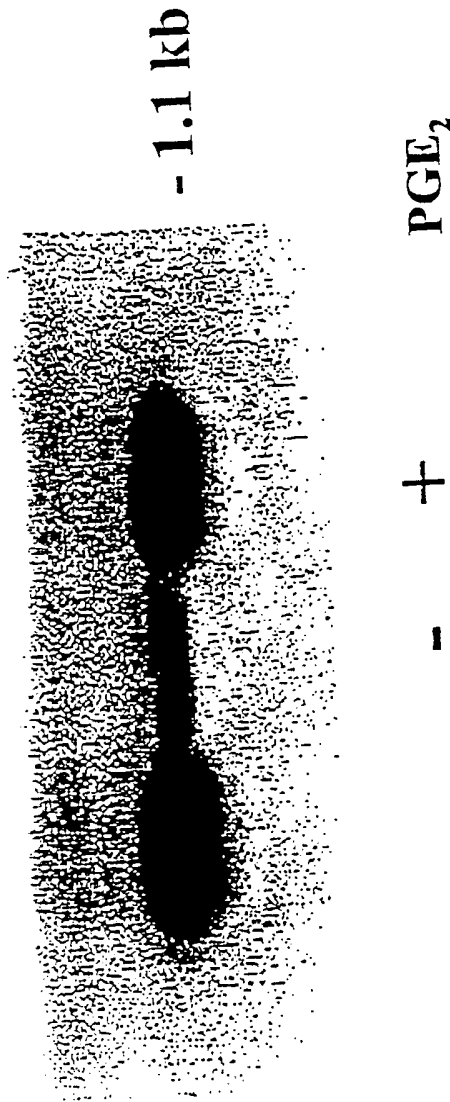
36088

8/30

RT-PCR pro kódující oblast FRP-1/SARP-2 v buňkách hOB-03-CE6

Southernův přenos s vnitřní oligonukleotidovou sondou

Placenta hOB



FRP-1/SARP-2 -

Obr. 8

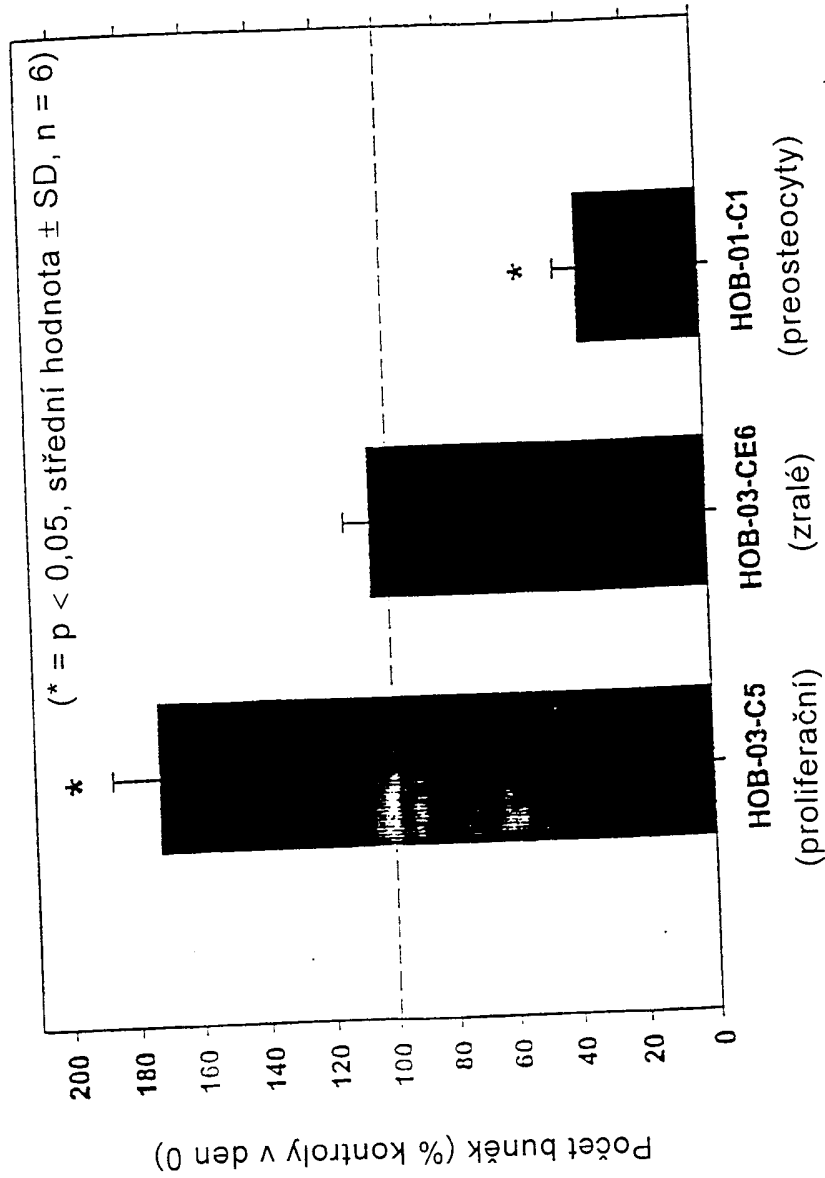
14.05.02

PI 2002 - 903

36088

9/30

Viabilita buněk hOB klesá se stoupajícím stupněm diferenciace



(Buňky hOB inkubované 6 dnů v médiu FBS při 39 °C)

