

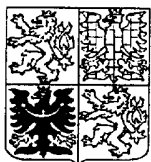
PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

285 996

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2482-95**

(22) Přihlášeno: **24. 03. 94**

(30) Právo přednosti:
26. 03. 93 US 93/040742

(40) Zveřejněno: **11. 12. 96**
(Věstník č. 12/96)

(47) Uděleno: **18. 10. 99**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **15. 12. 99**
(Věstník č. 12/99)

(86) PCT číslo: **PCT/US94/03208**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 94/23032**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N 15/12

C 07 K 14/475

A 61 K 38/18

(73) Majitel patentu:

Amgen Inc., Thousand Oaks, CA, US;

(72) Původce vynálezu:

Pierce Glenn F., Thousand Oaks, CA, US;

Morris Charles F., Newbury Park, CA, US;

Housley Regina M., Thousand Oaks, CA, US;

(74) Zástupce:

Čermák Karel Dr., Národní 32, Praha 1,
11000;

(54) Název vynálezu:

**Použití růstového faktoru keratinocytů
pro výrobu léčiva**

(57) Anotace:

Použití růstového faktoru keratinocytů pro výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci choroby nebo stavu, vyžadujícího stimulaci nefibroblastových epitelových buněk pacienta, jako je alopecie, indukovaná chemoterapií, žaludeční a dvanáctníkový vřed, eroze žaludku a jícnu, zejména erozivní gastritis, oesophagitis nebo oesophageální reflux, zánětlivá choroba střev, toxicita pro vnitřnosti, vyvolaná ozářením nebo chemoterapií, choroba hyalinní membrány, nekróza respiračního epitelu, vyvolaná vdechováním kouře, emphysema, plicní zánět a fibróza, cirhóza jater, fulminantní selhání jater, akutní virová hepatitis a toxické napadení jater. Růstový faktor keratinocytů může být přírodní, chemicky syntetizovaný nebo rekombinantně produkován. Rekombinantně produkováný růstový faktor keratinocytů s výhodou obsahuje aminokyselinovou sekvenci přírodního lidského růstového faktoru keratinocytů a je produktem bakteriálních buněk, přednostně E. coli.

CZ 285 996 B6

Použití růstového faktoru keratinocytů pro výrobu léčiva

Oblast techniky

5

Vynález se týká použití růstového faktoru keratinocytů (KGF) pro výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci choroby nebo stavu, vyžadujícího stimulaci nefibroblastových epitelových buněk pacienta. Toto použití je založeno na tom, že KGF stimuluje proliferaci růstu a diferenciaci buněk jiných, než jsou keratinocyty. Takového léčiva je možno použít pro léčbu chorob u pacientů, u nichž je prospěšné dosáhnout regenerace poškozených a nemocných buněk a tkání.

10

Dosavadní stav techniky

15 Pokrok v biotechnologii v nedávných letech vedl k vývoji a terapeutickému použití nových rekombinantních polypeptidů, jako je erythropoietin a faktor, stimulující granulocytovou kolonii, k užítu mnoha humánních pacientů. Od té doby byla objevena celá řada dalších polypeptidů, vykazujících biologickou účinnost in vitro. Pro identifikaci potenciálních terapeutických aplikací u člověka je však důležité zjištění biologických účinků těchto faktorů a charakterizace cílových
20 buněk, na něž jsou tyto faktory zaměřeny.

KGF je známý mitogen, u něhož byla nedávno zjištěna specifita pro buňky epitelu, zejména keratinocyty (Rubin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 802–806 (1 989); Finch et al., Science, 245: 752–755 (1 989) a Merchese et al., J. Cell. Phys. 144: 326 až 332 (1 990)). Expres
25 mediátorové RNA pro KGF byla zjištěna u několika buněčných linií stromálních fibroblastů, získaných z epitelových tkání embryonálního, neonatálního a adultního humánního původu a v RNA, extrahované z normálních adultních ledvin a gastrointestinálního traktu. Taková RNA nebyla zjištěna v gliálních buňkách, plicích, mozku, ani v různých buněčných liniích epitelu, včetně kultur karcinomů šupinatých buněk, mamárních epitelových buněk, imortalizovaných
30 bronchiálních epitelových buněk, imortalizovaných keratinocytů a primárních keratinocytů (Finch et al., Science, výše uvedená citace). KGF je však mitogenicky účinný u kontinuální linie myších buněk, BALB/MK (Weissman a Aaronson, Cell., 32: 599 (1 983) a také PNAS a Science viz výše). Toto pozorování podporuje tvrzení, že KGF vykazuje v kůži parakrinní účinek, přičemž k produkci KGF dochází v dermis (ale nikoliv v epidermis) a že působí na keratinocyty.

35

Pomocí exprese genů pro keratin a filagrin bylo dále ukázáno, že KGF ovlivňuje diferenciaci a maturaci keratinocytů (viz J. Cell. Phys., výše uvedená citace).

Velká část výše popsaných výzkumů biologické aktivity KGF byla prováděna s rekombinantním
40 KGF, což umožnilo rozšířit studii tohoto faktoru. Publikovaná patentová přihláška PCT WO 90/08 771 popisuje purifikaci KGF z kondicionovaného média linie humánních embryonálních fibroblastů, částečné sekvenování izolovaného polypeptidu, klonování genu a expresi v bakteriálních buňkách (E. coli) za účelem produkce rekombinantního biologicky účinného KGF.

45

Zatímco úloha KGF, jakožto stimulačního činidla pro keratinocyty in vitro, již byla jasně identifikována, mnohé zůstává nezodpovězeno, pokud se týče úlohy KGF jako růstového faktoru, včetně identifikace dalších typů buněk, na něž může být KGF zacílen, a účinku KGF na takové
50 buňky in vivo. Takové informace jsou velmi důležité pro pochopení celkového potenciálu KGF jako terapeutického činidla.

V EP 455 422 je popsán způsob zlepšování tělesného vzhledu člověka, při němž se na skalp aplikuje růstový faktor nebo růstové faktory fibroblastů (FGF) v množství, postačujícím pro léčení plešatosti mužského typu, například prostřednictvím stimulace implantovaných vlasových

štěpů. Z různých typů FGF jsou zde konkrétně zmíněny bFGF, int2, hst/KS3, FGF-6, KGF a popřípadě též aFGF.

5 V EP 455 422 není popisováno použití KGF pro léčení alopecie, indukované chemoterapií. Vzhledem k tomu, že etiologie ztráty vlasů při plešatosti mužského typu je odlišná od etiologie, vyvolané chemoterapií, nebylo možno předem předpokládat, že bude možno úspěšně použít KGF i ve druhém z výše uvedených případů. Předložený vynález proto vykazuje potřebnou novost i vynálezeckou činnost vůči řešení, popsanému v EP 455 422.

10 Ve WO 92/14 480 je obecně popsáno, že KGF se ukázal být účinným EGF při stimulaci proliferace lidských keratinocytů. Dále se zde uvádí, že KGF je možno kombinovat s G-CSF a vzniklé směsi je možno používat pro urychlení hojení ran. Použití, která jsou předmětem předloženého vynálezu, nejsou v citované přihlášce uvedena ani navržena.

15

Podstata vynálezu

Předmětem vynálezu je použití růstového faktoru keratinocytů pro výrobu léčiva nebo prevenci choroby nebo stavu, vyžadujícího stimulaci nefibroblastových epitelových buněk pacienta.

20

V krátkosti lze konstatovat, že vynález je založen na zjištění stimulačního účinku KGF na ne-keratinocytové buňky epitelu. Konkrétněji se zjistilo, že KGF indikuje in vivo proliferaci a diferenciaci v normálních adnexálních strukturách, jako jsou sebocyty a buňky vlasových folikulů, v jaterních buňkách, jako jsou hepatocyty, a v buňkách mukozálního epitelu respiračního traktu, jako jsou pneumocyty typu II. Existuje též přesvědčivý důkaz, že KGF stimuluje proliferaci a růst buněk intestinální sliznice, například pohárkovitých buněk, produkujících mucin v žaludečních žlázách a v tenkém střevu, kryptických buněk v tračníku a jiných epitelových buněk ve vnitřnostech.

25

30 Tyto objevy mají významný dosah v tom, že umožňují aplikovat KGF na tkáň, v nichž existuje specifické poškození nebo nedostatečnost v buňkách těchto konkrétních typů. Následuje popis chorob a stavů, které lze léčit pomocí KGF v souladu s poznatky tohoto vynálezu.

35 Stimulace proliferace a diferenciaci adnexálních struktur, jako jsou vlasové váčky, potní žlázy a mazové žlázy, má kritickou důležitost při regeneraci epidermis a dermis u pacientů, postižených popáleninami a jinými poškozeními v částečné nebo úplné tloušťce. Povrchové defekty se současné době hojí vytvořením jizvy a obnovením povrchové vrstvy keratinocytů, přičemž však úplné regenerace kůže dosud nelze dosáhnout. U kožních defektů, zasahujících celou tloušťku kůže, včetně popálenin, nedochází v současné době k repopulaci vlasových váčků, potních žláz a mazových žláz. Za použití KGF je takové repopulace možno dosáhnout.

40

45 Epidermolysis bullosa je defekt přilnavosti epidermis k podložní dermis, který má za následek časté otevřené a bolestivé puchýře, způsobující vážné onemocnění. Urychlená reepitelizace těchto lézí, například za použití KGF, by se projevila sníženým nebezpečím infekce, menší bolestivostí a sníženou potřebou péče o rány.

50 K alopecii, vyvolané chemoterapií, dochází u pacientů, léčených chemoterapeuticky za účelem potlačení maligních nádorových onemocnění. V současné době nejsou k dispozici žádná léčiva, která by účinně zabráňovala usmrcením buněk vlasových váčků, které způsobuje přechodnou ztrátu vlasů. KGF takový prostředek představuje.

Plešatost mužského typu je převládající typ plešatosti a je v podstatě neléčitelná. Progresivní ztráta vlasů u mužů a žen je vážným kosmetickým problémem. Tento stav by bylo možno léčit za použití KGF buď systemicky nebo topikálně, pokud by bylo léčivo možno aplikovat na skalp, kde

by docházelo k jeho absorpci, nebo pokud by bylo možno jej podávat sprejovými injekcemi do skalpu za použití vzduchové pistole nebo jiných technologií.

5 Žaludeční vředy je možno léčit antagonisty H_2 , ale přesto jsou významnou příčinou onemocnění, která se často opakují. Jejich hojení spočívá ve vytvoření jizvy v mukozální výstelce. Schopnost rychlejší regenerace glandulární mukózy, například podáváním KGF, by představovala významné terapeutické zlepšení při léčbě žaludečních vředů.

10 Dvanáctníkové vředy jsou sice, podobně jako žaludeční vředy, léčitelné, ale vyvinutí terapeutických činidel, která by měla za následek úplnější a rychlejší regeneraci mukozální výstelky dvanáctníku, by představovala významný pokrok. Užitečná by přitom byla také skutečnost, že by pomocí tohoto terapeutického činidla došlo k regenerativnímu vyhojení vředů a snížení jejich četnosti jejich opakovaného výskytu. KGF takový potenciál má.

15 Inflamatorní choroby střev, jako je Crohnova choroba (která převážně postihuje tenké střevo) a ulcerativní kolitis (která převážně postihuje tlusté střevo), jsou chronické choroby neznámé etiologie, které se projevují destrukcí mukozálního povrchu, zánětem, zjizvením a srůsty, vznikajícími při hojení, a značnou morbiditou postižených pacientů. Současná terapie se orientuje na potlačení zánětu. Terapeutika, jako je KGF, stimulující obnovení mukozálního povrchu a
20 urychlující hojení, by mohla být užitečná při potlačování postupu těchto chorob.

Střevní toxicita představuje hlavní omezující faktor pro léčebné režimy, zahrnující ozařování a chemoterapii. Předběžná léčba KGF by mohla mít cytoprotektivní účinek na sliznici tenkého střeva, což by umožnilo zvýšit dávky při takových druzích léčby za současného snížení
25 potenciálních fatálních vedlejších účinků střevní toxicity.

Léčba KGF má pozoruhodný účinek na produkci slizu v gastrointestinálním traktu. Tato vlastnost může být užitečná pro ochranu střevní sliznice před poškozením použitými škodlivými látkami nebo při omezování šíření poškození při chorobách, jako je zánětlivá choroba střev.

30 Choroba hyalinní membrány u předčasně narozených novorozenců má za následek absenci tvorby surfaktantu pneumocyty typu II v plicích, jejímž projevem je zhroucení alveol. Přestože je u plodů starých 28 týdnů a starších možno ve značném rozsahu urychlit maturaci a sekreci podáváním kortikosteroidů, neexistuje v současné době žádná léčba pro mladší plody, což má za následek
35 významnou morbiditu a mortalitu u této populace. Terapeutické činidlo, jako KGF, které indukuje proliferaci a diferenciaci pneumocytů typu II, je potenciálně velmi užitečné při léčbě této choroby.

Vdechování kouře je významnou příčinou morbidity a mortality v týdnu, který následuje po utrpení popálenin, a je způsobeno nekrózou bronchiolárního epitelu a alveol. Růstový faktor, jako
40 KGF, který by mohl stimulovat proliferaci těchto struktur a indukovat jejich opravu a regeneraci, by byl užitečný při léčbě takových inhalačních poškození.

Emphysema je důsledkem progresivní ztráty alveol. Růstový faktor, jako KGF, který by mohl stimulovat nový růst, nebo který by byl cytoprotektivní vzhledem ke zbývajícím alveolám, by byl
45 terapeuticky užitečný. V současné době neexistuje pro tuto chorobu žádná účinná léčba.

Cirhóza jater je vedle virové hepatitidy a chronického požívání alkoholu jednou z významných příčin morbidity a mortality. Cytoprotektivní účinek a účinek na proliferaci a diferenciaci hepatocytů, vyvolaný například KGF, by zvýšil funkci jater, což by se projevilo zpomalením nebo
50 znemožněním vzniku cirhózy.

Fulminantní selhání jater je choroba ohrožující život, k níž dochází v posledním stadiu cirhózy. Činidlo, jako KGF, které by mohlo indukovat proliferaci zbývajících hepatocytů, by vykazovalo přímý užitečný vliv na tuto chorobu, která je v současné době léčitelná pouze transplantací jater.

Akutní virová hepatitida je často subklinická a má samoomezující průběh. U menší části pacientů může však dojít k vážnému poškození jater během několika týdnů. Cytoprotektivní činidlo, jako je KGF, by mohlo být užitečné při prevenci hepatocelulární degenerace.

- 5 Toxické poškození jater, vyvolané acetaminofenem, haloethanem, tetrachlormethanem a jinými toxiny, by bylo možno zlepšit pomocí růstového faktoru, jako je KGF, který vykazuje cytoprotektivní účinek vůči hepatocytům.

- 10 Předmětem vynálezu je KGF pro terapeutickou (nebo, kde je to též vhodné, také pro profylaktickou) léčbu výše uvedených chorob. Dalším předmětem vynálezu jsou farmaceutické prostředky, obsahující terapeuticky účinné množství KGF.

Přehled obrázků na výkresech

- 15 Na obr. 1 je znázorněna sekvence nukleotidů syntetické oligonukleotidové DNA, použité při konstrukci rekombinantního expresního systému pro KGF, kterého bylo použito při experimentech in vivo, uvedených v tomto popisu.

- 20 Na obr. 2 je znázorněno dermální poranění králičího ucha v částečné tloušťce, které je modifikováno tak, že rána proniká chrupavkou, za účelem lepší kvantifikace růstu nové tkáně.

