

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.05.1999**  
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **22.05.1998 02.06.1998  
09.09.1998**  
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1998/086587 1998/088766  
1998/150485**  
(33) Země priority: **US US US**  
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **16.01.2002**  
**(Věstník č. 1/2002)**  
(86) PCT číslo: **PCT/US99/11073**  
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO99/61040**

(21) Číslo dokumentu:

**2000 - 4358**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

**A 61 K 38/39**

**A 61 P 13/12**

(71) Přihlašovatel:

**BOYS TOWN NATIONAL RESEARCH HOSPITAL,  
Omaha, NE, US;**

(72) Původce:

**Cosgrove Dominic, Omaha, NE, US;**

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Farmaceutický prostředek**

(57) Anotace:

Řešení se týká použití inhibitoru receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení poruch ledvin. Řešení se rovněž týká farmaceutického prostředku, který je určen pro léčení poruch ledvin a jako svou účinnou složku obsahuje inhibitor receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$ , popřípadě spolu s inhibitorem TGF- $\beta 1$ .

Oblast techniky

Tento vynález se týká onemocnění ledvin (to je poruch ledvin) charakterizovaných glomerulonefritidou a/nebo fibrózou. Tento vynález se zvláště týká použití integrinových inhibitorů  $\alpha 1\beta 1$  v kombinaci s inhibitory TGF- $\beta 1$  při poruchách ledvin.

Dosavadní stav techniky

V současné době ve Spojených státech žije přibližně 12 000 lidí trpících Alportovým syndromem. Tato dědičná porucha vede k progresivnímu renálnímu onemocnění, které je možné léčit pouze dialýzou a transplantací ledvin. Transplantované ledviny jsou ve většině případů odmítány. Proto je potřeba vytvořit alternativní léčbu. V současné době neexistuje léčba, která je vhodná pro léčbu mechanismu vzniku onemocnění nebo jeho postupu. Je nutná léčebná metoda, která ovlivňuje mechanismus vzniku a/nebo postupu onemocnění a která dokáže podstatně zpomalit průběh stavu onemocnění, jako je renální glomerulonefritida a renální fibróza.

Řada onemocnění ledvin je spojena se změnami v homeostáze matrice, kde je porušena citlivá rovnováha syntézy a přeměna strukturálních molekul. Alportův syndrom je onemocnění, které vede k progresivnímu selhání ledvin a je spojené s senzoneurální nedoslýchavostí. Nejvíce jsou ovlivněni nosiči mužského pohlaví a ultrastrukturální studie ukázaly abnormality v glomerulární bazální membráně (GBM) postižených jednotlivců. Přibližně jeden z 20 000 lidí trpí Alportovým syndromem, což toto onemocnění činí jedním z převládajících

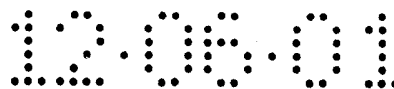
onemocnění vzniklých na základě genetických poruch (popisuje se například v publikaci Atkin et al., „Alport Syndrome“ R. W. Schrier and C.W. Gottschalk (Eds.), Diseases of the Kidney, 4<sup>th</sup> ed. Chap. 19, Little Brown, Boston, pp. 617-641, 1988. Alportův syndrom spojený s poruchou na chromozomu X je způsoben libovolnou serií mutací v genu kolagenu 4A5 (popisuje se v publikaci Barker et al., Science, 348: 1224-1227, 1990). V genu se identifikovalo alespoň 60 různých mutací. Autozomální forma Alportova syndromu vykazuje stejné rozmezí fenotypů jako forma spjatá s chromozómem X a vzniká jako výsledek mutací genu kolagenu bazální membrány 4A3 (COL4A3) nebo 4A4 (COL4A4) (popisuje se například v publikaci Lemmink et al., Hum. Mol. Gen., 3: 1269-1273, 1994 a Mochizuki et al., Nature Genet., 8: 77-81, 1994). Jiné onemocnění bazální membrány zahrnuje Goodpasturův syndrom, který způsobuje akutní autoimunitní odpověď řízenou proti epitopu na doméně NC1 kolagenu 4A3 (popisuje se v publikaci Hudson et al., Kidney Int., 43: 135-139, 1993) a difúzní leiomyomatóza, benigní nádor hladkého svalstva, který je spojen s delecí obou genů kolagenu 4A5 a 4A6 (popisuje se v publikaci Zhou et al., Science, 261: 1167-1169, 1993).

Bazální membrány jsou specializované extrabuněčné struktury spojené skoro s každým orgánem a tkání v těle. Obvykle se nacházejí na hranici mezi buňkami a konektivní tkání, ale také se nacházejí mezi epiteliálními a endoteliálními buňkami, jako je v případě glomerulí (to je klubičko kapilár). Predominantní výstavba bloků bazálních membrán zahrnuje kolagen typu IV, laminin, proteoglykan sulfátu heparinu, entaktin a někdy fibronectin a kolagen typu V. Komponent nejvíce přítomný v bazální membráně je kolagen typu IV, což je typ kolagenu, který se nachází pouze v bazálních membránách. Ve své nativní formě kolagen typu IV, stejně jako všechny kolageny se skládá ze tří molekul kolagenu, které jsou uspořádány do trojitého helixu, který

obsahuje různé kombinace šesti alfa řetězců (4A1-4A6). Nejběžnější jsou řetězce 4A1 a 4A2 (které se také nazývají řetězec  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  (popisuje se v publikaci Timpl, J. Biochem., 180., 487-502, 1989). Kolageny typu IV se liší od intersticiálních kolagenů řadou faktorů. Helikální struktura spojení alfa řetězce nemusí adherovat pouze na motiv glycin-X-Y pozorovaný u jiných kolagenů. Tento typ kolagenu obsahuje 3-hydroxyprolin spíše než 4-hydroxyprolin a je bohatý na sacharidy. Výsledná superstruktura kolagenu je síť kolagenů bazální membrány podobná kuřecímu peru. Tato síť tvoří podklad, na který se vážou další molekuly (laminin, sulfát heparinu atd.).

Bazální membrány jsou velmi heterogenní struktury, které jsou důležité vzhledem k jejich odlišným funkčním vlastnostem. Komplexnost těchto struktur není stále zcela pochopena. V současné době se objevilo několik nových kolagenových řetězců základní membrány (jsou to řetězce alfa 3, 4, 5 a 6) (popisuje se například v publikaci Gunwer et al., J. Biol. Chem., 266: 15318-15324, 1990, Hostikka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 1606-1610, 1990, Butkowski et al., J. Biol. Chem., 262: 7874-7877, 1987 a Zhoe et al., Science, 261: 1167-1169, 1993). Je zajímavé, že nové řetězce se zjistily pouze v některých tkáních (například glomeruly ledvin, Decimetovy membrány očí, očních čoček, kůže, plic, varlat a kochlea) (popisuje se například v publikaci Kleppel et al., Am. J. Pathol., 134: 813-825, 1989 a Tryggvason et al., Kidney Int., 43: 38-44, 1993). Úloha těchto nových řetězců v uspořádání a funkci bazální membrány není v současné době známa. Věří se, že tyto nové druhy kolagenů bazální membrány tvoří oddělené sítě kolagenů typu 4A1 ( $\alpha 1(\text{IV})$ ) a 4A2 ( $\alpha 2(\text{IV})$ ).

Ledvinové glomerulární bazální membrány (GMB) se účastní ultrafiltračního procesu (to znamená procesu, kde se krev filtruje, aby se odstranily metabolity při vylučování



například ve formě moče). Alportův syndrom vede k masivní akumulaci extrabuněčné matrice a oslabení bazální membrány, přičemž výsledek je fokální a segmentová glomerulonefritida (to znamená zánět kapilárních kliček v glomerulích), což vede k fatální uremii (to znamená přebytek močovin v krvi následkem selhání ledvin). Řada stejných molekul extrabuněčné matrice (například kolagen typu I, fibronektin, lamini a kolagen typu IV) se také progresivně akumuluje v GBM pacientů s IDDM (inzulíndependentní cukrovka) nefritidou. Při tomto onemocnění GBM se zvětšuje tloušťka GBM, ale ztrácí se fokální zeslabení a rozdělení GBM, které je charakteristické pro Alportův syndrom.

Integríny patří do rodiny heterodimerních transmembránových glykoproteinových receptorů, které se vážou na komponenty bazální membrány a extrabuněčné matrice. Fungují jako adhezivní molekuly, které se podílejí na agregaci a zakotvení buněk na bazální membránu. Přenášejí také signály do jádra a podílejí se na úpravě exprese genu, zvláště exprese genu v případě buněčné migrace a buněčné diferenciaci (popisuje se v publikaci Hynes, Cell, 69: 11-25). Je známo více než 20 různých integrinových receptorů, které zahrnují přibližně 14 různých podjednotek alfa a přibližně 8 různých podjednotek beta (popisuje se v publikaci DiSimone, Curr. Opin. Cell. Biol., 6. 182-194, 1994).

V renálních glomerulách existují rozdílné sady integrinových receptorů. Ty se spojují buď s mesangiální matricí (to znamená membrána, která pomáhá podpořit kapilární kličky ledvinových klubiček) nebo viscelární epiteliální buňky (popisuje se v publikaci Patey et al., Cell Adhesion Commun., 2: 159-167, 1994). Největší zastoupení integrinového receptoru na dospělých glomerulárních viscelárních epiteliálních buňkách má heterodimér  $\alpha3\beta1$  (popisuje se v publikaci Adler, Am. J. Pathol., 141: 571-578, 1992 a Patey et al., Cell Adhesion

Commun., 2: 159-167, 1994). Ukázalo se, že podjednotka  $\beta 5$  se exprimuje u dospělých viscerálních epiteliálních buněk (popisuje se v publikaci Yamada et al., Cell Adhesion Communic., 3: 311-325, 1995) a integrinové receptory  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ ,  $\alpha 5$ ,  $\alpha V$ ,  $\beta 1$  a  $\beta 3$  se exprimují postupně během morfogeneze ledvin (popisuje se v publikaci Korhonen et al., Lab. Invest., 62: 616-625, 1990, Wada et al., J. Cell. Biol., 132: 1161-1176, 1996 a Yamada et al., Cell Adhesion Communic., 3: 311-325, 1995). Heterodimérový integrinový receptor  $\alpha 1\beta 1$  je pouze integrinový receptor identifikovaný na povrchu mesangiálních buněk v glomerulách.

Vytvořili se myši s vyřazeným genem integrinové receptorové podjednotky  $\alpha 3$ . Narozená mláďata zemřela na základě dysfunkce ledvin brzy po narození (popisuje se v publikaci Kreidberg et al., Dev., 122: 3537-3547, 1996). Ultrastrukturální patologie GBM u novorozenců v tomto modelu je znatelně stejná jako u pokročilého Alportova syndromu. Bazální membrána se jeví porušena (to je abnormálně ztlustělá, zeslabená nebo rozdělená) a procesy retence vody viscerálních epiteliálních buněk fúzí. Protože jeden ligand receptoru  $\alpha 3\beta 1$  je kolagen typu IV (popisuje se v publikaci Krishnamurti et al., Lab. Invest., 74: 650-665, 1996 a Rupprecht et al., Kidney Int., 49: 1557-1582, 1996) a protože tento receptor se nachází podél kontaktní plochy mezi viscerálními epiteliálními buňkami a GBM (popisuje se v publikaci Baraldi et al., Nephron, 66: 295-301, 1994), pozorování uvedené shora v textu v případě myši s vyřazeným integrinem podporuje model, kde takové interakce integrin/ligand mají důležitou úlohu při vývoji bazální membrány.

U normálního zvířete celý řetězec  $\alpha 1(IV)$  a  $\alpha 2(IV)$  (zde popsán jako klasický kolagenový řetězec) obsahuje v embryogenní glomerulární bazální membráně (GBM) až do

okamžiku narození kolagen typu IV. Krátce po narození dojde k vývojové změně, kdy se v GBM jasně detekují řetězce  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  a  $\alpha 5(\text{IV})$  (zde uvedené jako nové kolagenové řetězce) a řetězce  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  se převážně lokalizují na mesangiální matrici (popisuje se v publikaci Minor and Sanes, J. Cell. Biol., 127: 879-891, 1994).

V ledvinách dospělého jedince tenká vrstva GBM obsahující řetězce  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  leží vedle vrstvy endoteliálních buněk, zatímco většina GBM plné šířky obsahuje řetězce  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  a  $\alpha 5(\text{IV})$  (popisuje se v publikaci Desjardins and Bendayan, J. Cell. Biol., 113: 689-700, 1991 a Kashtan et al., J. Clin. Invest., 78: 1035-1044, 1996). Existuje biologický důkaz naznačující, že dva různé sety kolagenových řetězců tvoří oddělené sítě (Kleppel et al., J. Biol. Chem., 267: 4137-4142, 1992). U obyčejné nefritidy nulové mutace (to znamená mutace, které porušily expresi genu) v genech  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  nebo  $\alpha 5(\text{IV})$  vedou k nepřítomnosti všech tří řetězců v GBM, což je pravděpodobně způsobeno obligatorní asociací v makromolekulárním uspořádání superstruktury GBM. To vede k přítomnosti řetězců  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  po celé tloušťce GBM. Receptory kolagenu typu IV na povrchu viscerálních epiteliálních buněk u Alportovy ledviny (to znamená ledvina jednotlivce s Alportovým syndromem) jsou v přímém kontaktu s GBM s řetězcí kolagenu typu IV, který není pro GBM charakteristický. Alespoň jedna studie se věnovala zkoumání relativní schopnosti viscerálních epiteliálních buněk adherovat na kolagen typu IV s těmito různými kompozicemi a zjistilo se, že adherují podstatně lépe na bazální membránu, která obsahuje nové řetězce, když se porovnávají přímo s klasickými řetězcí  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$ . Tato adheze se může zablokovat protilátkami proti integrinovému receptoru  $\alpha 3$ .

Myší model pro autozomální formu Alportova syndromu se vytvořil cílenou mutagenezí prokolagenového genu CPL4A3 (popisuje se v publikaci Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992, 1996). Ve zvířecím modelu se po čtyřech týdnech života vyvinula progresivní glomerulonefritida se vznikem proteinurie, přičemž průměrná délka života do úmrtí na selhání ledvin trvá 8,5 týdnů s inbredním pozadí 129Sv/J. Ultrastrukturální změny v GBM se pozorovaly dříve než ve stáří jednoho týdne, po třech týdnech života se mění struktura glomerulí po celé GBM, což je dlouho před tím, než dojde k proteinurii. Komponenty extrabuněčné matrice zahrnující laminin-1, proteoglykan sulfátu heparinu, fibronektin a entaktin se akumulují v GBM. Tato myš se zde nazývá „Alportova“ myš.

Akumulace extrabuněčné matrice v GBM a mesangiu jako funkce postupu onemocnění ledvin je rys sdílený různými druhy onemocnění ledvin, jak u pacientů tak v experimentálních zvířecích systémech (popisuje se například v publikaci Goyal and Wiggins, Am. Soc. Nephrol., 1: 1334-1342, 1991, Wilson et al., Contrib. Nephrol. Basel Karger, 118: 126-134, 1996, Razzaque et al., Clin. Nephrol., 46: 213-214, 1996, Yoshioka et al., Kidney Int., 35: 1203-1211, 1989 a Klahr et al., N. Engl. J. Med., 318: 1657-1666, 1988. V případě cukrovky primární mediátor tohoto účinku je prodloužená expozice neenzymaticky glukosylovaným sérovým proteinům, což je výsledek chronicky vysokého množství glukózy (popisuje se v publikaci Doi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 2873-2877, 1992 a Roy et al., J. Clin. Invest., 93: 483-442, 1994).

V případě většiny progresivních glomerulárních poruch se zdá, že nadměrná produkce transformačního růstového faktoru TGF- $\beta$ 1 se zdá blízce spojena s akumulací extrabuněčné matrice vedoucí k fibróze (to znamená tvorba fibrózní tkáně (popisuje se například v publikaci Border and Ruoslahti, Nature

(London), 346: 371-374, 1992, Yang et al., J. Am. Soc. Nephrol., 5: 1610-1617, 1995 a Yamamoto et al., Kidney Int., 45: 916-927, 1994). Ve zvířecím modelu v případě autoimunní nefritidy injekce buď s protilátkami proti TGF- $\beta$ 1 nebo s antisense oligonukleotidy k odpovídající mRNA inhibují progresivní glomerulonefritidu a akumulaci extrabuněčné matrice (popisuje se v publikaci Border et al., Nature (London), 346: 371-374, 1990 a Akagi et al., Kidney Int., 50: 148-155, 1996).

Poločas rozpadu kolagenu bazální membrány v GBM krys se odhadl na 16 až 40 dní na základě „pulse-chase“ studie s  $^3\text{H}$ -prolinem (popisuje se v publikaci Daha et al., Nephron. 22: 522-528, 1978). To je velmi dlouhá doba v porovnání s přeměnou proteoglykanů heparinsulfátu ( $t_{1/2}$  = 20 hodin) nebo jiných sulfatovaných molekul v GBM ( $t_{1/2}$  = 20 až 60 hodin). Akumulace proteinů bazální membrány v GBM Alportova myšího modelu (popisuje se v publikaci Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992, 1996) je pravděpodobně účinek změn při syntéze i degradaci těchto proteinů. Z proteáz, které se podílejí na přeměně matrice GBM a mesangiální matrici, jsou nejvíce charakterizovány metaloproteinázy MMP-2 (kolagenáza o molekulové hmotnosti 72 000) a MMP-9 (kolagenáza o molekulové hmotnosti 92 000), stejně jako MMP-3 (stromolyzin-1). Tyto enzymy budou rozkládat kolagen typu IV vedle různých jiných komponentů extrabuněčné matrice.

Mesangiální buňky (a pravděpodobně jiné typy glomerulárních buněk) také produkují přirozené inhibitory metaloproteináz. Ty se nazývají TIMP (tkáňové inhibitory metaloproteináz). Jsou to glykoproteiny s relativně nízkou molekulovou hmotností. TIMP-3 je specifický pro stromolyzin-1 a MMP-9, zatímco TIMP-2 a TIMP-3 inhibuje MMP-2 (popisuje se v publikaci Goldberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 8207-8211, 1989, Staskus et al., J. Biol. Chem., 266: 449-454,

1991 a Stetler-Stevenson et al., J. Biol. Chem. 264: 17374-17378, 1989).

Úprava metaloproteináz a jejich odpovídajících inhibitorů pravděpodobně hraje důležitou úlohu při udržování vhodného stupně přeměny GBM. Zatímco o regulaci genů kódujících tyto proteiny v ledvinných klubičkách je známo pouze málo, signální transdukce přes interakci integrinový receptor/ECM (extrabuněčná matrice) může být klíčovým aspektem v tomto procesu.

Stále však je nutné vytvořit zvířecí modely pro Alportův syndrom, zvláště ten, kde postup onemocnění se podstatně zpomalil. Také existuje potřeba nové terapie vhodné pro léčbu onemocnění ledvin spojeného s expanzí mesangiální matrice a progresivní akumulace matrice v glomerulární bazální membráně a tubulointerstitium. Tato onemocnění zahrnují například Alportův syndrom a inzulíndependentní cukrovku.

#### Podstata vynálezu

Vynález popisuje různé léčebné metody pro léčbu nebo omezení (to znamená oddálení vzniku onemocnění, zpomalení postupu onemocnění a/nebo reverzi onemocnění) poruch ledvin pacienta (jako pacient se upřednostňuje savec, více se upřednostňuje člověk). Poruchy ledvin přednostně zahrnují renální glomerulonefritidu, renální fibrózu nebo obojí. Tyto stavy mohou být spojeny s například Alportovým syndromem, IDDM nefritidou, mesangiální proliferativní nefritidou, membránoproliferativní glomerulonefritidou, srpkovitou glomerulonefritidou, diabetickou nefropatií a renální intersticiální fibrózou.

V jednom provedení vynálezu metoda zahrnuje aplikaci pacientovi účinného množství inhibitoru receptoru integrinu

$\alpha\beta 1$ . Tento inhibitor receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  může být blokační činidlo, které se váže na vazebné místo receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  na povrchu ledvinných buněk. Blokační činidlo může být alespoň nanomérový peptidový fragment proteinu vybraný ze skupiny zahrnující laminin, fibronektin, entaktin a kolagen typu 4. V jiném případě blokačním činidlem mohou být protilátky. Mohou se také použít jiná činidla, která inhibují (to je deaktivují) receptor integrinu  $\alpha\beta 1$  pomocí jiných mechanismů.

V jednom provedení vynálezu metoda zahrnuje aplikaci pacientovi účinného množství inhibitoru TGF- $\beta 1$  vedle integrinového receptorového inhibitoru  $\alpha\beta 1$ . Tyto inhibitory se mohou aplikovat současně (například jako směs) nebo postupně. Inhibitor TGF- $\beta 1$  může být činidlo, které se nevratně váže na TGF- $\beta 1$  a inhibuje jeho schopnost vázat se na jeho receptor. V jiném případě inhibitor TGF- $\beta 1$  může být činidlo, které inhibuje schopnost TGF- $\beta 1$  transdukovat signály do jádra ledvinové buňky. Pozdější typ inhibitoru je přednostně kalcineurinový inhibitor, jako je takrolimus (běžně dostupný jako FK506). Mohou se také použít jiná činidla, která inhibují (to je deaktivují) TGF- $\beta 1$  pomocí jiných mechanismů.

Vynález popisuje metody oddálení vzniku onemocnění a zpomalení postupu Alportova syndromu u pacienta. V jednom provedení vynálezu tato metoda zahrnuje aplikaci účinného množství činidla, které inhibuje signální transdukcii pomocí integrinového receptoru  $\alpha\beta 1$  ledvinových buněk. V jednom provedení vynálezu tato metoda zahrnuje blokační vazebné místo receptoru integrinu na povrchu ledvinových buněk pacienta. Tyto metody se mohou dále zesílit aplikací pacientovi účinného množství inhibitoru TGF- $\beta 1$ .

Vynález dále popisuje metody vhodné pro oddálení vzniku onemocnění ledvin a/nebo zpomalení jeho postupu u pacienta trpícího inzulindependentní cukrovkou. V jednom provedení vynálezu se popisuje metoda, která zahrnuje aplikaci účinného množství činidla, které inhibuje signální transdukcii pomocí receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  ledvinových buněk. V jiném provedení vynálezu tato metoda zahrnuje na povrchu ledvinové buňky blokační vazebné místo receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$ . Tyto metody se mohou dále zesilovat aplikací inhibitoru TGF- $\beta 1$  pacientovi.

Vynález popisuje metody vhodné pro omezení renální fibrózy. V jednom provedení vynálezu metoda zahrnuje u pacienta redukci aktivity TGF- $\beta 1$ , zatímco dochází k inhibici receptorů integrinů  $\alpha\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk pacienta. Tuto aktivitu je možné redukovat aplikací pacientovi činidla, které se nevratně váže na TGF- $\beta 1$  a inhibuje jeho schopnost vázat se na svůj receptor. V jiném případě se může tato aktivita redukovat tak, že se pacientovi aplikuje činidlo schopné inhibovat schopnost TGF- $\beta 1$ , transdukovat signály do jádra ledvinové buňky.

Další provedení vynálezu popisuje metody omezení akumulace matrice v GBM u pacienta trpícího Alportovým syndromem. Jedno provedení vynálezu popisuje metodu zahrnující redukci aktivity TGF- $\beta 1$  u pacienta. Toho je možné dosáhnout aplikací inhibitorů TGF- $\beta 1$ .

Ve zvláště preferovaném provedení vynálezu se popisuje způsob omezení renální fibrózy aplikací pacientovi kalcineurinového inhibitoru, přičemž se upřednostňuje takrolimus.

Vynález dále popisuje myší model ledvinového onemocnění, kde myši neexprimují normální kolagen typu 4 v GBM, což je

výsledek vyřazení genu kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$ . To znamená, že myš nezačlenila do glomerulární bazální membrány řetězce kolagenu typu  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  nebo  $\alpha 5(\text{IV})$  (tak GBM je zcela tvořena řetězcí  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  s ohledem na kompozici s řetězcem kolagenu typu IV). Dále neexprimuje integrinový receptor  $\alpha 1\beta 1$ , což je výsledek vyřazení podjednotky genu  $\alpha 1$ .

U myši s vyřazenými dvěma geny dochází k oddělení proteinurie, což se porovnává s předchozím stavem techniky v případě Alportova myšího modelu. Dále zvířata žijí skoro dvakrát tak dlouho jako Alportovi mláďata. Po přibližně osmi týdnech, což je průměrné stáří Alportových myší, kdy umírají, myši s vyřazenými dvěma geny, vykazují znatelně omezenou glomerulární patologii. To znamená, že ve srovnání s Alportovými myšmi stejného věku myši s vyřazenými dvěma geny vykazují znatelně redukovatelné poškození s daleko menší rarefikací GBM a velmi malým omezením procesu výživy podocytů. Atenuovaná akumulace fibronektinu, lamininu-1 a proteoglykanu sulfátu heparinu se vyskytuje v GBM, zatímco akumulace entaktinu a kolagenu typu 4 se nemění ve srovnání s Alportovou myší. Tyto výsledky indikují, že existuje specifická úloha receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  při patogenezi Alportova renálního onemocnění. Ukazuje se, že vyřazení jediného genu integrinu  $\alpha 1$  nemá jasný účinek na fyziologie a funkci ledvin.

Tato myš se může použít pro studium Alportova syndromu, inzulindependentní cukrovky a jiných poruch, které se charakterizují glomerulonefritidou a/nebo fibrózou. Tato myš se může také použít při testování činidel, které se mohou použít při léčbě Alportova syndromu a inzulindependentní cukrovky a jiných poruch, které se charakterizují ukládáním extrabuněčné matrice a/nebo fibrózou.

