

# PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:

**2003 -2697**

(19)  
ČESKÁ  
REPUBLIKA



ÚŘAD  
PRŮMYSLOVÉHO  
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **04.04.2002**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **05.04.2001 25.09.2001**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/107578 2001/290700**

(33) Země priority: **JP JP**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.01.2004**  
(Věstník č. 1/2004)

(86) PCT číslo: **PCT/JP02/03382**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/081522**

(13) Druh dokumentu: **A3**

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

C 07 K 16/18	A 61 P 29/00
C 07 K 7/06	A 61 P 43/00
C 07 K 7/08	A 61 P 19/02
C 12 N 15/09	
C 12 P 21/08	
A 61 K 39/395	
A 61 K 45/08	
A 61 P 37/02	

(71) Přihlašovatel:

IMMUNO-BIOLOGICAL LABORATORIES CO.,  
LTD., Gunma, JP;  
FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD., Osaka,  
JP;

(72) Původce:

Uede Toshimitsu, Sapporo-shi, JP;  
Kon Shigeyuki, Gunma, JP;  
Saeki Yukihiko, Osaka, JP;  
Yokosaki Yasuyuki, Hiroshima, JP;  
Noda Masaki, Tokyo, JP;  
Yamamoto Nobuchika, Osaka, JP;

(74) Zástupce:

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

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Protilátka proti osteopontinu a farmaceutický  
prostředek**

(57) Anotace:

Protilátka proti osteopontinu, která inhibuje vazbu integrinu rozpoznávajícího sekvenci RGD na osteopontin nebo jeho fragment, a která inhibuje vazbu integrinu rozpoznávajícího sekvenci SVVYGLR nebo její ekvivalentní sekvence na osteopontin nebo jeho fragment. Tato protilátka se používá pro léčení autoimunitních onemocnění, revmatismu a revmatoidní artritidy. Popisují se také farmaceutické prostředky použitelné pro léčení autoimunitních onemocnění, revmatismu nebo revmatoidní artritidy. Protilátka je také použitelná pro diagnostické účely a zvláště diagnostiku revmatismu.

CZ 2003 - 2697 A3

## Protilátka proti osteopontinu a farmaceutický prostředek

### Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká protilátky proti lidskému osteopontinu a způsobu léčení autoimunitních onemocnění, revmatismu a revmatoidní artritidy s použitím protilátky.

### Dosavadní stav techniky

Osteopontin (dále označovaný jako „OPN“) je kyselý, vápník vázající glykoprotein, který je ve velkém množství přítomen v kostech. Je známo, že alternativním sestřihem se přirozeně vytvářejí tři typy isoformů lidského OPN, totiž osteopontin-a (dále označovaný jako „OPN-a“), osteopontin-b (dále označovaný jako „OPN-b“) a osteopontin-c (dále označovaný jako „OPN-c“) (Y. Saitoh a další, (1995): Laboratory Investigation, 72, 55 - 63). Předpokládá se, že v rámci těchto látek má prekurzor OPN-a aminokyselinovou sekvenci ukázanou jako SEQ ID No. 1 dále ve výpisu sekvencí, kde se při sekreci odštěpuje signální peptid, takže se získá zralá forma OPN-a v rozmezí aminokyselin I17-N314. Navíc se zralý OPN štěpí na C-konci na 168. zbytku argininu thrombinem z živého organismu na dva fragmenty, N-koncový a C-koncový.

Výše popisovaný OPN má různé fyziologické, patologicky významné funkce, např. adhezi buněk, migraci buněk, tumorogenezi, imunitní odpověď a inhibici cytolýzy zprostředkované komplementem. Tyto různé funkce zprostředkují různé typy receptorů na povrchu buněk. OPN v sobě obsahuje sekvenci RGD (např. OPN-a má tuto sekvenci od zbytku v poloze 159 do zbytku v poloze 161). Hlavními receptory OPN jsou druhy integrinů rozpoznávající sekvenci RGD, jako jsou  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 1$  a  $\alpha V\beta 5$ ; Konkrétně typy integrinů  $\alpha V\beta 3$ ,  $\alpha V\beta 1$  a  $\alpha V\beta 5$

zprostředkují adhezi buněk na buňky hladkého svalstva cév.  $\alpha V\beta 3$  se dále účastní migrace makrofágů, lymfocytů, endoteliálních buněk, buněk hladkého svalstva apod.