- 25 Na obr. 3 je znázorněna reepitelizace rány, léčené KGF, a kontrolní rány za použití modifikovaného dermálního poranění v částečné tloušťce v králičím uchu, jako modelu. Celková plocha regenerujícího se epitelu po léčbě KGF je znázorněna nalevo, zatímco procentický podíl reepitelizace rány je uveden napravo.

- 30 Na obr. 4 je znázorněna proliferace bazálních a suprabazálních keratinocytů na okrajích rány do 5 dnů po ošetření KGF za použití poranění králičího ucha jako modelu.

- Na obr. 5 je znázorněna histologická analýza vlasových váčků, léčených bromdeoxyuridinem (BrdU) z ran léčených KGF a kontrolních ran, jejímž účelem je ukázat proliferaci buněk u modifikovaného králičího modelu.

- 35 Na obr. 6 je ukázáno vybarvení mazových žláz olejovou červení u poranění léčeného KGF a kontrolního poranění v případě stejného králičího modelu.

- Na obr. 7 a 8 je ukázán mikropapilární nárůst alveolárních septálních epitelových buněk v plicích zdravých krys, kterým byl intratracheálně podán KGF.

- 40 Na obr. 9 a 10 je ukázán krychlovitý nárůst epitelových buněk v alveolách velkých segmentů plic po intratracheálním podání KGF stejným zdravým krysám.

- 45 Obr. 11 a 12 ukazují, hyperplastické alveolární epitelové buňky, tvoří výstelku alveolárních sept takto léčených krys, obsahují lamelární inkluze různé velikosti a tvaru.

Obr. 13A ukazuje hyperplastické účinky léčby KGF v bronchiálním epitelu po intratracheálním podání KGF zdravým krysám.

- 50 Obr. 13B ukazuje bronchiální epitel kontrolní skupiny (podán pouze excipient) zdravých krys, která odpovídá zkušební skupině z obr. 13A.

Na obr. 14 jsou uvedeny výsledky zkoušky protekce receptoru KGF (KGFR) RNázou v plicích dospělých krys.

Obr. 15 ukazuje zvýšení hmotnosti gastrointestinálního traktu a jater v závislosti na podané dávce po čtyřdenním podávání KGF.

5 Obr. 16 ukazuje zvýšení syntézy proteinu v krysích játrech v závislosti na podané dávce po čtyřdenním podávání KGF.

Obr. 17 ukazuje zvýšenou proliferaci hepatocytů v játrech zvířat, ošetřovaných jeden až sedm dnů KGF, stanovenou pomocí značení BrdU (a) nebo počtu mitóz (b).

10 Obr. 18 a 19 uvádějí množství získané jaterní hmoty po ošetření zčásti hepatektomizovaných krys KGF.

15 Obr. 20 uvádí snížení hladiny sérové glutamát oxaloacetát tranaminázy (SGOT) v krevním séru u krys, otrávených tetrachlormethanem, po léčbě KGF.

Obr. 21 ukazuje zvětšení délky gastrických žláz a množství vytvořeného slizu v žaludečních žlázách krys, ošetřovaných KGF po dobu 1 až 7 dnů.

20 Obr. 22 ukazuje prodloužení duodenálních krypt a tvorbu slizu v tenkém střevě krys, ošetřovaných KGF po dobu 1 až 7 dnů.

Obr. 23 ukazuje zvýšení hyperplastických krypt v tračniku krys, ošetřovaných KGF po dobu 1 až 7 dnů.

25 Obr. 24 ukazuje prohloubení krypt v tračniku krys, ošetřovaných KGF po dobu 1 až 7 dnů.

Popis specifických provedení tohoto vynálezu

30 Pro identifikaci specifických typů epitelových buněk, u nichž KGF poskytuje významný biologický účinek, který je indikativní pro jeho potenciální terapeutickou užitečnost, byla provedena rozsáhlá studie na živých zvířatech. Těmto zvířatům byl in vivo podáván KGF, přičemž byly sledovány a analyzovány dosažené výsledky. Ve všech následujících příkladech bylo použito rekombinantního KGF, vyrobeného následujícím způsobem:

35 Rekombinantní gen KGF se izoluje z RNA fibroblastu humánní předložky (AG1523) pomocí polymerázové reakce (PCR) a výsledná DNA se liguje do expresního vektoru pCFM1156 mezi restrikční místa NdeI a BamHI. Plazmid pCFM1156 se může získat z plazmidu pCFM836 způsobem, popsaným v US patentu č. 4 710 473 (celý obsah tohoto patentu je relevantní pro popis tohoto vynálezu) tak, že se zničí dvě endogenní restrikční místa NdeI
40 vyplněním konce enzymem T4 polymerázou, načež se provede ligace tupého konce a nahrazení krátké sekvence DNA mezi jedinečnými restrikčními místy ClaI a KpnI následujícím oligonukleotidovým duplexem, zahrnujícím sekvenci SEQ. ID NO.: 1 a sekvenci SEQ. ID NO.: 2

45 ClaI KpnI
5'CGATTTGATTCTAGAAGGAGGAATAACATATGGTTAACGCGTTGGAATTCGGTAC3'
3' TAAACTAAGATCTTCCTCCTTATTGTATACCAATTGCGCAACCTTAAGC 5'

50 Plazmid pCFM1156KGF se potom klonuje do hostitelských buněk FM5 (ATCC č. 53 911) standardním elektroporačním transformačním postupem (za použití zařízení BioRad Gene Pulser). Pro snížení pozorované interní translační iniciace se sekvence DNA v genu KGF mezi restrikčními místy KpnI a EcoRI nahradí syntetickou oligonukleotidovou DNA, která je zkonstruována tak, aby se snížilo využití vnitřního ribosomálního vazebného místa (obr. 1). Po ligaci a elektroporaci do buněk FM5 (ATCC č. 53 911) se selektuje klon, obsahující

pCFM1156KGF-dsd. Potvrdí se sekvenční DNA kódující gen KGF. Potom se buňky kultivují při 30 °C v 10litrových fermentorech za použití standardního dávkování média, umožňujícího buňkám růst exponenciální rychlostí. Omezujícím faktorem je glukóza, aby se zabránilo akumulaci toxického vedlejšího produktu. Při dosažení poloexponenciální hustoty buněk se teplota na krátkou dobu zvýší na 42 °C za účelem indukce transkripce genu KGF. Potom se po zbytek KGF indukční fáze fermentace udržuje teplota přibližně na 42 °C. Oddělená buněčná pasta se skladuje ve zmrazeném stavu. Biologicky účinný KGF se získá purifikací z mechanicky lyzované buněčné pasty standardními chromatografickými postupy, při kterých se využívá velmi vysokého izoelektrického bodu tohoto proteinu (S-Sepharose Fast Flow, Pharmacia) a velikosti (Superdex 75, Pharmacia). Purifikovaný rekombinantní protein KGF se podrobí zkoušení na endotoxin a biologickou účinnost pomocí mitogenní zkoušky, popsané v publikaci Rubin et al., PNAS, viz výše.

Vynález je blíže objasněn v následujících příkladech provedení. Uvedené příklady mají výhradně ilustrativní charakter a vynález v žádném ohledu neomezuje.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

KGF–stimulovaná proliferace a diferenciací adnexálních struktur při modelovém hojení rány in vivo.

V tomto příkladu se používá modifikovaného modelu dermálního poranění v částečné tloušťce v uchu králíka. Modelový dermální vřed v uchu králíka, popsáný v Mustoe et al., J. Clin. Invest. 87: 694 až 703 (1991), se za použití 6mm trefinu modifikuje tak, že poranění pochází chrupavkou až k dermis na zadní straně ucha. V důsledku toho se rána hojí pučením elementů epitelu pod chrupavkou. Přitom se kontrakce nestává proměnnou veličinou v průběhu hojení, což umožňuje přesnou kvantifikaci nových tkání (viz obr. 2). Jako terapeutického činidla pro hojení rány se použije rekombinantního KGF, vyrobeného výše uvedeným způsobem.

Materiály a metody

KGF nebo samotné fosfátem pufované vehikulum na bázi roztoku chloridu sodného se aplikuje jednou v den chirurgického zákroku a rány (0,25 cm²) se kryjí okluzivním obvazem Tegaderm (výrobek firmy 3M Company, St. Paul, MN, USA). Před usmrcením obdrží každé zvíře intravenózní injekci BrdU (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI, USA) v množství 50 mg/kg tělesné hmotnosti. BrdU se používá pro zlepšení kvantifikace stupně proliferace bazálního keratinocyty a kinetiky migrace bazálních buněk k stratum spinosum a stratum corneum. Po usmrcení se poraněné místo rozřízne na dvě části, přičemž jedna část se zmrazí v médiu „Optimum Cooling Temperature Medium“ (OCT, Miles Inc., Elkhart, IN, USA) a druhá část se fixuje v prostředku Omnifix (Al-Con, Genetics, Inc. Melville, New York, USA) a zpracuje rutinními histologickými metodami. Vybarvení pomocí Masson Trichrome, červení Oil Red o a imunohistochemické vybarvení (IHC) se provádí na řezech poranění o tloušťce 3 µm.

Měření reepitelizace

U každého poranění se pomocí kalibrovaného objektivního mikrometru měří celková mezera a mezera v epitelu. Podíl reepitelizace v procentech u každého poranění se vypočítá jako rozdíl celkové mezery a mezery v epitelu, dělený celkovou mezerou v příslušném poranění. Data zjištěná ze dvou řezů každého poranění se zprůměrují. Rozdíly v naměřených hodnotách mezery

v epitelu a procentické podíly reepitelizace se analyzují nezdvojeným Studentovým t–testem s jednou větví.

- 5 U každé skupiny, která byla podána jedna dávka (léčivo nebo vehikulum), se vypočítá plocha vytvořeného epitelu. Pro každou dávku proti kontrolní skupině se provede jednosměrný test ANOVA a Dunnettův t–test.

Měření proliferace a diferenciací buněk epitelu

- 10 Řezy tkáně o tloušťce 3 μm , uložené v parafínu, se barví za použití anti–BrdU (Dako Corp. Carpinteria, CA, USA), komplexem avidin–biotin (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) a diaminobenzidínovým substrátem (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Řezy se louží 0,1 % roztokem proteázy a potom se zpracují 2N kyselinou chlorovodíkovou. Endogenní peroxidáza se rozloží působením 3 % roztoku peroxidu vodíku. Preparáty se blokují
15 10 % roztokem normálního koňského séra ve fosfátem pufovaném roztoku chloridu sodného (PBS) a potom inkubují a anti–BrdU, zředěným v poměru 1 : 400 1 % roztokem hovězího sérového albuminu (BSA). Po promytí se řezy 20 minut inkubují s avidin–biotinovým komplexem s navázanou peroxidázou při zředění 1 : 100 v 1 % roztoku BSA. Potom se preparáty uvedou na 10 minut do styku se substrátem DAB (10 mg DAB, 20 ml PBS a 20 μl 30 % peroxidu vodíku).
20 Nakonec se řezy dobarví hematoxylinem.

Histologická analýza vlasových váčků, ošetřovaných BrdU

- Po zavedení BrdU a obarvení IHC se zjistí celkový počet váčků v lůžku poranění a zjištěný údaj
25 se analyzuje za použití Kruskal–Wallisova několikanásobného srovnávacího testu. Další analýza zahrnuje zkoušku s Chí–čtverci na procentický podíl poranění s folikuly, obsahujícími 10 nebo více proliferčních buněk v každé skupině s jednou úrovní ošetření. Kromě toho se ve všech folikulech, obsahujících více než 5 proliferčních buněk, zjistí počet BrdU pozitivně vybarvených buněk.

30

Barvení mazových žláz barvivem Oil Red o

- Barviva Oil Red o, které je specifické pro neutrální lipidy, se použije pro identifikaci sebocytů a mazových žláz. Barvení se provádí na zmrazených řezech způsobem, popsáných v F. L. Carson,
35 Histotechnology“ A Self–Instructional Text; ASCP Press, Chicago (1990), USA. Použitý postup lze v krátkosti popsat takto: 7 μm zmrazené řezy se usuší na vzduchu a fixují v zinkovém formalinu po dobu 10 minut, potom se preparáty ponoří do roztoku Oil Red o (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) o koncentraci 3 g/litr, dále se máčí po dobu 30 minut v 60 % izopropylalkoholu o teplotě místnosti, odbarví se v 60 % izopropylalkoholu a dobarví se
40 Learnerovým hematoxylinem. Zjišťuje se velikost mazových žláz a počet buněk na žlázu.

Výsledky a diskuze

- Urychlená reepitelizace a zvýšená tloušťka epitelu jsou pozorovány u poranění, ošetřených KGF,
45 v množství 4 až 40 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Tato poranění vykazují 5. Den dodatečné léčby podstatně zvýšenou reepitelizací ve srovnání s kontrolními poraněními (76,7 % versus 52,5 %, 1 μg KGF). Vrstva nového epitelu se zvětšuje způsobem, závislým na dávce, 5. a 7. Den dodatečné léčby činí téměř dvojnásobek plochy epitelu v kontrolním poranění (při dávce 10 μg KGF na ránu, viz obr. 3). Histologická analýza ukazuje, že k regeneraci epitelu dochází převážně pučením z adnexálních
50 elementů v dermis, tj. mazových žláz, potních žláz a vlasových folikulů.

Analýza proliferace bazálních keratinocytů a migrace bazálních buněk ukazuje, že po prvním dnu léčby KGF dochází ke zvýšení počtu proliferčních bazálních keratinocytů na okrajích poranění

(viz obr. 4). Druhý den léčby KGF se zvýší počet proliferačních keratinocytů v suprabazální vrstvě epidermis, což ukazuje urychlení tranzitu proliferačních buněk k stratum spinosum. Pátý den léčby vykazují poranění menší proliferaci v bazální vrstvě, což ukazuje na samoomezenou akceleraci opravy epitelu a diferenciaci (viz obr. 4). Zdá se, že keratinocyty při migraci vzhůru za vzniku stratum corneum podléhají normální maturaci.

Neočekávaně je také pozorována zvýšená proliferace sebocytů a jejich diferenciaci, jakož i zvýšená proliferace vlasových folikulů. Jak vlasové folikuly, tak mazové žlázy se zdají být větší a četnější v poraněných, léčených KGF, ve srovnání s kontrolními (viz obr. 5 a 6). Histologické řezy, které byly obarveny Oil Red o za účelem selektivní identifikace mazových žláz, vykazují podstatně větší počet těchto žláz a také tyto žlázy jsou výrazně větší, což ukazuje, že dochází ke zvýšené proliferaci a diferenciaci sebocytů na buňky, produkující maz. U poranění, léčených KGF, je také pozorováno zvýšení počtu (v závislosti na dávce) proliferačních buněk na vlasový váček.

Nedávno byl na modelu s králičím uchem studován epidermální růstový faktor (EGF) a bazický fibroblastový růstový faktor (FGF) (J. Clin. Invest., výše uvedená citace a Pierce et al., Amer. J. Pathol. 140: 1 375 - 1 388 (1 992)). Přesto že je známo, že oba tyto růstové faktory stimulují reepitelizaci, ani KGF, ani bazický FGF neovlivňuje proliferaci nebo diferenciaci adnexálních struktur, jako jsou mazové žlázy a vlasové folikuly. Schopnost KGF stimulovat proliferaci a následnou diferenciaci několika epitelových typů buněk v kůži spolu s její původní izolací od fibroblastů ukazuje, že KGF je silným parakrinním stimulem regeneračních pochodů v kůži.