Vynález popisuje metody léčby, které atakují mechanismus renálního onemocnění (to je onemocnění ledvin) a které jsou schopny podstatně zpomalit vznik onemocnění a/nebo jeho postup. Tímto onemocněním může být například glomerulonefritida a renální fibróza. Věří se, že metody podle vynálezu mohou dokonce zvrátit stav spojený s onemocněním. Vynález zvláště popisuje způsoby léčby onemocnění ledvin spojené s přítomností nebo se zvýšeným nebezpečím vývoje glomerulonefritidy a renální fibrózy v ledvinových klubičkách tak, jak k tomu dochází při mesangiální proliferativní glomerulonefritidě, membránoproliferativní glomerulonefritidě, krescentrické glomerulonefritidě, diabetické nefropatii a renální insterstinální fibróze. Glomerulonefritida zahrnuje poškození glomerulí, což je v typickém případě spojeno s abnormálním ztluštěním, zúžením a/nebo rozdělením GBM. To může kulminovat v běžné dráze tubulointersticiální fibrózy. Tyto stavy se v typickém případě charakterizují objevením myofibroblastů a akumulací matrice (zahrnující kolagen typu I, fibronektin, laminin a kolagen typu IV) v tubulointerstitiu. Účinnost terapeutických činidel používaných v metodách podle vynálezu se může stanovit hodnocením jednoho nebo více charakteristik.

Vynález dále poskytuje myší model vhodný pro studium metod a testování činidel pro ošetření pacientů s onemocněním ledvin spojených s přítomností nebo se zvýšeným rizikem pro vývoj akumulace extrabuněčné matrice a zvláště v glomerulách a tubulointerstitiu. Tak v jednom provedení vynálezu se popisuje myší model Alportova syndromu. Tento myší model zahrnuje deaktivovaný receptor integrinu  $\alpha 1\beta 1$  v kombinaci s deaktivovanou molekulou kolagenu (typu IV). V preferovaném provedení molekula kolagenu typu IV se deaktivuje porušením exprese podjednotky kolagenu  $\alpha 3$  (typ IV). Výsledkem je, že myš

nezačleňuje řetězce kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  nebo  $\alpha 5(\text{IV})$  do GBM.

Tento myší model se používá při metodách pro testování činidel při léčbě renální dysfunkce, jak k tomu dochází při Alportově syndromu, při inzulíndependentní cukrovce a jiných renálních onemocnění, kde časné stádium onemocnění se charakterizuje expanzí mesangiální matrice a proliferací mesangiálních buněk ve spojení s poškozením glomerulové bazální membrány charakterizované ztluštěním, ztenčením rozdělením bazální membrány.

Preferované provedení vynálezu dále popisuje inhibitory, které blokují nebo jinak deaktivují funkci receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$ , jako metodu oddálení vzniku (měří se výskytem albuminu v moči) nebo zpomalením postupu (měří se rychlost, při které vzroste množství sérového albuminu v moči) nebo dokonce ústup (měří se rychlost, při které se sníží množství sérového albuminu v moči) glomerulonefritidy a/nebo fibrózy (což je následek objevení myofibroblastů a akumulace extrabuněčné matrice, která zahrnuje lamini, fibronektin, kolagen typu I a kolagen typu IV v tubulointerstitiu) v postupu glomerulárního onemocnění. Mohou se použít různá jiná syntetická a přirozená činidla, která se popisují dále v textu.

V jednom provedení vynálezu se popisuje úloha TGF- $\beta 1$  při patogenezi Alportova renálního onemocnění a jiných onemocnění ledvin. Zmíněné zvýšení množství mRNA v případě TGF- $\beta 1$ , což souvisí s počátkem proteinurie, se pozorovalo v myších modelech. Hybridizace *in situ* indikuje, že podocyty, které před vznikem proteinurie neprodukují ani malé množství mRNA pro TGF- $\beta 1$ , přičemž od vzniku proteinurie až do konečného stádia selhání ledvin se exprimuje v případě TGF- $\beta 1$  nadbytek mRNA. V přibližně stejnou dobu se pozorovala aktivace mRNA

kódující fibronektin COL4A1 a COL4A2 a entaktin. Metody snižující množství TGF- $\beta$ 1 je další mechanismus léčby renálních stavů, jako je glomerulonefritida a/nebo fibróza. Účinky inhibice aktivity TGF- $\beta$ 1 se mohou měřit stanovením okamžiku objevení a rychlosti růstu množství albuminu v moči a/nebo objevení myofibroblastů (v tubulointerstiiu) a/nebo akumulací molekul extrabuněčné matrice v GBM a tubulointerstitiu.

V jiném provedení vynálezu pomocí inhibitorů TGF- $\beta$ 1 u Alportových myši deficitních na integrin  $\alpha$ 1 se popisuje synergizmus kombinace léčby inhibitorů integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 a inhibitorů TGF- $\beta$ 1 při zpomalení vzniku a postupu glomerulonefritidy a/nebo preventivní fibrózy.

#### Myší model

Důležitým aspektem řízení pacientů s Alportovým syndromem a jiných onemocnění spojených s progresivním glomerulárním poškozením je spojeno se ztluštěním a zeslabením nebo rozdělením nepravidelností v GBM a kulminací běžné dráhy tubulointersticiální fibrózy, jak se charakterizuje objevením myofibroblastů a akumulací matrice (zahrnující kolagen typ I, fibronektin, laminin a kolagen typ IV) v tubulointersticiu, je stanovení způsobu a/nebo mechanismu postupu onemocnění. Zatímco mutace v genech kolagenu  $\alpha$ 3(IV) nebo  $\alpha$ 4(IV) vede k autozomálním recesivním formám Alportova syndromu a výsledkem mutace genu  $\alpha$ 5(IV) je forma onemocnění spojená s chromozomem X, přičemž samotné tyto mutace nezpůsobují progresivní selhání ledvin. Nepřítomnost kolagenu  $\alpha$ 3(IV),  $\alpha$ 4(IV) nebo  $\alpha$ 5(IV) se jeví být výsledkem přetrvávání složení GBM, které je podobné embryogennímu stádiu vývoje, přičemž obsahuje kolagenové řetězce  $\alpha$ 1(IV) a  $\alpha$ 2(IV). Tato GBM podobná embryogeni je vhodným glomerulárním filtrem pro období první dekády života člověka (nebo přibližně období prvních tří týdnů

v myším modelu). Po této době GBM podobná embryogenní nefunguje s dostatečnou účinností. U jednoho pacienta s Alportovým syndromem ultrastrukturální studie GBM devítiletého pacienta s Alportovým syndromem ukázaly relativně normální ultrastrukturu (popisuje se v publikaci Cangioti et al., Nephrol. Dial. Transplant., 11: 1829-183, 1996). Ve věku 18 let se však ultrastruktura GBM stejného pacienta indikovala při pokročilé Alportově glomerulonefritidě.

U Alportova syndromu bazální membrána u lidí je relativně normální mezi pěti a deseti lety života, přičemž ztrátu integrity bazální membrány je možné monitorovat progresivním zvýšením množství albuminu v moči. Studie biopsií potvrdily, že ultrastruktura bazální membrány je v případě pre-proteinurových pacientů trpících Alportovým syndromem normální. Onemocnění GBM se dokazuje nepravidelným ztluštěním a zeslabením GBM. Rozdělení membrány se přičítá na účet mikrohematurie (to znamená, že v moči je možné detekovat malé množství erytrocytů), kterou je možné pozorovat spolu s proteinurií.

Pouze málo se ví o mechanismu o vzniku Alportova renálního onemocnění avšak spekuluje se, že akumulace komponentů GBM a poškození GBM může být způsobeno zvýšenou citlivostí membrány k proteolýze a/nebo zesílenou syntézou matricových molekul způsobených změnami normálních regulačních drah.

Je nutné vytvořit model Alportova syndromu, protože existují omezení možnosti provést studii na lidech. Lidé vykazují rozmezí vážnosti onemocnění při postupu onemocnění, přičemž se předpokládá, že to způsobují rozdíly v genetickém pozadí. Studie, které zkoumají molekulární podstatu vzniku onemocnění a jeho postup, není možné logicky provést u člověka, což zpomaluje postup zkoumání Alportova lidského onemocnění u člověka.

Myší model Alportova syndromu vznikl cílenou mutagenezí genu kódujícího řetězec kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$  typ IV (popisuje se v publikaci Cosgrove et al., Genes Devel., 10: 2981-2992, 1996). U zvířecího modelu se vyvinula progresivní glomerulonefritida. Ultrastrukturální změny v GBM se pozorovaly už ve stáří jednoho týdne. Tato myš se zde nazývá Alportovou myší.

Myš také vznikla cílenou mutagenezí genu kódujícího receptorovou podjednotku  $\alpha 1$  (popisuje se v publikaci Gardner et al., Dev. Biol., 175: 301-313, 1996). Tato integrinová podjednotka tvoří heterodimér s integrinovou podjednotkou  $\beta 1$  za vzniku biologicky aktivního integrinového heterodiméru  $\alpha 1\beta 1$ , který se nachází na povrchu mesangiálních buněk v ledvinných kličkách. Integrinový receptor  $\alpha 1\beta 1$  je pouze integrinový receptor nalezený v mesangiální matrici, kde byly jako na jediném místě lokalizovány. Vedle změněné adheze fibrocytů na kolagenovou matrici, myši s vyřazenými geny nemají jasný fenotyp. Myši se vyvíjejí normálním způsobem a rozmnožují se a žijí normálním životem. Nedochozí k žádné nedostatečnosti funkce ledvin ani ke zjevným rozdílům v molekulárním složení nebo ultrastuktuře ledvinných kliček u těchto myší. Vzhledem k heterodimérovému integrinovému receptoru  $\alpha 1\beta 1$  na povrchu mesangiálních buněk v ledvinných kličkách bylo překvapující, že nepřítomnost uvedeného receptoru neovlivnila normální vývoj a/nebo funkci ledvin. To naznačuje, že přítomnost receptoru není nutná nebo redundantní dráhy mohou kompenzovat jeho nepřítomnost.

Vynález popisuje nový myší model s dvojitou mutací. Tento model se vyvinul křížením myšího kmene s vyřazeným genem  $\alpha 1$  s kmenem, který má vyřazený gen kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$  (Alportova myš) za vzniku mutantů defektních v genu podjednotky receptoru

integrinu  $\alpha 1$  a genu kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$ . Ačkoli nepřítomnost integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$  nemá zjevně žádnou úlohu při normálním vývoji a funkci ledvin, protože mesangiální matrice je místo syntézy metaloproteináz a cytokinů, jako je TGF- $\beta 1$  a časné stádium Alportovy glomerulonefritidy zahrnuje mesangiální buněčnou proliferaci a expanzi mesangiální matrice. Věřící se, že integrinový receptor  $\alpha 1\beta 1$  může vykazovat specifickou úlohu u renální patogenezi. Studie integrinu  $\alpha 1$  kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$  s dvojitou mutací jsou zvláště jedinečné a důležité. Následující diskuze popisuje řadu charakteristik myši s dvojitou mutací podle vynálezu.

Hodnocení integrity renálního filtru je proteinurie (to znamená přítomnost nadbytku sérových proteinů v moči). Jak se ilustruje na obrázku č. 1, vznik proteinurie u myši s dvojitou mutací se oddálil alespoň o jeden týden a vrchol je mezi 9 týdnů a 9,5 týdnů na rozdíl od mláďat Alportovi myši, kde je vrchol mezi 6 až 6,5 týdnů (to znamená, že chybí gen kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$ , ale obsahuje gen integrinové podjednotky  $\alpha 1$ ). Vznik a rychlost zvyšující se proteinurie (to znamená přítomnost sérového albuminu v moči) je dobrá míra pro hodnocení účinnosti metod podle vynálezu. Množství sérového albuminu se může měřit pomocí gelové elektroforézy a barvením Coomassieovou modří (používá se ekvivalent 1 mikrolitru moče) nebo komerčně dostupné testy. Průměrný věk úmrtí způsobený selháním ledvin je přibližně 8 až 9 týdnů v případě Alportovi myši s ohledem na skutečnost, zda se jako pozadí použijí myši 129 SV/J nebo 129 SV (Do konečného stádia se dostalo alespoň deset myši). Život myši s dvojitou mutací je v průměru přibližně 15 týdnů až 16,5 týdnů.

Odstranění integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$  mělo velký účinek na vznik a postup Alportova renálního onemocnění. Dále myš bez receptoru  $\alpha 1\beta 1$  měla zdokonalenou glomerulární funkci ve

srovnání s jinou testovanou myší. U zvířat, která neexprimují gen  $\alpha 3(\text{IV})$  a jsou heterozygotní v případě mutace  $\alpha 1$ , existuje bezprostřední zlepšení glomerulární funkce a postupu onemocnění, což naznačuje, že integrin  $\alpha 1$  vykazuje dávku závislou na účinku na postupu Alportova renálního onemocnění (to znamená redukce exprese integrinu  $\alpha 1$  na polovinu poskytuje ochranný účinek mezi Alportovou myší a myší s dvojí mutací). Tento zprostředkovaný ochranný účinek v Alportových zvířatech v případě mutace integrinu  $\alpha 1$  ilustruje, že částečná inhibice integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$  vykazuje jistou výhodu. To je podstatné zjištění a může se použít při terapii zahrnující inhibici integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$ , když se použije u člověka.

Analýza transmisní elektronovou mikroskopií se uskutečnila s ledvinami, které pocházejí z myší, jenž jsou sedm týdnů staré. Ledviny byly v případě obou alel normální (kontrola), nevykazovaly kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$  a byly normální v případě integrinu  $\alpha 1$  (Alportova myš) nebo nevykazovaly ani kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$  ani integrin  $\alpha 1$  (dvojitá mutace). Tento časový bod se vybral proto, že Alportova myš v tomto věku dosáhla konečného stádia onemocnění. Panely vybrané z obrázku č. 2 jsou reprezentativní alespoň v pěti různých glomerulárních polích. Jak se ilustruje na obrázku č. 2 ledvinné kapilární kličky normální myši (zobrazeno na obrázku č. 2) měli trilaminární bazální membránu v jednotné tloušťce. Kapilární klička Alportovi myši (zobrazeno na obrázku č. 2B) ukazuje porušenou bazální membránu s fokálním ztluštěním a zeslabením (což je charakteristické při pokročilém stádiu onemocnění). Chodidla byla nateklá následkem ovlivnění účinnosti renální filtrace. U myši s dvojitou mutací (zobrazeno a obrázku č. 2C) je bazální membrána znatelně méně ovlivněna než je tomu u Alportovi myši (Obrázek č. 2B). Zatímco bazální membrána je hslabší než

bazální membrána kontroly, byla daleko méně poškozena a podocyty se jeví ve velké míře normální. U Alportovi myši přibližně 40 % glomerulí je fibrotický, zatímco u myši s dvojitou mutací je fibrotických pouze 5%. Imunofluorescenční analýza se uskutečnila za použití zmrazeného renálního kortexu, který se odebral ze stejného zvířete, které se použilo na obrázku č. 2. Tkáň reagovala s protilátkami, které jsou specifické pro proteiny, které jsou známe, že akumulují GBM jako funkci postupu Alportova renálního onemocnění. Výsledky na obrázku č. 3 ukazují, že distribuce řetězce kolagenu COL 4A1 ( $\alpha 1(IV)$ ) a 4A2 ( $\alpha 2(IV)$ ) byla stejná v případě Alportova glomerulu a u glomerulí myši s dvojitou mutací. V obou případech ledvinné kapilární kličky (označené na všech panelech na obrázku č. 3 šipkou) a mesangiální matrice byly pozitivní (Obrázek č. 3B, C). Laminin-1 ukazuje značnou akumulaci v GBM Alportovi myši ve srovnání s kontrolou (porovnávají se obrázek č. 3D a 3E), avšak akumulace lamininu-1 u dvojitého mutantu byla značně utlumena ve srovnání s akumulací v Alportových lomerulách (zobrazeno na obrázku č. 3E). Fibronektin se v normálním případě nachází pouze v mesangiální matrici, ale také se zjistil v GBM a mesangiální matrici Alportovi myši (Obrázek č. 3H). Je překvapivé, že v případě dvojitého mutantu se nepozorovala akumulace fibronektinu v kapilárních kličkách (zobrazeno na Obrázku č. 3I). Tento výsledek je silně reprodukovatelný. Naopak barvení proteoglykanu sulfátu heparinu vykazuje tlumené barvení mesangiální matrice dvojitého mutantu (obrázek č. 3L) ve srovnání s kontrolou (obrázek č. 3J) nebo Alportovou myši (obrázek č. 3K). Akumulace entaktinu v GBM se pozorovala u vzorků Alportovi myši a dvojitých mutantů, přičemž není možno vidět mezi nimi rozdíly (zobrazeno na obrázku č. 3a a 3e).

Tato data ukazují, že nulová mutace  $\alpha 1$  ve dvojitém mutantu vede ke zpomalení postupu Alportova renálního onemocnění. To

je zřejmé, jak na úrovni fyziologie (zpoždění vzniku proteinurie, jak je zobrazeno na obrázku č. 1) a ultrastruktury (omezené poškození GBM a účinnosti procesu výživy, jak je zobrazeno na obrázku č. 2). Imunofluorescenční studie zobrazené na obrázku č. 3 ilustrují, že eliminace integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$  vedou ke specifickým změnám v akumulaci komponentů extrabuněčné matrice v GBM a mesangiální matrici. Vynález zahrnuje léčebné metody, kde vazebné místo integrinového receptoru  $\alpha 1\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk je blokováno. Takové léčebné metody se popisují dále v textu.

Dále na obrázku č. 9 je zobrazeno, že zatímco TGF- $\beta 1$  se indukuje v Alportově myši, neindukuje se v Alportově myši, která nese mutaci integrinu  $\alpha 1$ . Tak v nepřítomnosti integrinu  $\alpha 1\beta 1$  není možné pozorovat indukci TGF- $\beta 1$ , což znamená podstatné zpomalení postupu renálního onemocnění.

#### Úloha TGF- $\beta 1$

Zde uvedená data jasně naznačují, že TGF- $\beta 1$  se indukuje ve specifickém typu glomerulárních buněk (podocytů) v používaných myších modelech. Indukce mRNA TGF- $\beta 1$  se sleduje indukcí genů, které kódují matricové molekuly, které jsou známé tím, že se akumulují v glomerulární bazální membráně, jako funkce progresivní glomerulonefritidy v modelu (jsou to například laminin, fibronectin, entaktin a kolagen typu IV). Zde uvedená data ukazují, že TGF- $\beta 1$  se indukuje v lidském Alportově renálním kortexu. To podporuje platnost zvířecího modelu v jeho schopnosti napodobovat, co se děje v lidské Alportově ledvině.

Aby se ukázala úloha TGF- $\beta 1$ , celková RNA se izolovala z ledvin Alportových zvířat a testovaly se s radioaktivně značenými sondami, které jsou specifické pro řetězce kolagenu

$\alpha 1(IV)$  nebo  $\alpha 2(IV)$ , entaktin, řetězce laminu  $\beta 1$  nebo  $\beta 2$ , fibronektinu nebo TGF- $\beta 1$ . Výsledky na obrázku č. 4 ilustrují, že mRNA v případě všech uvedených proteinů s výjimkou lamininu  $\beta 1$  se vyvolávají vznikem proteinurie v Alportově myším modelu. Northernovy bloty se v tomto časovém průběhu také provedly pro laminin  $\alpha 1$ , laminin  $\beta 2$ , laminin  $\gamma 1$ , jaderný protein proteoglykan sulfátu heparinu a řetězců kolagenu  $\alpha 4(IV)$  a  $\alpha 5(IV)$ . V případě dalších proteinů bazální membrány, když se porovnávala kontrola s mutantem, nejsou zjevné žádné podstatné rozdíly.

Výsledky northernovy analýzou, kterou se přímo kvantifikovaly relativní změny ve specifické expresy mRNA v časovém průběhu, ilustrují na obrázku č. 5, že vyvolání specifického množství mRNA je jasné už v šesti týdnech věku. V osmém týdnu množství mRNA tvoří pík s mRNA kódující TGF- $\beta 1$  a fibronektin indukovaný 6,6 a 9,4 krát ve srovnání s kontrolní myší. Množství mRNA v případě kolagenu  $\alpha 1(IV)$ ,  $\alpha 2(IV)$  a entaktinu se indukovalo 3 krát víc než ve stáří osmi týdnů. Naopak v libovolném bodě renálního onemocnění se nepozorovaly žádné podstatné změny v mRNA, která kóduje řetězce lamininu  $\beta 1$  a  $\beta 2$ , jak se stanovilo těmito stejnými northernovými bloty celkové RNA.

Glomeruli tvoří pouze malé procento celkového množství ledvin. Jednotlivé buněčné typy v glomerulách obsahují dokonce i menší procento. Northernovy bloty celkové RNA ledvin nedetekovaly indukci mRNA, která může být specifická pro glomeruli nebo pro určitý glomerulární buněčný typ. Aby se testovalo, zda se indukovala mRNA kódující TGF- $\beta 1$  nebo různé komponenty bazální membrány v určitém glomerulárním typu buněk, provedla se *in situ* hybridizace za použití antisense sond značených digoxigeninem, které jsou specifické pro mRNA.

Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 6. U normálních myši se transkripty TGF- $\beta$ 1 (obrázek č. 6D), fibronectin (obrázek č. 6G) a laminin  $\beta$ 1 (obrázek č. 6M) nacházejí pouze v mesangiálních buňkách, zatímco u Alportovi myši tyto stejné transkripty (obrázek č. 6 E, H a A) jasně lokalizují podocyty (kruh buněk na vnější straně glomerul), což znázorňuje aktivaci genu v tomto typu buněk glomerul. Aktivace podocytů kolagenu  $\alpha$ 1(IV) je také evidentní (porovnává se obrázek č. 6B a 6A). Aktivace genů, které kódují matricové proteiny v glomerulárních podocytech by mohly být výsledkem změn v poloze GBM.

Data proteinu TGF- $\beta$ 1 založená na detekci imunoperoxidázou za použití protilátek specifických pro aktivní izoformu cytokinu podporuje data získaná analýzou mRNA TGF- $\beta$ 1 získaná hybridizací. Data zobrazená na obrázku č. 7 ilustrují, že hodnocená exprese mRNA TGF- $\beta$ 1 v podocytech se překládají do proteinu.

Protože data v případě TGF- $\beta$ 1 se shromáždila za použití analýzy RNázové ochrany myšního modelu, která se provedla za účelem stanovení, zda množství mRNA v případě cytokinu se zvyšuje v lidském renálním kortexu u Alportova pacienta ve srovnání s kontrolními pacienty. Data na obrázku č. 8 ilustrují 3 až 4 násobné zvýšení mRNA TGF- $\beta$ 1 v lidském Alportově renálním kortexu, což se vztahuje ke kontrole. To prokázalo, že cytokin se nadměrně exprimuje v lidských Alportových ledvinách. Inhibice aktivity TGF- $\beta$ 1 poskytuje významnou léčbu Alportova syndromu, zvláště při omezení a přednostně dokonce při omezení akumulace matrice v GBM.

Jak se diskutuje shora v textu, na obrázku č. 9 je zobrazeno, že zatímco TGF- $\beta$ 1 se indukuje v Alportově myši, neindukuje se v myši s dvojitou mutací, která nese také mutaci integrinu  $\alpha$ 1. Při nepřítomnosti integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 se nepozorovala

indukce TGF- $\beta$ 1, což má za následek akumulaci matrice v glomerulární bazální membráně a tak podstatné snížení rychlosti, kterou dochází k postupu renálního onemocnění.

Blokace (nebo jiná deaktivace) receptoru integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 a inhibice TGF- $\beta$ 1 je synergické při tlumení vzniku renálního onemocnění (zvláště Alportova renálního onemocnění), jeho postupu a/nebo jeho zvratu. Tento synergický účinek se demonstruje použitím například dvou různých činidel, která blokuji aktivitu TGF- $\beta$ 1 třemi různými způsoby. Provedla se studie, aby se dokázalo, že výsledky vedou k inhibici aktivity TGF- $\beta$ 1, spíše než vedlejšímu účinku léčby léky.

Prvním příkladem je lék produkovaný firmou Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan, který se nazývá takrolimus nebo FK506. Tento lék se běžně používá jako imunosupresivní činidlo, aby předcházel odmítnutí transplantovaných orgánů. Funguje na základě inhibice kritické podjednotky receptoru T buňky, která se nazývá kalcineurin, která je serinová-threoninová fosfatáza a kritická část signální transdukce receptoru T buňky. V publikaci Crabtree, Cell, 96: 611-614, 1999) se popisuje, že kalcineurin je podjednotka různých receptorů. Ukázalo se, že jeden z těchto receptorů je receptor pro TGF- $\beta$ 1 (popisuje se v publikaci Wang et al., Cell, 86: 435-444, 1996). Lék FK506 se testoval jako inhibitor TGF- $\beta$ 1. U myší léčených vhodnou dávkou FK506 se inhibuje receptor signální transdukce TGF- $\beta$ 1 typ I/typ II.

Protože FK506 má vedle inhibice TGF- $\beta$ 1 i jiné biologické účinky (silná imunosuprese prostřednictvím inhibice receptoru T buňky), hodnotil se druhý inhibitor TGF- $\beta$ 1. Tento druhý inhibitor je lék, který se vyvíjí u firmy Biogen Inc., Cambridge, MA. Tento lék je kompetitivní inhibitor cytokinu prosakování aktivního cytokinu jako neaktivního rozpustného

receptorového komplexu. Je to rozpustný chimerový myší fúzní protein TGF- $\beta$ RII/IgG1 (popisuje se v dokumentu mezinárodní přihláška WO 98/48024). Myšim se injekcí do ocasní cévy jednou týdně aplikovalo 25 mikrogramů inhibitoru.

Protože mód aktivity a potencionálních vedlejších účinků FK506 a rozpustného inhibitoru TGF- $\beta$ 1 Biogenu je odlišný, provedla se pozorování pomocí systémů zvířecích modelů, které jsou konzistentní s oběma léky, přičemž dochází k inhibici aktivity TGF- $\beta$ 1.

Provedly se dva typy experimentů. Obě činidla se testovala za použití myšího modelu 129 Sv/J (Alportova myš) za účelem testovat biologické účinky samotné inhibice TGF- $\beta$ 1. Obě činidla se testovala v myším modelu s dvojitou mutací, přičemž se testovaly biologické účinky inhibice integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 kombinované s inhibicí TGF- $\beta$ 1. Ve všech případech se zde prezentovaná data opakovala alespoň třikrát s vysokým stupněm shody.