Dalšími výzkumy bylo zjištěno, že OPN se také váže prostřednictvím sekvence SVVYGLR na typy integrinů  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  a  $\alpha 4\beta 7$ , a že je také rozdíl ve způsobu vazby, takže  $\alpha 4\beta 1$  se váže na oba OPN ještě nerozštěpené thrombinem (non-cleavage-type OPN) a N-koncový fragment OPN rozštěpeného thrombinem (cleavage-type OPN), zatímco  $\alpha 9\beta 1$  se váže pouze na OPN rozštěpená thrombinem (Y. Yokosaki a další, (1999): The Journal of Biological Chemistry 274, 36328 - 36334/P. M. Green a další, (2001): FEBS Letters 503, 75 - 79/S. T. Barry a další, (2000): Experimental Cell Research 258, 342 - 351). Tyto integrinové podjednotky  $\alpha 9$  a  $\alpha 4$  nebo integrinové podjednotky  $\beta 1$  a  $\beta 7$  mají vysokou podobnost co se týče aminokyselinové sekvence. Druhy integrinů  $\alpha 4\beta 1$  a  $\alpha 4\beta 7$  se dále nacházejí hlavně v lymfocytech a monocytech, zatímco v neutrofilech se tyto druhy integrinů exprimují velmi málo. Alternativně se  $\alpha 9\beta 1$  silně exprimuje selektivně v neutrofilech a má funkce nezbytné pro migraci neutrofilů přes VCAM-1 a Tenascin-C. Tento integrin je dále různě exprimován ve svalových buňkách, epiteliálních buňkách a jaterních buňkách. Jak bylo popsáno výše, cytoplasmatické domény integrinových podjednotek  $\alpha 4$  a  $\alpha 9$  společně podporují migraci leukocytů do míst zánětu a agregaci v těchto místech prostřednictvím individuálních biochemických cest přenosu signálů mezi buňkami, které se od sebe nepatrně liší, pro zesílení jejich infiltračních aktivit. Tímto způsobem se integrinové podjednotky účastní různých zánětlivých reakcí.

Jak bylo popsáno výše, různé typy integrinů podporují migraci leukocytů a účastní se tedy zánětlivých reakcí. Proto mohou být farmaceutické látky s inhibičními účinky na tyto aktivity integrinů potenciálně využity jako protizánětlivá léčiva. Například integrin  $\alpha V\beta 3$

se exprimuje v osteoklastech, cévních endoteliálních buňkách, buňkách hladkého svalstva apod. Nyní se vyvíjí protilátka proti  $\alpha V\beta 3$ , která bude inhibovat vazbu mezi integrinem  $\alpha V\beta 3$  a jeho různými vazebnými ligandy, což může potenciálně vést např. k potlačení poškození kloubů.

Protože receptory ze skupiny integrinů se běžně vyskytují v různých tkáních a zajišťují nezbytné funkce pro řízení vitálních aktivit, použití protilátek proti integrinu pro léčení revmatoidní artritidy a osteoartritidy může vyvolávat stejnou inhibici i na jiných místech a může tedy způsobovat nežádoucí účinky.

WO 01/71358 dále popisuje způsob screeningu na látku inhibující vazbu mezi  $\alpha 4$  integrinem a osteopontinem a způsob léčení zánětlivých onemocnění s použitím látky získané tímto screeninem.

Byly nalezeny různé faktory, které se účastní patogeneze revmatoidní artritidy. Tyto objevy jsou popisovány v četných publikacích. Tato zjištění však nejsou spolehlivá. Dosud známé způsoby léčení založené na těchto poznatcích mají vedlejší účinky a nejsou v podstatě uspokojivé.

Proto je nezbytné s konečnou platností objasnit patogenezi revmatoidní artritidy a poskytnout lepší způsoby léčení tohoto onemocnění. Řešení těchto problémů je cílem předkládaného vynálezu.

Revmatoidní artritidy se obtížně odlišuje od osteoartritidy. Dalším účelem vynálezu je tedy poskytnutí diagnostické metody.

25

### **Podstata vynálezu**

Autoři vynálezu zjistili, že se vyskytují vyšší koncentrace OPN v tekutinách kloubních dutin pacientů s revmatismem a pacientů s osteoartritidou. Dále autoři vynálezu našli poprvé zvýšený poměr

N-koncového fragmentu thrombinem rozštěpeného typu v celkovém OPN u pacientů s revmatismem. Autoři tedy uvažují, že OPN by mohl mít velký význam při nástupu těchto onemocnění. Jak je popsáno v následujícím referenčním příkladu, autoři vynálezu dále ověřili tato  
5 zjištění pomocí experimentu na myších s nefunkčním OPN.

Autoři vynálezu dále připravili protilátky, které individuálně rozpoznávají N-koncový fragment a C-koncový fragment OPN rozštěpeného thrombinem. Experimenty s těmito protilátkami bylo prokázáno, že N-koncový fragment OPN rozštěpeného thrombinem se  
10 vyskytoval ve vyšší koncentraci zvláště v tekutinách kloubních dutin pacientů s revmatoidní artritidou.