Příklad 2

KGF–stimulovaná proliferace a diferenciaci pneumocytů typu II in vivo

Tento příklad se provádí za účelem vyhodnocení účinku podávání KGF na epitelové buňky respiračního traktu zdravých krys.

Materiály a metody

Samcům Lewisovy krysy o hmotnosti 200 až 250 g se podá jedna intratracheální injekce s různou dávkou KGF, zředěnou v roztoku chloridu sodného nebo fosfátem pufrovaném roztoku chloridu sodného za použití protokolu, popsaného v Ulich et al., Amer. J. Pathol. 138: 1 485 až 1 496 (1991). KGF se injekčně podává v dávkách 0,1, 5,0 a 10,0 mg/kg. Kontrolním krysám se podává intratracheální injekce excipientu. V časových bodech 6 hodin a 1, 2, 3, 4, 5 a 6 dnů po injekci KGF se krysy usmrtí, jejich plíce se nafouknou prostřednictvím intratracheálního katetru Bouinovým fixativem, sagitální řezy plic se uloží do parafínu a histologické řezy se obarví hematoxylinem a eoxilinem.

Výsledky a diskuze

KGF v dávce 0,1 mg/kg nevyvolává histologicky rozeznatelnou hyperplazii buněk alveolárního epitelu. KGF v dávce 1,0 mg/kg vyvolává mírné, ale zjištěné zvýšení počtu buněk alveolárního epitelu. Zvýšená hyperplazie buněk alveolárního epitelu se zjistí při úpravě dávky na hodnotu 5,0 a 10,0 mg/kg. KGF nevyvolává histologicky zjištěné zvýšení počtu alveolárních epitelových buněk v době 6 hodin a jednoho dne po intratracheální injekci. V době 2 dnů se v plicích krys, ošetřených KGF, zjistí zvýšený mikropapilární nárůst alveolárních septálních epitelových buněk (viz obr. 7 a 8). V době 3 dnů se zjistí difúzní nízký krychlovitý až krychlovitý nárůst alveolárních epitelových buněk, který tvoří výstelku celých alveol ve velkých segmentech plic (obr. 9 a 10). Některé oblasti plic si však zachovávají normální histologii. Histologický vzhled hyperplastického alveolárního epitelu u krys třetí den je v podstatě stejný jako vzhled hyperplazie pneumocytů

reaktivního typu II v lidských plicích. Hyperplastický alveolární epitel je zjistitelný ve snižujícím se množství v plicích KGF–ošetřených krys v den 4 a 5 po intratracheální injekci. V den 6 nelze rozlišit plíce krys, léčených KGF, od plic kontrolních krys.

5 Plíce krys, ošetřovaných KGF, se ultrastrukturně vyšetřují 3 dny po intratracheální injekci. Výstelka hyperplastických alveolárních epitelových buněk v alveolárních septech téměř vždy obsahuje jednu nebo více lamelárních inkluzí proměnlivé velikosti a tvaru (obr. 11 a 12). Brochiální epitel krys ošetřovaných KGF je hyperplastický v den 3, ale tato hyperplazie není
10 ihned tak nápadná, jako hyperplazie alveolárních buněk. Hyperplazie se hodnotí jako pseudostratifikace epitelové výstelky menších distálních bronchů, které obsahují normálně jednu vrstvu epitelu jako výstelku, jako svazčitost nebo mikropapilární nárůst bronchiálního epitelu a jako zvýšení mitotického čísla v bronchiálním epitelu (viz obr. 13A a 13B).

Intratracheálně podaný KGF vyvolává nápadnou hyperplazii alveolárních epitelových buněk.
15 Přítomnost lamelárních cytoplazmických inkluzí v buňkách na ultrastrukturní úrovni je konzistentní s předpokladem, že hyperplastickými buňkami jsou pneumocyty typu II. Lamelární inkluze se nezdají být tak četné nebo tak osmifilní. Jako inkluze ilustrované v některých případech experimentální hyperplazie pneumocytů typu II u krys a jsou velmi podobné lamelárním inkluzím, ilustrovaným v normálních krysích plicích. KGF vyvolává nejen hyperplazii alveolárních buněk,
20 nýbrž i hyperplazii buněk bronchiálního epitelu. Je možné, že hyperplastický alveolární epitel představuje podrost bronchiálního epitelu z terminálních bronciol do alveolárního parenchymu. Zdá se však pravděpodobnější, že KGF působí přímo na pneumocyty typu II, s ohledem na multifokální mikropapilární pučení pneumocytů na alveolárních septech 2 dny po injekci KGF, což je typ nárůstu, který předchází konfluentní výstelce alveol krychlovitými buňkami v 3 den.
25 Kromě toho se předpokládá, že pneumocyty typu II tvoří mitoticky responzivní populaci alveolárních epitelových buněk a je možno očekávat, že právě buňky alveolárního typu budou responzivní vůči potenciálnímu endogennímu mediátoru růstu alveolárních buněk, jako je KGF. Konečně identifikace lamelárních inkluzí v hyperplastických buňkách potvrzuje nejen jejich diferenciaci na pneumocyty typu II.

30 Stimulační účinek KGF na pneumocyty typu II je v souladu s pozorováním, že množství KGF receptorové mediátorové RNA v plicích na ekvivalentní vzorek celkové RNA je dvakrát až třikrát vyšší než hladina, zjištěná v různých jiných orgánech mladé dospělé krysy. Při tomto pokusu se hladina KGF receptorové mediátorové RNA stavuje za použití modifikované zkoušky Ambion
35 RNase Protection Assay (RPA II, č. 1 410).

Próba antimediatorové RNA, které se používá při této zkoušce, má následující sekvenci (SEQ. ID NO.: 3)

40 5' GAAUACGAAUCCUUGCUGUUUGGGCAGGACAGUGA–
GCCAGGCAGACUGGUUGGCCUGCCCUAUAAUUGG–
AGACCUUACAUAAUAAUUCGCCAGCAUCCAUCUCCG–
UCACAUUGAACAGAGCCAGCACUUCUGCAUUGGAGC–
45 UAUUUAUCCCCGAGUGGAUC 3'

Antimediatorová próba se vyrobí za použití soupravy Promega Riboprobe Gemini II kit (č. P2020) z linearizované teplátové DNA kódující odpovídající sekvenci DNA, popsanou výše. RNA próba se purifikuje na močovínopolyakrylamidovém gelu vyříznutím pásu o správné velikosti a elucí RNA próby pomocí roztoku Ambion Solutin F.

50 Mediátorová RNA (standard) kódující komplementární sekvenci RNA vzhledem k antimediatorové próbě má následující sekvenci (SEQ. ID NO.: 4)

5' GGGAGACAAGCUUGCAUGCCUGCAGGUCGACUCUAG–
 AGGAUCCACUCGGGGAUAAAUAGCUCCAAUGCAGAA–
 GUGCUGGCUCUGUCAAUGUGACGGAGAUGGAUGCU–
 GGGGAUAUAUAUGUAAGGUCUCCAAUUAUAUAGGG–
 5 CAGGCCAACAGUCUGCCUGGCUCACUGUCCUGCCCA–
 AACAGCAAGG 3'

Mediátorový standard se připraví „chladný“ (bez radioaktivního značení) za použití soupravy Promega Riboprobe Gemini II kit (č. P2020) a purifikuje se na sloupci G50 Sephadex Quick Spin Column.

Podle standardního protokolu Ambion (RPA II č. 1 410) se 50 µg úplné RNA inkubuje s 10⁵ cpm/próba, nejprve 4 minuty při 95 °C a potom 12 až 18 hodin při teplotě 45 °C. RNáza (1: 500 Ambion roztok R) se inkubuje s hybridizačním roztokem 40 minut při 37 °C a potom se k ní přidá inaktivační/precipitační činidlo (roztok Dx).

RNáza–chráněné fragmenty se oddělí podle velikosti elektroforézou na močovínopolyakrylamidovém gelu a celý gel se exponuje na fosforimageru. Pásky se kvantifikují pomocí zařízení Molecular Dynamics Phosphorimager. Výstelky jsou uvedeny na obr. 14.

Identifikace KGF jako růstového faktoru pneumocytů typu II zvyšuje možnost, že KGF bude vykazovat podobný terapeutický potenciál, jako mají glukokortikoidy, jakožto stimulatory maturace fetálních plic. KGF by také mohl být klinicky užitečný při stimulaci bronchoalveolární opravy po poranění plic u dospělých. Proliferační účinek KGF na pneumocytu typu II naznačuje, že KGF by mohl hrát důležitou úlohu při regulaci syntézy a sekreci surfaktantu.

Příklad 3

30 KGF–stimulovaná proliferace a diferenciacie hepatocytů.

V tomto příkladu se vyhodnocují účinky systematicky podané KGF na epitelové tkáně jater dospělých krys.

35 Materiály a metody

Samci krysy, použité jako zkušební zvířata, dostávají vodu a potravu ad libidum. Všechna zvířata dostávají po dobu 1, 4 nebo 7 dnů jednou denně intraperitoneální injekci KGF nebo PBS. Při všech experimentech se používá alespoň pět zvířat v každé skupině.

40 Krysy se usmrtí zadušením oxidem uhličitým a odebere se jim krev pro sérovou chemii srdeční punkcí okamžitě po usmrcení. Sérum se určuje ve zmrazeném stavu až do použití při zkoušce. U séra se provádí standardní chemická analýza na elektrolyty. Játra se zváží a jejich hmotnost se vyjádří v g/100 g tělesné hmotnosti, tj. jako procentický podíl tělesné hmotnosti. Vzorky tkáně se umístí do 10 % pufovaného formalinu pro rutinní histologické zpracování.

Řezy z jater se obarví hematoxylinem a eosinem H a E). Jednu hodinu před usmrcením se krysám podá intraperitoneální injekcí 50 mg/kg BrdU. Provede se anti–BrdU imunohistochemie za účelem vizualizace inkorporace BrdU do DNA replikačních buněk.

50 Za použití kalibrované okulárové mřížky se stanoví index značení (Labeling Index – LI) jater. Spočítá se 10 políček na jedno zvíře a vypočítá průměr. Dále se vypočítá celkový počet jater a značených jater na jednotku plochy. Pro standardizaci políček, o nichž se předpokládá, že

představují podobné plochy jaterního parenchymu, se pro počítání používá políček sousedících s portálovou triádou.

5 Všechna data se analyzují za použití nezdvojeného Studentova t-testu se dvěma větvemi nebo jednosměrného testu ANOVA pro porovnání více skupin.

Výsledky a diskuze

10 Provede se studie závislosti odpovědi na dávce pro identifikaci účinné dávky KGF. KGF se podává injekčně každý den po dobu 4 dnů a vyjmou se orgány. Hmotnost jater vyjádřená v jednotkách % tělesné hmotnosti se podstatně odlišuje od hmotnosti kontrolních jater pouze při nejvyšší dávce 5 mg/kg za den při porovnání testem ANOVA (viz obr. 15). Zajímavé je, že ve srovnání s kontrolními játry obsahují játra zvířat, kterým bylo podáváno KGF, sérové proteiny, cholesterol a triglyceridy, což jsou sloučeniny syntetizované v játrech, v podstatně větším množství, a to jak při dávce KGF 1 mg/kg, tak při dávce KGF 5 mg/kg (viz obr. 16).

20 Zvířata se analyzují po jednodenním, čtyřdenním nebo sedmidenním každodenním podávání KGF v dávce 5 mg/kg. Při zevrubné pitvě se zjistí, že játra jsou v době sedmého dne podstatně zvětšena. Hmotnost jater je podstatně vyšší ve všech studovaných časových bodech u krys ošetřených KGF (den 7., KGF $4,08 \pm 0,08$ % versus kontrolní $3,49 \pm 0,06$ %, $p = 0,0003$).

25 Kvantifikace BrdU pozitivních jader vykazuje troj- až čtyřnásobné zvýšení u krys ošetřených KGF ve srovnání s kontrolou při jednodenním ošetření (viz obr. 7). Mitotický index (číslo), vyjádřený jako počet mitóz na políčko ve srovnání s kontrolou, což je konzistentní s počtem BrdU.

30 Tyto výsledky ukazují silné mitogenní a diferenciační účinky KGF na játra. Rychlé zvýšení hmotnosti jater po jednodenním ošetření KGF spolu se zvýšeným mitotickým indexem a BrdU-pozitivní frakcí ukazují, že KGF má rychlé a silné účinky na tuto převážně epitelovou tkáň. Přestože mitotické účinky KGF rychle mizí, hmotnost jater, vyjádřená jako procentický podíl tělesné hmotnosti, při studiích dále stoupá. Zvýšená hmotnost je převážně způsobena zvýšením počtu buněk, které byly histologicky pozorovatelné již při jednodenním ošetření a zůstaly zachovány i při čtyřdenní a sedmidenní ošetření. Jelikož se při regeneraci jater může hmotnost jater zvýšit více než dvojnásobně za méně než 2 týdny, není zjištění významných rozdílů, počínaje pro jednodenní ošetření, překvapující.

40 Zvýšená hladina albuminu není spojena s žádnou jinou známou chorobou, než je dehydratace. KGF pravděpodobně indukuje zvýšenou hladinu albuminu (a jiných proteinů) v séru díky zvýšenému počtu přítomných hepatocytů. Zvýšení syntézy proteinu, indukované KGF, by představovalo obrovský užitek pro pacienty s konečným stádiem jaterní choroby nebo cirhózy jater, který by jim mohl zachránit život.

Příklad 4

45 KGF–stimulovaná proliferace a regenerace jaterních buněk po částečné hepatektomii in vivo.

Při tomto pokusu se jako zkušebních subjektů používá samců krysy Sprague–Dawley o hmotnosti 300 až 340 g.

50

Materiály a metody

U všech krys se provede částečná hepatektomie (2/3) způsobem, popsáným v Higgins a Anderson, Archives of Pathology, sv. 12 str. 186 (1931). Počínaje 8 hodinami po chirurgickém zákroku a
 5 potom jednou denně se krysám subkutánně vstříkne buď PBS (kontrolní skupina) nebo KGF
 v dávce 1 mg/kg. Kontrolní i KGF-ošetřené krysy se zváží a usmrtí 4, 7, 10 nebo 14 dnů po
 chirurgickém zákroku. Zvířatům se odstraní zbytky jater, a ty se zváží.

Výsledky a diskuze

10 Zjistilo se, že ošetření částečně hepatektomizovaných krys KGF se projeví podstatným
 urychlením regenerace jaterní hmoty, a to jak absolutně, tak relativně (viz obr. 18 a 19). U
 skupiny léčené KGF se jaterní hmota vrátí na hodnotu před chirurgickým zákrokem do 7 dnů.
 Naproti tomu u kontrolní skupiny (která nebyla ošetřena KGF) se nedostane absolutní ani
 15 relativní regenerace jaterní hmoty ani po 14 dnech.

Příklad 5

20 Léčebné účinky KGF na chemicky indukovanou jaterní toxicitu.

Pro vyhodnocení terapeutického účinku KGF na játra po zavedení chemického toxinu se používá
 samců krysy Sprague-Dawley o hmotnosti 300 až 240 g.

25 Podávání

Skupinám po 12 samcích Sprague-Dawley se v den 0 podá tetrachlormethan v dávce 1 ml/kg
 nebo 2 ml/kg v kukuřičném oleji jako vehikulu. Každá skupina s jedním dávkováním se rozdělí do
 dvou podskupin po 6 krysách. Počínaje 3 hodinami po podání tetrachlormethanu a potom každý
 30 den se každé podskupině subkutánní injekcí podívá buď PBS nebo KGF v dávce 1 mg/kg/den.
 Po 22, 72 a 144 hodinách po podání tetrachlormethanu se každé kryse odebere krevní vzorek a
 stanoví se hladina glutamát-oxaloacetát transaminázy (SGOT) v séru.