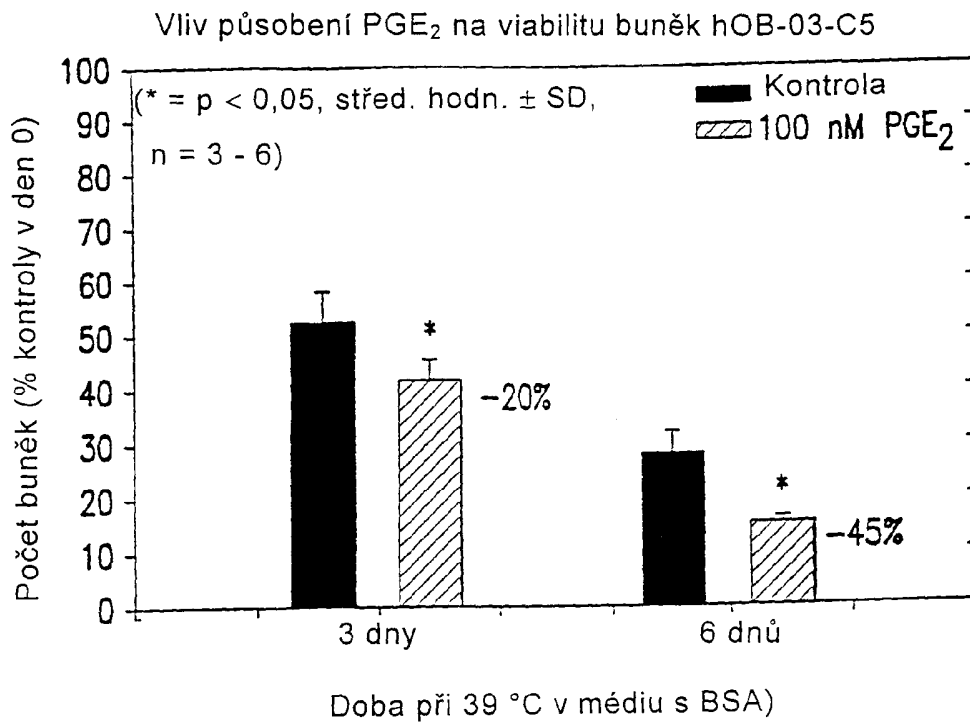
Obr. 9

10/30

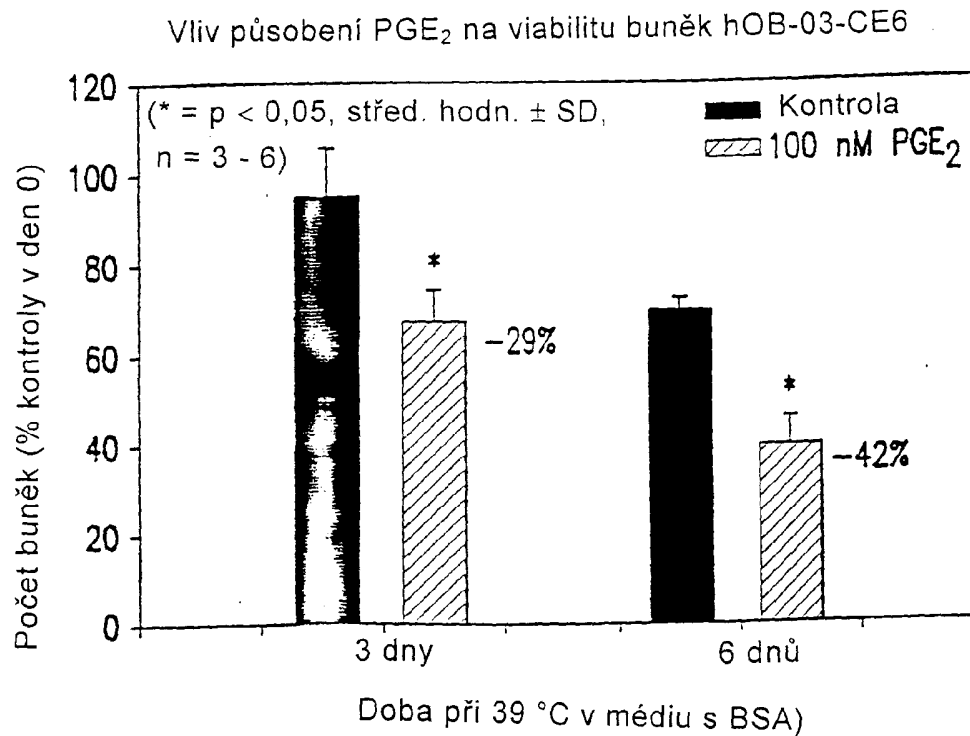
14.05.02

PI 2002-903

36088



Obr. 10A



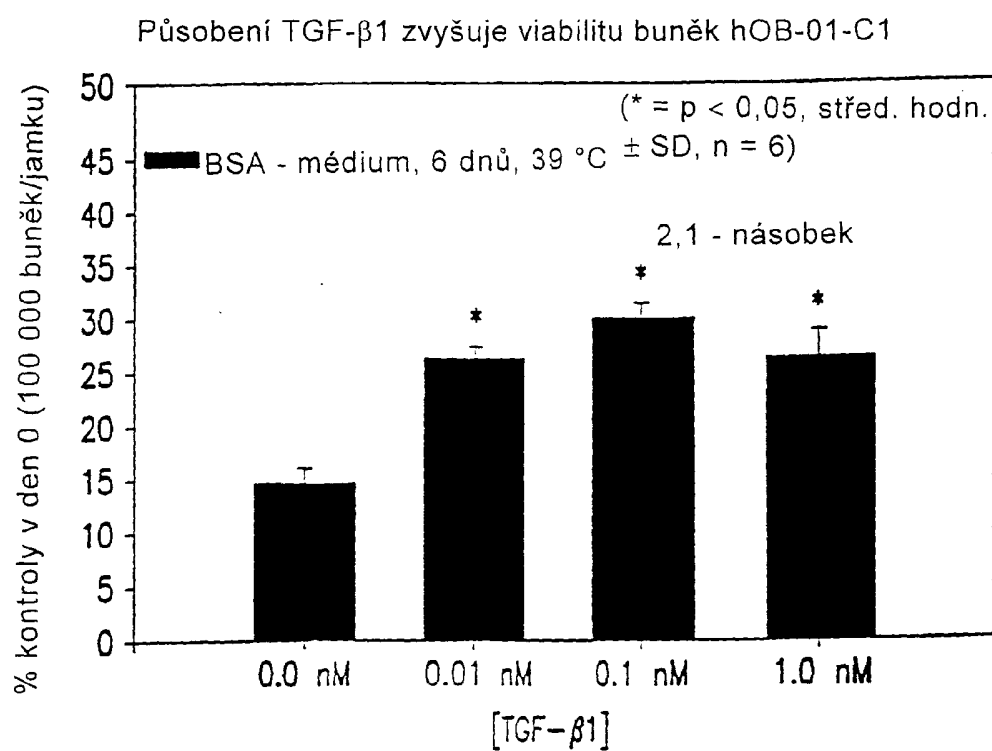
Obr. 10B

14.05.02

11/30

PV 2002-903

36888



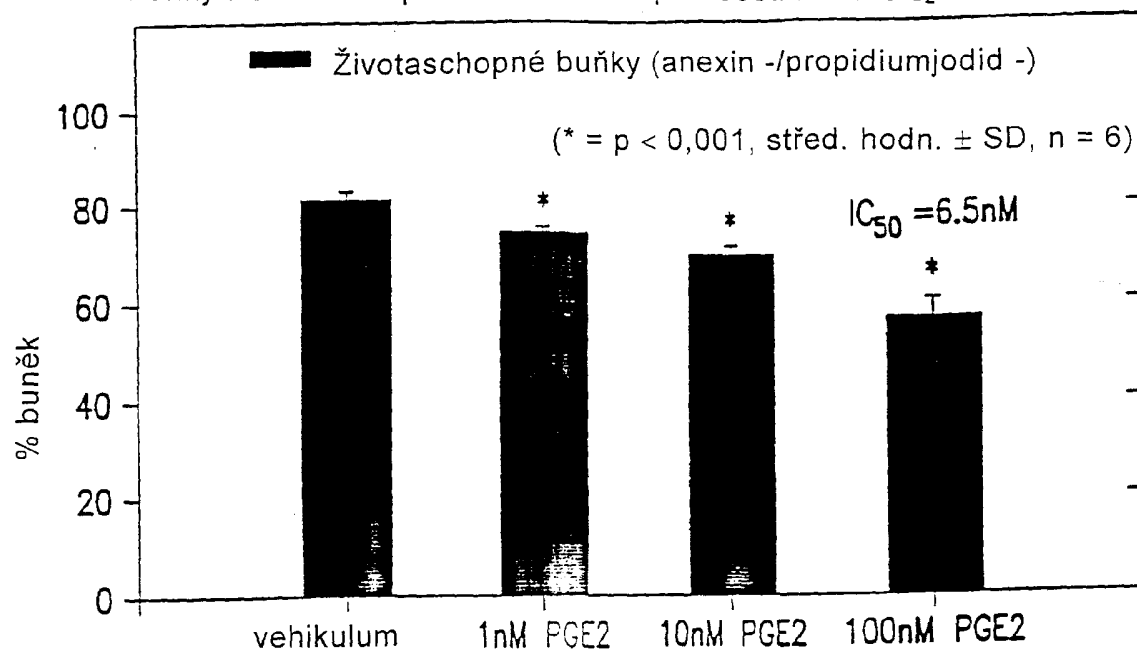
Obr. 10C

12/30

14.05.02

Test apoptózy metodou annexin V - FITC (průtoková cytometrie)
Buňky hOB-03-C5 proliferačního stupně ošetřené PGE₂

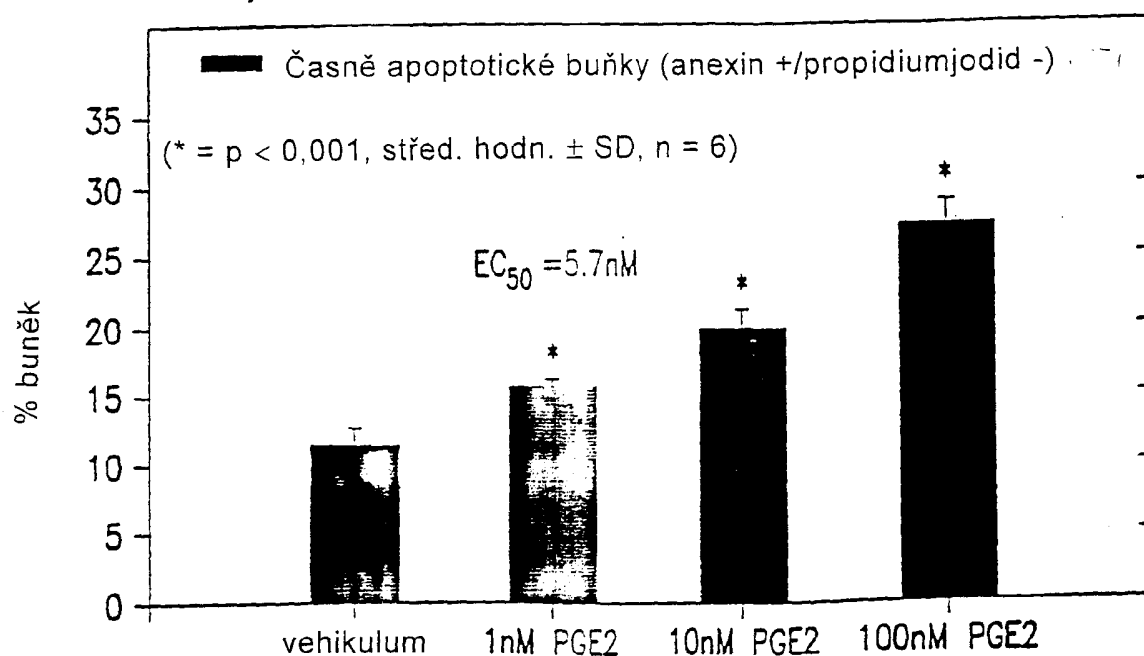
PV 2002-903
36 088



Působení na buňky
(BSA-médium, 6 dnů, 39 °C)

Obr. 11A

Test apoptózy metodou annexin V - FITC (průtoková cytometrie)
Buňky hOB-03-C5 proliferačního stupně ošetřené PGE₂



Působení na buňky
(BSA-médium, 6 dnů, 39 °C)

Obr. 11B

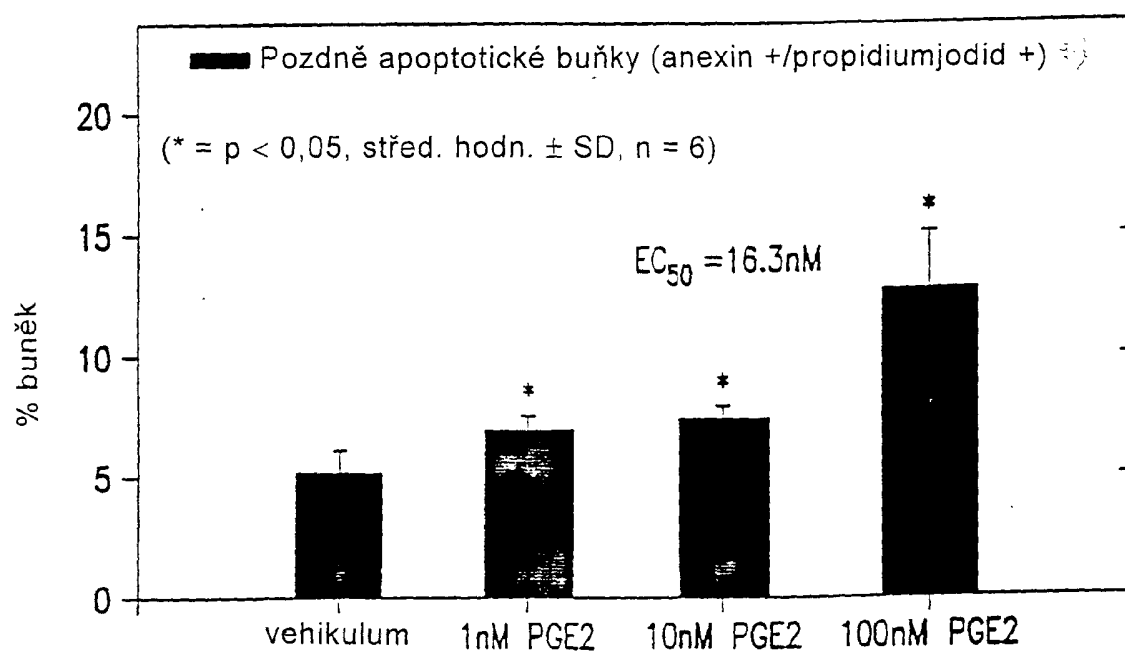
14.05.02

13/30

PI 2002-903

36/088

Test apoptózy metodou anexin V - FITC (průtoková cytometrie)
Buňky hOB-03-C5 proliferačního stupně ošetřené PGE₂