V případě, že se TGF- $\beta$ 1 inhibuje v Alportově myším modelu, dochází k pozitivním účinkům. Existuje zlepšení morfologie bazální membrány, ale stále dochází k podstatnému porušení procesu výživy. Tak TGF- $\beta$ 1 může vylepšit morfologii GBM snížením rychlosti akumulace matrice, ale nemá podstatný účinek na mechanismy porušení procesu výživy. To znamená, že samotné TGF- $\beta$ 1, ačkoli poskytují zlepšení nejsou schopny dosáhnout zlepšení všech charakteristik Alportova syndromu nebo jiných takových poruch. U myší s dvojitou mutací ve věku deseti týdnů většina procesů krmení se jeví být normální, avšak dochází k podstatné akumulaci matrice v GBM. Když se ošetří tato stejná zvířata libovolným inhibitorem TGF- $\beta$ 1, s čímž se začne ve věku zvířat čtyř týdnů a tkáň se shromáždí ve věku deseti týdnů, přibližně 30 % glomerul je ultrastrukturálně nerozlišitelných od glomerul normálních

myši. Zde popsané podstatné zlepšení v léčebných protokolech lze dosáhnout za použití inhibitorů TGF- $\beta$ 1 v kombinaci s inhibitory receptoru integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1.

Data získaná northernovou blotací specifické mRNA pocházející z ledvin odebraných z Alportovi myši nebo z myši s dvojitou mutací ošetřenou inhibitory TGF- $\beta$ 1 ukazují, že existující rozdíly mezi mutací TGF- $\beta$ 1 nebo dvojitou mutací integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 ovlivňují expresi těchto mRNA, které kódují matricové molekuly, jenž se akumulují v GBM. mRNA kódující metaloproteinázy (zahrnující matricovou metaloproteinázu 2 (MMP-2)) a jejich odpovídající inhibitory (zahrnující TIMP-2 a TIMP-3), o nichž se ví, že modulují rychlost přeměny molekul, které jsou obsaženy v GBM, jsou také odlišně ovlivněny u Alportovi myši na rozdíl od myši s dvojitou mutací ošetřenou inhibitory TGF- $\beta$ 1. Specificky Timp-3, který se exprimuje ve velmi velkém množství u normální myši, je potlačen u Alportovi myši a u myši s dvojitou mutací. Léčba myši s dvojitou mutací s inhibitory TGF- $\beta$ 1 brání potlačení TIMP-3, přičemž množství mRNA je srovnatelné s množstvím pozorovaným u kontrolní myši (obrázek č. 21).

Expese lamininu  $\alpha$ 2 je v normálním případě omezena na mesangiální matrici. Uložení lamininu  $\alpha$ 2 je nejčasněji identifikovaná molekulární změna spojovaná se vznikem Alportova onemocnění GBM, která se projeví ve stejný čas jako první ztlustění bazální membrány. Uložení lamininu  $\alpha$ 2 v GBM myši s dvojitou mutací se nepozorovalo ani v sedmém týdnu stáří (obrázek č. 18, skupina 1D). Aplikace inhibitorů TGF- $\beta$ 1 Alportově myši SV/J neinhibuje uložení lamininu  $\alpha$ 2 (obrázek č. 18, skupina 1C). To zdůrazňuje jiné rozdíly jak funkce integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 verus TGF- $\beta$ 1 při zpomalení postupu onemocnění odůvodňuje proč kombinovaná léčba poskytuje synergický účinek.

Věří se, že nedostatek TGF- $\beta$ 1 vedoucí k inhibici poruchy výživy podocytů je přímo spojen s pozorováním, které se týká lamininu  $\alpha$ 2. Lamininy tvoří heterotriméry, které obsahují řetězec alfa, beta a gama. V bazální membráně se vzájemně síťují a tvoří superstrukturu podobnou listu, která je integrální část bazální membrány. Je známo, že lamininy interagují s integrinovými receptory a hrají důležitou úlohu při diferenciaci a udržení funkce tkáně. U normální myši GBM obsahuje převážně laminin-11, heterotrimér a heterotrimér řetězců  $\alpha$ 5,  $\beta$ 2 a  $\gamma$ 1. Je známo, že tento laminin se váže s velkou afinitou na receptor integrinu  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 na povrchu podocytů. Věří se, že tato interakce hraje klíčovou úlohu při udržování komplexní cytoskeletové architektury, která je spojena s retencí vody. Heterodiméry lamininu, které obsahují řetězec  $\alpha$ 2 (jsou laminin-2 a laminin-4), se navážou na integrin  $\alpha$ 3 $\beta$ 1. Přítomnost řetězce lamininu-2 v GBM může vést k porušení procesu retence vody inhibicí navázání integrinu  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 na jeho normální substrát (laminin-11). Jak se zmiňuje v případě dvojité mutace inhibuje se uložení lamininu  $\alpha$ 2, což dobře koreluje s udržením normální retence vody u tohoto myšního kmenu.

Další pozorování se vztahuje ke tkáni interstiniální fibrózy. Interstiniální fibróza se objevuje v pozdějším stádiu Alportova syndromu. V Alportově myším modelu 129 Sv/J se pozorovala malá fibróza dříve než myši dosáhly věku 7 týdnů, přičemž průměrný věk úmrtí je 8 týdnů. Při dvojité mutaci dochází však ke vzniku fibrózy mezi 8 až 9 týdnem a postupuje až se dosáhne průměrného věku 15 týdnů. Tak se dvojitá mutace jeví být skvělým modelem při studiu fibrózy. Existuje podstatný průběh fibrózy u myši s dvojitou mutací a tomu je možné předcházet použitím inhibitorů TGF- $\beta$ 1.

## Léčebné metody

Vynález popisuje použití inhibitorů (například blokačních činidel), aby blokovaly nebo jinak deaktivovaly funkci receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$ , jako metody pro oddálení vzniku (měřením detekovatelného množství sérového albuminu v moči, přičemž se použije komerčně dostupný papírkový test nebo gelová elektroforéza a postup barvení gelu), což zpomaluje postup (jak se stanoví měřením rychlosti, při které roste množství albuminu v moči, jako funkce času, jak se měří shora v textu) nebo dokonce zvrácením glomerulárního onemocnění, zvláště pak progresivní glomerulární nefritidy a/nebo fibrózy. Mezi tyto inhibitory patří například devítimerní peptidy z proteinů, které se vážou na integrinový receptor  $\alpha\beta 1$ , jako je laminin, kolagen typu IV, fibronektin a entaktin. Malé molekuly vážající se na místo receptor/ligand receptoru  $\alpha\beta 1$  mohou vznikat na základě studie protein/integrinový receptor  $\alpha\beta 1$ . Vynález popisuje protilátky a protilátkové fragmenty, které se specificky vážou na vazebné místo receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$ . Tyto protilátky a protilátkové fragmenty zahrnují polyklonální, monoklonální, anti-idiotypové, zvířecí, humanizované a chimérové protilátky.

Činidlo (umělý ligand), které blokuje vazebné místo pro receptor integrinu  $\alpha\beta 1$  se může použít při metodách podle vynálezu. Příklady takových činidel zahrnují, ale nejsou omezeny na neutralizující protilátky, peptid, proteolytický fragment nebo podobně. Věří se, že taková činidla blokují signální transdukci prostřednictvím receptoru. Účinnost takové léčby se může stanovit hodnocením účinků na genovou expresi například v případě TGF- $\beta 1$ , fibronektinu, řetězců lamininu atd., pomocí morfometrických změn glomerulární bazální membrány a/nebo zlepšením glomerulární filtrací, což slouží jako důkaz rychlosti vzniku a postupu proteinurie.

Protilátky, které neutralizují funkci integrinu  $\alpha 1\beta 1$ , se popisují v příkladech a na obrázku č. 10. Jako příklad ilustrace, se ukázalo, že rozpustné činidlo schopné blokovat interakci integrinu  $\alpha 1\beta 1$  se svým ligandem, bude produkovat stejné účinky při patogenezi renálního onemocnění jako při vyřazení genu  $\alpha 1$ . Získaly se protilátky popsané v publikaci Fabbri et al., Tissue Antigens, 48: 47-51, 1996. Tato protilátka se zavedla injekcí (400 ng v injekci, která se aplikuje třikrát týdně, intraperitoneálně a ukazuje inhibici poškození glomerulární bazální membrány v modelu Alportovi myši, stejným způsobem, jako se pozorovalo ve dvojitým mutantu.

Vynález dále popisuje použití činidel, které snižují množství TGF- $\beta 1$ , jako způsob zpomalení akumulace matrice při postupu glomerulárního onemocnění, zvláště při postupující glomerulonefritidě. Taková činidla se mohou použít při léčbě pacientů s Alportovým syndromem a pacientů s inzulindependentní cukrovkou, stejně jako dalších jednotlivců trpících zvláště progresivní glomerulonefritidou nebo libovolnou takovou poruchou charakterizovanou expanzí mesangiální matrice, pomnožením mesangiálních buněk, uložením matrice v glomerulární bazální membráně, což vede k ztluštění, zeslabení, rozdělení nebo některým takovým nepravidlostem, k porušení procesu retence vody podocytů nebo kombinace shora uvedených poruch, což kulminuje v běžném průběhu renální fibrózy (prevence, při které je zvláště účinná kombinovaná terapie inhibitory integrinů  $\alpha 1\beta 1$  a inhibitorů TGF- $\beta 1$ ). „Antisense terapie“, jak se zde popisuje, se může použít při blokování exprese proteinu receptoru integrinů TGF- $\beta 1$  a  $\alpha 1\beta 1$ . Mohou se použít různá syntetická nebo přírodní činidla.

Činidlo, které neutralizuje schopnost cytokinu TGF- $\beta 1$  interagovat s jeho receptorem se může použít při metodě podle

vynálezu. Příklady takových činidel zahrnují, ale nejsou omezeny na neutralizující protilátky, kalcineurinový inhibitor (například mikrolid), jak se popisuje v dokumentu US patent č. 5,260,301 (Nakanishi et al.,) (například FK506 nebo takrolimus a strukturně příbuzné sloučeniny), rozpustný receptor, jako je rozpustný rekombinantní receptor TGF- $\beta$ 1, který se popisuje v dokumentu mezinárodní přihláška WO 98/4802 (Biogen Inc.) (například rozpustný chimérový fúzní protein TGF- $\beta$ R1I/IgG1), peptidový fragment receptoru nebo nějaký takový fragment, který má schopnost se vratně (nebo nevratně) vázat na cytokin a inhibovat svou schopnost vázat se na svůj receptor. Navíc se může použít činidlo, které inhibuje schopnost TGF- $\beta$ 1 transdukovat signály do jádra. Účinnost takové léčby se může stanovit hodnocením účinkům na expresi genu například fibronektinu, řetězců lamininu, atd. pomocí morfometrických změn v glomerulárních bazálních membránách a/nebo zlepšením glomerulární filtrace, což prokazuje snížení rychlosti nástupu a postupu proteinurie.

V jednom provedení vynálezu se může použít FK506 nebo cyklosporin A při inhibici kalcineurinové části receptoru TGF- $\beta$ 1, přičemž dochází k inhibici signální transdukce prostřednictvím receptorového komplexu, jak se popisuje v případě některých jiných onemocnění ledvin (popisuje se v publikaci Wang et al., Cell 86: 435-444, 1996 a Miller et al., Endocrinol., 3: 1926-1934, 1989), čímž se také inhibuje (prostřednictvím neznámého mechanismu) nástup proteinurie, jak se popisuje v případě stejných onemocnění ledvin (popisuje se v publikaci Callis et al., Pediatr. Nephrol., 6: 140-144, 1992). Takové doporučení nešlo udělat v případě Alportova syndromu, cukrovky nebo onemocnění spojeným se vzrůstem extrabuněčné matrice u glomerul dříve než se popisuje v tomto vynálezu.

Vynález zvláště popisuje účinek kombinace terapie inhibující receptor integrinu  $\alpha 1\beta 1$  a TGF- $\beta 1$ , která vykazuje synergický účinek při prevenci glomerulárního onemocnění a fibrózy spojené s Alportovým syndromem. Libovolné onemocnění, které zahrnuje expanzi mesangiální matrice, proliferaci mesangiálních buněk, progresivní poškození bazální membrány, jako vyjádření ztluštění, ztenčení, rozdělení GBM, poškození retence vody podocytů nebo libovolnou shora popsanou kombinací je výhodné také léčit uvedenou metodou. Navíc se popisuje účinnost kombinace léčby při prevenci fibrózy tubulointerstitia u Alportova syndromu. Fibróza je běžná dráha u onemocnění, kde je fibróza zahrnuta, přičemž se věří, že mechanismus takového onemocnění je shodný u všech renálních onemocnění. Účinnost této kombináční terapie u léčby fibrózy je možné proto aplikovat na všechny formy renální fibrózy, bez ohledu na libovolné způsoby, které iniciují dráhy vedoucí k fibróze.

Činidla používaná u těchto metod podle vynálezu se mohou aplikovat v kombinaci s farmaceuticky přijatelným nosičem. Činidla podle vynálezu se používají ve farmaceutických kompozicích (to jsou přípravky) a pak vzhledem k metodě podle vynálezu se aplikují savci, jako je například lidský pacient v různých formách, které se upravily pro vybraný způsob aplikace. Přípravky v typickém případě zahrnují ty, které jsou vhodné pro parenterální (zahrnující podkožní, intramuskulární, intraperitoneální a intravenózní) aplikaci nebo jiné metody, které umožňují stabilitu činidel.

Vhodné farmaceuticky přijatelné nosiče se mohou vyskytovat ve formě roztoků, jako semipevné látky, jemně rozpojené pevné látky nebo jejich kombinace. Přípravky vhodné pro parenterální aplikaci běžně obsahují sterilní vodné přípravky činidel nebo disperze sterilních prášků, které obsahují činidlo. Tyto přípravky jsou přednostně izotonické s krví recipienta.

Izotonická činidla, která mohou být zahrnuta v kapalných přípravcích obsahují cukry, pufrы a chlorid sodný. Roztoky činidla se mohou připravit ve vodě, mohou se smíchat s netoxickým povrchovým činidlem. Disperze činidla se mohou připravit ve vodě, etanolu, polyolu (jako je glycerol, propylenglykol, kapalná polyetylen glykol a podobně), v rostlinných olejích, glycerolesterech a v jejich směsi. Mezní dávková forma je sterilní a stabilní za výrobních podmínek a podmínek skladování. V případě disperze lze dosáhnout nezbytné fluidity například použitím lipozomů, použitím vhodné velikosti částic nebo použitím povrchově aktivního činidla. Sterilizace kapalného přípravku se může dosáhnout libovolnou vhodnou metodou, která brání bioaktivitě činidla, přičemž se upřednostňuje sterilizace filtrací. Preferované metody přípravy prášků zahrnují vakuové sušení a liofyzaci sterilních injektovatelných roztoků. Následná mikrobiální kontaminace se může zabránit použitím různých antimikrobiálních činidel. Jsou to například antibakteriální, antivirová a antifungicidní činidla zahrnující parabeny, chlorbutanol, fenol, kyselinu sorbovou, thimerosal a podobně. Absorpce činidel po prodlouženou dobu je možné dosáhnout použitím zpoždovacích činidel, jako je například monostearát hliníku a želatina.

Vedle dříve uvedených složek přípravky podle vynálezu mohou dále zahrnovat jednu nebo více přídavných ingrediencí, jako jsou ředidla, pufrы vazebná činidla, rozvolňovadlo, povrchově aktivní činidla, zahušťovadla, lubrikanty, konzervační činidla (zahrnující antioxidanty) a podobně. Přípravky se mohou běžně vyskytovat v jednotkové dávkové formě a mohou se připravit libovolným způsobem, který je dobře znám v oboru farmakologie.

Použitelné dávky (to znamená účinné množství, které vykazuje žádaný účinek) zde popsaných činidel se mohou

stanovit porovnáním jejich aktivity *in vitro* a *in vivo* ve zvířecích modelech. Metody extrapolace účinných dávek u myši a jiných zvířat a lidí jsou známy v oboru. Jsou to například dávky okolo 150 mg/kg až 300 mg/kg dvakrát denně intravenózní injekcí. Vhodné dávky pro aplikaci jsou v obecném případě ty, které jsou dostatečné pro produkci požadovaného účinku, jako je indukce podstatného zvýšení exprese enzymu fáze II nebo jiné zde popsané charakteristiky.

#### Přehled obrázků na výkrese

Obrázek č. 1 zobrazuje, že vytvoření proteinurie u Alportovi myši ve srovnání s myši dvěma mutacemi, která se studovala hromaděním moče myši v týdenních intervalech. Čísla označují věk (v týdnech) myši v době hromadění moče. A = Alportova myš, B = myš s dvěma mutacemi, Mr = standardy molekulové hmotnosti.

Na obrázku č. 2 jsou zobrazeny poškození glomerulární kapilární kličky u kontrolní myši a u myši se dvojitou mutací. Renální kortex pocházející z normální (A), Alportovi myši (B) a z myši s dvojitou mutací (C) se získal po dobu 7 týdnů, zalily se do epoxidové pryskyřice. Ultratenké vrstvy se obarvily a analyzovaly se transmisní elektronovou mikroskopií. symbol C značí kapilární lumen, symbol U značí urinární prostor. měřítko zvětšení představuje 0,5 mikrometrů.

Na obrázku č. 3 jsou uvedeny výsledky imunofluorescenční analýzy extrabuněčných matricových proteinů normální a Alportové myši a myši s dvojitou mutací. Zamražené kryosekce renálního kortexu se nechaly reagovat s protilátkami, které jsou specifické pro extrabuněčné matricové proteiny uvedené na ose Y. Signal se vyvinul za použití vhodných sekundárních protilátek, které jsou konjugované s fluoresceinem a obrázky se zaznamenávaly digitálně a zpracovávaly se za použití

softwaru Cytovision Ultra (Applied Imaging, Inc.). Šipky značí glomerulární kapilární kličky. 4A1,2 = řetězec kolagenu  $\alpha 1$ (IV) a  $\alpha 2$ (IV), Lam-1 = laminin-1, Fib = fibronectin, HSP = proteoglykan sulfátu heparinu, ent. = entaktin.  $\alpha 1^{+/+}$  = homozygotní normální gen integrinu  $\alpha 1$ ,  $\alpha 1^{-/-}$  = homozygotní mutant genu integrinu  $\alpha 1$ ,  $\alpha 3$ (IV) $^{+/+}$  = homozygotní normální genu kolagenu  $\alpha 3$ (IV),  $\alpha 3$ (IV) $^{-/-}$  = homozygotní mutant v genu kolagenu  $\alpha 3$ (IV) .

Na obrázku č. 4 jsou znázorněny výsledky analýzy mRNA z celé ledviny během průběhu progresse Alportova renálního onemocnění. Celková RNA izolovaná z ledvin získaných v označených časových bodech (v týdnech) se rozdělila na fragmenty na denaturačních agarózových gelech, přenesly se na nylonovou membránu a testovaly se sondou tvořenou myší cDNA , která kóduje buď TGF- $\beta 1$  nebo různé komponenty glomerulové bazální membrány a/nebo extrabuněčnou matrici. Sondy, které se použily pro vytvoření dat ilustrovaných na panelu jsou následující: A, TGF- $\beta 1$ ; B, kolagen  $\alpha 1$ (IV); C, kolagen  $\alpha 2$ (IV); D, fibronectin; E, entaktin; F, řetězec lamininu  $\beta 1$ ; G, řetězec lamininu  $\beta 2$ .

Na obrázku č. 5 je zobrazena kvantitativní analýza indukce mRNA během progresse Alportova renálního onemocnění. Po expozici filmu paprsky X se membrány použité pro vytvoření obrázku č. 4 analyzovaly za použití zobrazovače fosforu BioRad GS-525. Vynesené hodnoty indikují násobnou indukci specifické mRNA v Alportově vzorku ve srovnání se vzorky normálních mláďat. Všechny pruhy se odečetly proti pozadí. Specifické druhy analyzované mRNA jsou poznamenané v příloze.

Na obrázku č. 6 je zobrazena analýza hybridizace *in situ* specifických transkriptů u Alportových myší, které prodělaly proteinuremii. Ledviny pocházející z normálních mláďat (A, D,

G a J) se analyzovaly dpolu s ledvinami z Alportovy myši (B. E. H a K). Antisense sondy jsou specifické pro oblast NC1 kolagenu  $\alpha 1(\text{IV})$  (A a B), TGF- $\beta 1$  (D a E), fibronektin (G a H), entaktin (J a K) nebo řetězec  $\beta 1$  lamininu (M a A). Sonda specifická pro bakteriální  $\beta$ -galaktozidázu se použila jako kontrola při nespecifickém navázání (C, F, I, L a O).

Na obrázku č. 7 je zobrazena imunoperoxidázové barvení TGF- $\beta 1$  v sekcích tkáně pocházejících z normální a Alportovi myši. Sekce zalité v parafínu se barvily za účelem prokázání aktivní formy TGF- $\beta 1$  za použití imunoperoxidázové detekce. P = podocyty, M = mesangiální buňky.

Na obrázku č. 8 je zobrazena RNázová detekční analýza mRNA TGF- $\beta 1$  provedená s normálním a Alportovým lidským renálním kortexem. Celková RNA se izolovala normálního a Alportova lidského renálního kortexu a 10  $\mu\text{g}$  každé získané RNA se vystavilo působení analýze RNázové ochrany za použití radioaktivně značených částí, kdy se jako sonda použije „antisense message“ lidského TGF- $\beta 1$ . Test prokázal chráněný fragment o velikosti 264 bp. Markery molekulové hmotnosti jsou radioaktivně značené fragmenty štěpeného PBR322. Symbol A znamená normální myš. Symbol B znamená Alportova myš.

Na obrázku č. 9 je zobrazen northernův blot RNA z renálního kortexu normální myši, Alportovi myši a myši deficitní pro integrin  $\alpha 1$  a myši deficitní pro integrin  $\alpha 1$  a kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$ . Celková RNA se izolovala z renálního kortexu 7 týdnů starých myši (mláďat) s indikovaným genotypem: +/+ = normální v případě obou alel, -/- = mutantní v případě obou alel.

Na obrázku č. 10 je transmise elektronového mikroskopu GBM 7 týdnů starého Alportova zvířete kterým se injekcí aplikovaly

neutralizační protilátky specifické pro integrin  $\alpha 1$ . Je možné vidět regulární trilaminární vzhled GBM a nepřítomnost fokálně zeslabených oblastí. Zvětšení je 10 500 x.

Na obrázku č. 11 je znázorněný účinek inhibitorů TGF- $\beta 1$  na ultrastrukturu GBM u Alportovi myši 129 Sv/J. Zvířata se ošetřila buď FK506 nebo rozpustným receptorem TGF- $\beta 1$ . Renální kortex se zalil do epoxidu, krájel se a obarvil se uranylacetátem a ošetřil se citrátem a analyzoval se transmisní elektronovou mikroskopií. Symbol A značí kontrolu, symbol B značí neošetřenou Alportovu myš, symbol C značí Alportovu ošetřenou myš pomocí FK506, symbol D značí Alportovu ošetřenou myš pomocí rozpustného receptoru TGF- $\beta 1$ . Zvětšení je 11 000x.

Na obrázku č. 12 je řádkovací elektronový mikrograf glomerulu pocházející z ošetřené nebo neošetřené Alportovi myši 129 Sv/J. Renální kortex z myši užívané na obrázku č. 11 se liofyzoval, nařezal a obarvil uranylacetátem a ošetřil se citrátem a provedla se identifikace ledvinových kliček a vše se fotografovalo za použití řádkovacího elektronového mikroskopu. Symbol A je kontrola, symbol B značí Alportovu myš bez aplikace injekce, symbol C značí Alportovu myš ošetřenou rozpustným receptorem TGF- $\beta 1$ . Zvětšení 25 000x.

Na obrázku č. 13 je zobrazen účinek ošetření lékem na urinární albumin u Alportové myši 129 Sv/J. Během průběhu ošetření lékem se shromáždila moč, lyofilizovala se a ekvivalent 0,5  $\mu$ l frakce se nanese na polyakrylový gel. Gel se obarvil Comassieovou modří. V prvních dvou drahách se nacházejí kontroly, kterým se neaplikovaly injekce, v dalších dvou drahách (skupina 1) jsou vzorky s myší (skupina I), kterým se injekcí zavedlo FK506 a třetí skupinu (skupinu II) tvoří myši, kterým se zavedl injekcí rozpustný receptor TGF- $\beta 1$ .

Čísla uvedená na dně reprezentují stáří myši v době sběru moče v týdnech.

Symbol C značí kontrolu a symbol A značí Alportovu myš.

Na obrázku č. 14 je zobrazen účinek inhibitorů TGF- $\beta$ 1 na ultrastrukturu GBM u myši s vyřazením dvou genů. Zvířata, která se neošetřila nebo se ošetřila buď FK506 nebo rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1. Renální kortex se zalil do epoxidu, nařezaly sekce a obarvily se uranylacetátem a ošetřily se citrátem a analyzovaly se transmisní elektronovou mikroskopií. Symbol A značí kontrolu, které se neaplikovala injekcí. Symbol B je vzorek z myši s dvojitou mutací, které se neaplikovala injekce. Symbol C je vzorek z myši s dvojitou mutací, které se aplikovala injekce. Symbol D je vzorek z myši s dvojitou mutací, která se ošetřila rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1. Zvětšení je 8 000x.

Obrázek č. 15 zobrazuje příklad normální architektury ledvinných klubíček u deseti týdnů starých myši s dvojitou mutací genu ošetřených inhibitory TGF- $\beta$ 1. Přibližně 25 % ledvinných klubíček u myši ošetřených inhibitory TGF- $\beta$ 1 tvoří morfologicky nerozlišitelnou formu. Zvířata se neošetřila nebo ošetřila FK506. Renální kortex se zalil do pryskyřice, neřezaly se sekce a obarvily se uranylacetátem a ošetřily se citrátem a analyzovaly se transmisní elektronovou mikroskopií. Symbol A značí kontrolu, které se neaplikovala injekce, symbol B značí myši s dvojitou mutací ošetřené FK506.

Na obrázku č. 16 je zobrazen účinek aplikace léku na močový albuminu u myši s dvojitou mutací. Během průběhu ošetření lékem se shromáždila moč, lyofilizovala se a frakcionovaný ekvivalent 0,5  $\mu$ l se nanese na polyakrylamidový gel. Gel se barvil Coomassievou modří. Stáří myši v době sbírání moče se označil na spodní části obrázků (vyjádřeno

v týdnech). Symbol A značí myši s dvojitou mutací, které se neaplikovala injekce. Symbol B značí myš s dvojitou mutací, které se aplikovala injekce s rozpustným receptorem. Symbol C značí kontrolní myš, které se aplikovala injekce FK506. Symbol D značí myš s vyřazeným genem, které se injekcí aplikoval FK506.