Výsledky a diskuze

35 Jak je zřejmé z obr. 20, subkutánní injekce KGF po orálním podání tetrachlormethanu podstatně
 snižuje hladinu enzymu SGOT, který je známým indikátorem poškození jater, v krevním séru.
 Tento účinek je obzvláště zřejmý při podání tetrachlormethanu v dávce 2 ml/kg první den po
 podání.

40

Příklad 6

KGF-stimulované proliferace a diferenciacie epitelových buněk střevní sliznice.

45

Tento příklad ukazuje biologické účinky KGF na epitelové buňky střevní sliznice zdravých krys.

Materiály a metody

50 Samci krysy, použít jako zkušební zvířata, dostávají vodu a potravu ad libitum. Všechna zvířata
 dostávají po dobu 1, 4 nebo 7 dnů jednu denně intraperitoneální injekci KGF nebo PBS. Při všech
 experimentech se používá alespoň pět zvířat v každé skupině.

Krasy se usmrtí zadušením oxidem uhličitým. Hlavní orgány se zváží a jejich hmotnost se vyjádří v g/100 g tělesné hmotnosti (procenta tělesné hmotnosti). Vnitřnosti se rozdělí na neglandulární horní část trávicí trubice, žaludeční žlázy, tenké střevo a tlusté střevo. Vzorok tkání se umístí do 10% pufrovaného formalinu pro rutinní histologické zpracování.

Řezy ze všech odebraných orgánů se obarví hematoxylinem a eosinem (H a E). Jednu hodinu před usmrcením se krysám podá intraperitoneální injekce 50 mg/kg BrdU. Standardními metodami se provede anti-BrdU imunohistochemie za účelem vizualizace inkorporace BrdU do DNA replikačních buněk. Zvolené tkáně se obarví kyselinou jodistou-schiff (PAS), alcionovou modří při pH 2,5 a Masson-Trichrome.

Pro měření výšky žaludeční sliznice a hloubky vybarvení PAS s žaludeční sliznicí se použije kalibrovaného okuláru. Podobně se změří délka klků a hloubka střevních krypt ve dvanáctníku a hloubka tračnickových krypt. Pro kvantifikaci změn produkce pohárkovitých buněk se zjistí počet PAS-pozitivních pohárkovitých buněk na délce 100 μ m, počínaje u základny dvanáctníkového klku. Ve všech oblastech vnitřnosti se měření provádějí pouze na žlázách nebo klcích, které jsou kolmé k podkladové svalovině. Výsledky jsou uvedeny v μ m, nebo v případě malých intestinálních pohárkovitých buněk je uveden průměrný počet na jednotku plochy. Kromě toho se stanoví počet tračnickových krypt a počet hyperplastických (dvojitě nebo trojitě rozvětvených) krypt, zaujímajících definovanou délku tračnicku. U každého zvířete se provede 5 až 10 opakovaných měření a vypočítá se z nich průměr.

Všechna data se analyzují za použití nezdvojeného Studentova t-testu se dvěma větvemi nebo jednosměrného testu ANOVA pro porovnání více skupin (Statview II, Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA).

Výsledky a diskuze

Nejprve se provede studie závislosti odpovědi na dávce pro identifikaci účinné dávky KGF. KGF se podává injekčně každý den po dobu 4 dnů a vyjmou se orgány. Významná odpověď na dávku je pozorována u žaludečních žláz, tenkého střeva a tračnicku (obr. 15).

Zvířata se analyzují po jednodenním, čtyřdenním nebo sedmidenním každodenním podávání KGF v dávce 5 mg/kg. Při zevrubné pitvě se zjistí, že po čtyřdenním a sedmidenním ošetření je horní část trávicí trubice značně ztlustěna záhyby sliznice. Horní část trávicího traktu, žaludeční žlázy, dvanáctník a tračník vykazuje podstatné zvýšení hmotnosti po čtyřdenním a sedmidenním podávání, ale nikoliv po jednodenním podávání. Hmotnost žaludečních žláz po sedmidenním ošetření je $0,65 \pm 0,01$ g v případě zvířat ošetřených KGF a $0,48 \pm 0,02$ g v případě kontrolních zvířat ($p = 0,001$).

Neglandulární horní část trávicí trubice vykazuje podstatně zvýšenou hmotnost po čtyřdenním a sedmidenním ošetření. Na základě histologického vyšetření se zjistí, že šupinatý epitel neglandulární horní část trávicí trubice je mírně (po čtyřdenním ošetření) až výrazně (po sedmidenním ošetření) hyperplastický u zvířat, ošetřených KGF. Proliferační epitel se náhle mění u cardia z normálního šupinatého epitelu jícnu na proliferaci epitelu horní části trávicí trubice. Po jednodenním ošetření je glandulární gastrická mukóza z histologického hlediska normální. Po čtyřdenním a sedmidenním ošetření se při histologickém vyšetření zjistí zvýšený počet pohárkovitých buněk, jakožto buňky s otevřenou cytoplazmou. Zvířata, ošetřovaná KGF po dobu 4 a 7 dnů, vykazují mírné zvýšení tloušťky sliznice (obr. 21). Po sedmidenním ošetření je slizotvorná adnexální vrstva mukozálních buněk rozšířena a přemístěna k serosálnímu povrchu. Vybarvení PAS po čtyřdenním a sedmidenním ošetření vykazuje nápadný nárůst počtu a velikosti PAS pozitivních (mucin produkujících pohárkovitých buněk). Pomocí řezů barvených BrdU je tato vrstva dále identifikována jako vrstva dělicích se buněk v žaludečních žlázách, vykazující

nárůst proliferačních buněk během ošetření. Tloušťka PAS pozitivní vrstvy lumenálního povrchu gastrické mukózy je také významně zvýšena po čtyřdenním a sedmidenním ošetření KGF (obr. 21).

- 5 Tenké střevo je ve všech časových bodech studie zhruba normální. Barvení PAS ukazuje zvýšený počet pohárkovitých buněk, produkujících mucus. Tento rozdíl je významný po čtyřdenním a sedmidenním ošetření (obr. 22). Výška klků se neliší v žádném okamžiku, ale hloubka krypt je podstatně větší po jednodenním a sedmidenním ošetření (obr. 22).
- 10 Po sedmidenním ošetření tvoří sliznice tračníku zvrásněné záhyby, které významně zvyšují celkovou povrchovou plochu. Indikátory hyperplazie, dvojnásobně a trojnásobně rozvětvené tračnickové krypty, jsou pozorovány ve všech skupinách, včetně kontrolních skupin, ale nejčastější a nejnapadnější jsou u krátkodobě ošetřovaných skupin, tj. u skupin, ošetřovaných jeden a čtyři dny, přičemž počet hyperplastických krypt klesá s délkou ošetření (obr. 23). Tomu odpovídá
- 15 hloubka krypt v tračníku, která se zvětšuje s délkou ošetření (obr. 24).

Barvení PAS a alcianovou modří ukazuje zvýšení pohárkovitých buněk, produkujících mucus v tračníku po ošetření KGF. Kromě toho počet pohárkovitých buněk, pozitivních na alcianovou modř na lumenálním povrchu, je vyšší po sedmidenním ošetření u všech zkoušených zvířat. Zvířata, která byla ošetřována již jen 4 dny, vykazují významné zvýšení PAS pozitivních buněk v horní polovině a jedné třetině krypt tračníku.

Tyto výsledky ukazují, že KGF má silné mitogenní a diferenciacní účinky na epitelové tkáně gastrointestinálního traktu. Ze značení BrdU je zřejmé, že KGF iniciuje proliferaci buněk ve slizotvorné adnexální vrstvě žaludeční sliznice. Tyto buňky tvoří progenitorové buňky žaludečních žláz. Po rozdělení migrují buňky z této vrstvy vzhůru směrem k průsvitu vnitřností a vytvářejí povrchové buňky, nebo dolů k serosálnímu povrchu, kde se stávají buňkami, které vytvářejí žaludeční žlázy (Toner et al., 1989, Gastrointestinal and Esophageal Pathology, Churchill Livingstone, New York, NY, USA, str. 1328). KGF kromě toho podporuje selektivní

- 25 diferenciaci slizotvorných adnexálních buněk na buňky, které se pohybují směrem vzhůru a stávají se pohárkovitými buňkami. Celková tloušťka žaludeční sliznice je po čtyřdenním a sedmidenním ošetření zvýšena. Podobné účinky jsou pozorovány v tenkém a tlustém střevě. KGF podporuje zvýšené dělení buněk, které má za následek vznik protáhlých krypt, prostřednictvím stimulace progenitorových buněk. KGF také indukuje diferenciaci dělicích se buněk krypt, což je
- 30 zřejmé ze zvýšené produkce slizu a vyššího počtu pohárkovitých buněk v klcích nebo kryptách.

Vynález byl popsán na specifických provedeních a příkladech, která však pro něj nepředstavují žádné omezení. Pro popsání použití je například možno použít jakékoliv formy KGF, která má v podstatě shodné biologické vlastnosti jako přírodní KGF. Takové formy zahrnují samotný

- 40 purifikovaný přírodní KGF, KGF syntetizovaný chemickými postupy a KGF získaný rekombinací za použití jiných expresních systémů než těch, které jsou uvedeny výše, jakož i jejich analogy, varianty, chiméry atd., založené na přírodní aminokyselinové sekvenci. Všechny těchto forem je možno použít při provádění tohoto vynálezu.

Odborníkům v tomto oboru je také zřejmé, že pro expresi sekvence kódující protein KGF je možno použít různých systémů hostitel–vektor. Tyto systémy zahrnují systémy na bázi savčích buněk, infikovaných virem (například vacciniavirem, adenovirem atd.); systém na bázi hmyzích buněk, infikovaných virem (například baculovirem); mikroorganismy, jako jsou kvasinky, obsahující kvasinkové vektory, nebo jiné bakterie kromě *E. coli*, které jsou transformovány

- 50 bakteriofágovou DNA, plazmidovou DNA nebo kozmidovou DNA. Na výše uvedený výčet systémů se vynález také neomezuje. Expresní elementy těchto vektorů se mohou lišit ve své síle a specifitě. V závislosti na použitém systému hostitel–vektor se může použít kterýchkoliv z řady vhodných transkripčních a translačních elementů.

Poté, co byl proteinový produkt KGF z exprese cDNA izolován, purifikován a poté, co byla u něho stanovena aktivita KGF za použití metod, opsaných v tomto textu, nebo za použití jiných postupů, známých odborníkům v tomto oboru, je možno ho zpracovat na různé farmaceutické prostředky. Tyto farmaceutické prostředky typicky obsahují vhodný, obvykle chemicky definovaný nosič nebo excipient pro toto terapeutické činidlo, tj. KGF a také jiné přísady, v závislosti na zamýšleném způsobu podávání. Prostředky mohou obsahovat vodné nosiče, nebo se může jednat o prostředky v tuhé fázi, v nichž je KGF zaveden do nevodných nosičů, jako jsou kolageny, kyselina hyaluronová a různé polymery. Takové prostředky je možno účelně zpracovávat na formy vhodné pro různé způsoby podávání, jako je injekční, orální, topické, intranasální a pulmonární podávání.

Odborníkům v tomto oboru je také zřejmé, že množství dávkovaného KGF se bude měnit v závislosti na léčené chorobě a způsobu podávání. Jako orientační vodítko pro účinnou dávku je možno uvést například dávku v rozmezí od 0,01 do 500 mg/kg tělesné hmotnosti. Takovou dávku lze podávat jednorázově nebo opakovaně v závislosti na chorobě a stavu pacienta. Výše uvedené prostředky je možno podávat v kombinaci s jinými druhy léčby, jako například spolu s podáváním jiných cytokinů a růstových faktorů nebo jiných farmaceutických prostředků, vhodných pro léčbu chorob kůže, plic, jater a gastrointestinálního traktu.

SEZNAM SEKVENCÍ

(1) OBECNÉ INFORMACE:

- (i) PŘIHLAŠOVATEL: Amgen Inc.
- (ii) NÁZEV VYNÁLEZU: Therapeutic Uses of Keratinocyte Grown Factor
(Terapeutická použití růstového faktoru keratinocytů)
- (iii) POČET SEKVENCÍ: 4

(iv) ADRESA PRO KORESPONDENCI:

- (A) ADRESÁT: Amgen Inc.,
(B) ULICE: Amgen Cente, 1840 DeHavilland Drive
(C) MĚSTO: Thousand Oaks
(D) STÁT: Kalifornie
(E) ZEMĚ: USA
(F) PSČ: 91320-1789 (ZIP)

(v) STOJNĚ ČITELNÁ FORMA:

- (A) TYP MÉDIA: Disketa, 3,5 inch, DS, 2,0 Mb
(B) POČÍTAČ: IBM kompatibilní
(C) OPERAČNÍ SYSTÉM: MS-DOS
(D) SOFTWARE: Microsoft Word Version 5.1a

(vi) DATA VZTAHUJÍCÍ SE K TÉTO PŘIHLÁŠCE:

- (A) ČÍSLO PŘIHLÁŠKY:
(B) DATUM PODÁNÍ: 26. 3. 1993
(C) ZATŘÍDĚNÍ:

(2) INFORMACE O SEQ ID NO:1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 5 (A) DÉLKA: 55 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPLOGIE: lineární

10 (xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 1:

CGATTTGATT CTAGAAGGAG GAATAACATA TGGTTAACGC GTTGGAATTC
 GGTAC

15 (3) INFORMACE O SEQ ID NO: 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 20 (A) DÉLKA: 49 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 2:

25 CGAATTCCAA CGCGTTAACC ATATGTTATT CCTCCTTCTAA GAATCAAAT 49

(4) INFORMACE O SEQ ID NO: 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 30 (A) DÉLKA: 164 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 35 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 3:

40 GAAUACGAAUU UCCUUGCUGU UUGGGCAGGA CAGUGAGCCA GGCAGACUGG
 UUGGCCUGCC CUAUAUAAUU GGAGACCUUA CAUAUAUAUU CCCCAGCAUC
 CAUCUCCGUC ACAUUGAACA GAGCCAGCAC UUCUGCAUUG GAGCUAUUUA
 UCCCCGAGUG GAUC 164

(5) INFORMACE O SEQ ID NO: 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- 45 (A) DÉLKA: 191 bázových párů
 (B) TYP: nukleová kyselina
 50 (C) ŘETĚZCOVOST: jeden řetězec
 (D) TOPOLOGIE: lineární

(xi) POPIS SEKVENCE: SEQ ID NO: 4:

GGGAGACAAG CUUGCAUGCC UGCAGGUCGA CUCUAGAGGA UCCACUCGGG
 GAUAAAUAGC UCCAAUGCAG AAGUGCUGGC UCUGUUCAAU GUGACGGAGA
 UGGAUGCUGG GGAUAUAUA UGUAAGGUCU CCAAUUAUAU AGGGCAGGCC
 AACCAGUCUG CCUGGCUCAC UGUCCUGCCC AAACAGCAAG G 191

5

PATENTOVÉ NÁROKY

10

1. Použití růstového faktoru keratinocytů pro výrobu léčiva pro léčení nebo prevenci choroby nebo stavu, vyžadujícího stimulaci nefibroblastových epitelových buněk pacienta.
- 15 2. Použití podle nároku 1, kde choroba nebo stav, vyžadující stimulaci nefibroblastových epitelových buněk, je zvolen ze souboru, zahrnujícího
 - A) alopecii indukovanou chemoterapií;
 - B) žaludeční vřed;
 - 20 C) dvanáctníkový vřed;
 - D) erozi žaludku a jícnu, zejména erozivní gastritis, oesophagitis nebo oesophageální reflux;
 - E) zánětlivé choroby střev;
 - F) toxicitu pro vnitřnosti, vyvolanou ozářením nebo chemoterapií;
 - G) chorobu hyalinní membrány;
 - 25 H) nekrózu respiračního epitelu, vyvolanou vdechováním kouře;
 - I) emphysema;
 - J) plicní zánět a fibrózu;
 - K) cirhózu jater;
 - L) fulminantní selhání jater;
 - 30 M) akutní virovou hepatitis; a
 - N) toxické napadení jater.
3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde růstovým faktorem keratinocytů je přírodní, chemicky syntetizovaný nebo rekombinantně produkováný růstový faktor keratinocytů.
- 35 4. Použití podle některého z nároků 1 až 3, kde růstovým faktorem keratinocytů je rekombinantně produkováný růstový faktor keratinocytů, obsahující aminokyselinovou sekvenci přírodního lidského růstového faktoru keratinocytů.
- 40 5. Použití podle některého z nároků 1 až 4, kde růstový faktor keratinocytů obsahuje aminokyselinovou sekvenci, znázorněnou na obr.1, nebo její analog, variantu nebo chiméru.
6. Použití podle některého z nároků 3 až 5, kde rekombinantní růstový faktor keratinocytů je produktem bakteriálních buněk, přednostně E. coli.