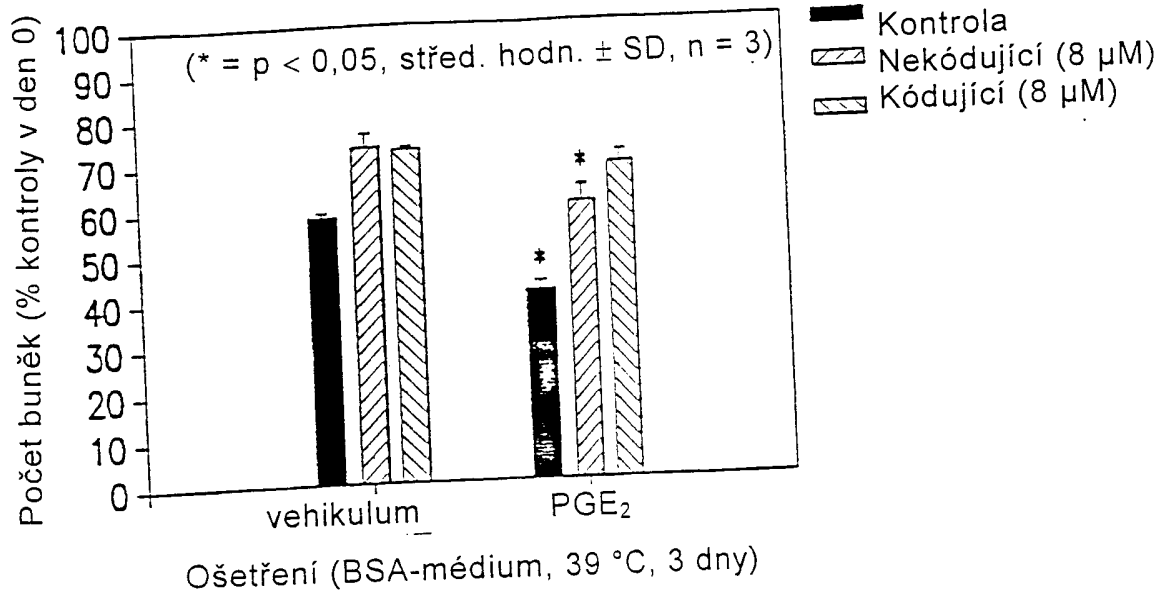
Působení na buňky
(BSA-médium, 6 dnů, 39 °C)

Obr. 11C

14.05.02
PV 2002 - 903
36088

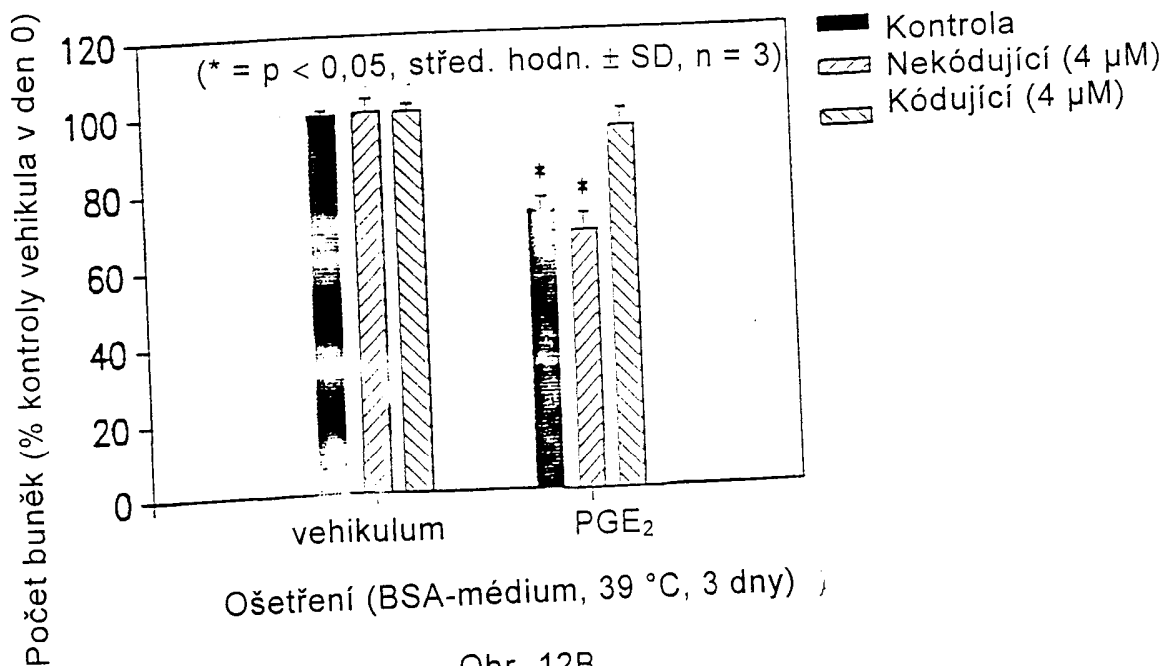
14/30

Nekódující oligonukleotid pro SARP-2 zaměřený na místo iniciace
zabráni indukci smrti buněk působením PGE₂ u buněk hOB-03-C5



Obr. 12A

Nekódující oligonukleotid pro SARP-2 zaměřený na místo iniciace
zabráni indukci smrti buněk působením PGE₂ u buněk hOB-03-CE6



Obr. 12B

14.05.02

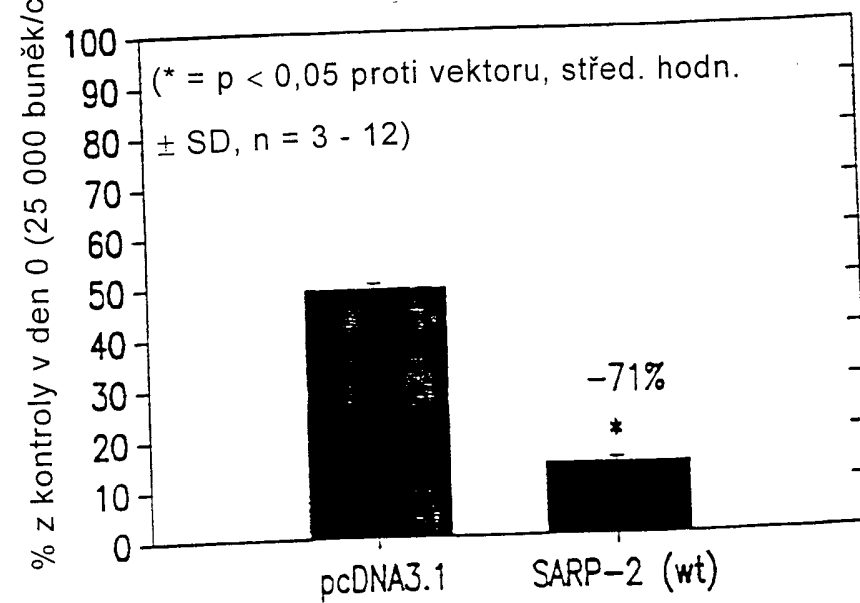
15/30

PI 2002-903

36088

Nadměrná exprese SARP-2 urychluje smrt buněk hOB
Vyhodnocení in vitro

Nadměrná exprese SARP-2 urychluje smrt buněk hOB-01-C1-PS-09



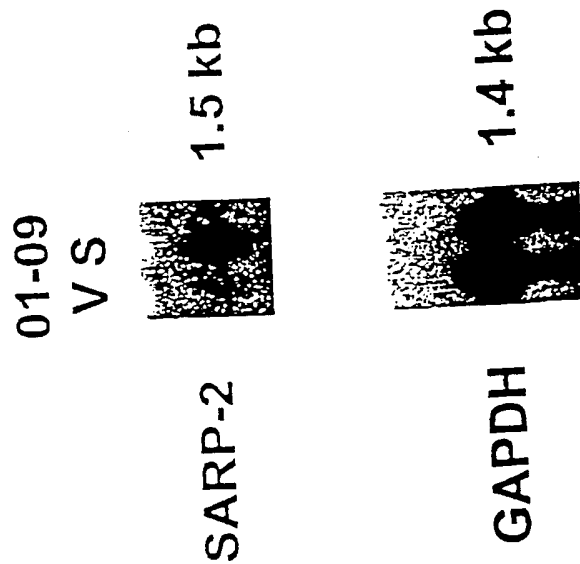
Ošetření látkami
(BSA-médium, 37 °C, 6 dnů)