Na obrázku č. 17 je znázorněn řádkovací elektronový mikrograf ledvinných kliček pocházející z myši s dvojitou mutací. Renální kortex z myši starých sedm týdnů se lyofilizoval, řezal, barvil uranylacetátem a ošetřil se citrátem. Exponované glomeruli se identifikovaly a fotografovaly za použití řádkovacího elektronového mikroskopu. Symbol A značí kontrolu. Symbol B značí Alportovu myš a symbol C značí myš s dvojitou mutací.

Na obrázku č. 18 je znázorněno duální imunofluorescenční barvení řetězce  $\alpha 2$  lamininu u normální a mutantní myši. Glomerulární bazální membrána se barvila na zeleno za použití primárních protilátek specifických pro entaktin a sekundárních protilátek konjugovaných FITC. Řetězec  $\alpha 2$  lamininu se obarvil červenou za použití sekundárních protilátek konjugovaných Texas červení. Ko-lokalizace v kapilárních kličkách vede k žlutému obarvení. Skupina I jsou glomeruli z myši ve stáří 7 týdnů. Symbol A znamená kontrolu, které se neaplikovaly injekce. Symbol B znamená Alportovu myš, které se neaplikovala injekce. Symbol C znamená Alportovu myš, které se injekcí aplikoval rozpustný receptor. Symbol D znamená myš s dvojitou mutací, které se neaplikovala injekce. Skupina II jsou glomeruli z myši starých dva týdny. Symbol A je kontrola a symbol B je Alportova myš. Šipky značí imunozbarvení v kapilárních kličkách v glomerulách.

Na obrázku č. 19 je transmisní elektronový mikrograf GBM normálních verzus Alportových myši. Renální kortex se zalil

do pryskyřice, nařezal se a obarvil se uranylacetátem a ošetřil se citrátem a analyzoval se transmisí elektronovou mikroskopií. Symbol A je kontrola a symbol B značí Alportovu myš.

Obrázek č. 20 demonstruje účinek inhibitorů TGF- $\beta$ 1 na expresi RNA kódující molekuly buněčné matrice v ledvinách nebo metaloproteinázové inhibitory u normální verzus Alportovi myši. Celková RNA se izolovala z ledvin 7 týdnů starých normálních (C) a Alportových myší (A), které se ošetřily FK506 (I) nebo se neošetřily (NI). RNA se rozdělila na fragmenty na denaturačním agarózovém gelu a analyzovala se hybridizací s radioaktivně značenými sondami, které kódují buď molekuly extrabuněčné matrice nebo inhibitory metaloproteináz. Po hybridizaci se membrány promyly a exponovaly se na film vhodný pro X-paprsky. Používané sondy se označily na levé straně panelů. Symbol  $\alpha$ 1(IV) značí kolagen  $\alpha$ 1(IV). Symbol fn značí fribronektin a symbol ent značí entaktin. Symbol Timp2 značí inhibitor metaloproteinázy Timp-2. Symbol Timp3 značí inhibitor metaloproteinázy Timp-3.

Na obrázku č. 21 je znázorněn účinek inhibitorů TGF- $\beta$ 1 na expresi RNA kódující molekuly buněčné matrice v ledvinách nebo inhibitory metaloproteináz u normální myši verzus myši s dvojitou mutací. Celková RNA se izolovala z ledvin 10 týdnů starých normálních myší (C) a myší s dvojitou mutací (Dko), které se buď ošetřily FK506(I), rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1 (II) nebo neošetřily. RNA se pak naštipala na denaturačních agarózových gelech a analyzovala se hybridizací s radioaktivně značenými sondami, které kódují buď molekuly extrabuněčné matrice nebo inhibitory metaloproteináz. Po hybridizaci se membrány promyly a exponovaly se na film vhodný pro paprsky X. Použité sondy se pak uvedly na levou stranu panelu. Symbol  $\alpha$ 1(IV) značí kolagen  $\alpha$ 1(IV). Symbol fn značí fribronektin,

symbol ent značí entaktin a symbol Timp2 značí metaloproteinázový inhibitor Timp-2 a symbol Timp3 značí metaloproteinázový inhibitor Timp-3.

Obrázek č. 22 znázorňuje inhibici akumulace matrice v tubulointerstitiu myši s dvojitou mutací za použití inhibitorů TGF- $\beta$ 1. Ledviny z deset týdnů starých normálních myši a myši s dvojitou mutací se zalily do plastiku a nařezaly se sekce o tloušťce jeden mikrometr a obarvily se za použití Jonesovi metody barvení metenaminem stříbra. Symbol A značí normální ledvinu, symbol B značí ledvinu myši s dvojitou mutací, kterým se neaplikovala injekce, symbol C značí ledvinu z myši s dvojitou mutací ošetřenou FK506 a symbol D značí ledvinu myši s dvojitou mutací ošetřenou rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1.

Na obrázku č. 23 je zobrazena inhibice akumulace kolagenu typu I v tubulointerstitiu myši s dvojitou mutací za použití inhibitorů TGF- $\beta$ 1. Ledviny pocházející z deseti týdnů starých normálních myši nebo z myši s dvojitou mutací se zalily do plastu a sekce o tloušťce jednoho mikrometru se imunologicky obarvily za použití protilátek specifických pro kolagen typu I. Barva se vyvinula za použití barvicího kitu streptavidin AEC od firmy Vector laboratories. Symbol A značí ledviny pocházející z normálních myši. Symbol B značí ledviny s myši s dvojitou mutací, kterým se neaplikovala injekce. Symbol C značí ledviny z myši s dvojitou mutací ošetřené FK506 a symbol D značí ledviny z myši s dvojitou mutací ošetřené rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1.

Obrázek č. 24 zobrazuje inhibici akumulace fibronektinu v tubulointerstitiu myši s dvojitou mutací za použití inhibitorů TGF- $\beta$ 1. Ledviny pocházející z deseti týdnů starých normálních myši a myši s dvojitou mutací se zalily do plastu a jedno mikrometrové sekce se imunologicky obarvily za použití

protilátek specifických pro fibronektin. Barvení se vyvinulo za použití barvicího kitu se streptavidinem AEC od firmy Vector laboratories. Symbol A znamená normální ledviny, symbol B znamená ledviny z myši s dvojitou mutací, kterým se neaplikovala injekce a symbol C znamená ledviny myši s dvojitou mutací ošetřené FK506 a symbol D znamená ledviny z myši s dvojitou mutací ošetřené rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1.

#### Příklady provedení vynálezu

V příkladech se popisují dva různé zvířecí modely. Prvním je Alportův myši model, který neexprimuje kolagen  $\alpha$ 3(IV) a je normální v případě integrinu  $\alpha$ 1 (popisuje se v publikaci Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992). Druhým modelem je myš s dvojitou mutací, která se získala křížením Alportovi myši s myší, která nese nulovou mutaci v genu integrinu  $\alpha$ 1. Existují zde rozdíly mezi Alportovou myší a myší s dvojitou mutací, které slouží k ilustraci účinnosti blokování funkce integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 na zpomalení postupu glomerulárního onemocnění. Tyto účinky se popisují dále v textu.

Alportova myš tvoří čisté genetické pozadí 129Sv/J a myš s dvojitou mutací je z 97,5 % čisté pozadí 129 Sv. Výjimkou jsou zvířata, která se mohou použít při vytvoření obrázků č. 4, 5 a 6. Tyto experimenty se provedly časně v historii Alportova myšního modelu a tak se vytvořily křížením chimerických samců se samicemi C57 B1/6 a pak křížením vzniklých heterozygotů za vzniku homozygot Alportova myšního modelu, což je generace F2. To je stejná generace zvířat používaná při původním popise Alportova myšního modelu (popisuje se v publikaci Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992, 1996). To je vhodné pro studii mutace časného genu, protože zrychluje identifikaci mutovaného fenotypu. Výsledky získané z těchto populací F2' s ohledem na indukci specifické

mRNA jsou konzistentní s výsledky získanými čistou mutací 129 Sv/J. Je nutné poznamenat, že všechny experimenty, které poskytují srovnatelnou analýzu Alportovi myši verzus myši s dvojitou mutací se uskutečnily v inbredních kmenech.

Úloha TGF- $\beta$ 1 při postupu renálního onemocnění stejně jako při vývoji fibrózy v obou testovaných zvířecích modelech. To se provedlo testováním dvou různých inhibitorů TGF- $\beta$ 1, které působí velmi odlišným způsobem. Za použití dvou různých inhibitorů (FK506 a rozpustný inhibitor TGF- $\beta$ 1) poskytují důkaz, že tento účinek způsobuje inhibitor TGF- $\beta$ 1 spíše než vedlejší účinek použitého činidla. FK506 může působit jako terapeutické činidlo při léčbě postupující fibrózy, která je spojena s nadměrnou expresí TGF- $\beta$ 1.

V průběhu analýzy různých zvířecích modelů a popsané léčby léky existuje specifický způsob hodnocení, které zůstává po celý průběh konstantní. Hodnotily se tři různé oblasti. Za prvé se testovala renální funkce, která poskytuje odhad integrity glomerulárního filtru. To se provedlo testováním sérovým albuminem v moči. Za druhé se testovala strukturální integrita tkáně světelnou a elektronovou mikroskopií. Použila se oba postupy transmisní a řádkovací elektronová mikroskopie. Tyto postupy se navrhly tak, aby sloužily ke stanovení stupně renální histopatologie za různých podmínek. Nakonec se uskutečnil experiment molekulární analýzy, za účelem testovat k jakým změnám dochází ve specifických genech a jim odpovídajících proteinech, což je výsledek působení těchto různých podmínek. Tyto změny se testovaly vyhledáváním specifické RNA za použití northernových blotů, *in situ* hybridizace a RNázové ochrany a použitím imunohistochemické detekce v případě specifických proteinů. Specifické postupy se opakovaly v případě analýzy různých zvířecích modelů a různých léčebných postupů za použití léků u různých zvířecích modelů.

Aby se zabránilo redundanci, postupy se uskutečnily shodným způsobem ve všech případech a popisují se v dále uvedených příkladech.

Existuje řada různých postupů, které jsou dobře známy v oboru, které podobně umožňují úspěšně použít popsany vynález. Všechna činidla se získala od firmy Sigma Chemical Co., St. Louis, MO a nejsou specifikována jiným způsobem. PBS používaná ve všech popsanych studiích se používá ve formě tablet, přičemž každá tableta se rozpustí ve 200 ml vody, přičemž vzniká PBS, jehož hodnota pH je 7,4. Tablety se získaly od firmy Sigma Chemical Co, St. Louis MO, č. produktu P-4417.

## Metody

### I. Funkce ledvin

#### A. Analýza proteinů

Počáteční měření proteinů v moči se provedlo za použití Albustix (Miles Laboratories, Elkhart, IN) a relativní množství se odečítá z barevné stupnice, která je obsažena v kitu.

Vzorky moče se shromáždily v týdenních intervalech a 0,5  $\mu$ l vzorku se rozdělilo na frakce elektroforézou na 10 % denaturačních akrylamidových gelech. Protein v gelech se barvil Coomassieovou modří a gely se fotografovaly. Bovinní sérový albumin se použil jako standart molekulové hmotnosti.

### II. Strukturální integrita

#### A. Transmisní elektronová mikroskopie

Čerstvý externí renální kortex se ponořil do 4 % paraformaldehydu, nechal se zafixovat po dobu 2 hodin a uchovával se při teplotě 5 °C v PBS (pH 7,4). Tkáň se extenzivně promyla (pětkrát po dobu deseti minut při teplotě 4 °C) 0,1 M Sorensonovým pufrem (Sorensonův pufr se připravil

kombinací 100 ml 200 mM monobazického fosforečnanu sodného a 400 ml 200 mM dibazického fosforečnanu sodného s 500 ml vody a pH se upravilo na hodnotu 7,4) a pak se fixovala 1 % tetraoxidem osmia v Sorensově pufru po dobu 1 hodiny. Tkáň se pak dehydratovala v stupňující koncentraci etanolu (70 %, pak 80 %, pak 90% a pak 100 % po dobu deseti minut při každé koncentraci) a nakonec propylenoxid a zafixovaly se v epoxydové pryskyřici Poly/Bed 812 (Polysciences, Inc., Warrington, PA) podle postupu, který se popisuje výrobcem. 42 ml pryskyřice Polybed 812 se smíchalo s 26 ml dodecylsukcinanhydridu (DDSA, Polysciences, Inc.) a 24 ml nadického metylanhydridu (Polysciences Inc.). 1,5 ml 2,4,6-tri(dimetylaminometyl)fenolu se přidalo jako katalyzátor a aktivovala se pryskyřice v 10 ml alikvotech, která je nutná pro zalití vzorků. V sekcích o tloušťce jeden mikrometr barvených toluidinovou modří se identifikovaly glomeruli a sekce se pak nařezaly na tloušťku 70 nm za použití ultramikrotomu Reichert Jung Ultracut E (Cambridge Instrument Co, Vienna, Austria). Sekce se nanasly na mřížky a barvily se uranylacetátem a přelily se citrátem za použití postupů dobře známých v oboru. Sekce nanesené na mřížku se testovaly a fotografovaly se za použití elektronového mikroskopu Phillips CM10.

#### B. Řádkovací elektronová mikroskopie

Malé kousky (kostičky o rozměru dva milimetry) ledvinového kortexu se fixovaly ve 3% glutaraldehydu pufrovaným fosfátem, pak se fixovaly v 1 % tetraoxidu osmia pufrovaným fosforečnanem. Vzorky se pak dehydratovaly ve vzrůstající koncentraci etanolu a sušily se v oxidu uhličitém. Kostičky se pak rozlámaly na malé kousky za použití ostří žiletky a připevnilly se lepidlem na blok s popraskaným povrchem směrem nahoru. Povrch se pokryl rozprašováním iontovým bombardováním

ve vakuu latelem/paládiem za použití dobře známých postupů a vizualizoval se řádkovací elektronovou mikroskopií.

### C. Barvení methenaminem stříbra podle Jonese

V parafinu zalité ledviny se obarvily Jonesovým barvením za použití metod popsaných v publikaci Burns and Bretschneider, Thin is in: plastic embedding of tissue for light microscopy, Educational Products Division, American Society of Clinical Pathologists, Chicago, Il, pp. 24-25, 1981.

## III. Molekulová analýza

### A. Analýza northernovým přenosem

Vyňaly se ledviny, zamrazily se v kapalném dusíku a rozmělnily se na prášek v kapalném dusíku za použití tloučku a misky. Prášek se rozpustil v činidle TRIZOL (GibCo/BRL, Grand Island, NY) za použití 5 ml činidla najednu ledvinu. Celková buněčná RNA se extrahovala podle instrukcí výrobce. Dvacet mikrogramů RNA se rozdělilo na frakce v 1% gelu složeném z agaróza/formaldehyd/MOPS (3-(N-morfolinpropan-sulfonová kyselina) elektroforézou, která proběhla při napětí 80 V po dobu 4 hodiny. Gely se namočily do vody po dobu 45 minut a přenesly se na membránu Hybond A (nylonová membrána bez náboje, New England Nuclear, Inc., Boston, MA) kapilárními bloty přes noc, kde se jako transferový pufr použil acetát amonný o koncentraci 750 mM (ve vodě). RNA se zachytila UV zářením na membráně za použití Stratalinkeru (Stratagene, Inc., LaJolla, CA). Bloty se předem hybridizovaly v roztoku, který obsahuje 50 % formamid, 10 x koncentrovaný Denhardtův roztok, 1M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1% SDS a 200 µg/ml sonikované a denaturované DNA sperma lososa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). Sondy (fragmenty cDNA značené <sup>32</sup>P) se značily náhodným zavedením, přičemž konečná koncentrace je 10<sup>9</sup> cpm/µg za použití kitu pro značení DNA náhodným začleněním

(Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Prehybridizace a hybridizační pufry obsahují 5x koncentrovaný fyziologický roztok pufrovaný citrátem sodným (SSC), 5x koncentrovaný Denhardtův roztok, 0,5 % dodecylsulfát sodný (SDS) a 200 µg/ml sonikované a denaturované DNA sperma lososa. Membrány se předem hybridizovaly po dobu alespoň 5 hodin a pak se nechaly hybridizovat přes noc za použití 1 miliónu DPM (rozklad za minutu) sondy na mililitr hybridizačního roztoku. Filtry se pak promyly při vysoké příslosti (dvakrát po dobu 30 minut při teplotě 65 °C v roztoku, který obsahuje 300 mM NaCl, 30 mM citrát sodný a 0,2 % dodecylsulfát sodný ve vodě) a exponoval se na film vhodný pro paprsky X. Kvalita přípravy RNA a konzistence nanesení se odhadla barvením gelů ethidiumbromidem a sledováním pruhů ribozomální RNA podjednotek 18S a 28S za použití digitálního systému zobrazení Gel Imager 2 000 a příslušného software (Applied Imaging, Santa Clara, CA). Vhodné poměry ribozomálních pruhů potvrdily, že přípravky RNA byly vysoké a konzistentní kvality. Kvantitativní denzitometrické sledování potvrdilo více jak 10 % odchylku při nanesení vzorku. Tyto nástroje se použily spíše než kontrolní sondy, protože je zřejmé, že změny ve fyziologii buněk souhlasné s postupující fibrózou činí takové kontrolní sondy nespolehlivými. Kvantitativní rozdíly při expresi se odhadly analýzou zobrazení fosforu za použití zařízení BioRad GS-525 (Bio Rad, Inc., Hercules, CA) a odečetla se hodnota pozadí hybridizace.

Sondy se izolovaly z knihovny 5'pruhů cDNA myších ledvin (Clontech) pomocí PCR amplifikace za použití publikované sekvence za použití různých cDNA kolagenu bazální membrány a dále sekvence kódující asociované proteiny. V případě sond vhodných pro kolagen bazální membrány se amplifikovaly sekvence kódující konzervativní oblast NC1. Používané primery a podmínky byly stejné jako se popisuje v publikaci Miner and

Sanes, J. Cell Biol., 127: 879-891, 1994. V případě kolagenu COL4A1 se použily primery (popisuje se v publikaci Muthukumaran et al., J. Biol. Chem., 264: 6310-6317, 1989) „sense“ primer 5'TCTGTGGACCATGGCTTC3' (SEQ ID NO: 1), „antisense primer“ 5'TTCTCATGCACACTTGGC3' (SEQ ID NO: 2). V případě kolagenu COL4A2 se použily primery (popisuje se v publikaci Saus et al., J. Biol. Chem. 264: 6318-6324, 1989): „sense“ primer 5'GGCTACCTCCTGGTGAAG3' (SEQ ID NO: 3) a „antisense primer“ 5'TTCATGCACACTTGGCAG3' (SEQ ID NO: 4). Oba kolageny COL4A1 a COL4A2 se amplifikovaly za stejných podmínek. Virióny ( $a \times 10^6$ ) se amplifikovaly ve 35 cyklech PCR za použití horkého startu (při teplotě 95 °C po dobu 10 minut), pak následují cykly: teplota 95 °C po dobu 30 vteřin, teplota 55 °C po dobu 30 vteřin a teplota 72 °C po dobu jedné minuty. Sondy se subklonovaly a ověřily se sekvenční analýzou DNA.

Sondy vhodné pro proteiny asociované s bazální membránou se amplifikovaly ze stejné knihovny jako kolageny bazální membrány. Primery se získaly z 3' sekvence. V případě jaderného proteinu HSPG se použily primery (popisuje se v publikaci Nooman et al., J. Biol. Chem., 263: 16379-16387, 1988) „sense primer“ 5' CGGGCCACATTCTCC3' (SEQ ID NO: 5), „antisense primer“ 5'GGAGTGGCCGTTGCATT3' (SEQ ID NO: 6). V případě lamininu B2 se použijí (popisuje se v publikaci Sasaki and Yamada, J. Biol. Chem., 262: 17111-17117, 1987) „sense“ primer 5'ACCAGTACCAAGGCGGA3' (SEQ ID NO: 7) a „antisense“ primer 5'TCATTGAGCTTGTTTCAGG3' (SEQ ID NO: 8). V případě lamininu B1 se použily (popisuje se v publikaci Sasaki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 935-939, 1987) „sense“ primer 5'TAGAGGTTATTTTGCAGCAGA3' (SEQ ID NO: 9) a „antisense“ primer 5'TTGGATATCCTCATCAGCTTG3' (SEQ ID NO: 10). V případě entaktinu se použily (popisuje se v publikaci Mann et al., EMBO Journal, 8: 65-72, 1989) „sense“ primer 5'GTGGTTTACTGGACAGACATC3' (SEQ ID NO: 11) a „antisense“ primer 5'CCAATCTGTCCAATAAAGG3' (SEQ

ID NO: 12). V případě řetězce A lamininu se použily (popisuje se v publikaci Duetzmann et al., Eyr. J. Biochem., 177: 35-45, 1988) „sense“ primer 5'ACACACTCCAAGCCCACAAAAGCAAG3' (SEQ ID NO: 13) a „antisense“ primer 5'GAGGGAAGACTCCTTGTAGGTCAA3' (SEQ ID NO: 14). V případě S-lamininu se použily (popisuje se v publikaci Hunter et al., Nature, 338: 229-234, 1989) „sense“ primer 5'GCAGAGCGGGCACGGAGC3' (SEQ ID NO: 15) a „antisense“ primer 5'TGTACCTGCCATCCTCTCCTG3' (SEQ ID NO: 16). Podmínky PCR jsou shodné s podmínkami použitými pro shora popsáné řetězce kolagenu typu IV.

Sondy vhodné pro MMP-2, Timp2 a Timp3 se izolovaly za použití celkové RNA, která pochází z myších embryí ve věku 13 dní pomocí RT-PCR. Za použití sady primerů vhodných pro amplifikaci MMP-2 se amplifikoval fragment mRNA o velikosti 237 bp (popisuje se v publikaci Reponen et al., J. Biol. Chem., 267: 7856-7862, 1992) a zahrnuje primer proti směru exprese genu 5' CCC CTA TCT ACA CCT ACA CCA 3' (SEQ ID NO: 17) a primer po směru exprese genu 5'TGT CAC TGT CCG CCA AAT AAA3' (SEQ ID NO: 18). Sada primerů pro Timp-2 amplifikuje fragment o velikosti 195 bp mRNA (popisuje se v publikaci Shimizu et al., Gene, 114: 291-292, 1992) a zahrnuje primer proti směru exprese genu 5'CAG AAG AAG AGC CTG AAC CAC A3' (popisuje se v publikaci SEQ ID NO: 19) a primer po směru exprese genu 5'GTA CCA CGC GCA AGA ACC3' (SEQ ID NO: 20). Sada primerů v případě Timp-3 amplifikuje fragment o velikosti 337 bp z mRNA (popisuje se v publikaci Apte et al., Development Dynamics, 200: 177-197, 1994) a zahrnuje primer proti směru exprese genu 5'GGT CTA CAC TAT TAA GCA GAT GAA G3' (SEQ ID NO: 21) a primer po směru exprese genu 5'AAA ATT GGA GAG CAT GTC GGT (SEQ ID NO: 22). V případě všech tří sond jeden mikrogram celkové RNA se reverzně přepisuje za použití reverzní transkriptázy Gibco Superscript plus a primeru po směru exprese genu podle protokolů popsáných výrobcem. Jedna

desetina objemu reakce se podrobila 40 cyklům PCR s horkým koncem za použití polymerázy PFU (Stratagene, Inc.).

Sonda TGF- $\beta$ 1 se získala jako dárek od H.L. Moses (popisuje se v publikaci Miller et al., Mol. Endocrinol., 3: 1926-1934, 1989) s výjimkou RNázové ochrany, která požaduje lidskou sondu. V případě této sondy se fragment o velikosti 24 párů bází TGF- $\beta$ 1 amplifikoval PCR za použití knihovny cDNA lidské ledviny (Clontech, Palo Alto, CA). Používaly se následující sady primerů GCA GAA GTT GGC ATG GTA G (SEQ ID NO: 23) (nižší) a GGA CAT CAA CGG GTT CAC TA (SEQ ID NO: 24) (horní). Fragment se znovu amplifikoval polymerázou PFU (Stratagene) a tupý konec se ligoval do plazmidu pBluescript SK+.

#### B. Hybridizace *in situ*

Ledviny se na počátku fixovaly pomalou transkardiální perfúzí (za použití 4% paraformaldehydu v PBS). Zvířata nejdříve uspala hlubokou anestézi za použití Avertinu (2, 2, 2-tribromoetanol, Aldrich Chemical Co, Milwaukee, WI). Otevřel se hrudník a píchnutím tuberkulinovou jehlou se vytvořila v pravé srdeční komoře malá díra, což umožňuje odsát perfuzát. Do apexu levé srdeční komory se zavedla druhá tuberkulinová jehla spojená s injekcí o objemu 30 ml, která obsahuje perfúzní pufr. Jeden mililitr fixačního činidla se perfúzovalo na jeden gram tělesné hmotnosti rychlostí okolo 3 mililitry za minutu. Dobře fixované ledviny byly pevné a vykazovaly mramorovaný vzhled. Po perfúzi se renální kapsule odstranila pinzetou, ledviny se podélně přepůlily (rozpůlila se pánev, ledvinová dřeň a kortex) a umístily se do fixátoru při teplotě 4 °C po dobu jedné hodiny. Fixované poloviny se zalily do parafinu, nařezaly se na sekce o tloušťce šest mikrometrů a přenesly se na mikroskopická sklíčka SUPERFROST PLUS (Fisher Scientific, Inc., Pittsburg, PA). Sklíčka se zapekla při teplotě 60 °C po dobu 20 minut a uchovávaly se při teplotě 4 °C až do okamžiku použití (sklíčka se mohou použít po dobu

šesti týdnů). Ledviny z kontrolních a Alportových mláďat se zalily vedle sebe tak, aby se daly porovnat i malé rozdíly, které se mohou vzniknout v průběhu hybridizace.