45

25 výkresů

NdeI

KGF-dsd

TATGTGCAATGACATGACTCCAGAGCAAATGGCTACAAATGTGAACTGTTCCAGCCCTGA
ACACGTTACTGTACTGAGGTCTCGTTTACCGATGTTTACACTTGACAAGGTCGGGACT

M C N D M T P E Q M A T N V N C S S P E -

GCGACACACAAGAAGTTATGATTACATGGAAGGAGGGGATATAAGAGTGAGAAGACTCTT
CGCTGTGTGTTCTTCAATACTAATGTACCTTCCTCCCCTATATTCTCACTCTTCTGAGAA

R H T R S Y D Y M E G G D I R V R R L F -

KpnI

|-----syntetická DNA -----
CTGTGCAACACAGTGGTACCTGCGTATCGACAAACGCGGCAAAGTCAAGGGGCACCCAAGA
GACAGCTTGTGTCACCATGGACGCATAGCTGTTTGCGCCGTTTCAGTTCCCGTGGGTTCT

C R T Q W Y L R I D K R G K V K G T Q E -

GATGAAAAACAACCTACAATATTATGGAAATCCGTACTGTTGCTGTTGGTATCGTTGCAAT
CTACTTTTTGTTGATGTTATAATACCTTTAGGCATGACAACGACAACCATAGCAACGTTA

M K N N Y N I M E I R T V A V G I V A I -

EcoRI

-----|
CAAAGGTGTTGAATCTGAATTCTATCTTGCAATGAACAAGGAAGGAAAACCTCTATGCAAA
GTTTCCACAACCTTAGACTTAAGATAGAACGTTACTTGTTTCCTTCTTTTGAGATACGTTT

K G V E S E F Y L A M N K E G K L Y A K -

GAAAGAATGCAATGAAGATTGTAACCTTCAAAGAATAATTCTGGAAAACCATTACAACAC
CTTTCTTACGTTACTTCTAACATTGAAGTTTCTTGATTAAGACCTTTTGGTAATGTTGTG

K E C N E D C N F K E L I L E N H Y N T -

ATATGCATCAGCTAAATGGACACACAACGGAGGGGAAATGTTTGTGCTTAAATCAAAA
TATACGTAGTCGATTACCTGTGTGTTGCCTCCCCTTTACAAACAACGGAATTTAGTTTT

Y A S A K W T H N G G E M F V A L N Q K -

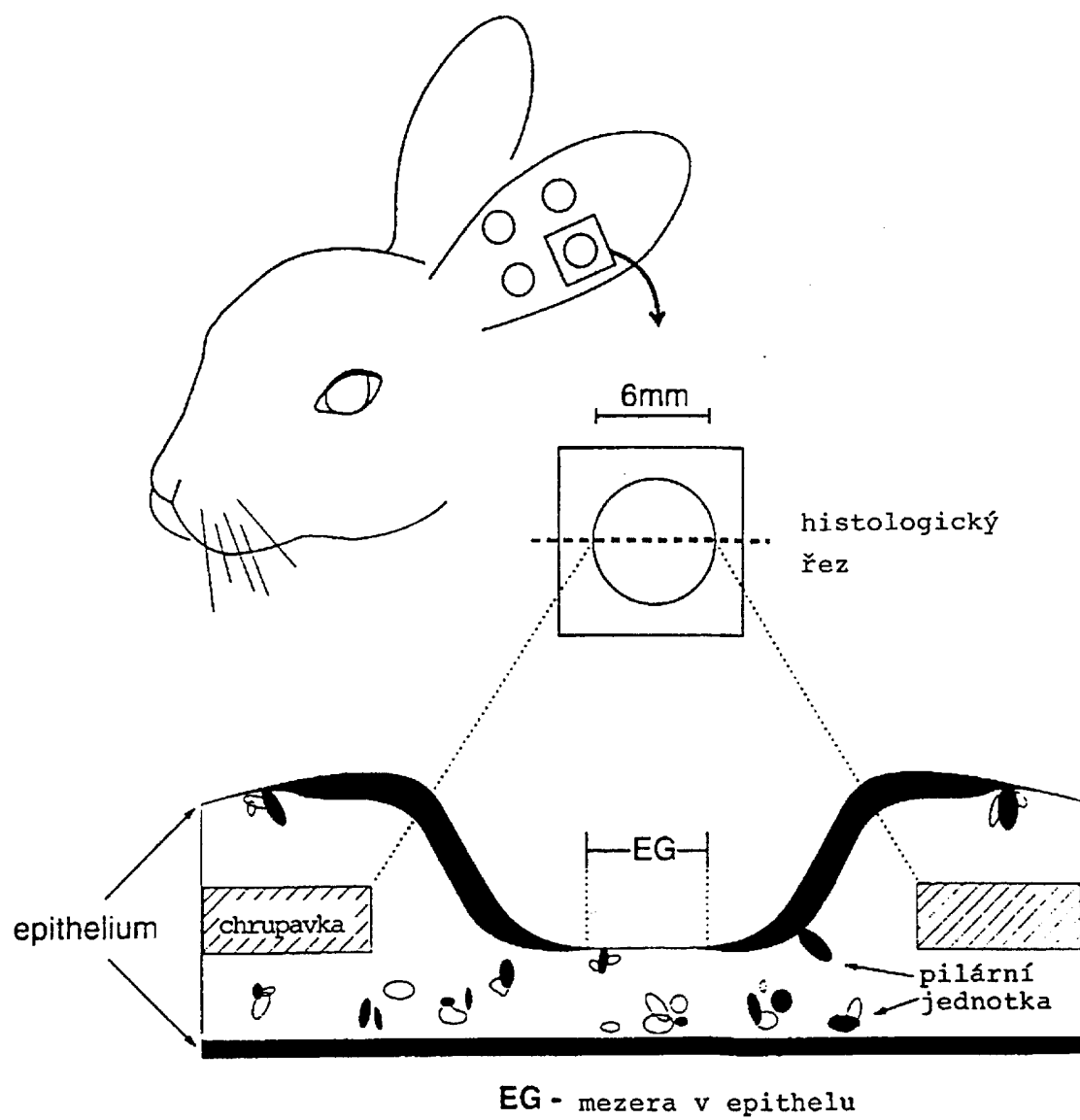
GGGGATTCCTGTAAGAGGAAAAAAAACGAAGAAAGAACAAAAACAGCCCACTTTCTTCC
CCCCTAAGGACATTCTCCTTTTTTTTGCTTCTTCTGTTTTTTGTCGGGTGAAAGAAGG

G I P V R G K K T K K E Q K T A H F L P -

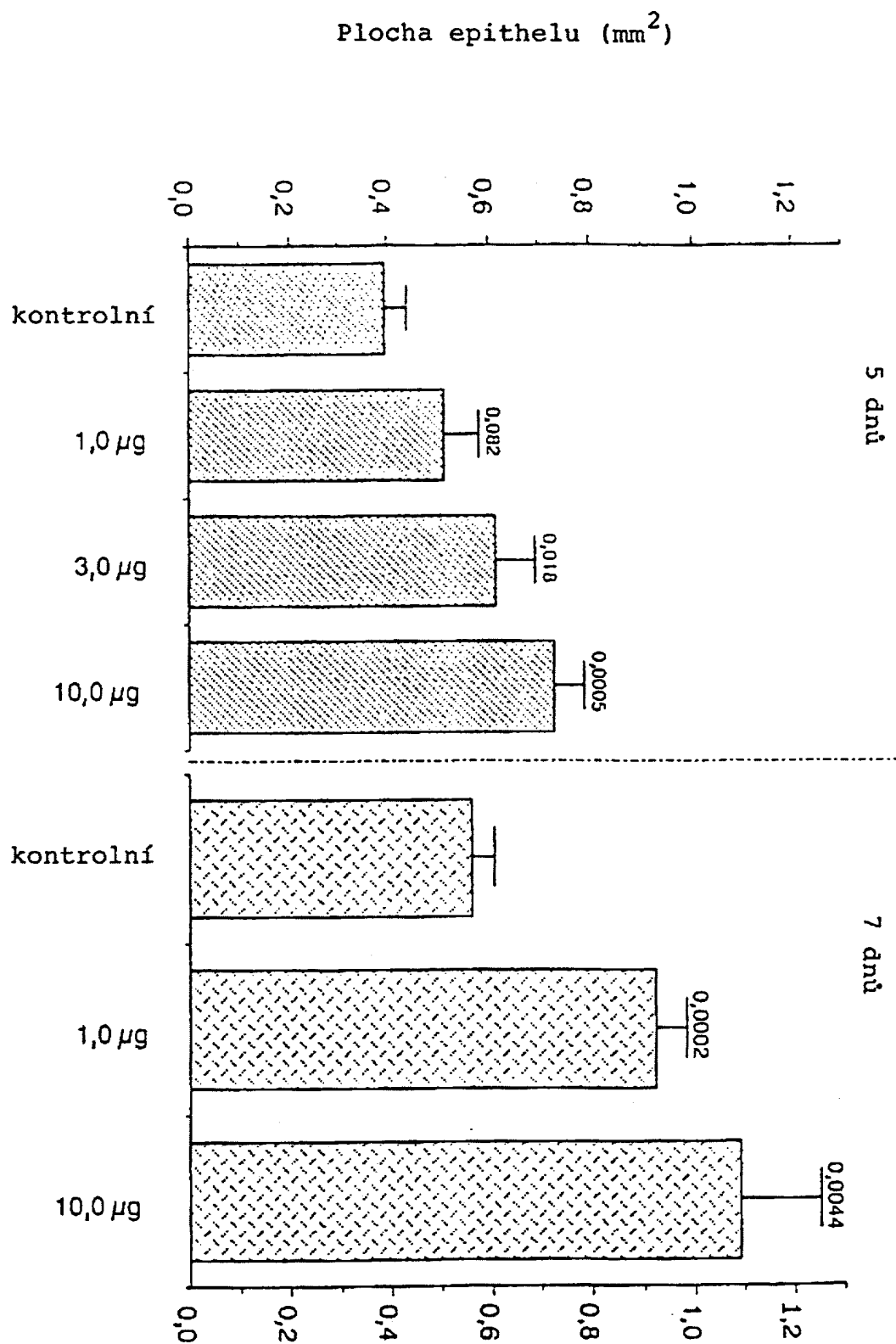
TATGGCAATAACTTAATAG
ATACCGTTATTGAATTATCCTAG