Autoři vynálezu zaměřili svou pozornost na společnou přítomnost sekvence RGD a sekvence SVVYGLR, obě rozpoznávané integrinem lidského typu, v N-koncovém fragmentu v takto vysokých  
15 koncentracích, jak bylo pozorováno u pacientů s revmatoidní artritidou. Autoři předpokládali, že protilátka současně blokuje obě tyto sekvence by široce inhibovala vazbu mezi OPN a integrinem, takže taková protilátka by mohla být účinná pro léčení revmatoidní artritidy a osteoartritidy.

OPN se dále vyskytuje v ledvinách, placentě, vaječnicích, mozku, kůži apod., ale exprimuje se hlavně v kostní tkáni. Autoři předpokládají, že pro léčení revmatoidní artritidy by byla vazba mezi OPN a integrinem s výhodou blokována způsobem specifitějším pro  
20 místo OPN. Protože zánětu se společně účastní různé typy integrinů, mohlo by být účinné širší blokování vazby těchto různých typů integrinů.  
25

Autoři vynálezu proto připravili protilátku inhibující vazbu mezi sekvencí RGD lidského OPN a integrinem a vazbu mezi sekvencí SVVYGLR lidského OPN a integrinem a potom ověřili její účinky při  
30 experimentech s adhezí buněk, migrací buněk apod. Autoři vynálezu dále izolovali protilátku proti syntetickým peptidům odpovídajícím

těmto vnitřním sekvencím myšního OPN pro testování účinnosti této protilátky jako léčiva s použitím myšního modelu artritidy.

Protože myší OPN má sekvence RGD a SLAYGLR rozpoznávané myším integrinem na polohách homologních s lidským OPN z hlediska aminokyselinové sekvence, byla izolována protilátka M5 současně blokující tyto sekvence. Bylo ověřeno, že vazba protilátky M5 s myším OPN a produkty jeho štěpení thrombinem byla inhibována peptidem GRGDSP včetně místa sekvence RGD, a že protilátka M5 inhibovala migraci monocytů aktivovaných TNF- $\alpha$  odvozených z myší sleziny. Bylo také pozorováno, že protilátka M5 potlačuje poškození kostí při testování v systému orgánové kultivace lebeční části calvarium myší. Dále bylo potvrzeno, že tato protilátka má zřejmé léčebné účinky při podávání v modelu kolagenem vyvolané myší artritidy.

Výše uvedené výsledky ukazují, že protilátka současně blokující vazbu s lidským integrinem na sekvencích RGD a SVVYGLR inhibuje vazbu mezi OPN a integrinem, a je proto účinná pro léčení revmatoidní artritidy, a že tato protilátka bude účinkovat pravděpodobně nejen na revmatismus jako je juvenilní kloubní revmatismus a chronický revmatismus, ale také na psoriatickou artritidu a lupénku. Chronické odmítání po transplantacích orgánů charakteristicky zahrnuje vaskulární a bronchiální okluzivní poruchy. Jejich histologická vyšetření ukazují, že z důvodů spouštění tvorby cytokinů a růstových faktorů a poškození cévních endoteliálních buněk prostřednictvím aktivace T-buněk a makrofágů, a z důvodů vyvolání fibrinogeneze a dalších jevů prostřednictvím proliferace buněk hladkého svalstva cév, dochází pravděpodobně k uzavření cév (P. Freese a další, (2001): Nephrol Dial Transplant, 16, 2401 - 2406/J. R. Waller a další, (2001): British Journal of Surgery, 88, 1429 - 1441/S. R. Lehtonen a další, (2001): Transplantation, 72, 1138 - 1144). Uvádí se, že OPN funguje jako protein nezbytný pro aktivaci makrofágů a fibrinogenezi buněk hladkého svalstva cév (A. O'Regan a další, (2000): Int. J. Exp. Pathol.,

81, 373 - 390). Protilátka inhibující OPN podle vynálezu potlačující migraci monocytů a neutrofilů tedy bude pravděpodobně inhibovat průběh této fibrinogeneze. Tato protilátka bude tedy potlačovat chronické odmítání po transplantaci orgánů, což v důsledku povede k adhezi orgánů. Dále bude mít tato protilátka účinky při léčeni autoimunitních onemocnění včetně systémových autoimunitních onemocnění, erythematodes, zánětu spojivek, Behcetovy nemoci, mnohočetné myositidy, proliferativní glomerulonefritidy, sarkoidózy apod.

Jinými slovy, vynález poskytuje protilátku proti osteopontinu inhibující vazbu mezi integrinem rozpoznávající sekvenci RGD a OPN nebo její fragment a také široce inhibující vazbu mezi integrinem rozpoznávajícím sekvenci SVVYGLR nebo odpovídající sekvenci a osteopontinem nebo jeho fragmentem.