Sklička se zapekla ve vakuu v troubě při teplotě 60 °C po dobu jedné hodiny, pak se odstranil vosk třemi promytími nadbytkem xylenu po dobu 2 minut. Tkáň se dehydratovala v etanolu, odstranily se proteiny inkubací v 0,2 N HCl po dobu 15 minut, promyly se v PBS a štěpily se proteinázou K o koncentraci 3 µg/ml (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) po dobu 10 minut při teplotě 37 °C. Štěpení se zastavilo promytím glycinem v PBS o koncentraci 2 mg/ml. Následuje dehydratace tkáně roztokem etanolu se stoupající koncentrací (70 %, 80 %, 90 %, 100 % po dobu 10 minut při teplotě místnosti). Pak se provedla prehybridizace tkáně, její hybridizace a tkáň se promyla v souladu s protokolem popsány v publikaci *Genius in situ Hybridization Kit* (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) s následujícími modifikacemi. V případě prehybridizačního nebo hybridizačního roztoku se používá tRNA kvasinek extrahovaných směsí fenolu a chloroformu v koncentraci 10 mg/ml. Tento krok podstatně redukuje nespecifický signál. Po hybridizaci se tkáň promyla dvakrát 2x koncentrovaným roztokem SSC při teplotě 50 °C, pak se štěpila RNázou A po dobu 6 minut při teplotě místnosti. Množství RNázy A se stanovilo v případě každé sondy (rozmezí je 200 ng/ml až 5 µg/ml). Sondy pro negativní kontrolu zahrnují kódující sekvenci bakteriální β-galaktosidázy nebo neomycin fosfotransferázy. Všechny sondy obsahují přibližně 200 bazí a klonovaly se do míst rozeznávaných restrikcí enzymem SacI plazmidu BlueScript SK+ (Stratagene, Inc., LaJolla, CA) a přepsaly se (po linearizaci) ze strany T3. Jedinou výjimkou je TGF-β1, který vykazuje 974 bazí a klonoval se do vektoru pmT.

### C. Test RNázové ochrany

Experimenty se provedly za použití kitu RPAII (Ambion, Inc., Austin, TX) podle protokolu uvedeném v kitu. V případě sondy se fragment TGF- $\beta$ 1 o velikosti 264 párů bází amplifikoval pomocí PCR z knihovny cDNA lidských ledvin (Clontech, Palo Alto, CA). Používala se sada primerů, která zahrnuje GCA GAA GTT GGC ATG GTA G (SEQ ID NO: 25) (nižší) a GGA CAT CAA CGG GTT CAC TA (SEQ ID NO: 26) (horní). Fragment se znovu amplifikoval pomocí polymerázy PFU (Stratagene) a tupé konce se ligovaly do plazmidu pBluescript SK+ (Stratagene). „Antisense“ sonda se připravila z promotoru T7.

#### D. Imunofluorescenční analýza

Vyňala se čerstvá ledvina a nařezala se na příčné sekce o tloušťce 3 mm a sekce se zalily do vodné látky Tissue Tek OCT (produkt č. 4583, Miles Laboratories, Elkhart, IN) a zamrazily se v mrazáku  $-150\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Sekce se nakrájely na tlošťku 3 mikrónů za použití kryostatu Microm typ HM505a (Zeiss, Inc., Walldorf, Německo) a nechaly se roztát na sklíčkách potažených poly-L-lyzinem. Sklíčka se fixovaly po dobu 15 minut a nechaly se namočené v chlazeném (při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 95 % etanolu v případě, že se použijí pro barvení pomocí protilátek specifických pro kolagen bazální membrány, nebo smáčely chladným acetonem ( $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) za účelem barvení protilátkami specifickými pro proteiny asociované s bazální membránou. Sklíčka se nechaly uschnout na vzduchu přes noc a uchovávaly se ve vysušené formě při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  až do okamžiku použití.

Vzorky se nechaly stát, aby se ohřály na teplotu okolí, pak se třikrát promyly v PBS (pH 7,4) při teplotě místnosti. V případě barvení protilátkami proti kolagenům typu IV se tkáň předem ošetřila 0,1 M glycinem a 6 M močovinou (pH 3,5), přičemž se denaturovaly proteiny a odhalily se antigenní místa. Vhodná ředění primárních protilátek se aplikovaly na vzorek a ten se nechal reagovat po dobu 3 hodin při teplotě 5

°C v humidizovaném boxu. Protilátky se ředily do roztoku 5 % netučného sušeného mléka v PBS (pH 7,4). Použitím netučného sušeného mléka podstatně redukovalo pozadí fluorescence. Vzorky se promyly čtyřikrát v PBS (pH 7,4) po dobu 10 minut při teplotě místnosti, čímž se odstranily primární protilátky a pak reagovaly s vhodným sekundárním činidlem konjugovaným s FITC. Všechny sekundární činidla se použily v ředění 1:100 za použití 7 % netučného sušeného mléka v PBS, který slouží jako ředidlo. Sekundární činidla se nechaly reagovat po dobu 2 hodin při teplotě 4 °C. Sklíčka se pak promyla čtyřikrát chlazeným PBS (pH 7,4) a pak se aplikovalo médium, které brání zeslabení signálu (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA). Vzorky se zatahly pod skleněné krycí sklíčko za použití laku na nehty. Sklíčka se vyfotografovala při zvětšení 1 000x. V plastu zalité vzorky se barvily methenaminem stříbra podle Jonese.

Kozí antiséra proti řetězcům COL4A1 a COL4A2 se získala od Southern Biotechnology, Inc., Birmingham, AL. U těchto protilátek se testovala zkřížená reaktivita a tyto protilátky produkují barevný patern v glomerulách, přičemž patern je konzistentní s jinými protilátkami proti uvedeným řetězcům (popisuje se v publikaci Miner and Sanes, J. Cell Biol., 127: 879-891, 1994). Protilátky proti proteoglykanu sulfátu heparinu (HSPG) jsou krysí monoklonální protilátky, které vznikly proti jadernému proteinu HSPG čištěnému z myšího nádoru EHS. U protilátek se testovala zkřížená reaktivita s lamininem, kolagenem typu IV, fibrinektinem a entaktinem westernovým blotem a imunologickým testem dot blot (Chemicon International, Temecula, CA) (jak se popisuje v publikaci Horiguchi et al., J. Histochem. Cytochem., 37: 961-970, 1989). Protilátkou proti lamininu-1 je králičí antisérum. Imunogen se čistil z bazální membrány EHS a získal se od firmy Sigma Immunochemicals (St. Louis, MO). Imunologické testy Dot blot se provedly výrobcem (Sigma) a potvrdily nepřítomnost zkřížené

reaktivita s kolagenem typ IV, fibronektinem, vitronektinem a sulfátem chondroitinu typy A, B a C. Anti-fibronektin je králičí sérum vzniklé proti fibronektinu získanému z lidské plazmy. Výrobce (Sigma Immunochemicals) také testoval zkříženou reaktivitu s kolagenem typu IV, lamininem, vitronektinem a sukfátu chondroitinu A, B a C za použití imunologického testu dot blot. Anti-entaktinové protilátky jsou krysí monoklonální protilátky produkované za použití entaktinu získaného z EHS, jako imunogenu. Toto činidlo se získalo od firmy Upstate Biotechnology Incorporated, Lake Placid, NY a testovala se vhodná imunologická reaktivita stejně jako absence zkřížené reaktivity s jinými hlavními komponenty bazální membrány analýzou westernovým přenosem (popisuje se v publikaci Ljubimov et al., Exp. Cell Res., 165: 530-540, 1986).

Imunofluorescence a zobrazení Jonesova barvení se zaznamenávalo a zpracovalo za použití fluorescenčního mikroskopu Olympus BH2 RFLA propojeného se systémem pro analýzu zobrazení Applied Imaging Cytovision Ultra (Applied Imaging Inc.). Obrázky se snímaly za použití černobílé videokamery s vysokým rozlišením. Tyto obrázky se upravily za použití systémového software. Při zpracování obrázků se hodnotila i přibližná fluorescence pozorovaná přímo v mikroskopu.

#### E. Imunoperoxidázová detekce

Imunoperoxidázová detekce se používala při imunologickém barvení TGF- $\beta$ 1 v glomeruláci stejně jako fibronektin a kolagen typu I v tubunointerstitiu. Protilátky proti kolagenu typu I jsou králičí anti-myší a získaly se od firmy Biogenesis, Inc. (Sandown, NH). Antiséra se použila v ředění 1 : 100 při imunoperoxidázovém barvení. Protilátky proti fibronektinu jsou ty samé jako při imunofluorescenčním barvení (králičí anti-

lidské fibronektinové antisérum od firmy Sigma Chemical Company, St. Louis, MO a použily se v ředění 1:100. Sekundární činidla byly protikráličí protilátky značené biotinem, které se získaly od firmy Vector laboratories (Burlingame, CA) a použily se při ředění 1:100. Tato tkáň se zalila do parafínu (za použití stejného postupu), jak se popisuje v případě *in situ* hybridizace a připravily se sekce o tloušťce 3 mikróny. Sekce po odstranění parafínu se předem ošetřily 5 mikrogramy proteinázy K (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ve 100 mM Tris-HCl (pH 7,4), přičemž se odhalí epitopy. Proteinázové štěpení se zastavilo inkubací v glycinu o koncentraci 2 mg/ml v PBS po dobu 30 vteřin. Tkáň ošetřená proteinázou K po odstranění vosku se třikrát promyla PBS a reagovala primárními protilátkami po dobu 1 hodiny při teplotě místnosti, dále se promyla třikrát PBS a pak se nechala reagovat se sekundárními protilátkami značenými biotinem po dobu jedné hodiny při teplotě místnosti. Po tři násobném promytí PBS (pH 7,4) se sklíčka inkubovala s křenovou peroxidázou streptavidinu (3 µg/ml, Vector Laboratories) po dobu 30 minut při teplotě místnosti). Po třech promytích PBS se navázané protilátky vyvinuly C SK-4200, Vector Laboratories) pak následují postupy popsané výrobcem.

V případě TGF-β1 primární protilátky byly kuřecí α-lidské TGF-β1 (R&D Systems, Minneapolis, MN) užívané v ředění 1:15 v 7% netučném sušeném mléce v PBS (které se používá jako ředidlo pro všechny protilátky). Směs se nechala reagovat po dobu alespoň tří hodin při teplotě místnosti. Sekundární protilátky byly kozí anti-kuřecí protilátky pro TGF-β1 značené biotinem (Vectro Laboratories Burlingame, CA) a aplikovaly se v ředění 1:100 a nechaly se reagovat po dobu alespoň jedné hodiny. Po třech promytích se provedla imunoperoxidázová detekce za použití kitu AEC (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Příklad 1: Produkce dvojitého mutantu Alport/integrinu  $\alpha 1$

Myši model autozomální formy Alportova syndromu se vytvořil cílenou mutagenezí genu prokolagenu COL4A3, jak se popisuje například v publikaci Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992, 1996. Tento model se nazývá „Alportova myš“ a je jí možno získat z Jackson Laboratories v Bar Harbor, Maine s přístupovým číslem 2908. Tato myš s vypuštěným genem  $\alpha 3(\text{IV})$ , která tvoří pozadí 129 Sv/J, se křížila (pět úspěšných zpětných křížení s původním 129 Sv a pak s myší s nulovou mutací integrinu  $\alpha 1$ , kterou je původní 129 Sv), za vzniku myši s dvojitou mutací, která z 97,5 % čistá 129 Sv. Mutovaná myš  $\alpha 1$  se získala z instituce Humphrey Gardner of the Scripps Institute in LaJolla, CA a popisuje se v publikaci Gardner et al., Dev. Biol., 175: 301-313, 1996.

Příklad 2: Odhad postupu Alportova renálního onemocnění v myších modelech

Myši studované v tomto příkladu zahrnovaly Alportovu myš, která neexprimuje kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$  a jsou normální v případě integrinu  $\alpha 1$  (dostupné u instituce Jackson Laboratories of Bar Harbor, Maine), a dvojitého mutantu, který neexprimuje kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$  a integrin  $\alpha 1$ . Dvojitý mutant je z 97,5 % 129 Sv a 2,5 Sv/J.

Moč se shromažďovala v týdenních intervalech a provedla se proteinová analýza, jak se popisuje v sekci popisující metody. Jak je zobrazeno na obrázku č. 1, v případě zvířat, která neexprimují kolagen  $\alpha 3(\text{IV})$  a jsou normální pro integrin  $\alpha 1$  průměrný věk vzniku Alportova renálního onemocnění (založeno na studiu šesti jednotlivců) a udává se vznik proteinurie, je 3,5 týdnů až 4 týdny. Proteinurie rychle postupuje, přičemž dosahuje maxima ve věku mezi 6 a 6,5 týdny. Průměrný věk

odumírání následkem selhání ledvin je mezi 8 a 9 týdny. Žádné zvíře uvedeného genotypu (devět testovaných) nepřežilo devět týdnů. Močovina v krvi jako množství dusíku (BUN) se hodnotila v 7 a 7,5 týdne věku. U dvojitých mutantů (v případě tohoto měření se testovaly čtyři jedinci) došlo ke vzniku proteinurie mezi 5-ti a 5,5 týdny a pokračovala daleko pomaleji, přičemž maxima se dosáhlo mezi 9 a 9,5 týdny. Průměrný věk úmrtí způsobené selháním ledvin je 15 až 16,5 týdnů. U zvířat se projevila hodnotitelná hodnota BUN mezi 10 a 11 týdnem.

### Příklad 3: Charakterizace myšního modelu s dvojitou mutací

Ve 4 až 7 týdnech věku se za použití různých metod testovaly tři sady zvířat (normální kontroly, zvířata, která neexprimují gen  $\alpha 3(IV)$  a normální v případě integrinu  $\alpha 1$  (Alportova myš) a dvojití mutanti).

Transmisní elektronová mikroskopie se provedla za účelem stanovit integritu bazální membrány. Ve 4 týdnech věku (data nejsou uvedena) Alportovi mláďata vykazují rozředené bazální membrány do 100 % glomerulárních kapilárních kliček. Dvojití mutanti vykazují poškození některé glomerulární bazální membrány (GBM) (to znamená neregulérní ztlustění, ztenčení a rozdělení), přičemž tento jev není častý a řídce rozsáhlý. Přibližně 20 % glomerulí u dvojitých mutantů nevykazuje žádné zjevné poškození bazální membrány. Přibližně 5 % glomerulí u Alportovy myši byly v tomto čase fibrotické, zatímco u mláďat dvojitých mutantů se nezjistily žádné fibrotické glomeruli. Na obrázku č. 2 je zobrazen stupeň poškození glomerulární bazální membrány, které jsou charakteristické pro tyto různé myši ve věku sedmi týdnů. Zobrazují se typické glomerulární kapilární kličky. Glomerulární bazální membrána u Alportovy myši v tomto okamžik vývoje je těžce poškozena prakticky u všech glomerul. Na obrázku č. 2B je evidentní makroskopické nenormální ztlustění a ztenčení a extenzivní retence podocytů. U

dvojitých mutantů je však GBM (na obrázku č. 2C) ve většině případů ultrastrukturálně normálních s výjimkou několika malých abnormalit si podocyty udržují normální architekturu (porovnávají se oblasti) označené šipkou v případě normální myši na obrázku č. 2A s myší s dvojitou mutací na obrázku č. 2C). V tomto čase je 30 a 50 % glomerulí u Alportovy myši fibrotických, zatímco méně než 5 % glomerulí je fibrotických v případě dvojitých mutantů.

Řádkovací elektronová mikroskopie aplikovaná v případě sedmítýdnů starých myší (data nejsou uvedena) indikovala, že Alportova myš vykazuje podstatný zbytnění podocytů jako následek retence vody, přičemž dochází k porušení normálně elegantní a komplexní struktury těchto buněk. Porušení normální retence vody se popisuje v případě Alportovy glomerulonefritidy. U dvojitých mutantů, zatímco architektura nebyla perfektní, byla velmi blízká architektuře pozorované v glomerulách, které pocházejí z kontrolních myší. Bobtnání následkem retence vody odpovídá za blokování glomerulárních filtrů a vede k urémii. Proto toto zjištění je podstatné s ohledem na zlepšenou glomerulární funkci u dvojitého mutantu, které se porevnávají s Alportovými mláďaty.

Mikroskopický preparát celých ledvin zalitých v parafinu, které se získaly v sedmítýdenních myších se obarvily za použití Jonesovi metody a zpočítalo se celkového množství fibrotických glomerul (data nejsou uvedeny).

Všechny glomeruli pocházející z Alportovy myši byly ovlivněny do stejného stupně. Většina glomerulí vykazuje hyperbuněčnost a expanzi mesangiální matrice a přibližně jedna třetina je fibrotická. Naopak glomeruli pocházející z myší s dvojitou mutací byly normální s ohledem na mesangiální matrici a buněčnost. Přibližně 25 % myší vykazuje důkaz o mesangiální buněčné proliferaci a 5 % je fibrotických. Analýzy

se opakovaly ve dvou různých sadách myši a dosáhlo se velmi podobných výsledků.

Imunofluorescenční analýza se provedla za použití zmrazeného renálního kortexu, který se odebral ze stejných zvířat. Tkáň reagovala s protilátkami, které jsou specifické pro proteiny, o nichž se ví, že se akumulují v GBM, jako funkce postupu Alportova renálního onemocnění. Tkáně zahrnují laminin-1 (Lam-1) (užívaný v ředění 1:200), řetězce kolagenu  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  (COL4A1,2) (užívané v ředění 1:15), fibronektin (Fib) (užívaný v ředění 1:200), proteoglykan sulfát heparinu (HSP) (používané v ředění 1:100) a entaktin (ent) (užívaný v ředění 1:200). Všechny protilátky se ředily v 7% netučném sušeném mléce rozpuštěném v PBS. Výsledky jsou uvedeny na obrázku č. 3. V sedmi týdnech věku se výskyt všech těchto komponentů podstatně zvýšil v GBM Alportovy myši vzhledem ke kontrole. Ve fibrotických ledvinných kanálcích jsou všechny komponenty v nadbytku. U dvojitých mutantů se imunologické barvení řetězců kolagenu  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$  porovnávalo s barvením Alportovy myši v nefibrotických ledvinných klubičkách. To se očekávalo, protože sožení kolagenu typu IV GBM u dvojitého mutantu je stejné jako u Alportovy myši (to znamená, že obsahuje celé řetězce kolagenu  $\alpha 1(\text{IV})$  a  $\alpha 2(\text{IV})$ ). Barvení lamininu-1 a sulfátproteoglykanu heparinu se podstatně redukovalo v GBM dvojitých mutantů ve srovnání s Alportovou myši (porovnává se obrázek č. 3F s obrázkem č. 3E, obrázek č. 3L s obrázkem 3K) a neexistovalo zde zjevné barvení fibronektinu v GBM u dvojitých mutantů (obrázek č. 3I), který se vyskytuje v GBM Alportovy myši v nadbytku (obrázek č. 3H). Imunologické barvení mesangiální matrice za účelem zjištění těchto proteinů se porovnávalo mezi dvojitým mutantem a Alportovou myši, avšak v případě sulfátproteoglykanu heparinu se mesangiální barvení redukovalo

u dvojitych mutantů (obrázek č. 3L) relativně k buď normálním kontrolám (obrázek č. 3J) nebo Alportově myši (obrázek č. 3K).

Analýza northernovým přenosem se provedla za použití RNA izolované z celého renálního kortexu z normální a Alportovi myši a z myši s dvojitou mutací ve věku sedmi týdnů. Dvacet mikrogramů RNA každého vzorku se rozdělilo na frakce na agarózovém gelu, přeneslo se na nylonovou membránu kapilárním přenosem a hybridizovalo se s radioaktivně značenou sondou, která odpovídá části myši cDNA TGF- $\beta$ 1. Pak následuje série promytá za přísných podmínek a membrána se exponovala na film vhodný pro paprsky X. Na obrázku č. 9 je znázorněno, že v Alportově myši se indukuje TGF- $\beta$ 1 (čtvrtá dráha z leva se porovnává s druhou dráhou z leva, která slouží jako kontrola). TGF- $\beta$ 1 se neindukuje v Alportově myši, která nese mutaci v integrinu  $\alpha$ 1 (třetí dráha z leva se porovnává s druhou dráhou z leva, která je kontrolní). To jsou data, která vedou ke spekulaci, zda účinek inhibitorů  $\alpha$ 1 mohou zprostředkovat potlačení TGF- $\beta$ 1. Pak se provedly experimenty s inhibitorem TGF- $\beta$ 1, které klasifikují tuto tkáň.

#### Příklad 4: Úloha TGF- $\beta$ 1 při postupu post-proteinurového Alportova renálního onemocnění

Tkáně se získaly z F-2, které vznikají zkřížením zvířat 129Sv/J a C57 B1/6 (popisuje se shora v textu). Experimenty se uskutečnily alespoň dvakrát (na zvířeti, které pochází ze dvou různých sad zvířat). Výsledky v případě zde uvedených dat byly jasné a konzistentní.

Tyto experimenty se uskutečnily za účelem ilustrovat dva body. První je dočasná korelace mezi indukcí mRNA TGF- $\beta$ 1 a mRNA kódující matricové proteiny, které se akumulují jako funkce postupu Alportova renálního onemocnění a za druhé se tyto mRNA

indukují v glomerulích. (Protože 5% vlhké hmotnosti ledvin tvoří glomeruli, indukce specifické mRNA v celkovém renálním kortexu se vztahuje více ke problému progresivní fibrózy než ke glomerulonefritidě).

Celková RNA se izolovala z ledvin Alportova zvířete a kontrolních mláďat ve dvoutýdenních intervalech, které začínají v šesti týdnech věku a končí ve 12 týdnech věku. Proteinurie, která se objevuje u myši F2 při této studii začíná, když myši jsou přibližně 5,5 až 6 týdnů staré (data nejsou ukázána). RNA se rozdělila na denaturovaných agarózových gelech, přenesla se na nylonovou membránu a testovala za použití radioaktivně značených sond, které jsou specifické buď pro řetězce kolagenu  $\alpha 1(IV)$  a  $\alpha 2(IV)$ , entaktinu, řetězců lamininu  $\beta 1$  a  $\beta 2$ , fibronektinu nebo TGF- $\beta 1$ . Výsledky na obrázku č. 1 ukazují, že mRNA pro všechny uvedené proteiny s výjimkou lamininu  $\beta 1$  se indukují po vzniku proteinurie v modelu Alportovy myši.

Také se provedly northernovy přenosy se stejným průběhem v případě lamininu  $\alpha 1$ , lamininu  $\beta 2$ , lamininu  $\gamma 1$ , jaderného proteinu sulfátproteoglykanu heparinu a řetězců kolagenu  $\alpha 4(IV)$  a  $\alpha 5(IV)$  (data nejsou uvedena). Při porovnání kontroly a mutantu nejsou zjevné podstatné rozdíly v množství mRNA těchto jiných proteinů bazální membrány.

Výsledky northernovy analýzy se analyzovaly za použití zobrazovače fosforu, přičemž dochází k přímé kvantifikaci relativních změn při expresi specifické mRNA během jejího průběhu. Obrázek č. 5 ilustruje, že indukce specifického množství mRNA se poprvé objevuje v šesti týdnech věku nebo přibližně v době, kdy protein v urinárním prostoru dosahuje maximálního množství u myši F2 (Cosgrove et al., Genes Dev., 10: 2981-2992, 1996). V osmém týdnu množství mRNA dosáhlo

píku. Tento pík zahrnuje mRNA kódující TGF- $\beta$ 1 a fibronektin v 6,6 a 9,4 násobném nadbytku ve srovnání s kontrolní myší. Množství mRNA v případě kolagenu  $\alpha$ 1(IV) a  $\alpha$ 2(IV) a entaktinu bylo v tři násobném nadbytku a vyvolalo se v osmém týdnu. Naopak nepodstatné změny v množství mRNA kódující řetězce lamininu  $\beta$ 1 a  $\beta$ 2, což se stanovilo northernovými přenosy celkové RNA, se pozorovaly v libovolném bodě postupu renálního onemocnění.

Aby se testovalo, zda mRNA kódující TGF- $\beta$ 1 nebo různé komponenty bazální membrány se indukovaly v určitém typu glomerulárních buněk, provedla se hybridizace *in situ* za použití antisense sond specifických pro mRNA značených digoxigeninem. Ledviny se získaly z deseti dnů starých Alportových myší F2 a z normálních kontrolních mláďat po perfúzi s 4% paraformaldehydem v PBS a zpracovaly se *in situ* hybridizací, jak se popisuje v části týkající se metod. Antisense sondy jsou specifické pro oblast kolagenu  $\alpha$ 1(IV), TGF- $\beta$ 1, fibronektinu, entaktinu nebo řetězce lamininu  $\beta$ 1. Sonda specifická pro bakteriální  $\beta$ -galaktozidázu se použila jako kontrola pro nespecifické navázání (negativní kontrola) a tato sonda nehybridizuje s celkovou RNA z ledvin myši na northernových blotech (data nejsou uvedena). Kontrolní sonda se hybridizovala ve stejnou dobu jako každá specifická sonda a ošetřila se stejnou koncentrací RNázy A, pak následuje hybridizace. Ošetření RNázou se provedlo při koncentraci 0, 25  $\mu$ g/ml v případě  $\alpha$ 1(IV), TGF- $\beta$ 1 a fibronektinu, a v koncentraci 3  $\mu$ g/ml v případě entaktinu a lamininu  $\beta$ 1. Tyto výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 6.

Výsledky zobrazené na obrázku č. 6 ukazují, že v případě všech specifických testovaných mRNA se pozorovalo zvýšení množství viscerálních epiteliálních buněk (podocytů) glomerulů u myši s jedinou mutací COL4A3 (Alportova myš). V případě

řetězce kolagenu  $\alpha 1(IV)$  se exprese mRNA u kontroly pozorovala u obou druhů mesangiálních buněk a endoteliálních buněk glomerulů (zobrazeno na obrázku č. 6), které jsou konzistentní s místem, kde se tato molekula lokalizuje v normálním přirozeném zvířeti. V mutantu se může zvýšit exprese mesangiální matrice, což dokazuje daleko tmavší zbarvení ve srovnání se zbarvením mesangiálních buněk v kontrolním vzorku. Avšak nejjasnější rozdíl mezi kontrolou a mutantem je kruh obarvených buněk lemující vnější hranici glomerulu, což odpovídá podocyům (obrázek č. 6B). Expese fibronektinu v kontrolním glomerulu se pozoruje primárně v mesangiálních buňkách (obrázek č. 6D). Zatímco u mutantu se pozorovalo obarvení mesangiálních buněk, podocyty jasně exprimují podstatné množství mRNA fibronektinu (zobrazeno na obrázku č. 6). Expese TGF- $\beta 1$  je v glomerulách kontrolních zvířat velmi slabá avšak některé specifické obarvení se pozorovalo v mesangiálních buňkách kontrolních zvířat (zobrazeno na obrázku č. 6G). U mutantu množství mRNA TGF- $\beta 1$  se podstatně zvýšilo v mesangiálních buňkách, v endoteliálních buňkách a v podocytech (obrázek č. 6H). V případě entaktinu se mRNA lokalizovala v podocytech kontrolních zvířat, což se neočekávalo, protože tento protein se lokalizuje specificky v GBM. Také se neočekávalo, že se u kontrolních zvířat pozorovalo obarvení specifické pro mesangiální buňky. Zatímco obarvení ve viscerálních epiteliálních buňkách u mutantu se zdá indikací zvýšeného exprese, nejde o kvantitativní test a rozdíl mezi kontrolním a mutantním zvířetem je příliš malý, aby byl definitivní (porovnává se obrázek č. 6J a 6K).