Obr. 13A

Nadměrná exprese SARP-2 urychluje smrt buněk hOB

Vyhodnocení in vitro

Northernový přenos poly(A) + RNA



Obr. 13B

17/30

14.05.02

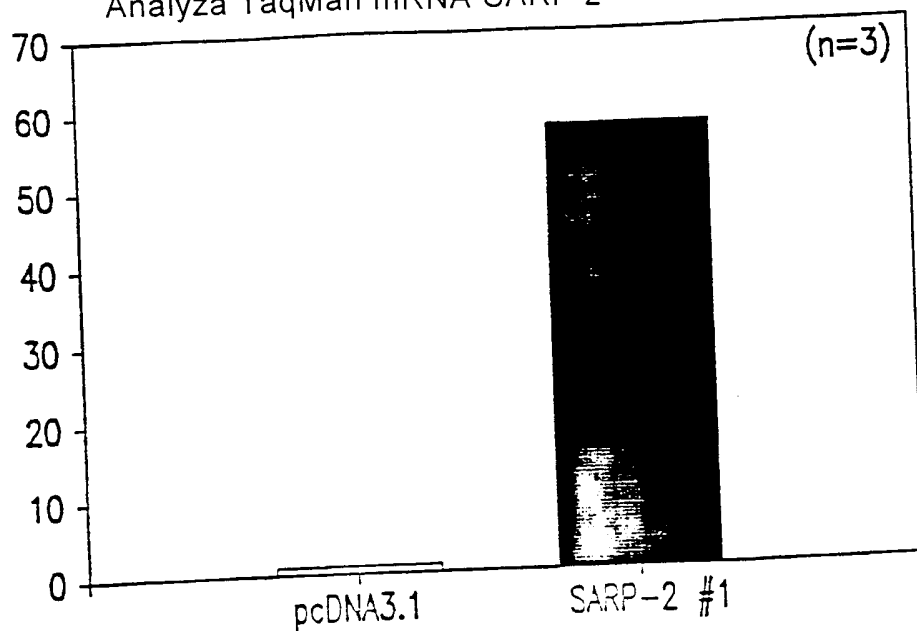
PI 2002-903

36088

Nadměrná exprese SARP-2 urychluje smrt buněk hOB
Vyhodnocení in vitro

Buňky hOB-01-C1-PS-09
Analýza TaqMan mRNA SARP-2

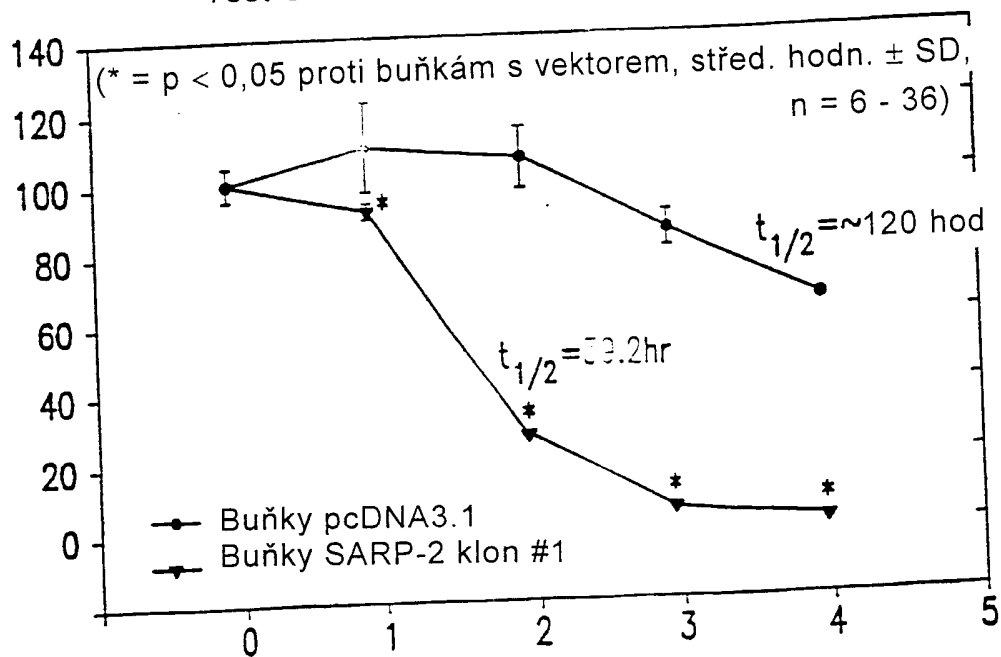
Násobek změny (vzhledem k buňkám s vektorem)



Preosteocytické buněčné linie hOB-01-09

Obr. 14A

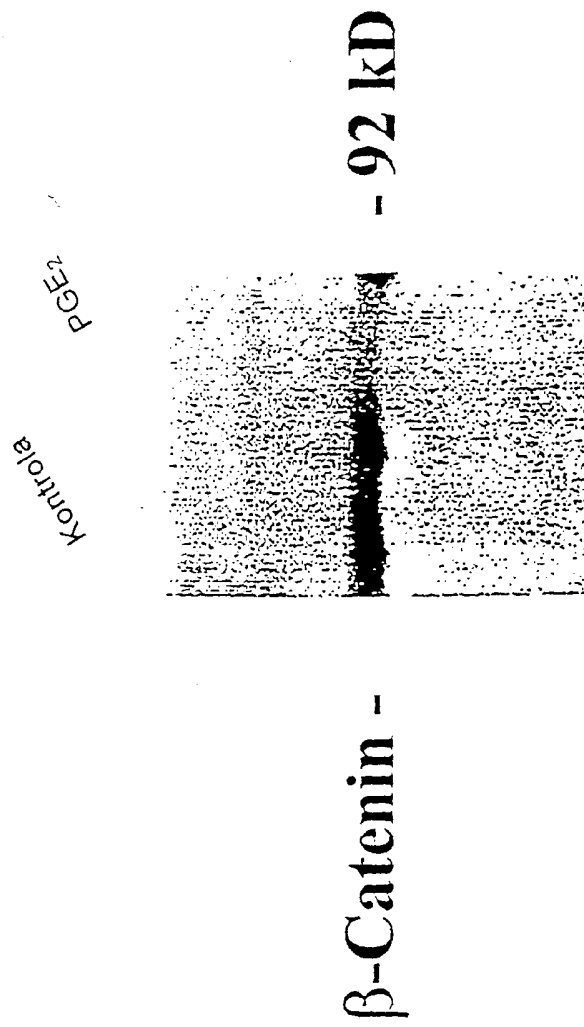
Buňky hOB-01-C1-PS-09
Test Coulter cell counter



Dny v kultuře (BSA-médium, 39 °C)

Obr. 14B

Potvrzení osteogenního RADE: SFRP
Westernový přenos extraktů celých buněk
(jako sonda byla použita monoklonální protilátka proti β -catenin)