Vynález dále poskytuje léčivo pro léčeni autoimunitních onemocnění, revmatismu a revmatoidní artritidy, přičemž tato léčiva jako účinné složky obsahují protilátku proti osteopontinu.

Vynález dále poskytuje způsob léčeni autoimunitních onemocnění, revmatismu a revmatoidní artritidy, který zahrnuje podávání protilátky proti osteopontinu pacientům s revmatismem a revmatoidní artritidou, pro inhibici vazby mezi sekvencí RGD osteopontinu a integrinem a/nebo pro inhibici vazby mezi sekvencí SVVYGLR a integrinem.

Vynález ještě dále poskytuje diagnostický prostředek pro zjištění revmatismu a způsob diagnostiky revmatismu využívající protilátku proti osteopontinu.

#### Podrobný popis vynálezu

Protilátka proti osteopontinu (označovaná jako „protilátka inhibující OPN“) inhibující vazbu mezi integrinem rozpoznávající

sekvenci RGD a OPN nebo její fragment a také inhibující vazbu mezi integrinem rozpoznávajícím sekvenci SVVYGLR nebo odpovídající sekvenci a OPN nebo jeho fragmentem může být jakákoli z protilátek inhibující vazbu integrinu rozpoznávajícího sekvenci RGD, například

5  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ , a  $\alpha v\beta 5$ , s OPN-a, OPN-b, OPN-c nebo jejich N-koncovým fragmentem, a také inhibující vazbu integrinu rozpoznávajícího sekvenci SVVYGLR, např.  $\alpha 9\beta 1$ ,  $\alpha 4\beta 1$  a  $\alpha 4\beta 7$  s OPN-a, OPN-b, OPN-c nebo jeho N-koncovým fragmentem. Sekvence SVVYGLR nebo odpovídající sekvence mají následující významy: sekvence SVVYGLR

10 znamená sekvenci od serinu v poloze 162 do argininu v poloze 168 lidského OPN, přičemž odpovídající sekvence znamená sekvenci odpovídající SVVYGLR u typů OPN jiných savců, jako je například vepřová sekvence SVVYGLR identická s lidskou sekvencí, SVAYGLR osla, SLAYGLR myši a krysy, SVAYGLK vepře a SVAYRLK králíka.

15 Protilátka inhibující OPN podle vynálezu může být jakákoli z protilátek, která si zachová tyto vlastnosti, přičemž způsob přípravy protilátky není konkrétně vymezen. Protilátka inhibující OPN může být připravena použitím například OPN-a, OPN-b, OPN-c, nebo jejich N-koncového fragmentu, nebo peptidu obsahujícího aminokyselinovou

20 sekvenci RGDSVVYGLR nebo její odpovídající sekvenci (dále označováno jako „peptid příbuzný OPN“) jako antigenu. Zde uváděný fragment OPN zahrnuje fragmenty OPN vytvořené štěpením OPN proteinázami apod., a jde např. o fragment získaný štěpením thrombinem.

25 Protilátka inhibující OPN se s výhodou připravuje s použitím peptidu obsahujícího sekvenci RGDSVVYGLR jako antigenu. Výhodněji se protilátka inhibující OPN připravuje např. použitím peptidu (VDTYDGRGDSVVYGLRS) jako antigenu obsahujícího obě tyto sekvence následující za sebou, přičemž sekvence začíná od

30 valinu v poloze 153 a končí na serinu v poloze 169 v případě OPN-a, a následným zpracováním peptidu obecnými metodami. Pro zvýšení

antigenicity se s výhodou používá peptid příbuzný OPN navázaný na biopolymerní sloučeninu.

Při výzkumech onemocnění souvisejících s OPN s použitím myši jako experimentálního zvířete se s výhodou používá protilátka 5 inhibující OPN proti myšimu OPN. Tato protilátka se s výhodou připravuje použitím peptidu obsahujícího sekvenci RGDSLAYGLR jako antigenu.

Příklady biopolymerní sloučeniny pro navázání na peptid příbuzný OPN zahrnují například látky Macroschisma hemocyanin 10 („KLH“), ovalbumin (dále označovaný jako „OVA“), bovinní sérový albumin (dále označovaný jako „BSA“), králičí sérový albumin (dále označovaný jako „RSA“) a thyroglobulin. Mezi těmito látkami jsou výhodnější KLH a thyroglobulin.