M A I T * BamHI

Obr. 1

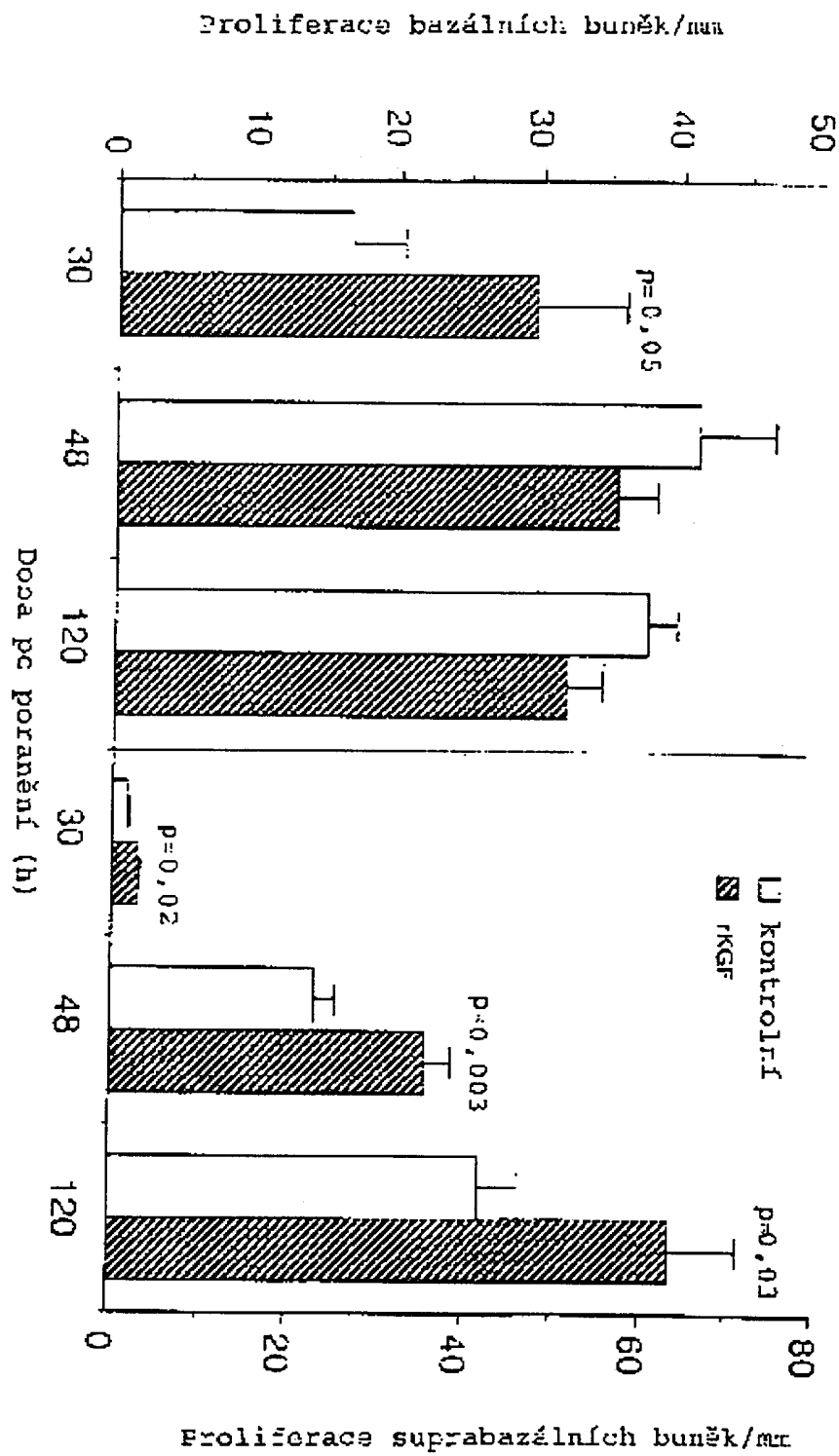


Obr. 2

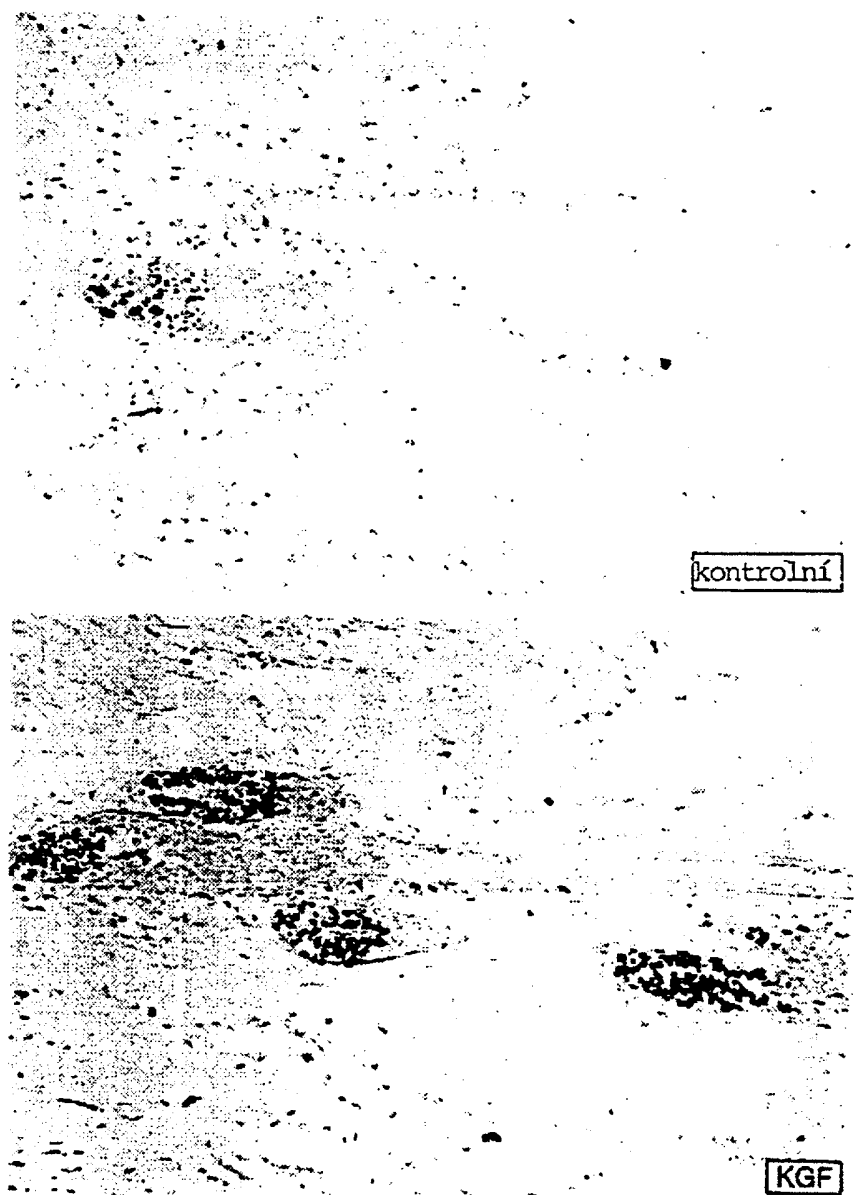


obr. 3

obr. 4



Účinek rKGF na keratinocyty



obr. 5



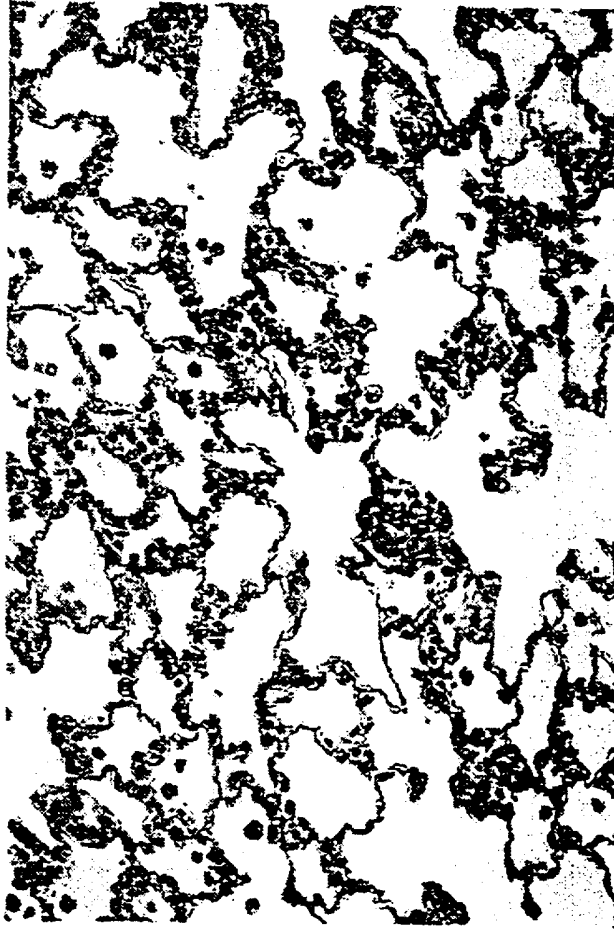
obr. 6



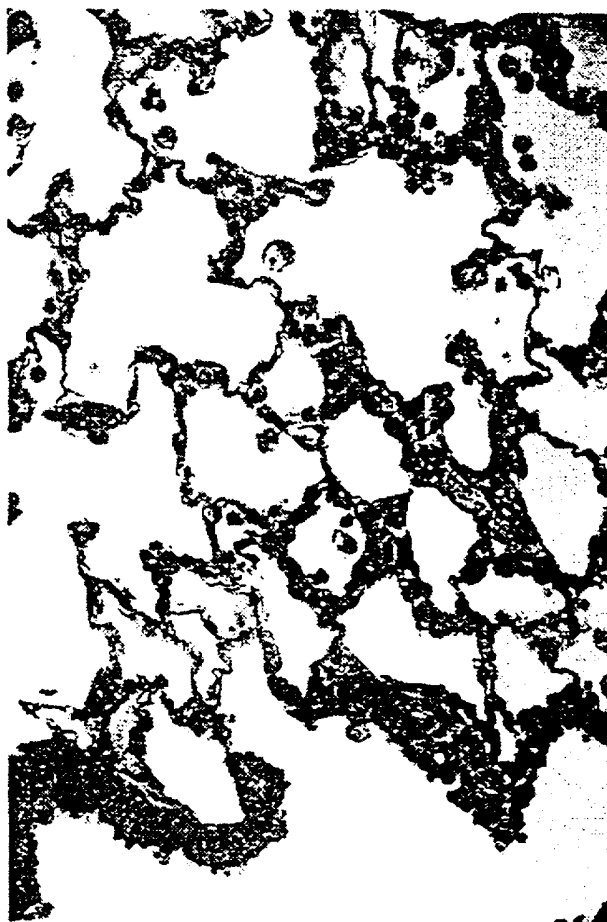
Obr. 7



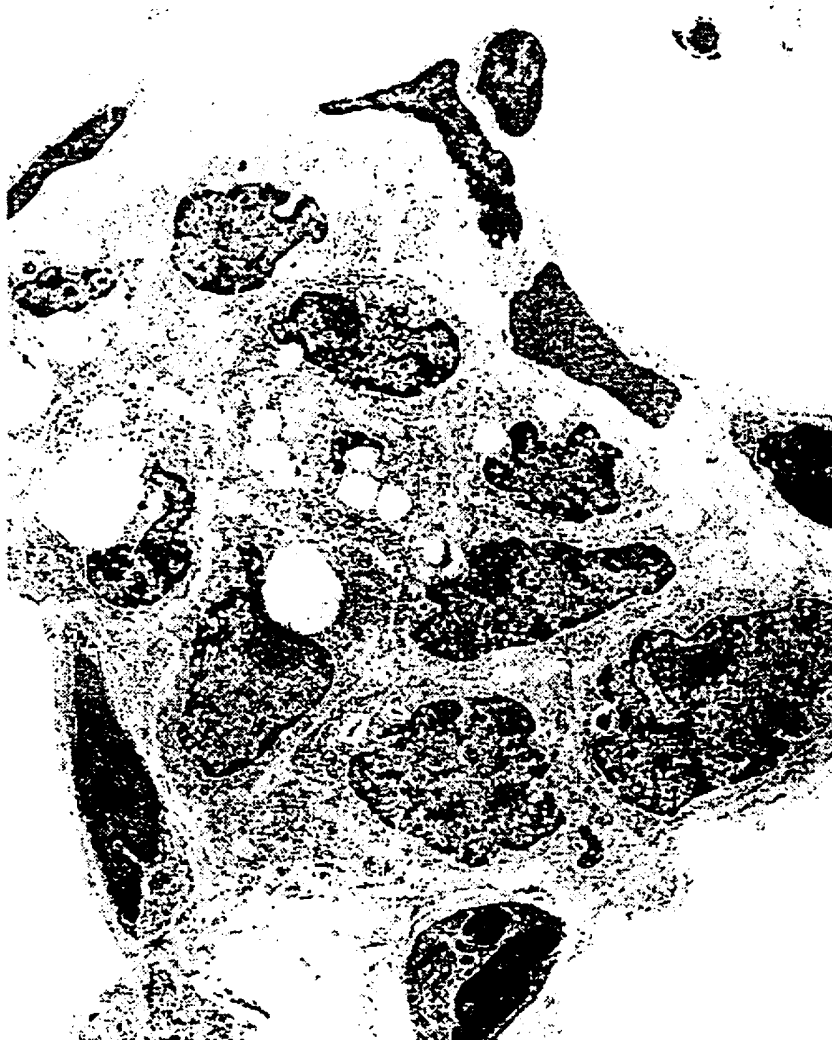
Obr. 8



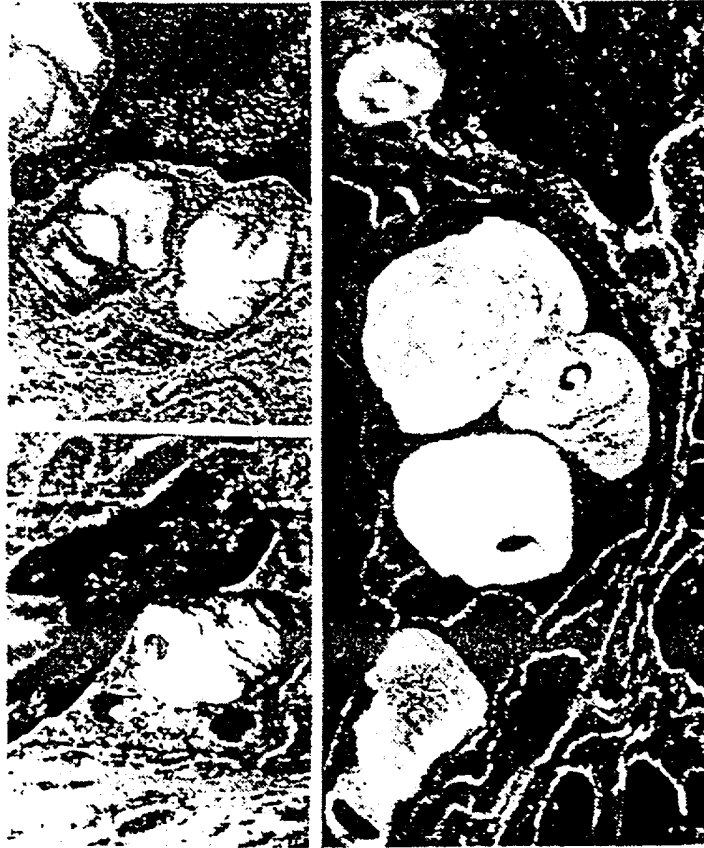
obr. 9



obr. 10