Buňky hOB-03-CE6

Obr. 15

18/30

14.05.02

PI 2002-403
36/88

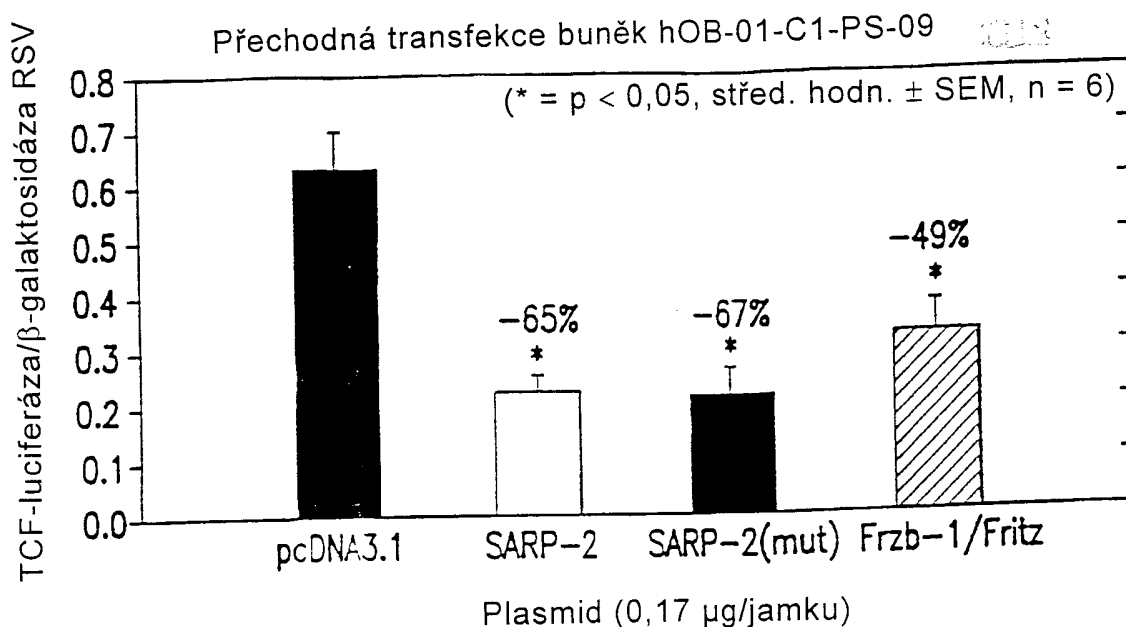
14.05.02

PI 2002-903

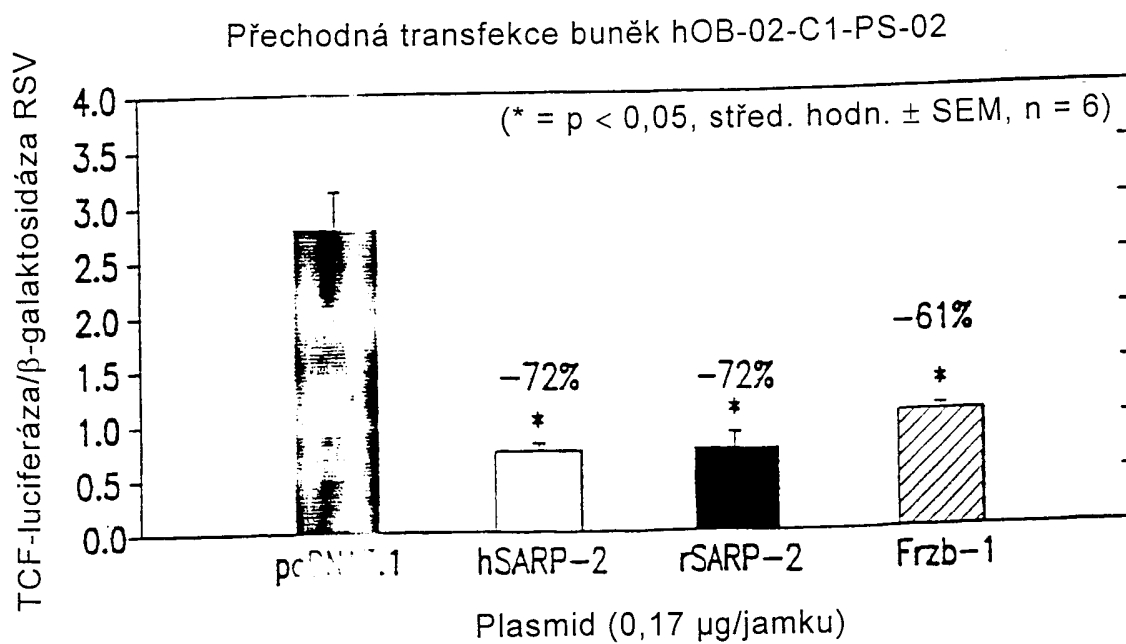
36/088

19/30

Nadměrná exprese SARP-2 antagonizuje přenos signálů Wnt
v buňkách hOB

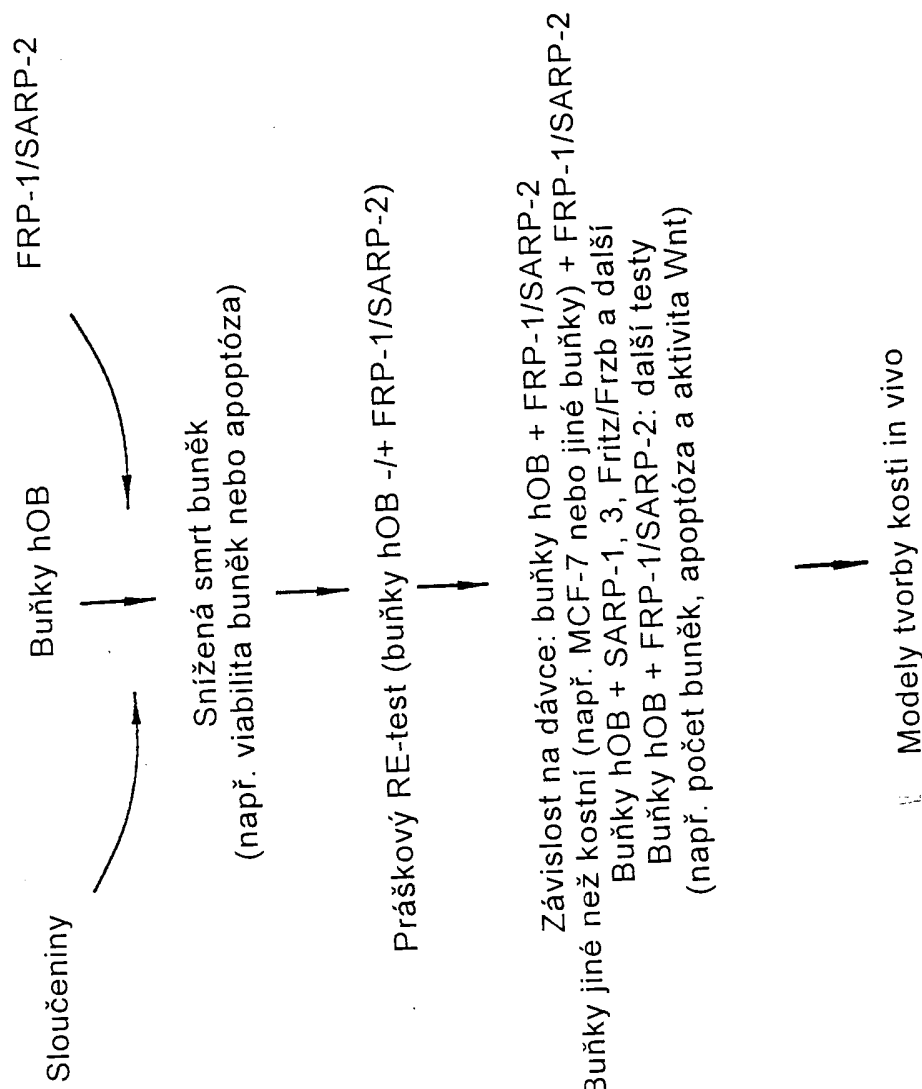


Obr. 16A



Obr. 16B

Použití lidských FRP-1/SARP-2 a buněk hOB při screeningu na prostředek s anabolickým účinkem na kosti



Obr. 17

14.05.02

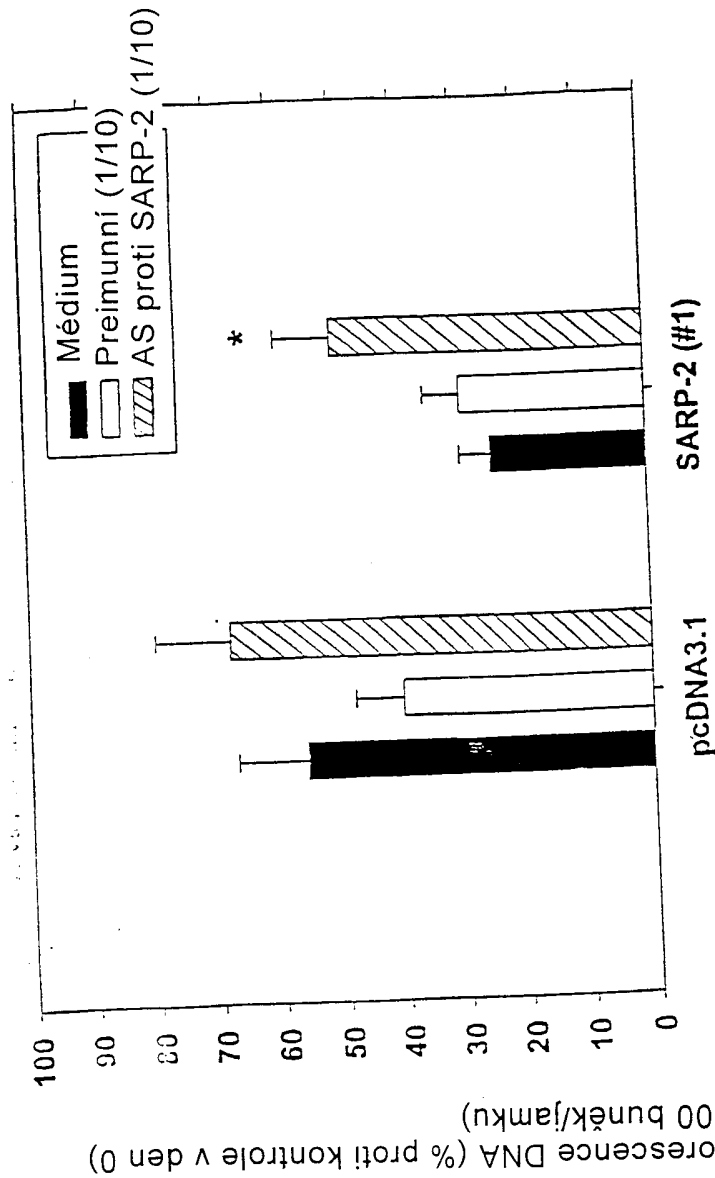
P1 2002 - 903

36/88

21/30

Antisérum proti SARP-2 blokuje smrt buněk indukovanou SARP-2 při HTS testu CyQuant

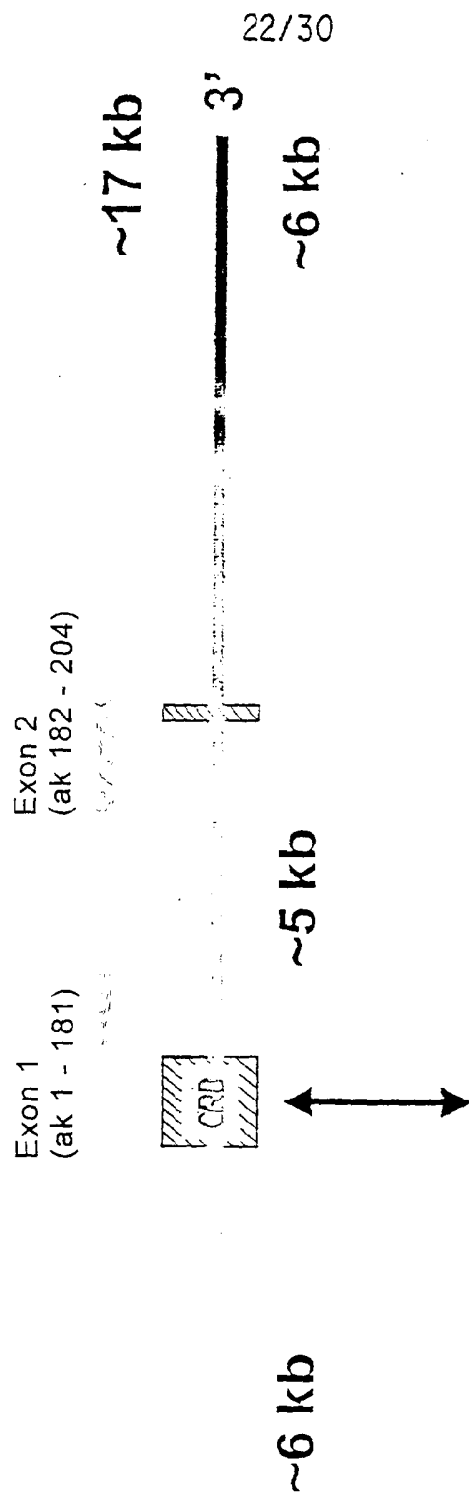
(* = $p < 0,001$ proti médiu s kontrolou, střed. hodn. $\pm$ SD, $n = 12-36$)



Buněčná linie hOB-01-C1-PS-09
(Médium s BSA, 39 °C, 3 dny)