Peptid příbuzný s OPN a biopolymerní sloučenina jsou svázány 15 známými způsoby, například potupem využívajícím směšného anhydridu kyseliny (například B. F. Erlanger a další, (1954): J. Biol. Chem. 234, 1090 - 1094) nebo postupu využívajícího aktivovaný ester (A. E. Karu a další, (1994): J. Agric. Food Chem. 42, 301 - 309).

Směšný anhydrid používaný v postupu využívajícím směšného 20 anhydridu může být získán vystavením peptidu příbuzného OPN obecné Schotten-Baumannově reakci a potom reakcí s biopolymerní sloučeninou pro přípravu systému peptid - polymerní sloučenina. Jako haloformátový ester používaný při způsobu využívajícím směšný anhydrid kyselin se může použít např. methylchloroformát, 25 methylbromoformát, ethylchloroformát, ethylbromoformát, isobutylchloroformát apod. Poměr peptidu, haloformátového esteru a polymerní sloučeniny pro použití podle předkládaného vynálezu se s výhodou volí v širokém rozmezí.

Schotten-Baumannova reakce se zde provádí v přítomnosti 30 bazické sloučeniny. Bazická sloučenina pro použití při reakci zahrnuje sloučeniny běžně používané při Schotten-Baumannově reakci, např.

organické báze jako triethylamin, trimethylamin, pyridin, dimethylanilin, N-methylmorfolin, diazabicyklononen (DBN), diazabicykloundecen (DBU), diazabicyklooktan (DABCO) apod., a anorganické báze jako je uhlíčan draselný, uhlíčan sodný, hydrogenuhlíčan draselný, hydrogenuhlíčan sodný apod.

Reakce se dále provádí při teplotách  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Doba reakce je přibližně 5 min až 10 h, s výhodou 5 min až 2 h.

Reakce mezi získaným směsným anhydridem kyselin a biopolymerní sloučeninou se obecně provádí při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ , s výhodou  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ , po dobu přibližně 5 min až 10 h, s výhodou 5 min až 5 h. Metoda směsného anhydridu kyselin se obecně provádí v rozpouštědle. Jako rozpouštědlo může být použito např. kterékoli rozpouštědlo běžně používané při metodě směsného anhydridu kyselin, např. halogenované uhlovodíky jako je dichlormethan, chloroform a dichlorethan; aromatické uhlovodíky jako je benzen, toluen a xylen; ethery jako je diethylether, dioxan, tetrahydrofuran a dimethoxyethan; estery jako je methylacetát a ethylacetát; neprotonová polární rozpouštědla jako je N,N-dimethylformamid, dimethylsulfoxid a hexamethylfosfotriamid; apod.

Proces aktivace esteru se obecně provádí následujícím způsobem. Nejprve se rozpustí peptid příbuzný s OPN v organickém rozpouštědle pro reakci s N-hydroxysukcinimidem v přítomnosti vazebného činidla, za získání esteru aktivovaného N-hydroxysukcinimidem.

Jako vazebné činidlo se používají obecná vazebná činidla pro rutinní použití při kondenzačních reakcích, jako je například dicyklohexylkarbodiimid, karbonyldiimidazol a ve vodě rozpustný karbodiimid. Jako organické rozpouštědlo se může použít např. N,N-dimethylformamid (DMF), dimethylsulfoxid a dioxan. Molární poměr peptidu a vazebného činidla jako je N-hydroxysukcinimid pro použití

při reakci je s výhodou 1 : 10 až 10 : 1, nejlépe 1 : 1. Reakční teplota je 0 °C až 50 °C, s výhodou 22 °C až 27 °C, přičemž reakční doba je 5 min až 24 h, s výhodou 1 h až 2 h. Vhodná reakční teplota je vyšší než teploty tání jednotlivých složek a nižší než teploty varu jednotlivých složek.

Po provedení vazebné reakce se reakční roztok přidá k roztoku s rozpuštěnou biopolymerní sloučeninou pro uskutečnění reakce. V případě, že biopolymerní sloučenina obsahuje volnou aminovou skupinu, se například vytvoří amidová vazba mezi aminoskupinou a karboxylovou skupinou peptidu. Reakční teplota je 0 °C až 60 °C, s výhodou 5 °C až 40 °C, ještě výhodněji 22 °C až 27 °C, a doba reakce je 5 min až 24 h, s výhodou 1 h až 16 h, ještě výhodněji 1 h až 2 h.

Reakční produkt mezi peptidem příbuzným s OPN a biopolymerní sloučeninou vytvořený tímto způsobem se čistí dialýzou nebo použitím odsolovací kolony apod., pro získání produktu, kterým je peptid příbuzný s OPN navázaný na biopolymerní sloučeninu (jednoduše dále označovaný jako „navázaný produkt“).