Obr. ||



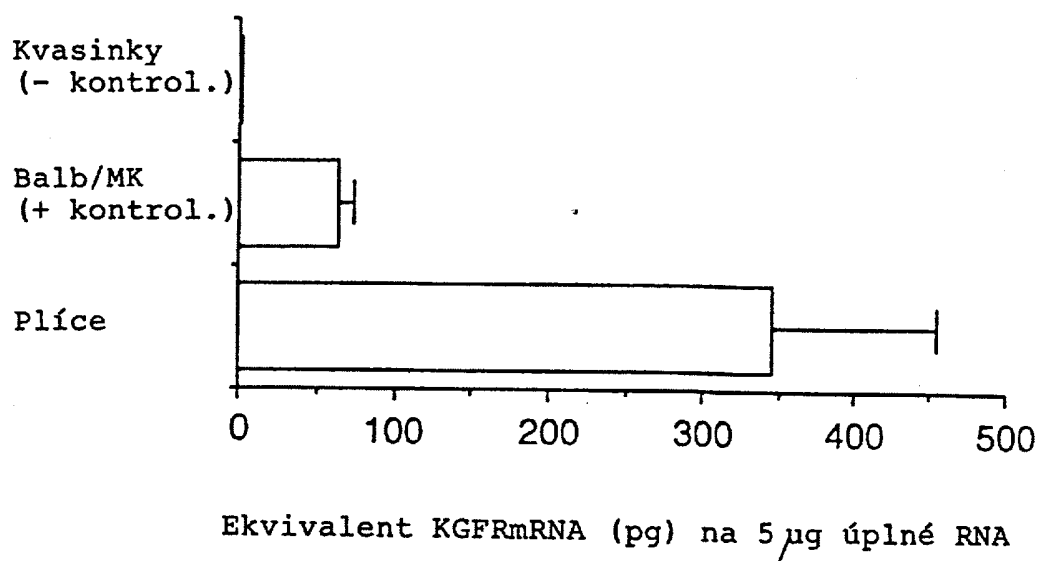
Obr. 12



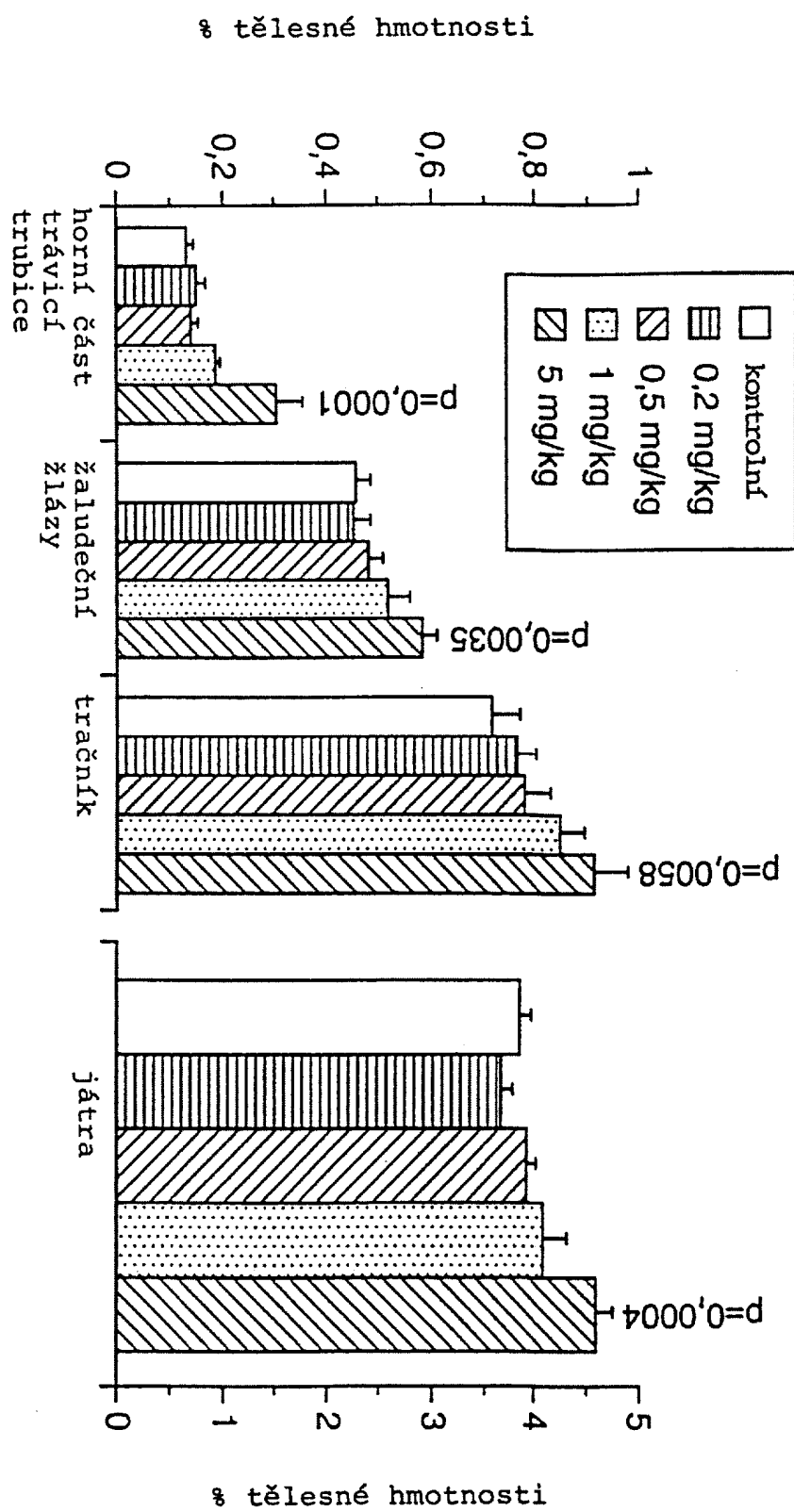
Obr. 13A



Obr. 13 B

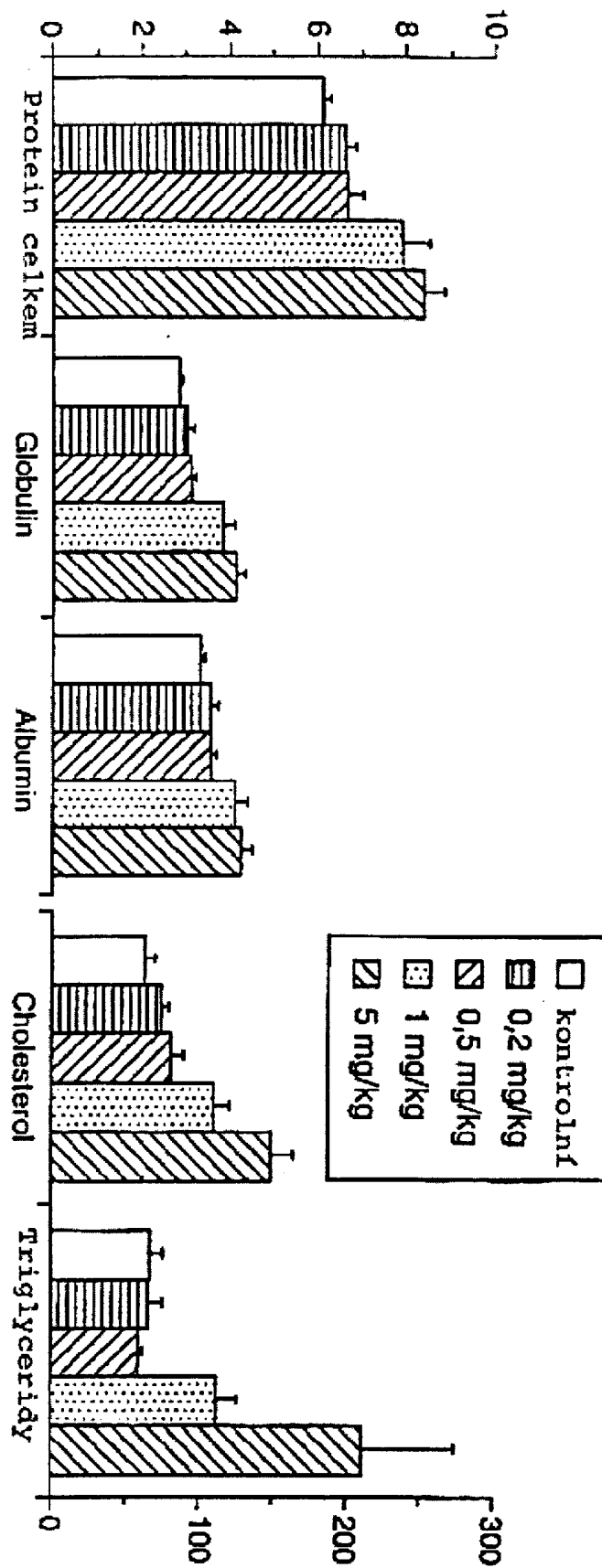


Obr. 14

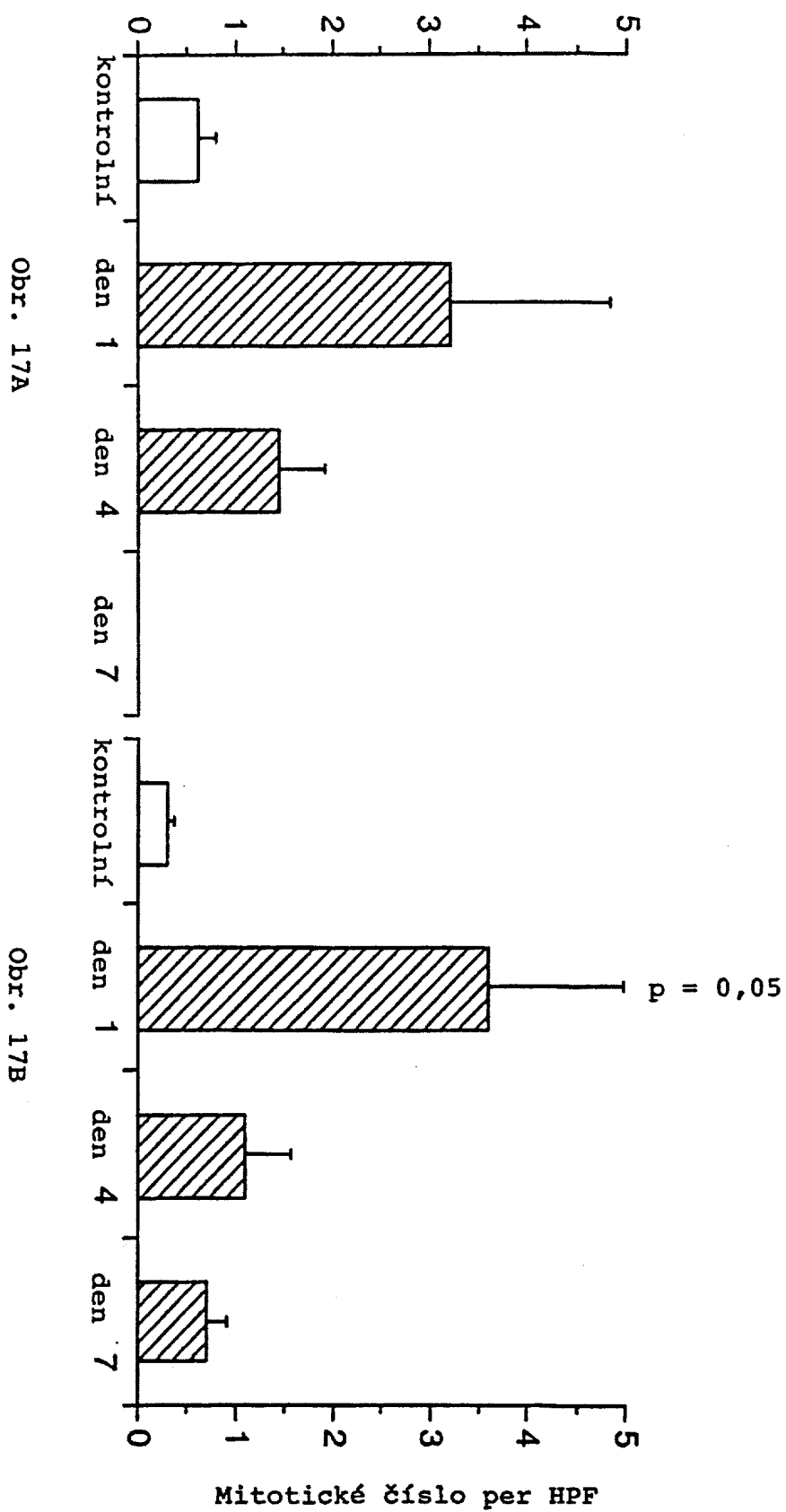


obr. 15

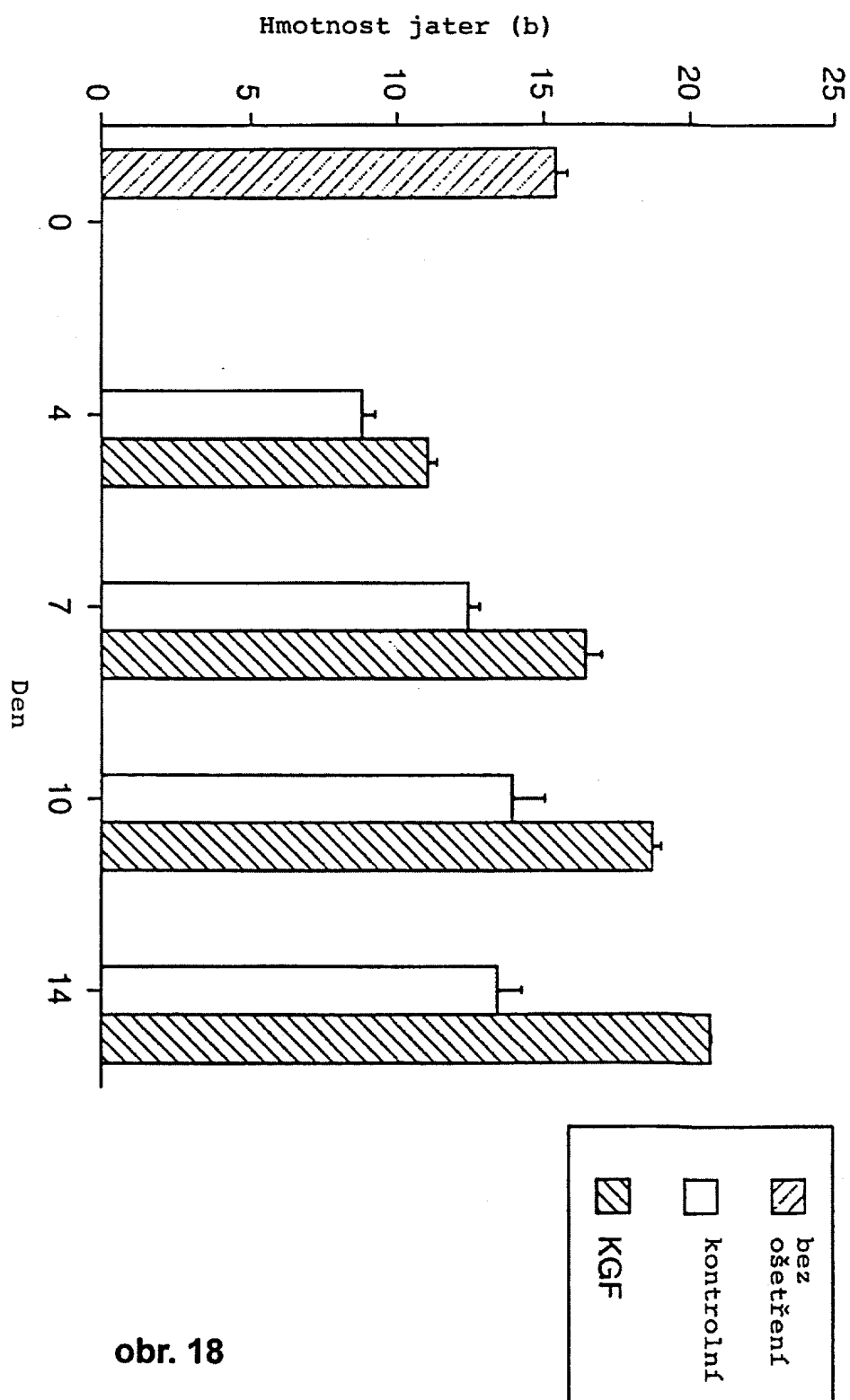
obr. 16



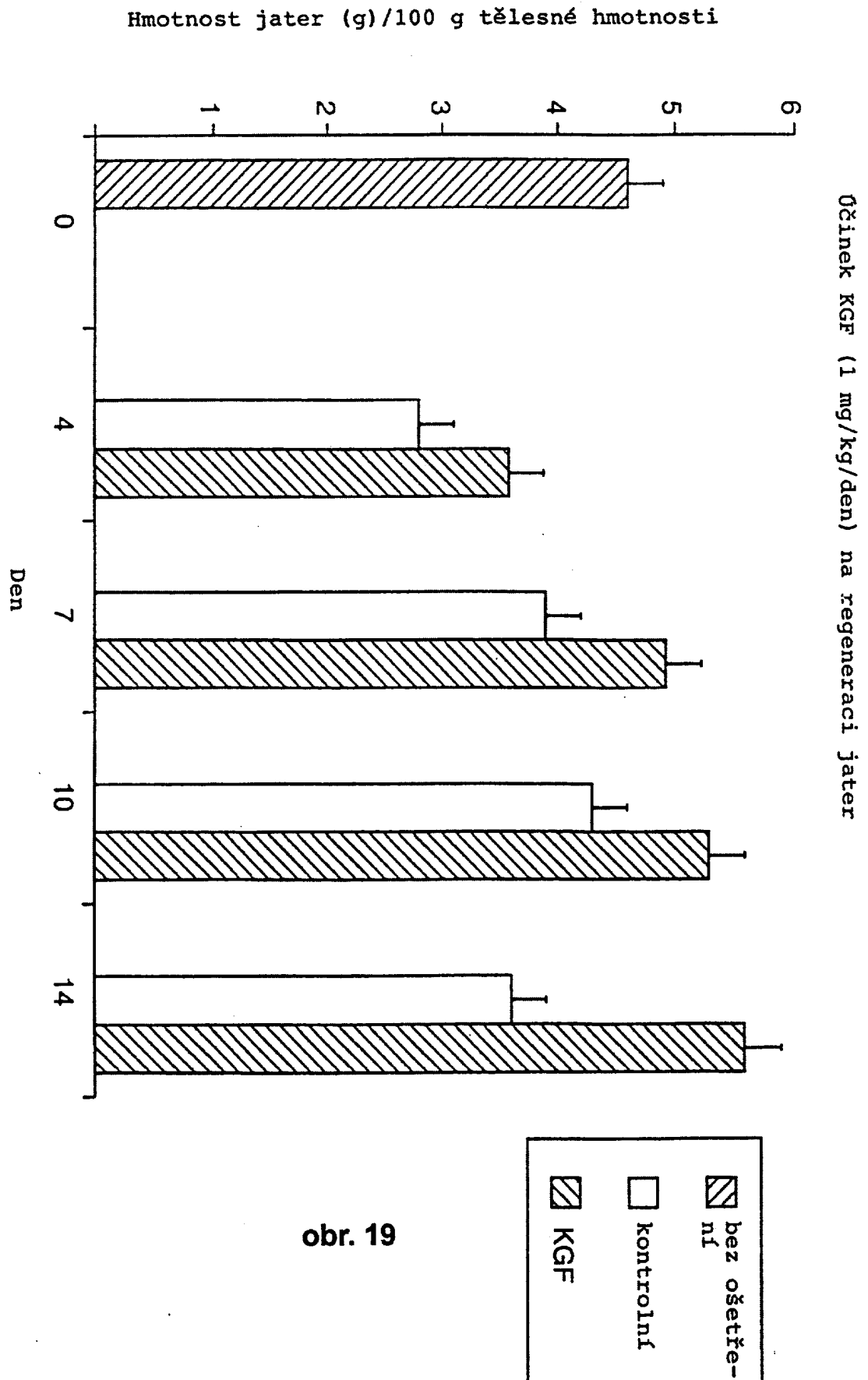
% BrdU značených hepatocytů

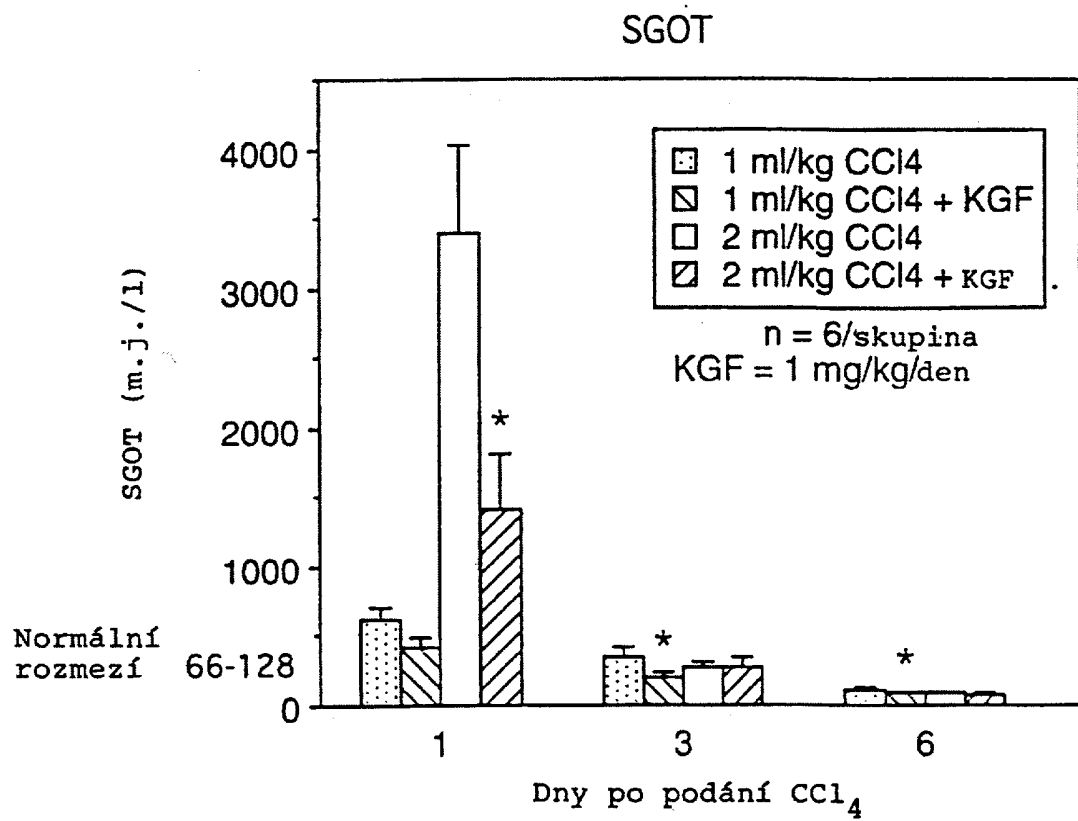