Northernovy bloty ukázaly, že množství mRNA v případě řetězce lamininu se nezměnilo u kontrolního ani v případě mutantního zvířete po celou dobu onemocnění. Hybridizace *in situ* této stejné mRNA ilustrovala očekávanou lokalizaci specifickou pro mesangiální buňky v glomerulách v případě

kontrolních ledvin (zobrazeno na obrázku č. 6M). V glomerulách pocházejících z mutantní myši se mRNA jasně indukuje ve viscelárních epiteliálních buňkách (obrázek č. 6a).

Vzorky tkání se získaly ve věku myši 3 a 5 týdnů a analyzovaly se hybridizací *in situ* za použití stejných sond. Patern barvení glomerulů není možné rozlišit od paternu zjištěného u normálních mláďat (data nejsou uvedena). To naznačuje, že k aktivaci těchto genů v podocytech dochází po vzniku proteinurie.

Data získaná o proteinu  $\beta 1$  založená na detekci imunoperoxidázou za použití protilátek specifických pro aktivní izoformu cytokinu potvrzují data získaná hybridizací *in situ* v případě mRNA TGF- $\beta 1$  (porovnává se imunologické barvení obrázku č. 7B s obrázkem č. 7A). To ukazuje, že zvýšená exprese mRNA TGF- $\beta 1$  v podocytech se převádí na zvýšené množství proteinu.

Analýza RNázové ochrany se provedla za účelem stanovit, zda se také zvýší množství mRNA v případě cytokinů v lidském renálním kortexu získaném z Alportových pacientů ve srovnání s kontrolními pacienty. Lidský Alportův renální kortex se získal během transplantace od 15-ti letého chlapce. Ve vzorku se zjistila mírné množství skarifikace, přičemž přibližně 50 % ledvinných klubiček je fibrotických. Vzorek s bezprostředně po vyjmutí zamrazil v kapalném dusíku. RNA normálních lidských ledvin se získal od firmy Clontech (Palo Alto, CA) a uvedená RNA se spojila se vzorkem ze sbírky normálních lidských zdrojů. RNA z Alportových pacientů se izolovala za použití stejného postupu, jako tomu bylo u myších ledvin. U RNA se testovala integrita frakcionací 10 mikrogramů na agarózovém gelu a následným barvením gelu ethidiumbromidem (10 mikrogramů v jednom mililitru vody). Normální a Alportovy vzorky zůstaly nepoškozeny, což vyplývá z pruhů podjednotek ribozomální RNA

28S a 18S. RNázový ochranný experiment se provedl podle popsaných metod. Data zobrazená na obrázku č. 8 ilustrují 3 až 4 násobné zvýšení mRNA TGF- $\beta$ 1 v lidském Alportově renálním kortexu ve srovnání s kontrolou. To dokazuje, že cytokin se také nadměrně exprimuje v lidských Alportových ledvinách. Data splňují očekávání, že tato technologie funguje i u člověka.

#### Příklad 5: Použití neutralizačních protilátek při blokování integrinu $\alpha$ 1 $\beta$ 1

Tento příklad popisuje, že rozpustné činidlo schopné blokovat interakci integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 se svým ligandem bude produkovat stejné účinky při patogenezi Alportova renálního onemocnění, jako mutaci genu  $\alpha$ 1, přičemž se získaly protilátky popsané v publikaci Fabbri et al., Tissue Antigens, 48: 47-51, 1996. Tyto protilátky se zavedly injekcí (400 ng v jedné injekci, třikrát týdně, intraperitoneálně) do Alportovy myši, přičemž se začalo ve věku myši dva týdny. Zvířata se začala hromadit ve věku šesti týdnů a bazální membrány se analyzovaly transmisí elektronovou mikroskopií. Jak je jasné z obrázku č. 10, bazální membrány u těchto ošetřených zvířat se regulovaly, přičemž vykazují normální trilaminární vzhled. Pozorovalo se bobtnání endoteliálních buněk, což je způsobeno imunitní odpovědí na protilátky. Tyto výsledky ukazují, že rozpustné činidlo, které blokuje receptor integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 zpomaluje postup Alportova GBM onemocnění prakticky stejným způsobem, jak se pozorovalo u myši linie s dvojitou mutací.

#### Příklad 6: Účinky inhibice samotného TGF- $\beta$ 1 v Alportově myším modelu (129 Sv/J)

Podle experimentálního protokolu se injekcí zavedl FK506 (2  $\mu$ g/g tělesné hmotnosti, intraperitoneální injekcí, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan) nebo rozpustný

receptor TGF- $\beta$ 1 (25  $\mu$ g v jedné injekci, intravenózně do ocasní žíly, Bogen Inc., Cambridge, MA) dvakrát týdně, přičemž se začalo ve věku 3 týdnů. Ledviny se vyňaly ve věku sedmi týdnů a provedly se popsané analýzy.

Analýza ultrastruktury bazální membrány provedená transmisní elektronovou mikroskopií je zobrazena na obrázku č. 11. Obrázek č. 11A ukazuje glomerulární kapilární kličky, které pochází z normálního neošetřeného zvířete. Zaznamenal se regulární odchod vody a obarvení trilaminární bazální membrány. Na obrázku 11B je zobrazena kapilární klička z typické 7 dní staré Alportovy myši 129 Sv/J. Dochází k retenci vody a makroskopickému ztluštění GBM. Na obrázku č. 11C je zobrazena typická kapilární klička pocházející ze sedmi dní starého Alportova zvířete ošetřeného pomocí FK506. Nedochozí ke ztluštění bazální membrány, což naznačuje že léky redukuje rychlost akumulace matrice v GBM. Dochází však k podstatnému stupni retence vody, přičemž se podstatně mění architektura tlapy. Stejně skutečnosti se pozorovaly u myši, kterým se zavedl injekcí rozpustný receptor TGF- $\beta$ 1 (Obrázek č. 11D). Tyto data ilustrují, že inhibitory TGF- $\beta$ 1 mohou bránit deregulaci tloušťky GBM, nemohou zabránit změnám v architektuře tlapy spojenou s pokročilým stádiem Alportovým GBM onemocněním.

Některé se vzorků ledvin se zpracovaly řádkovací elektronovou mikroskopií. Glomeruli se vystavily prasknutí renálního kortexu mrznutím, přičemž se odstraní Bowmanova kapsule a odhalí se vnější membrána podocytů, které kryjou kapilární kličky glomerulu. Normální glomerulus je zobrazen na obrázku č. 12A, kde komplexní architektura podocytů velmi evidentní, jako větvicí proces okolo kapilárních kliček. U sedmi týdnů starých Alportových myši povrch podocytů v glomerulách neobsahuje vláknité větvení, které se odstranilo

otokem (zobrazeno na obrázku č. 12). V případě Alportova zvířete ošetřeného buď FK506 nebo rozpustným receptorem TGF- $\beta$ 1, povrch glomerulů vypadá podobně jako v případě neošetřených Alportových myší (zobrazeno na obrázku č. 12C). Tento obrázek jasně demonstruje, že blokování samotného TGF- $\beta$ 1 nezabrání změnám v architektuře tlapek spojených s pokročilým stádiem Alportova glomerulárního onemocnění.

Proteinuria se měřila elektroforézou na polyakrylamidovém gelu lyofilizovanou močí sebranou jednou týdně během průběhu ošetření léky. Jak zmiňuje shora v textu přítomnost a přebytek albuminu v moči poskytuje celkový odhad integrity glomerulárního filtru. Obrázek č. 13 ilustruje, že zatímco aplikace inhibitorů TGF- $\beta$ 1 oddaluje vznik proteinurie, dochází velmi rychle ke zvýšení množství albuminu v moči (jeden týden). Tyto výsledky ukazují, že inhibitory TGF- $\beta$ 1, když se použijí samotný, nezlepší glomerulární filtraci ačkoli se oddálí vznik proteinurie. Je pravděpodobné, že tyto vlastnosti souvisí s neschopností těchto inhibitorů předcházet retenci vody v podocytech, což se popisuje shora v textu a je to zobrazeno na obrázcích č. 11 a 12.

Mělo by se poznamenat, že aplikace léku normálním mláďatům vedla k nerozlišitelným rozdílům, když se porovnájí s normálními myšima, kterým se injekce neaplikovala.

Příklad 7: Účinky inhibitorů TGF- $\beta$ 1 na myši s dvojitou mutací (DKO)

Myším (myši DKO vykazují nulovou mutaci jak genu  $\alpha$ 3(IV) tak genu integrinu  $\alpha$ 1) se injekcí zavedli inhibitory TGF- $\beta$ 1 FK506 (2  $\mu$ g/g tělesné hmotnosti, dvakrát týdně, intraperitoneální injekcí) nebo Biogenův TGF- $\beta$ 1 rozpustný receptor (25 mikrogramů v jedné injekci, dvakrát týdně,

intravenózní injekcí), přičemž injekce se začaly aplikovat ve čtyřech týdnech věku. Ve věku deseti týdnů se ledviny odebraly a podrobily se analýze. Věk deseti týdnů se vybral proto, že v případě dvojitých mutantů onemocnění v typickém případě postupuje do bodu, kdy se podstatně mění tloušťka GBM a zvířata začínají postupovat ke konečnému stádiu selhání ledvin. V případě, že inhibitory TGF- $\beta$ 1 poskytují další ochranu, tato ochrana by měla být znatelná v tomto stádiu postupu onemocnění GBM. Analýza transmisí elektronovou mikroskopií ukazuje velmi jasné a konzistentní rozdíly mezi myši, které se aplikuje injekcí inhibitor a neošetřenou myši s dvojitou mutací. Typický příklad těchto rozdílů se ilustruje na obrázku č. 14. Na obrázku č. 14 je zobrazen typický profil glomerulárních kapilárních kliček u myši s dvojitou mutací ve stáří deseti týdnů. Na bazální membráně se tvoří podstatné kapsy, které charakterizují postup Alportovy glomerulonefritidy. Retence vody u podocytů je regulární a závisí na štěrbinových clonách dokonce i v pokročilém stavu onemocnění. Tuto charakteristiku myši s dvojitou mutací nesdílí Alportovy myši (porovnává se retence vody s tím, co je zobrazeno na obrázku č. 12B).

Když se ošetřila myš s dvojitou mutací inhibitory TGF- $\beta$ , došlo k velké redukci fokální tloušťky GBM a retenci vody (obrázek č. 14 C zobrazuje aplikaci FK506 a obrázek č. 14 D zobrazuje aplikaci rozpustného receptoru TGF- $\beta$ 1). Zatímco GBM většiny glomerulů nevykazuje zcela normální strukturu u zvířat s dvojitou mutací v tomto stádiu onemocnění zcela chybí výskyt podstatné kapsy ve většině glomerulárních kapilárních kliček (jak je zobrazeno na obrázku č. 14B). U přibližně 25 % testovaných glomerul inhibitory TGF- $\beta$ 1 obnovují glomerulární ultrastrukturu až do stupně, kde glomeruli DKO nelze rozlišit od glomerulí normálních myši (na obrázku č. 15 A je zobrazena GBM deset týdnů staré normální myši, na obrázku č. 15B

zobrazuje GBM desetitýdnů staré myši s dvojitou mutací ošetřené FK506). Když uvažuje, že tento věk odpovídá věku o dva týdny delšímu než je průměrný věk konečného selhání ledvin u Alportového zvířecího modelu, kde se neaplikoval lék. Je to jedinečné a překvapující zjištění.

U těchto stejných myši, které se shromáždily během ošetření se testovala proteinurie. Vzorek (ekvivalent přibližně jedné polovině mikrolitru) se analyzoval elektorforézou na polyakrylamidovém gelu. Albumin se vizualizoval obarvením Koomassieovou modří. Výsledky zobrazené na obrázku č. 16 ilustrují, že aplikace FK506 (obrázek č. 16D) nebo rozpustného receptoru TGF- $\beta$ 1 (obrázek č. 16B) znatelně zlepšily glomerulární filtraci, což se porovnává s myšima s dvojitou mutací (obrázek č. 16A). Na obrázku č. 16C je urinární protein normální myši ošetřené FK506. Je nutné poznamenat difúzní skupinu pruhů, které jsou evidentní v časovém bodě u normální myši a myši DKO (obrázek č. 16D) ošetřených FK506. To je možné také pozorovat u myši ošetřených lékem a pravděpodobně je to spojeno s účinky zmiňovaných u některého pacienta ošetřeného lékem po transplantaci (popisuje se v publikaci Solez et al., Transplantation, 66: 1736-1740, 1998).

Příklad 8: Mechanismus synergických účinků blokačních činidel integrinu  $\alpha$ 1 a inhibitorů TGF- $\beta$ 1 při zpomalení vzniku a postupu Alportovy glomerulonefritity

Data uvedená na obrázku č. 11, 12 a 14 společně naznačují, že význam blokačních činidel integrinu  $\alpha$ 1 je synergický s blokačními činidly TGF- $\beta$ 1. Inhibice integrinu  $\alpha$ 1 vede ke zlepšení architektury podocytů při retenci vody, zatímco v případě inhibice TGF- $\beta$ 1 dochází k redukci ukládání matric v GBM. Na obrázku č. 17 je zobrazena další úloha blokačních

činidel integrinu  $\alpha 1$  při zlepšení architektury podocytů. Renální kortex se připravil stejným způsobem jako ten zobrazený na obrázku č. 12. Obrázek č. 17 A ilustruje povrch glomerulu získaného ze sedmi týdnů starých myši. Na obrázku č. 17 je zobrazen glomerulus ze sedmi týdnů staré Alportovy myši. Dochází ke ztrátě architektury podocytů, což je způsobeno účinností procesu retence vody. Na obrázku č. 17 je zobrazen povrch glomerulu ze sedmi týdnů starých myši s dvojitou mutací. Dochází skoro k celkovému obnovení normální architektury podocytů. Tyto data jsou konzistentní s pohledem příčného řezu transmisní elektronovou mikroskopií zobrazeného na obrázku č. 14B, kde procesy probíhající v nohách vykazují excelentní morfologii u myši s dvojitou mutací.

#### Příklad 9: Blokační účinek integrinu $\alpha 1$

Při testování přijatelného mechanismu tohoto jevu se hodnotil řetězec lamininu. Protože je známo, že primární laminin nalezený v glomerulární bazální membráně je laminin 11 (popisuje se v publikaci Miner et al., J. Cell. Biol., 137: 65-701, 1997), věří se, že výskyt nového lamininu v Alportově GBM může souviset s uvolněním podocytů z GBM. Po testování složení lamininu Alportovy GBM se zjistilo, že v normálním případě se řetězec lamininu  $\alpha 2$  nachází u normálních myši pouze v mesangiální matrici a nachází se u Alportovy myši v GBM. Na obrázku č. 18 je zobrazena série panelů glomerul imunologicky barvených pomocí duálního fluorescenčního protokolu.

Při duální fluorescenční analýze se čerstvý renální kortex ponořil do vodného roztoku sloučeniny Tissue Tek, rychle se zmrazil a neřezal se na sekce o tloušťce 4 mikróny v kryostatu. Plátky se zafixovaly v chladu (při teplotě  $-20^{\circ}\text{C}$ ) 100 % acetonem po dobu deseti minut a pak se sušily celou noc na vzduchu. Tkáň se opětne hydratovala třemi promytími

v PBS po dobu 10 minut. Primární protilátky se ředily v 7 % netučném sušeném mléce (BioRad). Protilátky proti entaktinu (Chemicon Inc.) se použily jako známý marker pro glomerulární bazální membránu v ředění 1:200. Protilátky specifické pro řetězec lamininu  $\alpha 2$  je dárek od Dr. Petera Yurchenco (popisuje se v publikaci Robert Wood Johnson Medical School, Piscataway, NJ). Specifita těchto protilátek v případě řetězce lamininu  $\alpha 2$  se ilustrovala v publikaci Cheng et al., J. Biol. Chem., 272: 31525-31532, 1997. Protilátky se použily v koncentraci 1:10. primární protilátky se nechaly reagovat přes noc při teplotě 4 °C ve vlhkém prostředí. Plátky se promyly třikrát po dobu 10 minut v chladném PBS, pak se nechaly reagovat se sekundárními protilátkami, které se také přidaly dohromady. Sekundární protilátky byly anti-králičí protilátky pro laminin  $\alpha 2$  spojené s texaskou červení a anti-kryší protilátky proti entaktinu spojené s FITC. Obě protilátky se použily v ředění 1:100 (Vektor Laboratories, Burlingame, CA). Sekundární činidla se nechaly reagovat po dobu 4 hodin při teplotě 4 °C. Sklíčka se promyla třikrát po dobu deseti minut PBS a přidala se kapka „Vectashield anti-fade mounting media“ 100 (Vektor Laboratories, Burlingame, CA), které se aplikovalo před zatavením na skleněné krycí sklíčko. Zobrazení v případě každých protilátek zaznamenalo pomocí epifluorescenčního mikroskopu BH-2 propojeným se systémem analýzy obrazu Cytovision Ultra (Applied Imaging, Inc.).

Specifický antigen glomerulární bazální membrány (entaktin) je zelený, zatímco řetězec lamininu  $\alpha 2$  je červený. V místech, kde se nachází jak laminin  $\alpha 2$  tak entaktin je žluté zbarvení. Na obrázku č. 18 skupina I panel A reprezentuje imunologické barvení glomerulu získaného ze sedmi týdnů starých normálních myší. Laminin  $\alpha 2$  se nachází pouze v mesangiální matrici. Panel B ilustruje barvení u sedmi týdnů starých Alportových mláďat. Šipkou se označila skutečnost, že

v případě Alportovy myši laminin  $\alpha 2$  se nachází jak v mesangiální matrici tak v glomerulární bazální membráně, což naznačuje, že zbarvení kapilární kličky je převážně žluté. Panel C ukazuje imunologické barvení glomerul získaných z Alportovy myši 129Sv/J ošetřené FK506 (kortex se odebral ze zvířat užívaných v experimentech popsaných shora v textu a prezentovaných na obrázku č. 11, 12 a 13). Většina glomerulárních kapilárních kliček je žlutých, což indikuje, že inhibice TGF- $\beta 1$  nebrání akumulaci lamininu  $\alpha 2$  v GBM Alportovy myši. U myši sedm týdnů staré neexistuje v glomerulárních kapilárních kličkách žádný imunologicky obarvený laminin  $\alpha 2$  (znázorněno na panelu D šipkou). Převažující integrinový receptor na povrchu podocytů je integrin  $\alpha 3\beta 1$  (popisuje se v publikaci Patey et al., Cell Adhesion and Communication, 2: 159-167, 1994). Věří se, že tento integrin má důležitou úlohu při zachycení podocytů na GBM a udržení normální retence vody (popisuje se v publikaci Smoyer and Mundel, J. Mol. Med., 76: 172-183, 1998). Jako příklad se ukázalo, že vyloučením genu integrinu  $\alpha 3$  vede k celkové likvidaci architektury podocytů (popisuje se v publikaci Kreidberg et al., Development, 122: 3537-3547, 1996). V současné době se produkují rozpustné receptory integrinu  $\alpha 3\beta 1$  a vykazují schopnost vázat se s vysokou afinitou na řetězec lamininu  $\alpha 5$ , který obsahuje lamininy (podobný lamininu 11, který je heterotrimér obsahující řetězce  $\alpha 5$ ,  $\beta 2$  a  $\gamma 1$ ), ale nikoli afinitou vůči řetězci  $\alpha 2$ , který obsahuje lamininy (popisuje se v publikaci Eble et al., Biochemistry, 37: 10945-10955, 1998). Spolu s touto informací data ukazují v modelu Alportovy myši postupující ukládání lamininu  $\alpha 2$  v GBM vede k redukované adhezi prostřednictvím receptorů integrinu  $\alpha 3\beta 1$ , což vede k zesílení procesu retence vody. Blokování řetězce integrinu  $\alpha 1$  vede k redukovanému ukládání řetězců lamininu  $\alpha 2$  v GBM nebo

k jeho úplnému zrušení, což předchází ztrátě normální architektury.

Dále se hodnotila distribuce řetězce lamininu  $\alpha 2$  u Alportových myši Sv/J dva týdny starých, což se porovnávalo s distribucí u normálních myši. V tomto velmi ranném stádiu postupu onemocnění GBM, existují zmíněné kapsy GBM, které se nacházejí na polovině glomerulí. Jedna taková kapsa GBM je zobrazena na obrázku č. 19B. V tomto stádiu vývoje jsou GBM a procesy podocytů v neovlivněných oblastech glomerul morfologicky normální avšak v oblasti fokálního ztlustění dochází k retenci vody a dochází ke změnám, které je možné spatřit v pozdějším stádiu vývoje onemocnění GBM. Ukázalo se, že jestliže ukládání lamininu  $\alpha 2$  vede ke ztrátě fokálního adhezivního kontaktu s podocyty, je možné spatřit fokální ukládání lamininu  $\alpha 2$  v GBM dva týdny starých Alportových myši. Tento příklad je zobrazený na obrázku č. 18 skupina II. Šipky na panelu B ukazují fokální ukládání lamininu  $\alpha 2$  v GBM u Alportovy myši ve stáří dva týdny. To je nejčasnější molekulová změna (která se liší od změny složení kolagenu typu IV, která vzniká na základě genetické mutace) detekovaná v modelu Alportovy myši a odpovídá skutečně vzniku detekovatelného poškození GBM.

Příklad 10: Synergický účinek inhibitorů TGF- $\beta 1$  s blokačními činidly integrinu  $\alpha 1$ .

Jak je zobrazeno na obrázku č. 3 matrice, která se akumuluje v GBM a interstitiu jako funkce patogeneze Alportova renálního onemocnění zahrnuje řetězce kolagenu  $\alpha 1(IV)$  a  $\alpha 2(IV)$ , fibronektin a entaktin. Jak se ilustruje na obrázku č. 20 (první dvě dráhy každého gelu) v Alportově ledvině se indukuje mRNA kódující každý protein, což se porovnává s normálními kontrolními ledvinami. Injekce

inhibitorů TGF- $\beta$ 1 redukuje stupeň indukce (zobrazeno na obrázku č. 20 v posledních dvou drahách gelu). K tomu může dojít následkem redukce ztluštění bazální membrány pozorované u Alportovy myši Sv/J ošetřené inhibitory TGF- $\beta$ 1 (ilustruje se na obrázku č. 11).

Tato podobná sada northernových blotů se uskutečnila za použití RNA získané z ledvin myši s dvojitou mutací, které se buď neošetřovaly a nebo se jim injekcí aplikoval inhibitor TGF- $\beta$ 1. Byly to stejné myši, jako se používaly při získávání data prezentovaných na obrázku č. 14. Protokol zavádění léku injekcí se popisuje v příkladu 7. Z dat uvedených na obrázku č. 21 je evidentní, že aplikace inhibitorů TGF- $\beta$ 1 podstatně nemění množství mRNA kódující matricové proteiny, což se porovnává s kontrolou, které se injekce neaplikovaly, verzus s myši s dvojitou mutací. Když se k sondám přidá inhibitor Timp-3, dochází však ke znatelnému účinku na expresi mRNA kódující metaloproteinázu (obrázek č. 21). Jak je zřejmé z dráhy 1 a 2, dochází ke znatelné redukci exprese Timp-3 v ledvinách deseti týdenních neošetřených myši s dvojitou mutací ve srovnání s kontrolní myši (rozdíl je devítinásobný a je založený na analýze zobrazení fosforu). Tato redukce při expresi Timp-3 se pozorovala u myši s dvojitou mutací, kterým se injekcí zavedl buď FK506 (dráhy 3 a 4) nebo rozpustný receptor TGF- $\beta$ 1 (dráhy 5 a 6). Tento stejný účinek na expresi Timp-3 byl pozorován u myši Sv/J (obrázek č. 20, spodní řada), který ukazuje, že schopnost inhibovat supresi mRNA Timp-3 u Alportovy myši je výsledkem působení inhibitorů TGF- $\beta$ 1 spíše než výsledkem duální inhibice integrinu  $\alpha$  TGF- $\beta$ 1.

Funkční důležitost tohoto pozorování je založena na skutečnosti, že Timp-3 je modulátorem matrixových metaloproteináz a naznačuje se, že je klíčovým hráčem při homeostáze renální bazální membrány a při eliminaci homeostázi

při onemocnění (popisuje se v publikaci Esposito et al., *Kidney Int.*, 50: 506-514, 1996 a Elliot et al., *J. Am. Soc. Nephrol.*, 10: 62-68, 1999). Redukce exprese inhibitoru metaloproteinázy Timp-3 vede k odpovídajícímu zvýšení metaloproteinázové aktivity. Takové zvýšení může způsobit poškození bazální membrány, což vede k aktivaci TGF- $\beta$ 1 doprovázenou akumulací matrice. Při porušení tohoto cyklu dojde k opětovnému vzniku homeostázi bazální membrány, která by se měla projevit opětovným navození morfologie GBM, což odpovídá tomu, co bylo pozorováno (zobrazeno na obrázcích č. 11, 14 a 15).