Nyní bude popsán způsob přípravy protilátky s použitím navázaného produktu získaného výše popsaným způsobem jako antigenu a imunologický test s využitím této protilátky. Pro přípravu protilátky mohou být použity známé metody, které se popisují např. v Zoku Seikagaku Jikken Koza (Biochemical Experimental Lecture Series) a Meneki Seikagaku Kenkyu Ho (Immuno-Biochemistry Research Method) (Nihon Seikagaku Gakkai hen (Japan Biochemical Association, ed.)).

Pro přípravu polyklonální protilátky použitím navázaného produktu podle vynálezu se zvíře imunizuje navázaným produktem a potom se odebírá protilátka.

Konkrétněji se např. navázaný produkt, jako je navázaný produkt peptid příbuzný s OPN-thyroglobulin nejprve rozpustí v pufru s fosforečnanem sodným (dále označovaný jako „PBS“), který se

potom smísí s Freundovým kompletním adjuvans nebo Freundovým nekompletním adjuvans, nebo pomocnou látkou jako je hydroxid hlinitý. Získaná směs se použije jako imunogen pro imunizaci savce.

Pro imunizaci může být použito jakékoli zvíře běžně používané v oboru, jako je např. myš, krysa, králík, koza a kůň. Podání imunogenu pro imunizaci se může uskutečnit např. subkutánní injekcí, intraperitoneální injekcí, intravenózní injekcí a intramuskulární injekcí. Výhodná je subkutánní injekce nebo intraperitoneální injekce. Imunizace se může provést jednou nebo vícekrát ve vhodných intervalech, s výhodou v intervalu 1 týden až 5 týdnů.

Obecně se potom imunizovanému zvířeti odebere krev, ze které se oddělí sérum. Čištěním frakce polyklonální protilátky se může izolovat protilátka inhibující OPN.

Obecně se dále může fúzovat imunitní buňka získaná imunizací zvířete navázaným produktem s myelomovou buňkou za vytvoření hybridomu. Odebíráním protilátky z kultury hybridomu se může izolovat protilátka inhibující OPN jako monoklonální protilátka.

Jestliže se protilátka podle vynálezu má používat při léčení zvířat včetně lidí, dává se přednost použití chiméřní protilátky (viz zveřejněná evropská patentová přihláška EP 0125023) připravené takovou modifikací genetického inženýrství, aby získaná protilátka inhibující OPN měla stejnou konstantní oblast jako tato protilátka pro léčeného člověka nebo zvíře, nebo se používá animalizované protilátky (viz zveřejněná evropská patentová přihláška EP 0239400 nebo EP 045126). Dále se s výhodou používá monoklonální protilátka (protilátka živočišného typu pro jednotlivé druhy zvířat) (viz zveřejněná evropská patentová přihláška EP 0546073 nebo WO 97/07671) připravená použitím transgenního zvířete s uměle zavedeným genem, který se účastní tvorby protilátky u léčeného člověka nebo zvířete.

V případě, že léčeným pacientem je člověk, a zvířetem vytvářejícím protilátku inhibující OPN je myš, se s výhodou použije

lidských/myších chimérických protilátek nebo humanizovaných protilátek. Výhodněji se do transgenního zvířete jako je myš zavede lidský gen, který se účastní tvorby protilátky, a zvíře se použije pro přípravu monoklonální protilátky lidského typu pro následné použití. Dále se pro tvorbu protilátky může s výhodou použít metoda exprese na povrchu fága (phage display).

Takto získaná protilátka inhibující OPN může být použita ve formě Fv, Fab nebo F(ab')<sub>2</sub> s rozpoznávacím místem antigenu vystřiženým z protilátky inhibující OPN proteázou apod.

Takto získaná protilátka inhibující OPN se dále v případě potřeby čistí a dále se formuluje známým způsobem do dávkových forem použitelných při léčení revmatoidní artritidy, revmatismu jako je juvenilní kloubní revmatismus a chronický revmatismus, psoriatická artritida a lupénka; potlačení chronického odmítání po transplantaci orgánů; a léčení autoimunitních onemocnění jako jsou systémová autoimunitní onemocnění, erythematodes, zánět spojivek, Behcetova nemoc, mnohočetná myositida, proliferativní nefritida vřeténkového (provazcového) typu a sarkoidóza.

Protilátka inhibující OPN podle vynálezu se s výhodou může používat jako léčivo pro léčení revmatismu nebo revmatoidní artritidy. Příklady dávkových forem obsahujících tato léčiva pro léčení revmatismu apod., zahrnují parenterální formy jako jsou injekce a infuze, které se s výhodou podávají intravenózní injekcí a subkutánní injekcí (pro použití jako terapeutický prostředek pro léčení autoimunitních onemocnění se používá např. výše uvedených příkladů). Pro formulaci mohou být dále použity farmaceuticky přijatelné nosiče a aditiva ve farmaceuticky přijatelném rozsahu v závislosti na dávkové formě.