Účinek KGF (1 mg/kg/den) na regeneraci jater

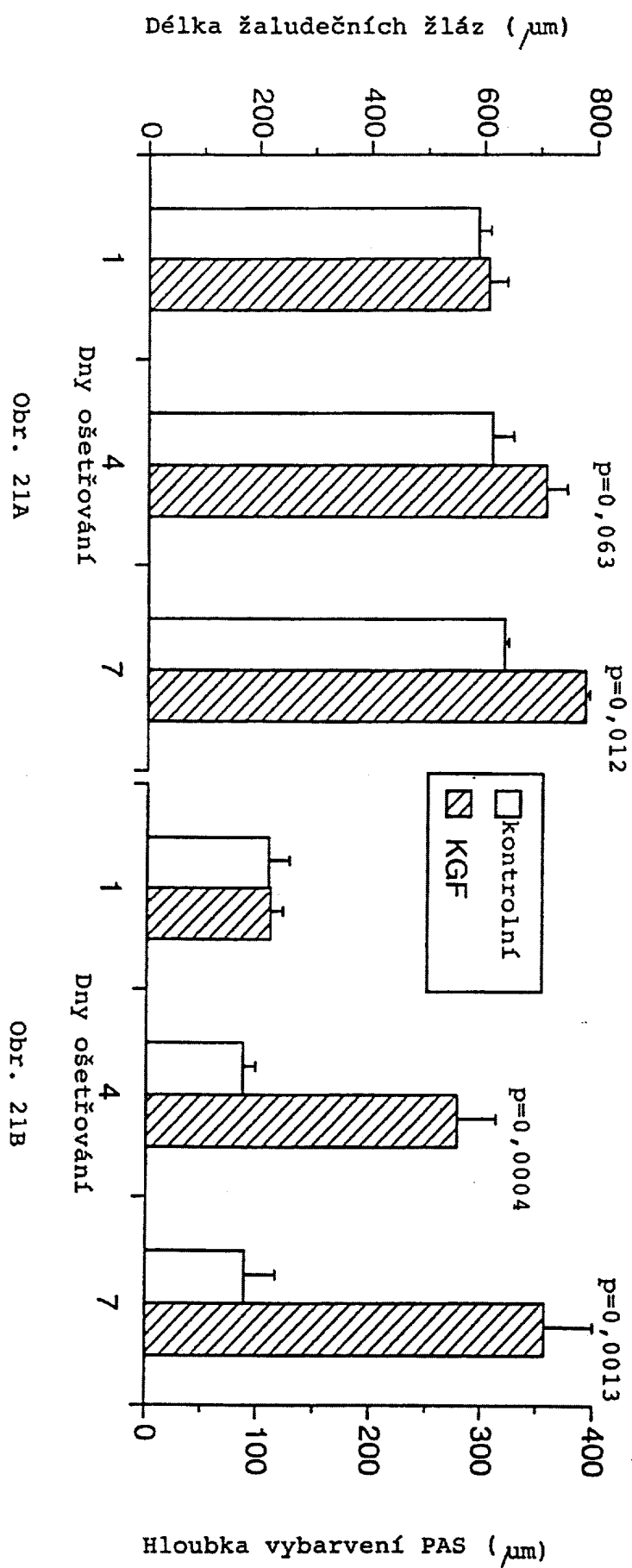


obr. 18



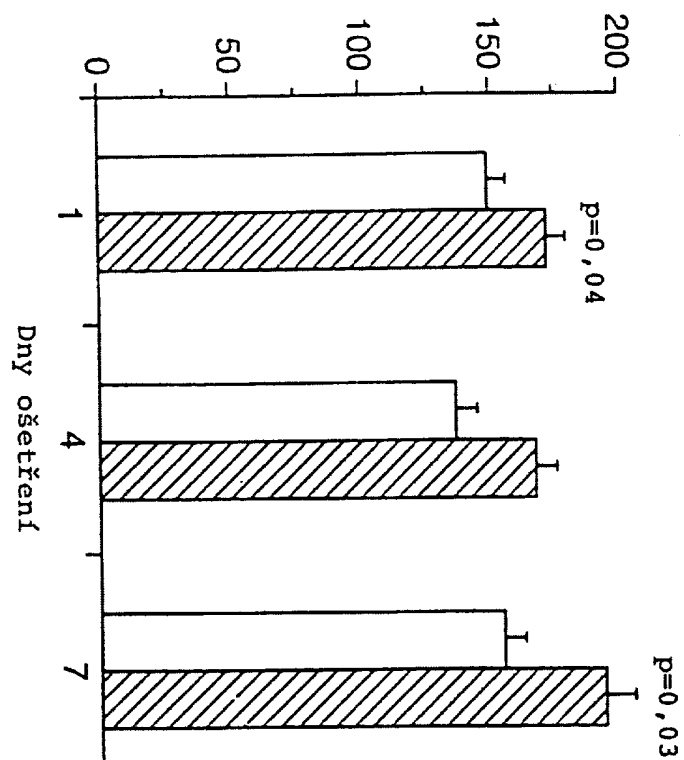


Obr. 20

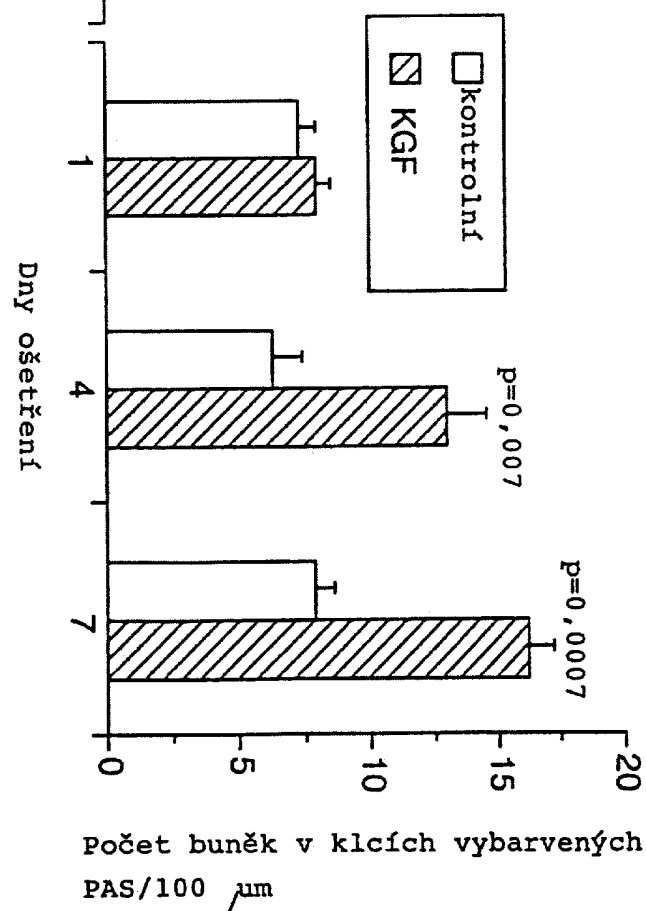


Obr. 21A

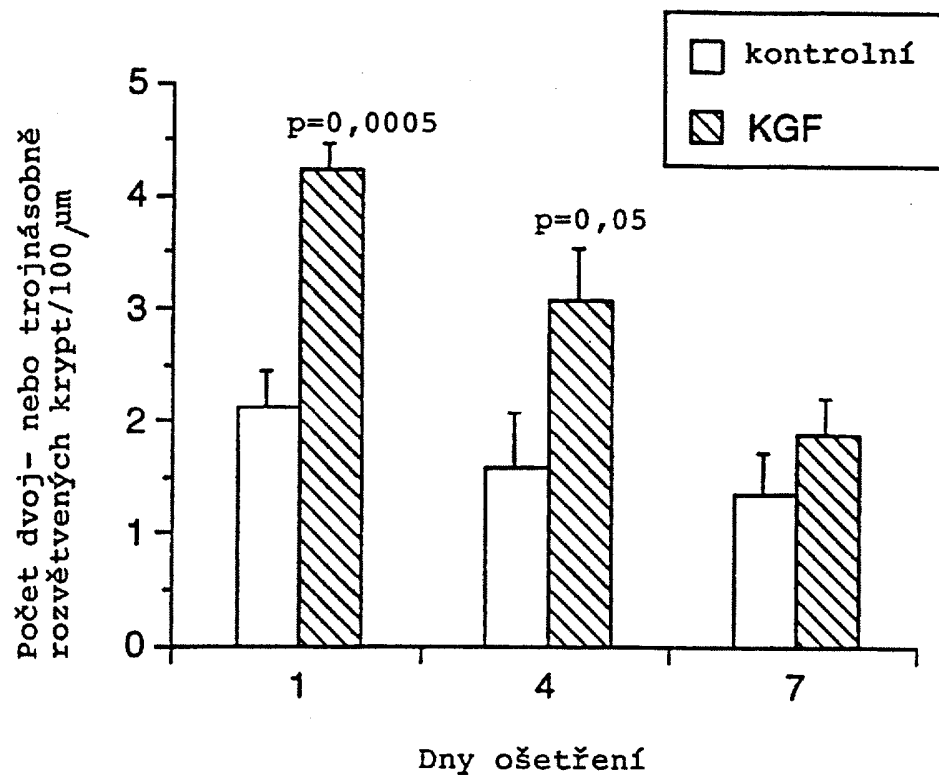
Obr. 21B

Hloubka dvanáctníkových krypt (μm)

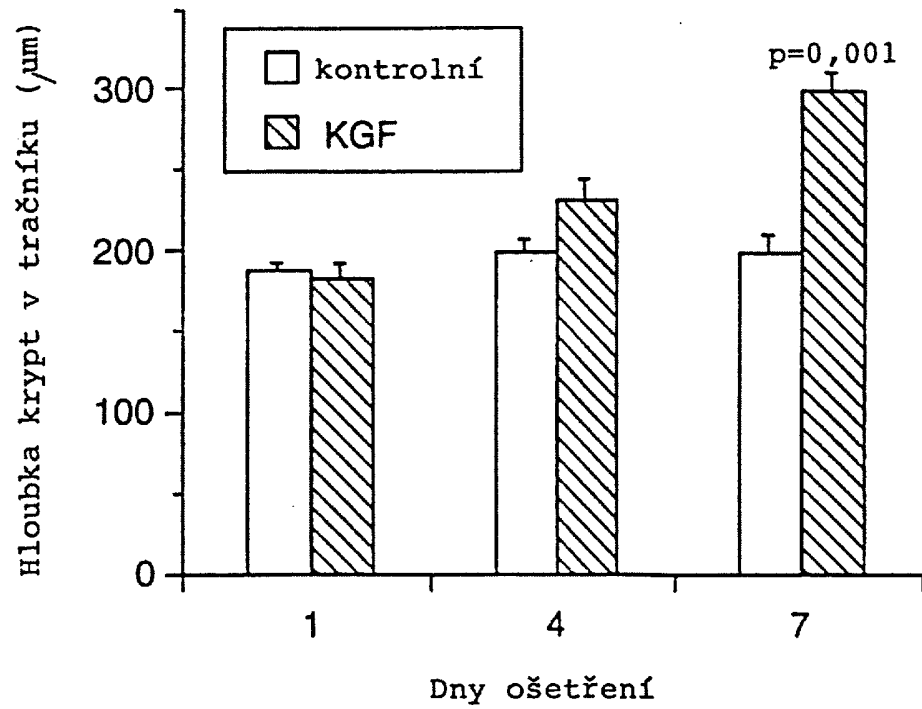
Obr. 22A



Obr. 22B



Obr. 23



Obr. 24

Konec dokumentu