Příklad 11: Inhibice interstinální fibrózy u myši s dvojitou mutací ošetřených inhibitory TGF- $\beta$ 1

Stanovila se úloha TGF- $\beta$ 1 při pozitivní regulaci matricových proteinů a při renální fibróze (popisuje se v publikaci Yand et al., *J. Am., Soc., Nephrol.*, 5: 1610-1617, 1994; Border and Ruoslahti, *J. Clin. Invest.*, 90: 1-7, 1992). V případě myši s dvojitou mutací se oddálila renální interstinální fibróza, ale v desetitýdnech věku se stává široce rozšířenou a postupuje do konečného stádia selhání ledvin ve věku přibližně 15 týdnů. Zvířata, kterým se aplikovaly inhibitory TGF- $\beta$ 1 se analyzovaly za použití tří markerů, které značí interstinální fibrózu a výsledky se porovnávaly s desetitýdenními zvířaty s dvojitou mutací, které se neošetřily inhibitory. Zvířatům se aplikovaly injekce podle stejného protokolu jako se používaly při vzniku obrázku č. 14 v příkladu 7. V případě obrázků 22, 23 a 24 slouží panel A jako kontrola. Panel B na stejném obrázku znázorňuje dvojitého mutanta a panel C je dvojitý mutant ošetřený s FK506 a panel D znázorňuje dvojitého mutanta ošetřeného rozpustným receptorem TGF- $\beta$ . Všechny tyto obrázky reprezentují 50-ti násobné zvětšení renálního kortexu. Na obrázku č. 22 je znázorněno Jonesovo

barvení metenaminem stříbra, což je standardní histochemické barvení matrice. Je evidentní, že matrice se akumuluje v interstitiu renálního kortexu v neošetřených myších (porovnává se panel B a A). Renální kortex pocházející ze zvířat ošetřených buď inhibitorem TGF- $\beta$ 1 není však možné odlišit od kontrol, které indukují malou nebo žádnou fibrózu. Běžně používané molekulární markery v případě renální intersticiální fibrózy zahrnují kolagen typu I a fibronektin (popisuje se v publikaci Yamamoto et al., *Kidney Int.*, 45: 916-927, 1994). Obrázek č. 23 znázorňuje imunologické barvení kolagenu typu I. Je jasné, že kolagen typu I se akumuluje v interstitiu renálního kortexu neošetřených zvířat (porovnává se panel B s kontrolním panelem A). Na obrázku č. 23 panelech B a C se zobrazuje relativní absence akumulace kolagenu typu I v ledvinách z myši s dvojitou mutací ošetřenou s FK506 nebo s rozpustným receptorem. Stejný scénář se použil v případě fibronektinu, který se v kortexu neošetřených dvojitých mutantů (obrázek č. 24) vyskytuje v nadbytku a většiny kontrol v renálním kortexu myši, kterým se aplikovala injekce inhibitorů TGF- $\beta$ 1 (obrázek č. 24 panely C a D). Tato data indikují, že inhibitory TGF- $\beta$ 1 v kombinaci s blokačním činidlem integrinu alfa 1 předchází (nebo oddalují) intersticiální fibrózu v modelu Alportovy myši.

## P A T E N T O V É   N Á R O K Y

1. Použití inhibitoru receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení poruchy ledvin.
2. Použití inhibitoru receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení glomerulonefritidy, fibrose ledvin nebo obou těchto chorob.
3. Použití inhibitoru receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení glomerulonefritidy ledvin nebo fibrose ledvin, spojené s Alportovým syndromem, IDDM nefritidou, mesangiální proliferativní glomerulonefritidou, membránoproliferativní glomerulonefritidou, krescentickou glomerulonefritidou, diabetickou nefropatií nebo intersticiální fibrózou ledvin.
4. Použití inhibitoru receptoru itegrinu  $\alpha 1\beta 1$ , který je blokujícím činidlem, který se váže na vazné místo pro receptor integrinu  $\alpha 1\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení poruch ledvin.
5. Použití látky, která blokuje vazné místo receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk pro výrobu farmaceutického prostředku pro oddálení nástupu a/nebo pro zpomalení progresu alportova syndromu nebo ledvinového onemocnění u diabetiků, závislých na inzulinu.

6. Použití látky, která blokuje vazné místo receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk, přičemž tato látka má povahu peptidu, neutralizující protilátky nebo proteolytického fragmentu, pro výrobu farmaceutického prostředku pro oddálení nástupu a/nebo pro zpomalení progresu alportova syndromu nebo ledvinového onemocnění u diabetiků, závislých na inzulinu.
7. Použití látky, která blokuje vazné místo receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  na povrchu ledvinových buněk, přičemž tato látka má povahu proteínu ze skupiny laminin, fibronectin, entactin a kolagen typu 4 pro výrobu farmaceutického prostředku pro oddálení nástupu a/nebo pro zpomalení progresu alportova syndromu nebo ledvinového onemocnění u diabetiků, závislých na inzulinu.
8. Použití podle některého z nároků 1 až 7, při němž farmaceutický prostředek rovněž obsahuje inhibitor TGF- $\beta 1$ .
9. Použití podle nároku 8, při němž se inhibitor receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  a inhibitor TGF- $\beta 1$  podává současně nebo následně.
10. Použití podle nároku 8 nebo 9, při němž se inhibitor TGF- $\beta 1$  ireverzibilně váže na TGF- $\beta 1$  a inhibuje schopnost této látky vázat se na receptor.
11. Použití podle nároku 8 nebo 9, při němž inhibitorem TGF- $\beta 1$  je látka, která inhibuje schopnost TGF- $\beta 1$  převádět signály k jádru ledvinové buňky.

12. Použití podle nároku 11, při němž inhibitorem TGF- $\beta$ 1 je inhibitor kalcineurinu.
13. Použití látky, schopné vyvolat inhibici převodu signálu přes receptor integrinu  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 ledvinové buňky pro výrobu farmaceutického prostředku pro zpoždění nástupu a/nebo zpomalení progresu Alportova syndromu nebo ledvinového onemocnění u diabetiků, závislých na inzulinu.
14. Použití látky, snižující účinnost TGF- $\beta$ 1 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení fibrózy ledvin, přičemž tento prostředek je určen k podávání nemocným v době inhibice receptorů pro integrin  $\alpha$ 1 $\beta$ 1 na ledvinových buňkách nemocného.
15. Použití podle nároku 14, při němž se uvedená látka ireverzibilně váže na TGF- $\beta$ 1 a inhibuje schopnost této látky vázat se na její receptor nebo vyvolává inhibici schopnosti TGF- $\beta$ 1 převádět signály na jádro ledvinové buňky.
16. Použití inhibitoru kalcineurinu pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení fibrózy ledvin.
17. Použití podle nároku 12 nebo 16, při němž je inhibitorem kalcineurinu tacrolimus.
18. Použití látky, snižující účinnost TGF- $\beta$ 1 pro výrobu farmaceutického prostředku pro omezení hromadění matrice

na glomerulární bazální membráně GBM nemocného s Alportovým syndromem.

19. Myší model, vhodný pro onemocnění ledvin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o myš, která neexprimuje v glomerulární bazální membráně normální složení kolagenu typu 4 a současně neexprimuje receptor integrinu  $\alpha 1\beta 1$ .
20. Myší model podle nároku 30, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jde o myš, která nezačleňuje do glomerulární bazální membrány řetězce kolagenu  $\alpha 3(\text{IV})$ ,  $\alpha 4(\text{IV})$  a  $\alpha 5(\text{IV})$ .
21. Způsob testování činidla, vhodného pro použití k léčení poruch ledvin, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se zkoumaná látka podává myším podle nároku 19 nebo 20.
22. Farmaceutický prostředek, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako svou účinnou složku obsahuje inhibitor receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  a inhibitor TGF- $\beta 1$ .
23. Farmaceutický prostředek podle nároku 22, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako inhibitor receptoru integrinu  $\alpha 1\beta 1$  obsahuje látku, která se váže na vazné místo pro receptor integrinu  $\alpha 1\beta 1$  na povrchu ledvinové buňky.
24. Farmaceutický prostředek podle nároku 23,

v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako inhibitor receptoru integrinu  $\alpha\beta 1$  obsahuje peptid, neutralizující protilátku nebo proteolitický fragment.

25. Farmaceutický prostředek podle nároku 24, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako peptid obsahuje 9-mer proteinu ze skupiny laminin, fibronectin, actin a kolagen typu 4.

26. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 22 až 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že se inhibitor TGF- $\beta 1$  ireverzibilně váže na TGF- $\beta 1$  a inhibuje schopnost této látky vázat se na její receptor.

27. Farmaceutický prostředek podle některého z nároků 22 až 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako inhibitor TGF- $\beta 1$  obsahuje látku, která inhibuje schopnost TGF- $\beta 1$  převádět signály na jádro ledvinové buňky.

28. Farmaceutický prostředek podle nároku 27, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako inhibitor TGF- $\beta 1$  obsahuje inhibitor kalcineurinu.

29. Farmaceutický prostředek podle nároku 28, v y z n a č u j í c í s e t í m, že jako inhibitor kalcineurinu obsahuje tacrolimus.

Zastupuje:

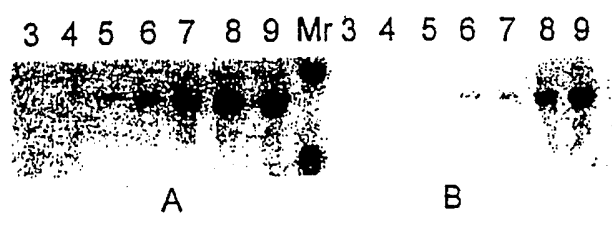


Fig. 1

Fig. 2



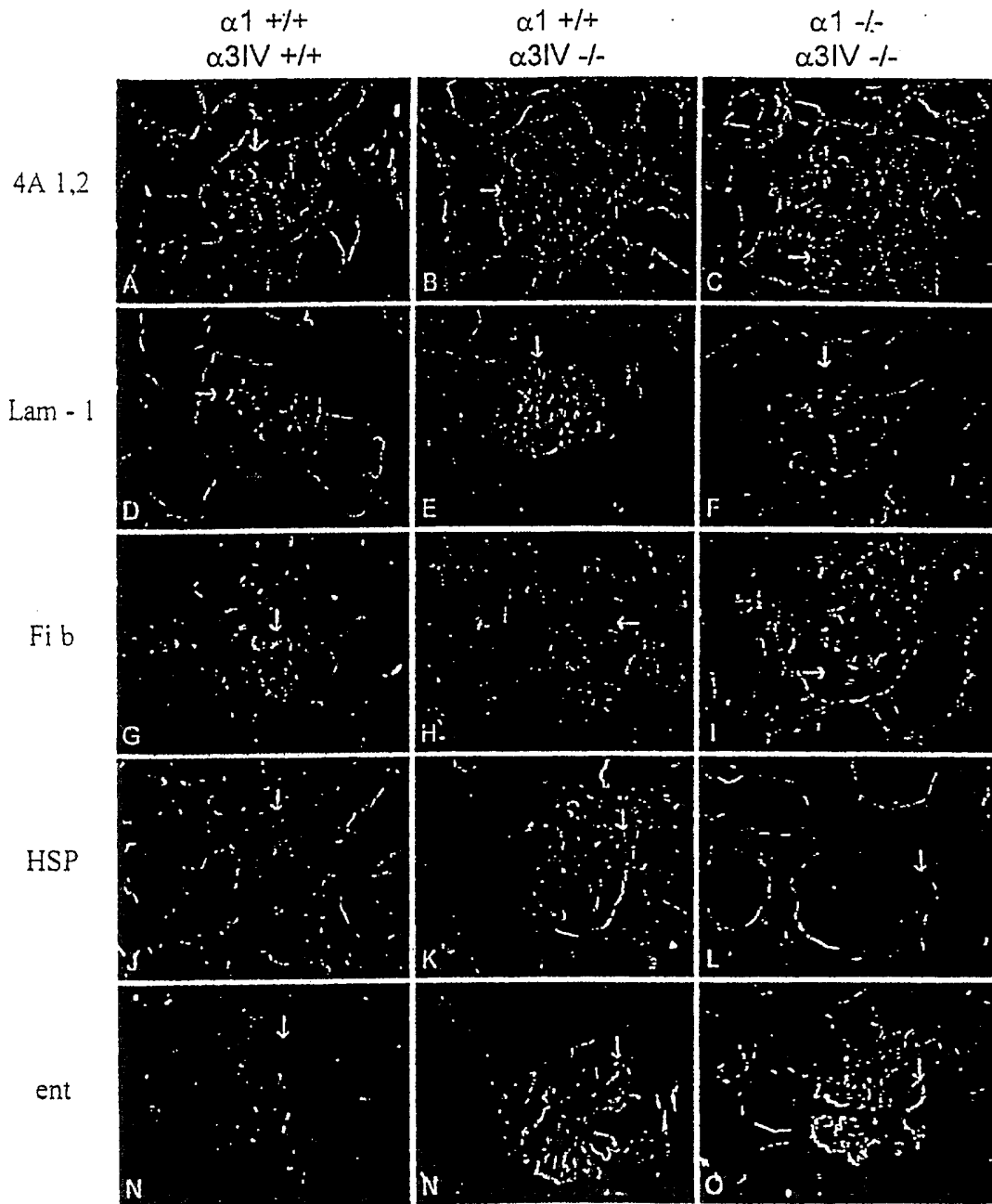


Fig. 3

02.07.01

PV 2000-4358

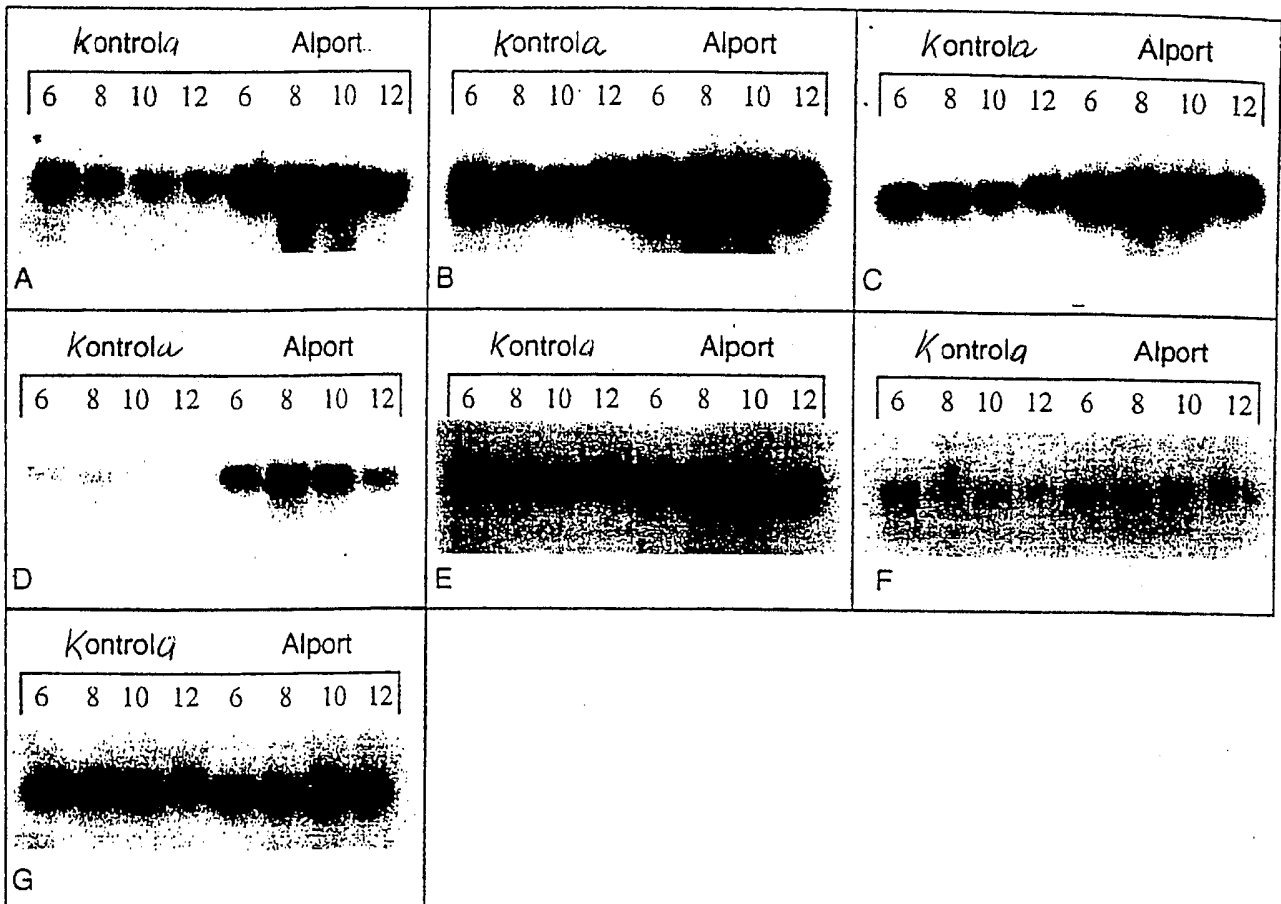


Fig. 4

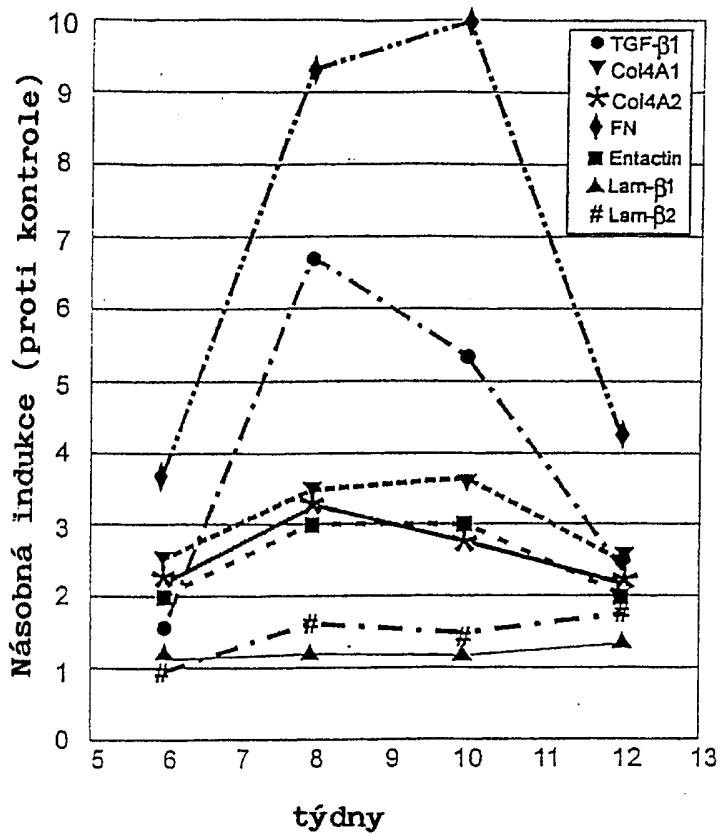


Fig. 5

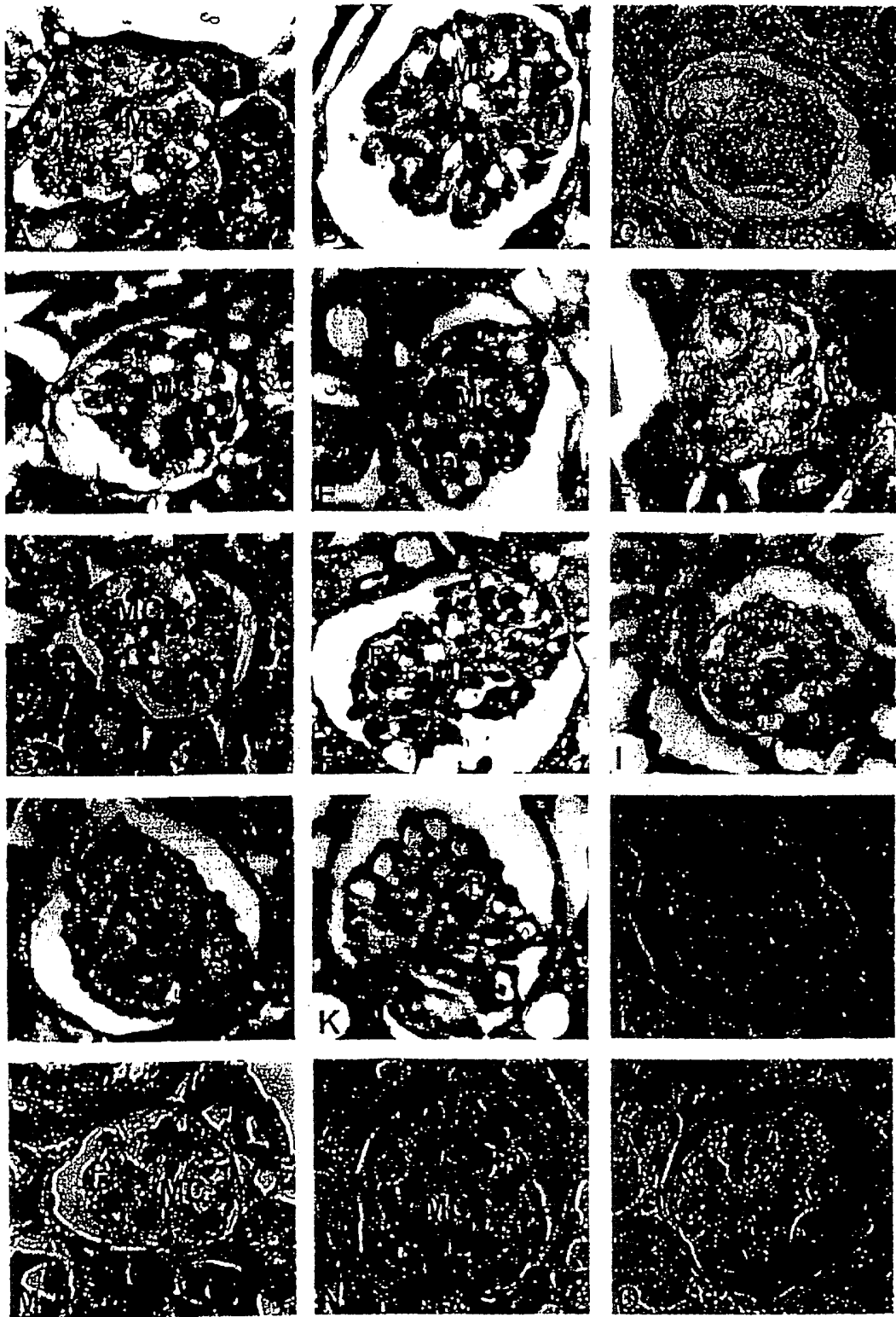


Fig. 6



Kontrola



Alport

Fig. 7

02-07-01

PV 2000-4358

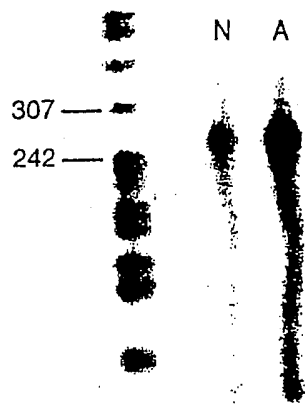
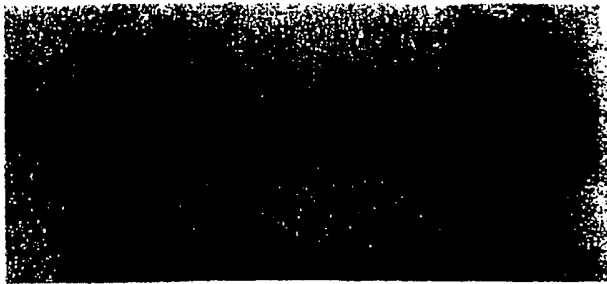