Obr. 18

SFRP-1/SARP-2 - knock-out myši
Struktura genomu a konstruktů



Obr. 19

22/30

14.05.02

PI 2002-903
36888

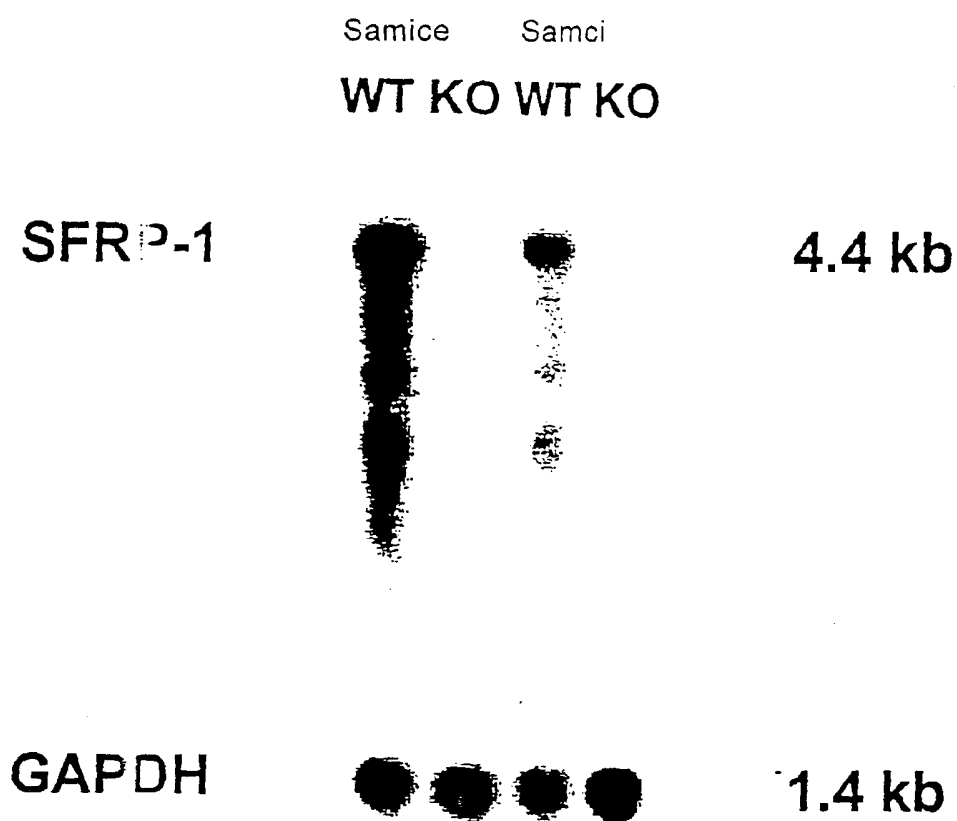
14.05.02

23/30

PV 2002-903

36/088

Myši SFRP-1: stáří 16 až 18 týdnů
(Northernový přenos poly A + RNA z ledvin)



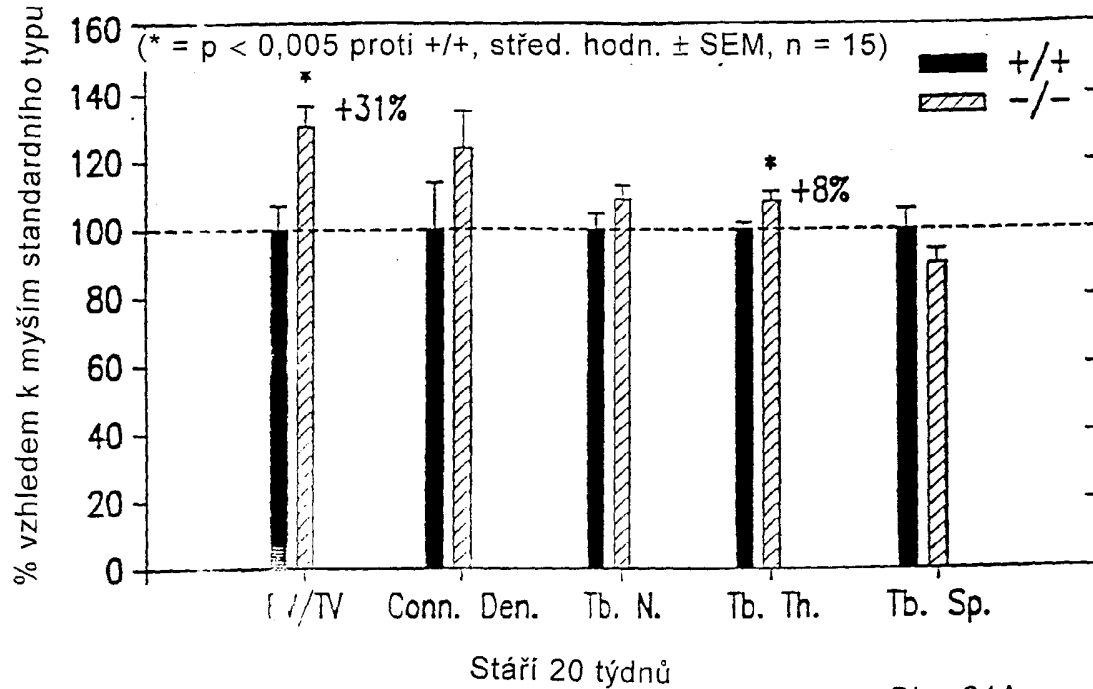
Obr. 20

24/30

14.05.00

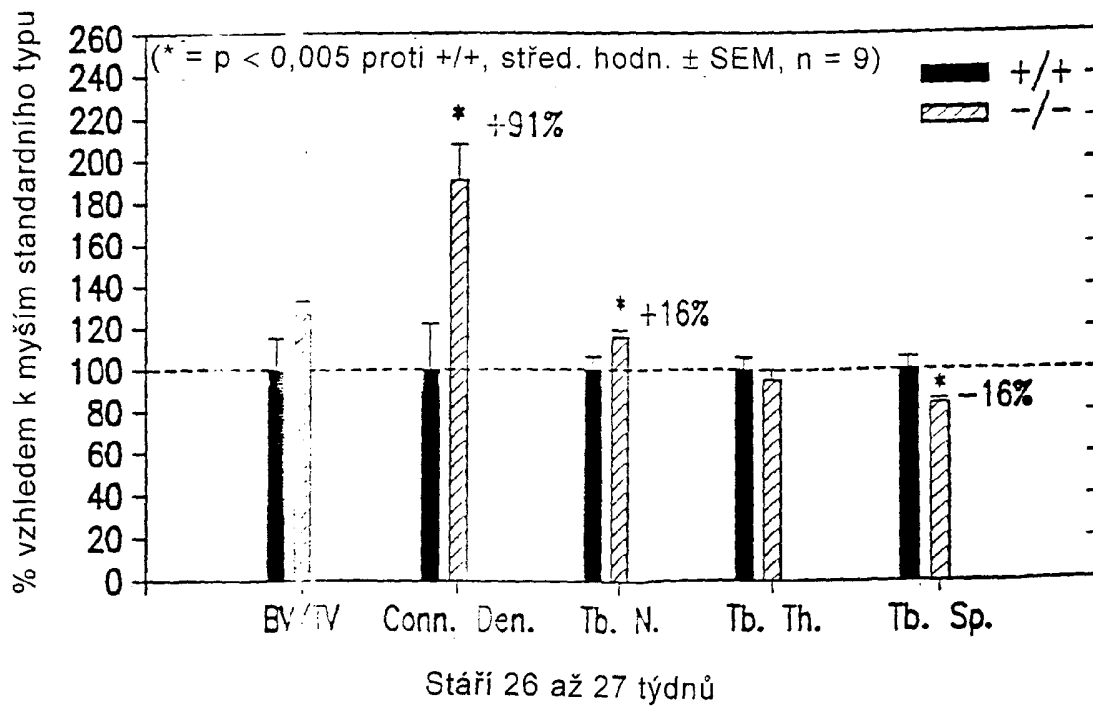
Myši SFRP-1 KO
Samci myši SFRP-1
 μ CT distálního femuru (1° & 2° spongiosa)