Množství protilátky inhibující OPN přidávané do formulací se bude lišit v závislosti na vážnosti příznaků a věku pacienta, používané dávkové formě formulace nebo vazebném titru protilátky inhibující

OPN apod. Vhodně se například používá množství přibližně 0,1 mg/kg až 100 mg/kg.

Protože protilátka inhibující OPN se jako účinná složka takto získaného terapeutického prostředku podle vynálezu silně váže na sekvence RGD a SVVYGLR v OPN, protilátka inhibující OPN bude pravděpodobně inhibovat vazbu mezi těmito oblastmi OPN a integrinem, čímž potlačí vypuknutí příznaků revmatismu, revmatoidní artritidy a dalších autoimunitních onemocnění.

Protože protilátka inhibující OPN podle vynálezu se specificky váže na místo OPN, nikoli na místo na integrinu, protilátka nebude pravděpodobně inhibovat jiné významné funkce integrinu, takže se očekává, že je možno předejít nepříznivým vedlejším účinkům.

Protilátka inhibující OPN podle vynálezu se také může používat pro účely screeningu na terapeutický prostředek proti autoimunitním onemocněním. Jak bylo popsáno výše, sloučenina inhibující vazbu mezi sekvencí RGD OPN a integrinem a inhibující vazbu mezi sekvencí SVVYGLR a integrinem, může sloužit jako léčivo autoimunitních onemocnění. Použitelnost látky hledané při screeningu (testovaná látka) jako terapeutického prostředku autoimunitních onemocnění tedy může být vyhodnocována v reakčním systému připraveném přidáním testované látky a protilátky inhibující OPN kompetitivním způsobem do testovacího systému v přítomnosti daných množství OPN a integrinu pro testování míry inhibice vazby mezi OPN a integrinem vztažené na množství použité protilátky inhibující OPN.

Podobně sloučenina inhibující vazbu mezi sekvencí RGD OPN a integrinem a sekvencí SVVYGLR a integrinem bude pravděpodobně sloužit jako léčivo pro revmatismus a revmatoidní artritidu. Jestliže se protilátka inhibující OPN používá pro sestavení stejného reakčního systému jako bylo popsáno výše, může se tento reakční systém použít také pro screening na revmatismus a revmatoidní artritidu.

Protilátka inhibující OPN podle vynálezu se dále může použít jako diagnostický prostředek revmatismu. Jak bylo popsáno výše, je prokázáno, že při artróze pacientů s revmatoidní artritidou se nacházejí vysoké koncentrace N-koncového fragmentu OPN rozštěpeného thrombinem. Při tomto testu může tedy sloužit OPN nebo jeho N-koncový fragment ve vzorku s použitím protilátky inhibující OPN pro diagnostiku revmatismu. Pro testy se používají následující obecné metody imunochemických testů ["Hybridoma Method and Monoclonal Antibody", vydáno R&D Planning KK., str. 30 - 53, 5. března 1982], použitelné jsou radioimunologická metoda (RIA), ELISA (E. Engvall a další, (1980): Methods in Enzymol., 70, 419 - 439), metoda fluorescenčně značených protilátek, plaková metoda, tečkovací metoda, agregační metoda, Ouchterlonyho test apod.

Použitá metoda se může vhodně zvolit na základě různých hledisek. Z hlediska citlivosti, jednoduchosti apod. je výhodná metoda ELISA. Tato metoda výhodně zahrnuje imobilizaci protilátky inhibující OPN podle vynálezu na nosič a označení protilátky rozpoznávající místo na OPN odlišné od místa pro protilátku inhibující OPN podle vynálezu, pro detekci OPN nebo jeho N-koncového fragmentu. Tato metoda detekce tedy může být použita pro diagnostický prostředek revmatoidní artritidy.

Látka použitá pro značení protilátky může zahrnovat enzymy jako je křenová peroxidáza (dále označována jako „HRP“), alkalická fosfatáza (dále označovaná jako „AP“) apod., fluorescenční látky jako je fluoresceinisokyanát a rhodamin apod., radioaktivní látky jako je <sup>32</sup>P, <sup>125</sup>I apod., chemiluminiscenční látky apod. Dále se popisuje sendvičová metoda jako jedna ze specifitějších detekčních metod jednotlivých isoform OPN. Tento postup zahrnuje v prvním kroku (a) imobilizaci protilátky proti isoformě OPN podle vynálezu na nosiči, ve druhém kroku (b) blokování povrchu nosiče bez imobilizované protilátky materiálem, který nesouvisí s antigenem, např. proteinem.