Fig. 8

02.07.01

PV 2000-4358

$\alpha 1$	-/-	+/+	-/-	+/+
4A3	+/+	+/+	-/-	-/-



TGF- $\beta$ 1

Fig. 9

02.07.01

PV 2000-4358

7 týdnů SV/J  $\alpha 1$  integrin nAb

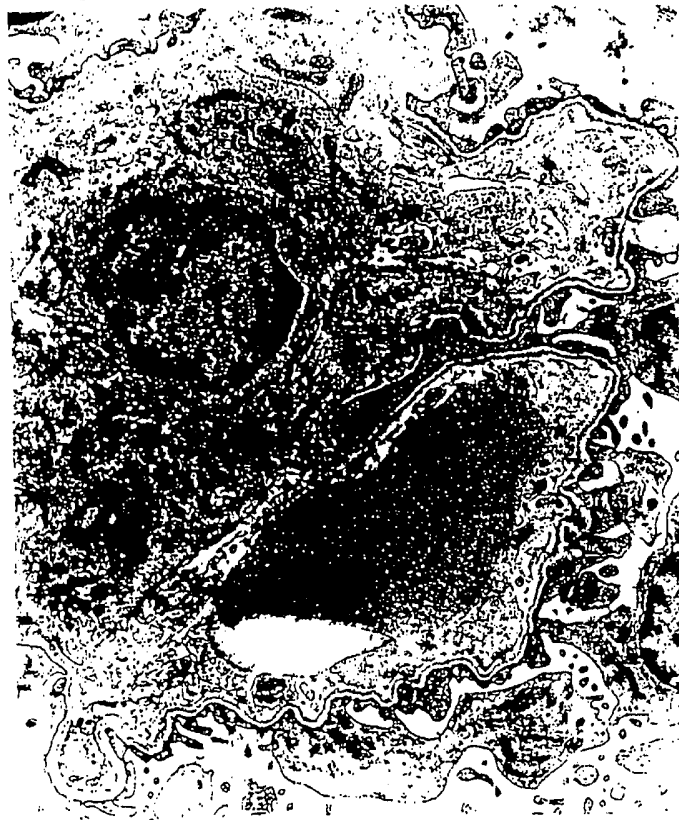


Fig. 10

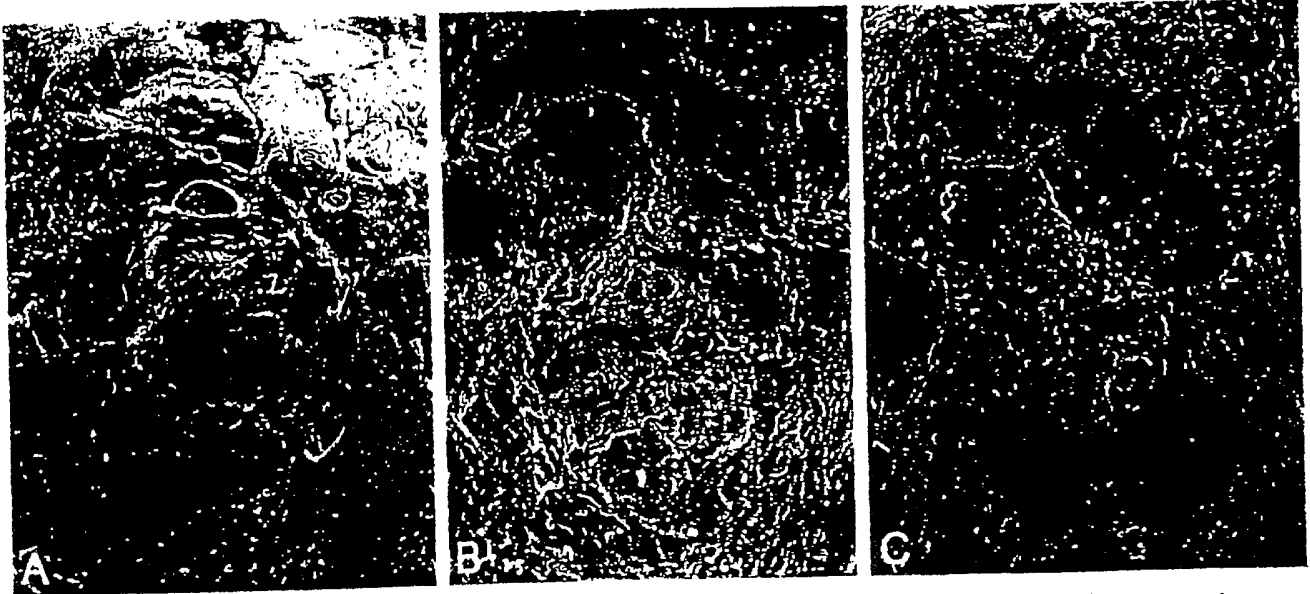
02.07.01

7 týdnů SV/J Alport

PV 2000-4358



Fig. 11



Kontrola

Alport

Rozpustný receptor

Fig. 12

Albumin v moči

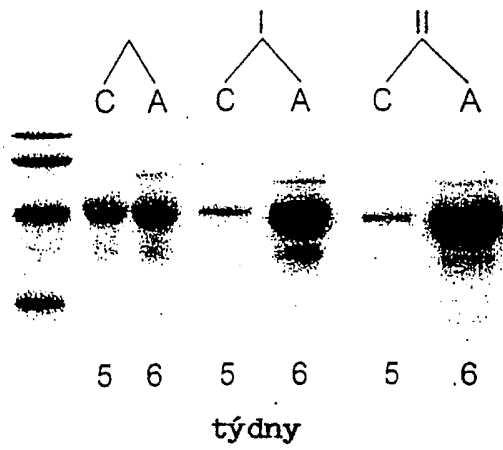


Fig. 13

10 týdnů DKO

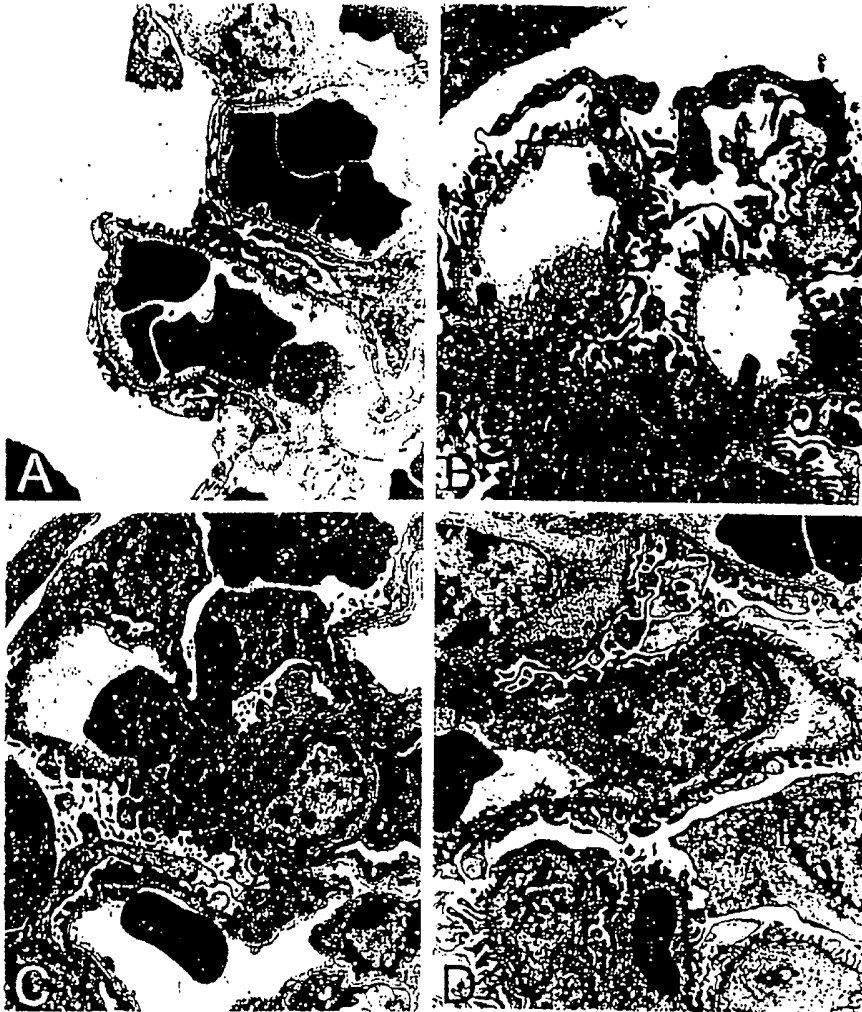


Fig. 14

02.07.01

PV 2000-4358

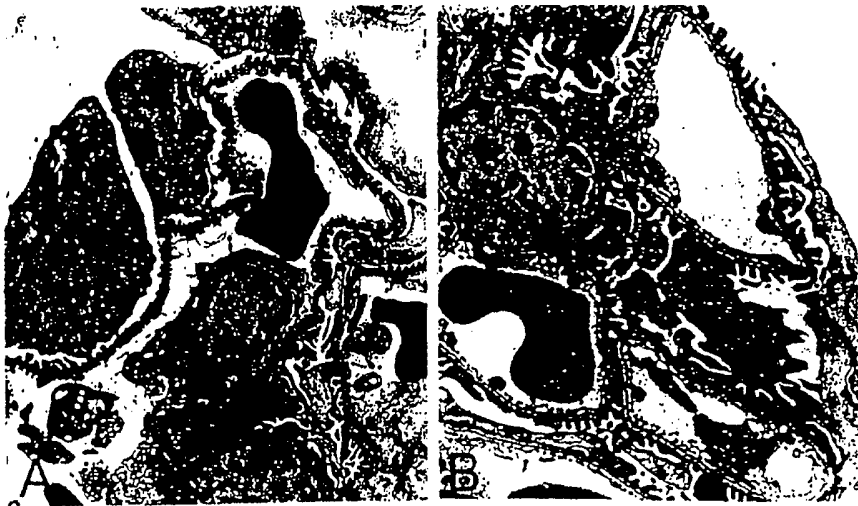


Fig. 15

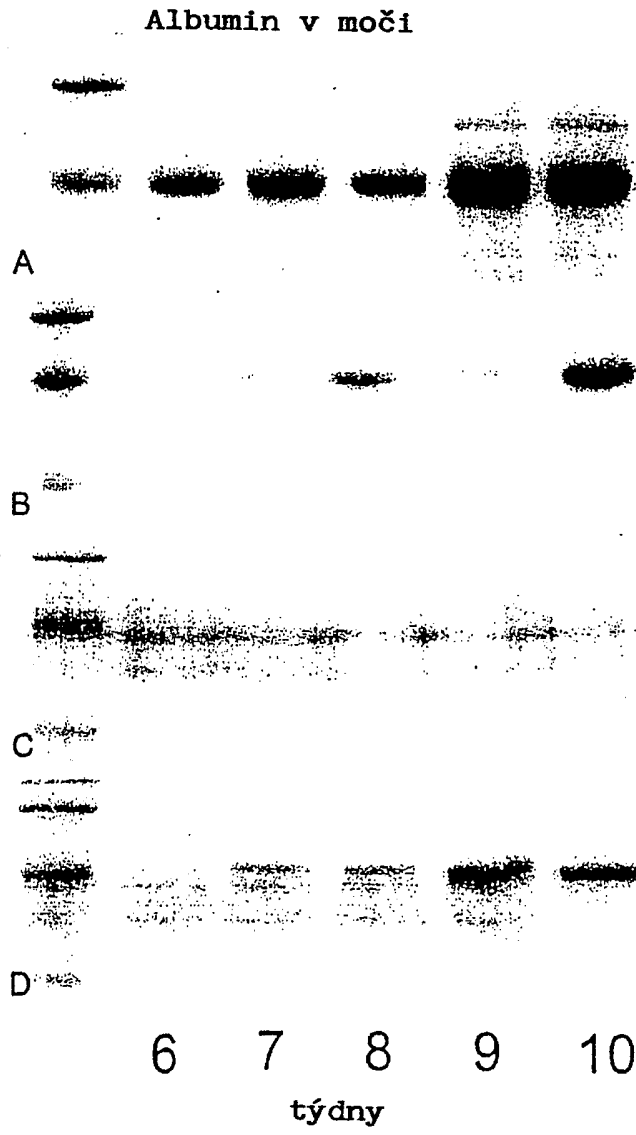


Fig. 16

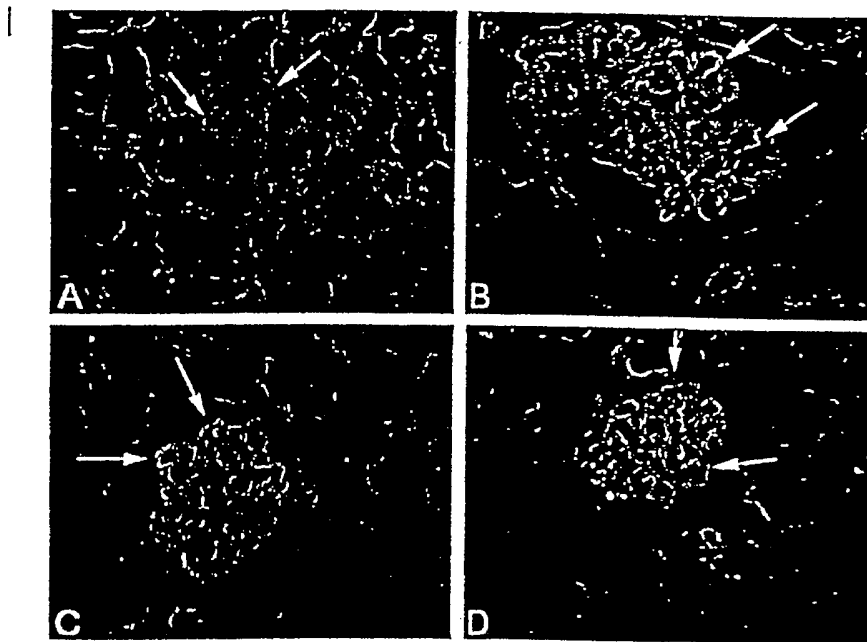
Fig. 17



	$\alpha 1$ integrin	$\alpha 3(\text{IV})$ kolagen
A	+/+	+/+
B	+/+	-/-
C	-/-	-/-

\* délka úseček je 10  $\mu\text{m}$

Řetězec lamininu  $\alpha 2$



2 týdny SV/J

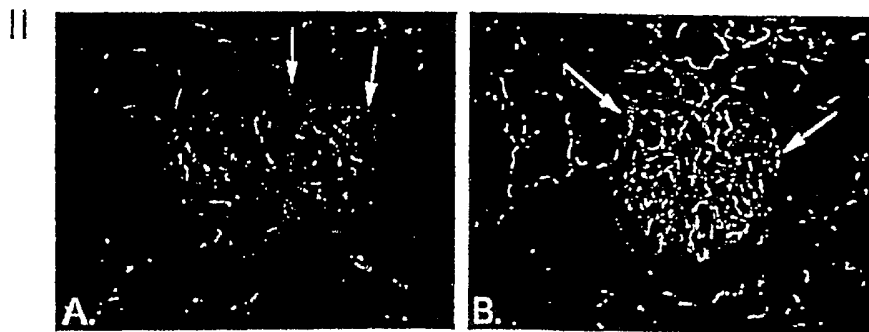


Fig. 18

00.07.01

PV 2000-4358

2 týdny SV/J Alport

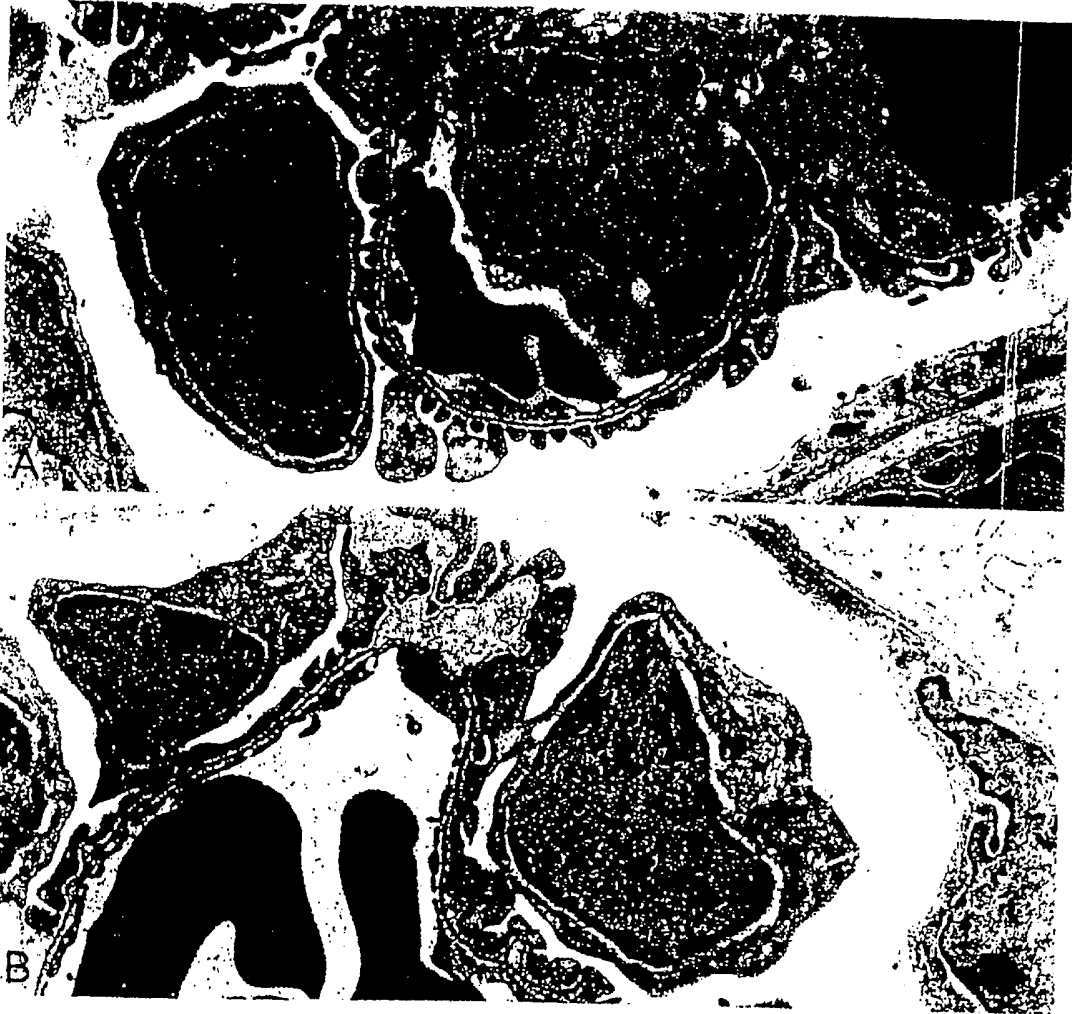


Fig. 19

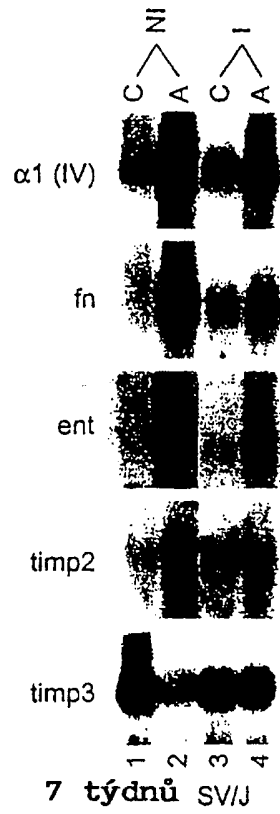


Fig. 20

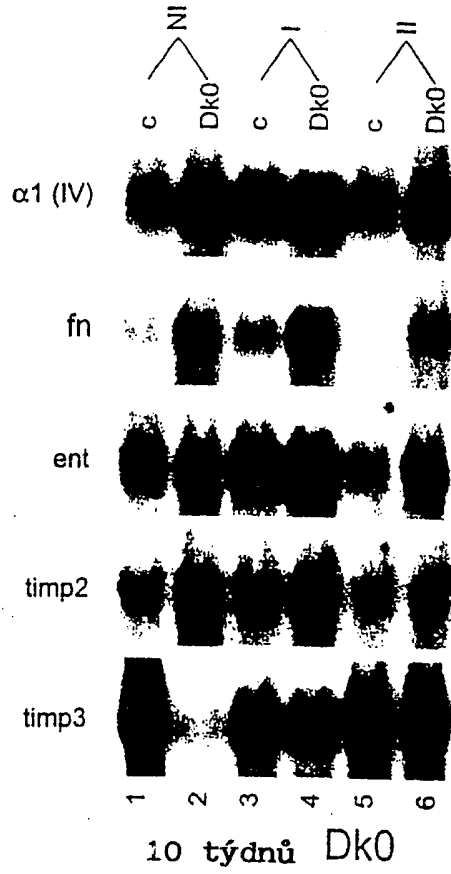


Fig. 21

Barvení methenaminem stříbra podle Jonese

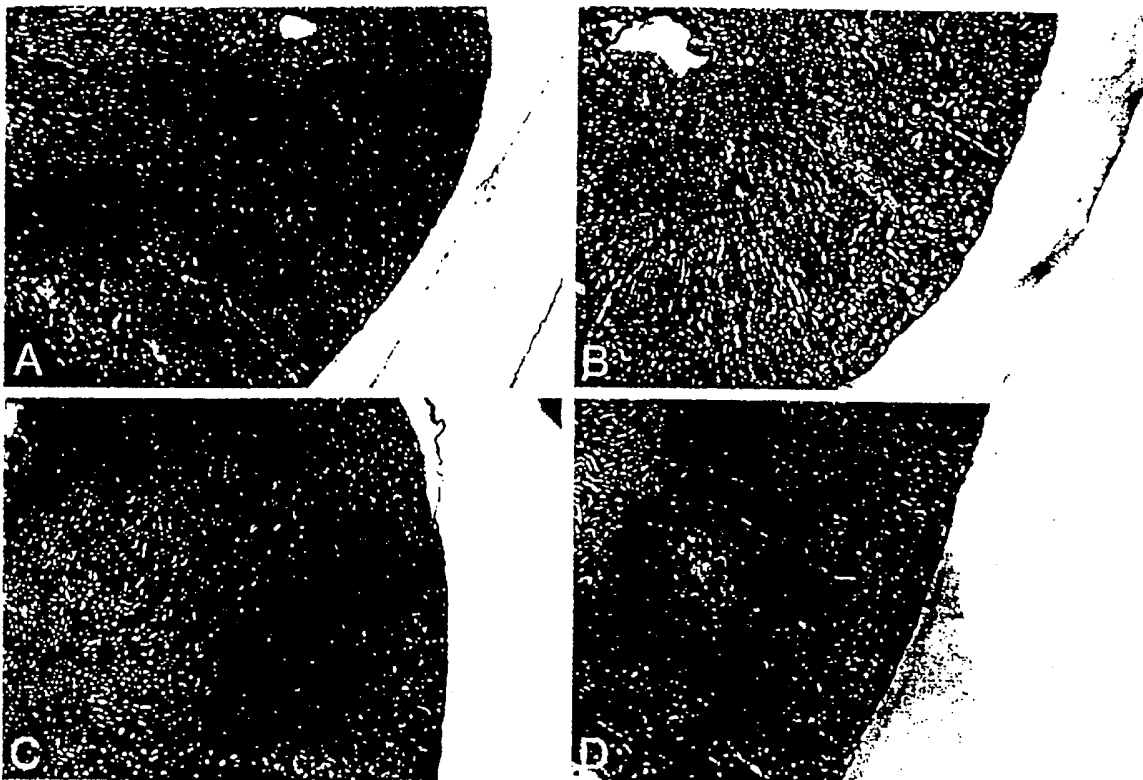


Fig. 22

Kolagen typ I

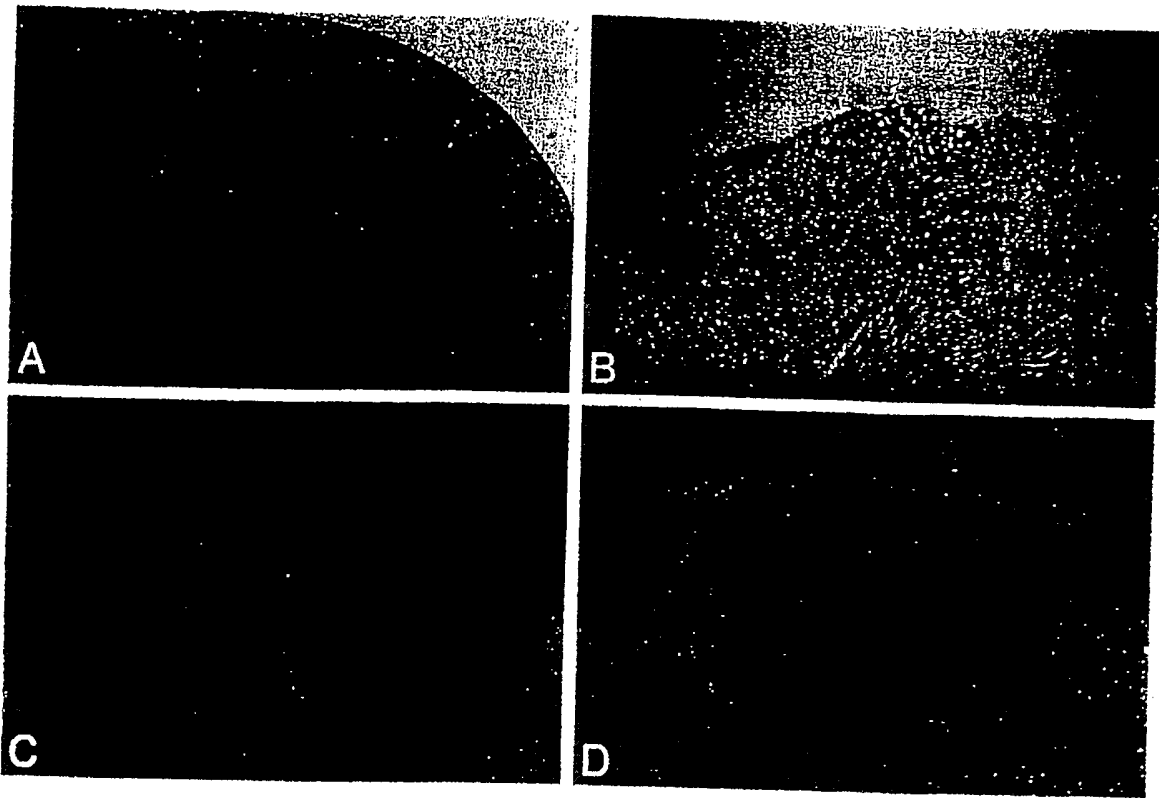


Fig. 23

Fibronectin

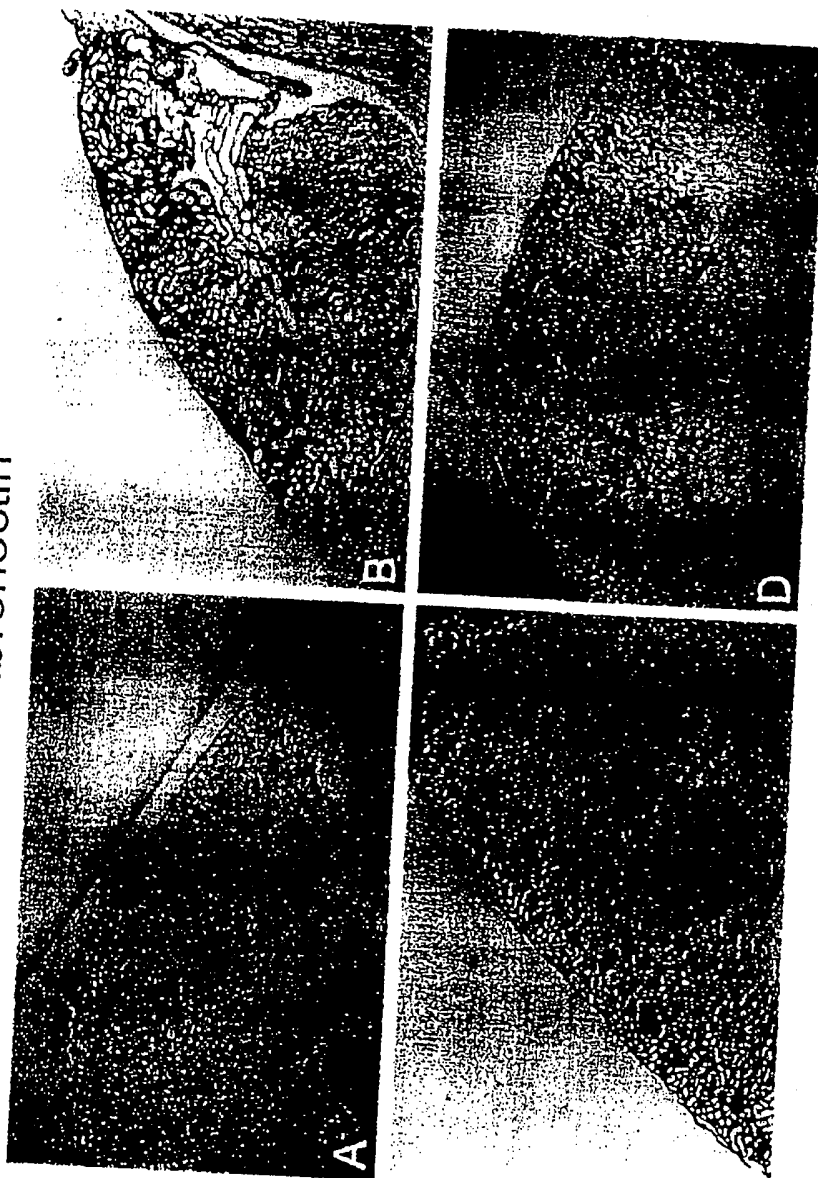


Fig. 24