PV 2002-903
36/88

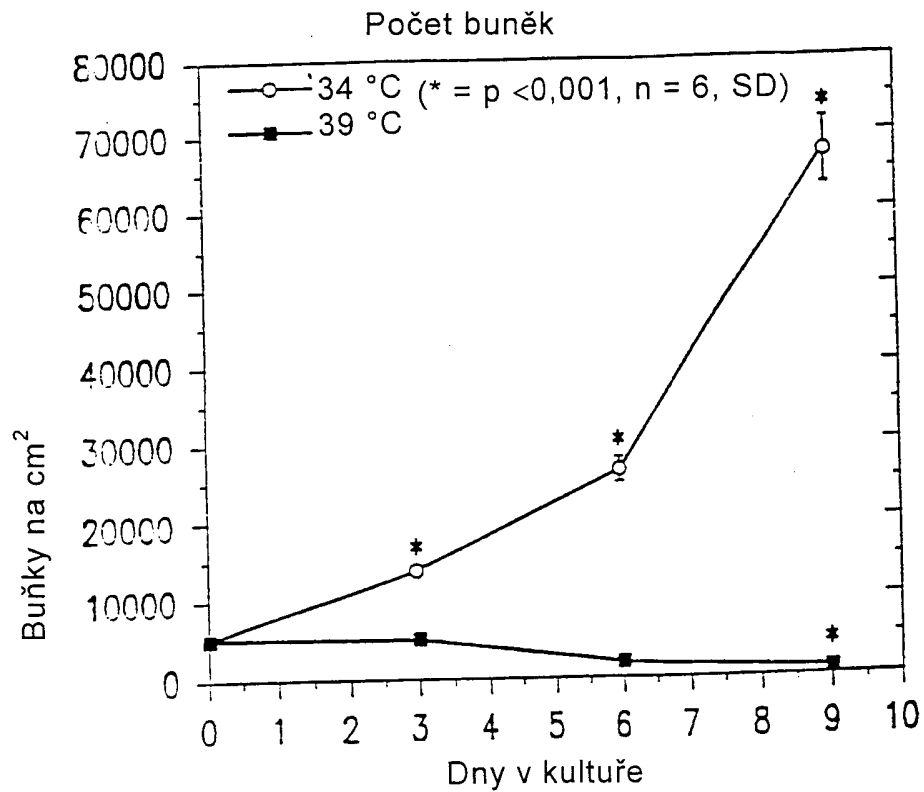


Obr. 21A

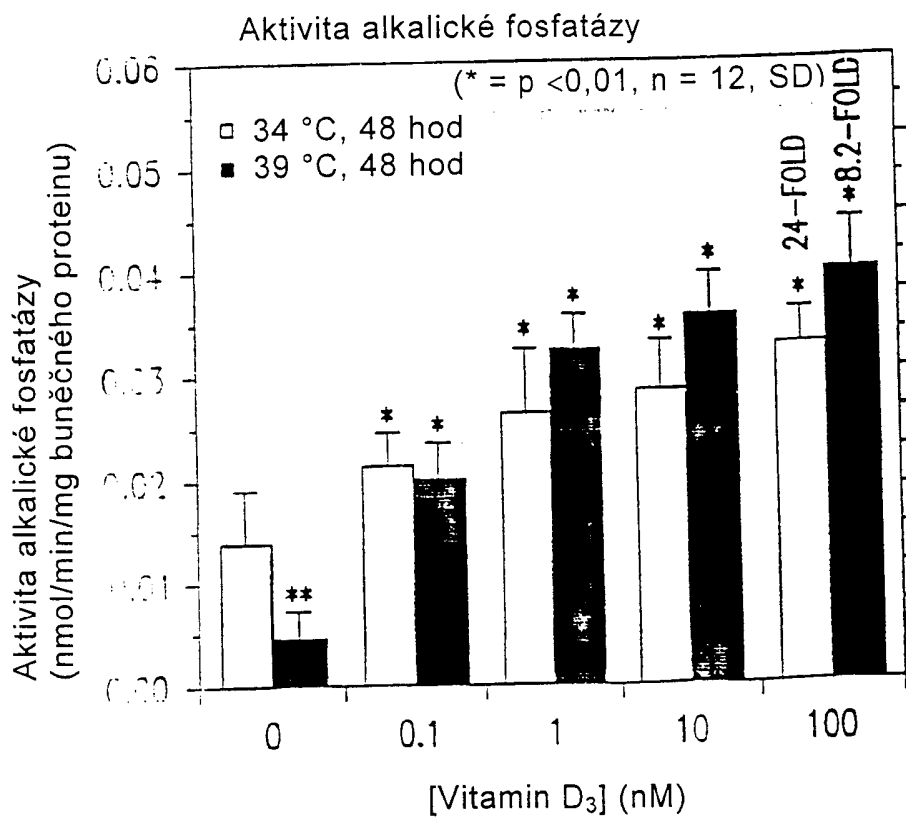
Samice myši SFRP-1
 μ CT distálního femuru (1° spongiosa)



Obr. 21B



Obr. 22A



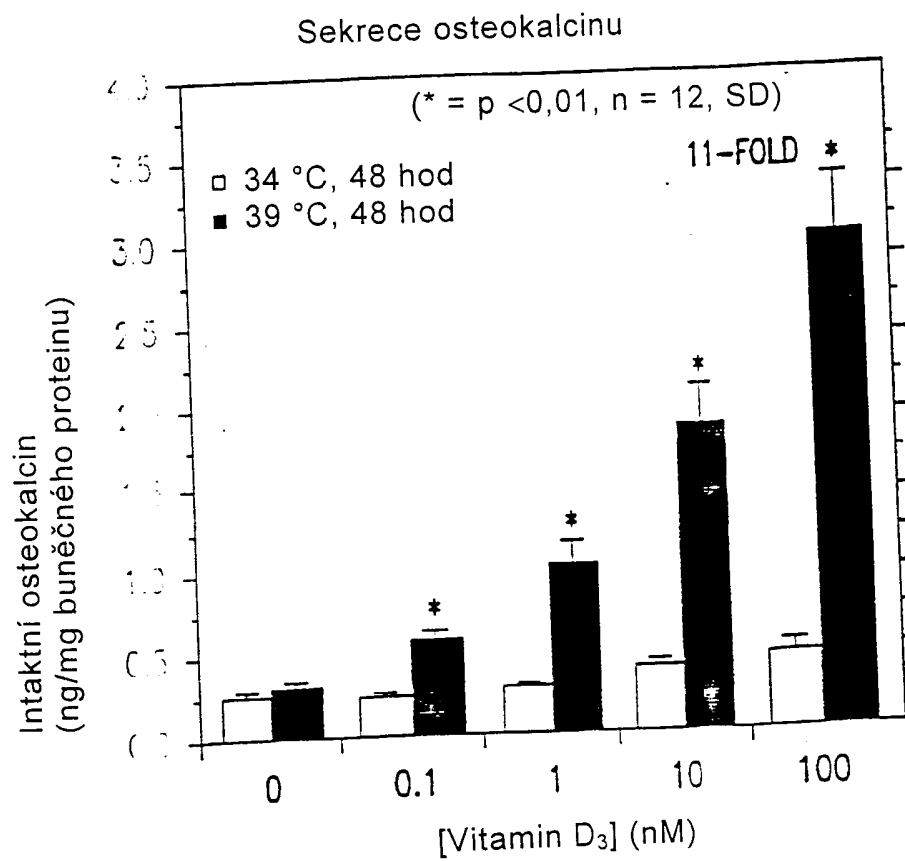
Obr. 22B

14.05.00

PI 2002-903

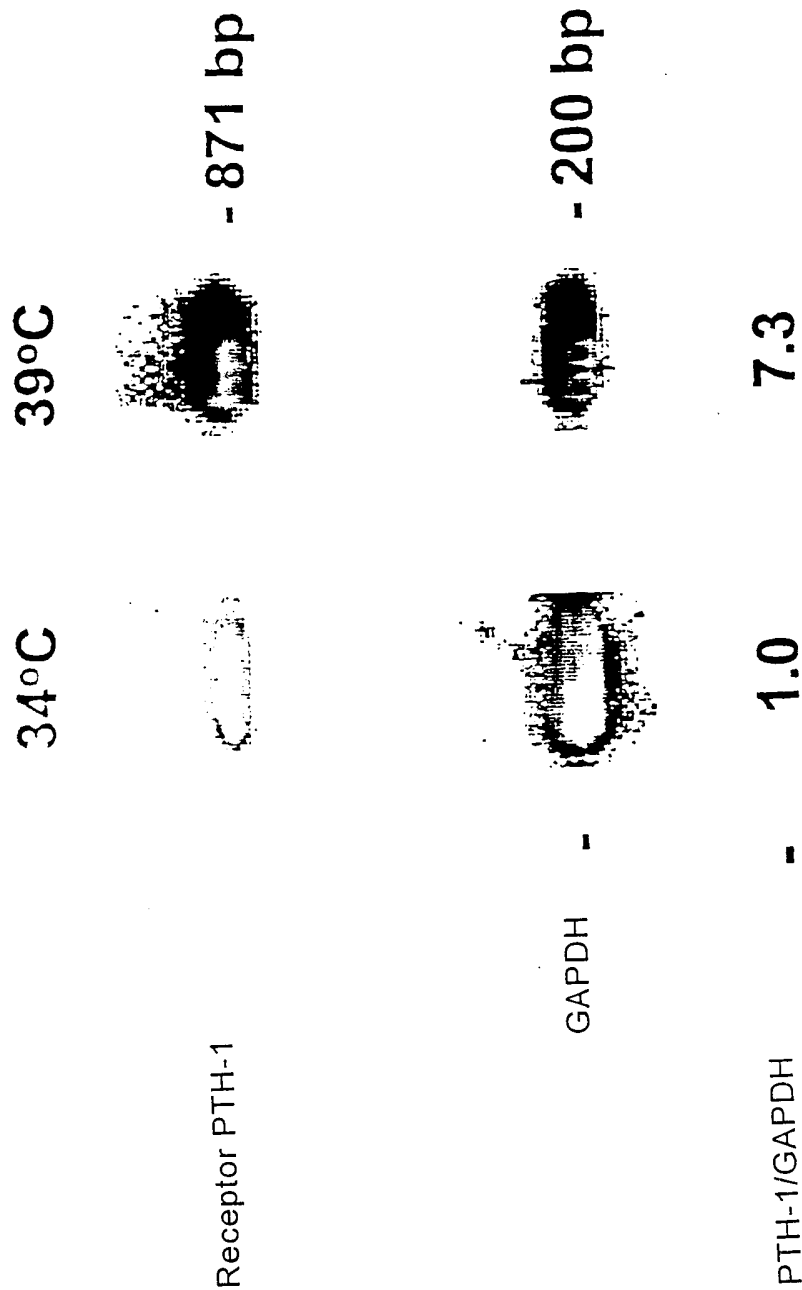
3688

26/30



Obr. 22C

Expresa mRNA receptoru PTH/PTHrp (PTH-1) u buněk hOB 01-C1-
PS-09 při stanovení metodou RT-PCR



Obr. 23

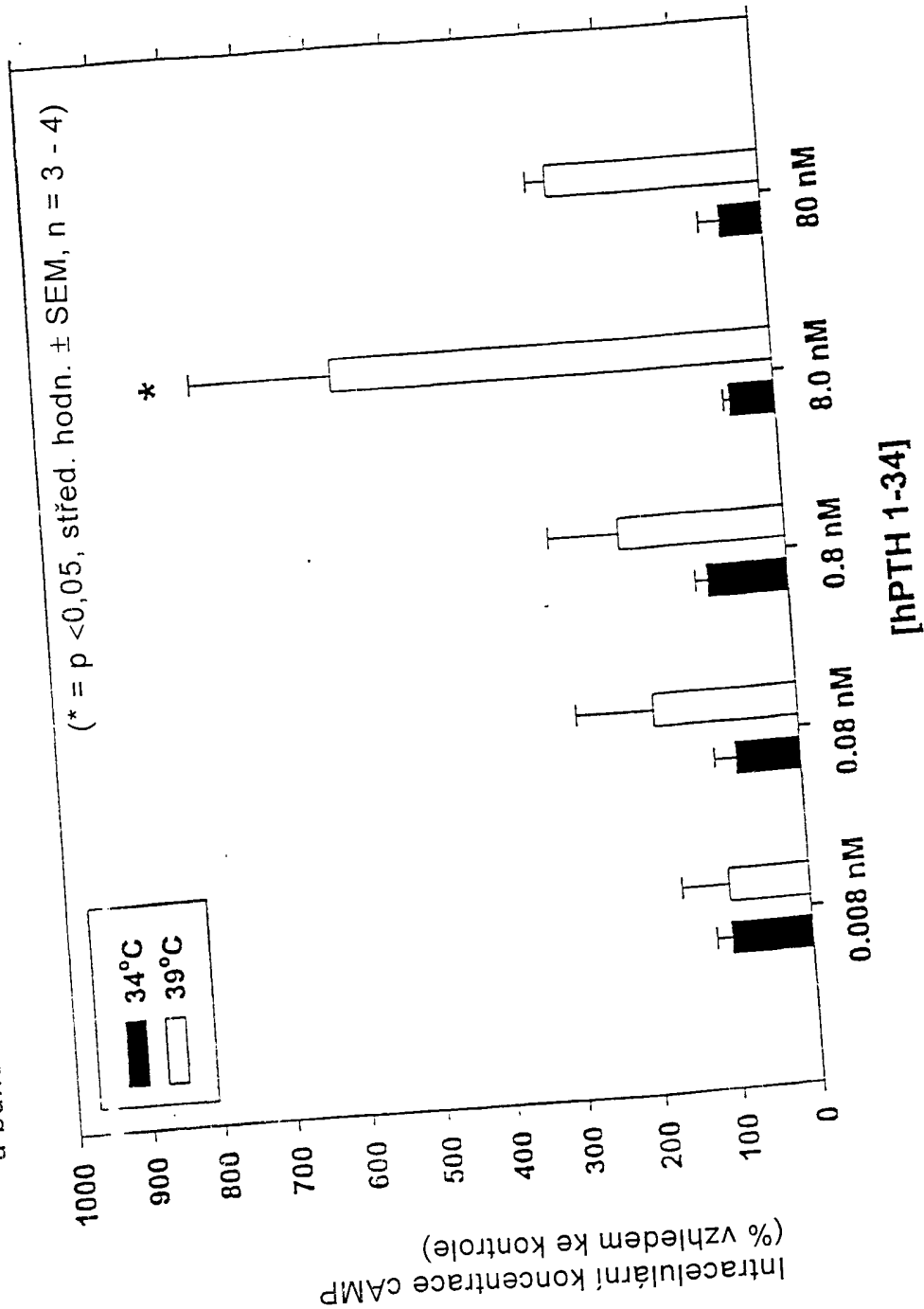
14.05.02

PI 2002-903

36088

28/30

Regulace intracelulárních hladin cAMP parathyroidním hormonem
u buněk hOB-01-C1-PS-09



Obr. 24

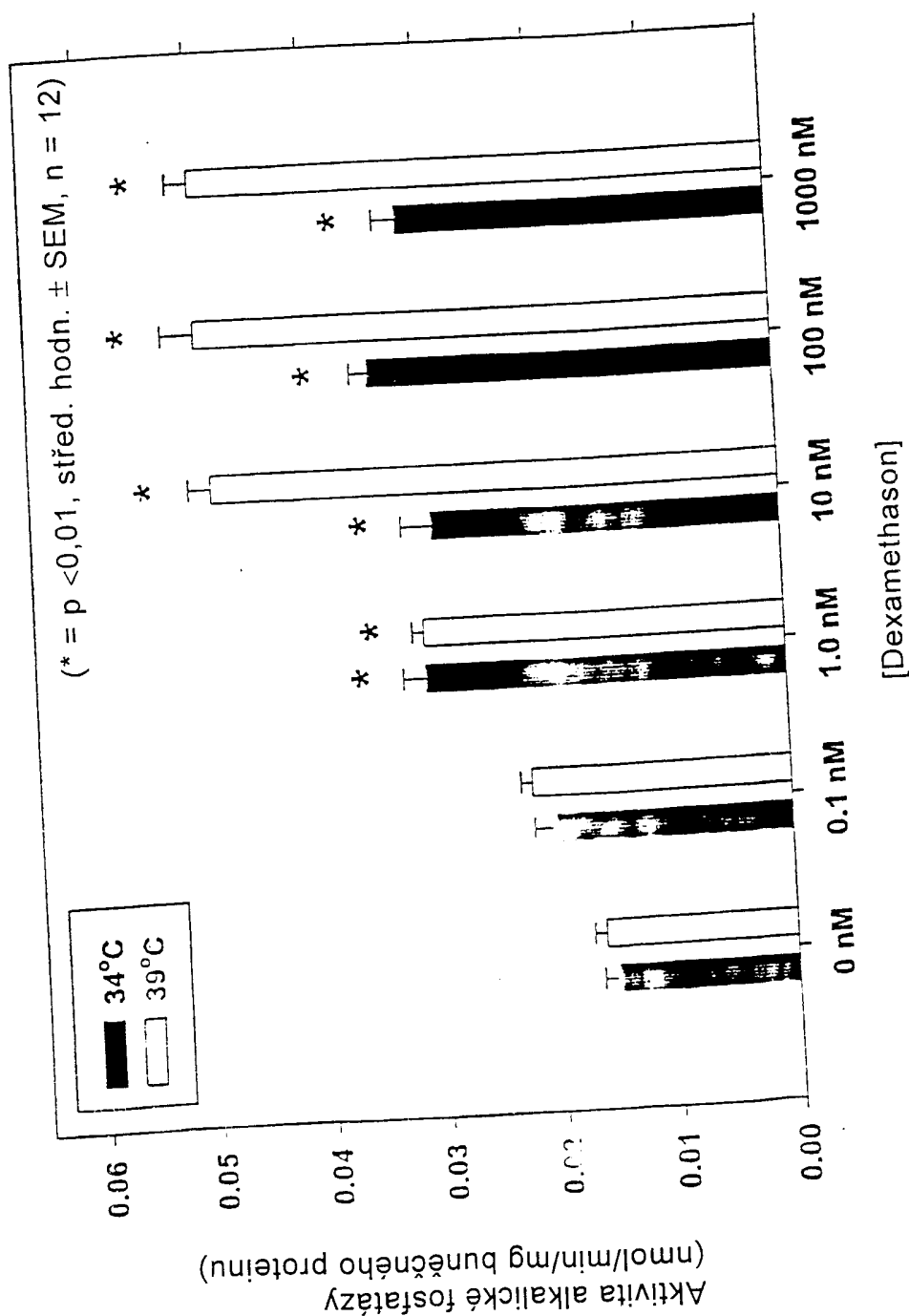
14.05.02

PV 2002-903

36088

29/30

Regulace aktivity alkalické fosfatázy dexamethasonem u buněk hOB-01-C1-PS-09



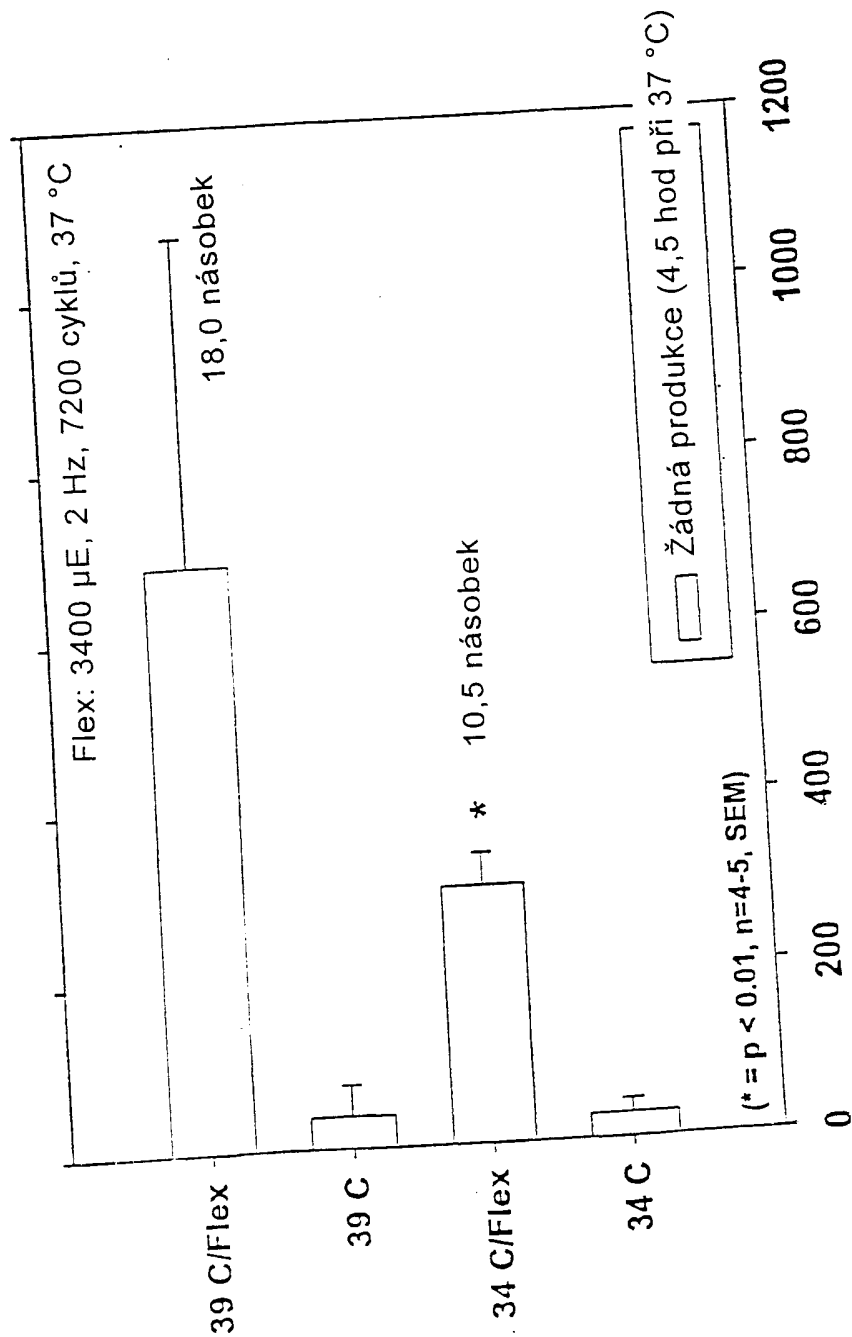
Obr. 25

14.05.00

PI 2002 - 903
36/088

30/30

Vliv mechanosenzorické stimulace na preosteocytické buňky hOB-01-C1-PS-09



[NO₂] (nM)

Obr. 26