Postup dále zahrnuje krok (c) přidání vzorku s obsahem různých koncentrací isoformy OPN k získané směsi pro vytvoření komplexu isoforma OPN - protilátka a krok (d) následného přidání značené protilátky proti isoformě OPN a ponechání protilátky navázat se na imobilizovaný komplex antigen - protilátka, a konečný krok (e) zjišťování množství značky navázané na nosič pro zjištění množství isoformy OPN přítomné ve volném stavu ve vzorku na základě předem připravené kalibrační křivky.

Nosič použitý v kroku (a) pro imobilizaci protilátky zahrnuje bez omezení jakékoli nosiče rutinně používané při metodách imunochemických testů. Nosič může být například polystyrenová 96-jamková mikrotitrační destička nebo mikrotitrační destička s navázanými aminovými skupinami. Pro další imobilizaci protilátky se může například používat pufr obsahující protilátku přidaný k nosiči spolu s vhodnou dobou inkubace. Jako pufr se mohou používat známé pufrы jako je např. 10 mM PBS. Koncentrace protilátky v pufru se může volit v širokém rozmezí, ale obecně je vhodná koncentrace přibližně 0,01 až 100 µg/ml a s výhodou 0,1 až 20 µg/ml. Množství pufru je 300 µl/jamku nebo méně, a s výhodou přibližně 20 až 150 µl/jamku, jestliže se jako nosič používá 96-jamková mikrotitrační destička. Inkubace se může provádět bez omezení například jako inkubace přes noc při teplotě 4 °C, která je obecně nejvhodnější.

Při kroku (b) blokování se nosič blokuje pro zabránění nespecifické adsorpce na nosič, protože na OPN přidávaném v následujícím kroku se může vyskytovat část potenciálně adsorbovatelná na nosič bez ohledu na reakci antigen - protilátka. Jako blokovací látka se používá například bovinní sérový albumin (BSA) a roztok odstředěného mléka. Mohou se také používat komerčně dostupné blokovací prostředky jako je Block-Ace (vyráběný firmou Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.; Code No. UK-25B). Konkrétně se bez omezení blokování provádí přidáním např. vhodného objemu činidla Block-Ace k části, která má na sobě imobilizovaný

antigen, provede se inkubace přes noc při přibližně 4 °C a získaná část se opláchne pufrům. Jako pufr se může použít např. pufr se složením 10 mM PBS, pH 7,2, 0,8 % (hmotn./obj.) NaCl, 0,02 % (hmotn./obj.) KCl a 0,02 % (obj./obj.) Tween 20.

5 V dalším kroku (c) se potom přivede do styku vzorek obsahující isoformu OPN s imobilizovanou protilátkou, aby se mohla isoforma OPN zachytit na imobilizované protilátce za získání komplexu imobilizovaná protilátka - isoforma OPN. Reakce se bez omezení provádí při teplotě přibližně 37 °C po dobu 1 h. Po ukončení reakce se  
10 nosič opláchne pufrům pro odstranění nereaktivních proteinů apod. Výhodný pufr použitelný při této reakci má složení 10 mM PBS, pH 7,2 a 0,05 % (obj./obj.) Tween 20.

V kroku (d) se dále vytvoří komplex imobilizovaná protilátka - isoforma OPN - značená protilátka přidáním značené protilátky  
15 rozpoznávající jiný epitop na isoformě OPN zachycené na imobilizované protilátce. Po ukončení reakce se nosič s výhodou opláchne pufrům pro odstranění nereaktivních proteinů apod. Jako pufr pro tuto reakci se používá pufr popsáný v kroku (c).

Značená protilátka používaná v kroku (d) je nutná pro  
20 rozpoznání epitopu odlišného od epitopu rozpoznávaného imobilizovanou protilátkou v kroku (a). Jestliže se jako imobilizovaná protilátka používá polyklonální protilátka rozpoznávající první poloviční doménu isoformy OPN, jako protilátka značená navázaným enzymem (např. HRP nebo AP apod.) se používá např. polyklonální protilátka  
25 rozpoznávající druhou poloviční doménu isoformy OPN. Použití těchto protilátek rozpoznávajících různá místa jak bylo popsáno výše, umožňuje vysoce citlivý specifický test na isoformu OPN vytvořenou alternativním sestřihem.

Množství značené protilátky používané v kroku (d) je s výhodou  
30 přibližně 5000 až 10 000násobek množství imobilizované protilátky navázané na nosič. Je vhodné, jestliže se pro reakci používá značená

protilátka zředěná na konečnou maximální adsorbanci 1,5 až 2,0 při konečném testu. Pro toto ředění se mohou používat pufry a reakce se s výhodou provádí při teplotě přibližně 37 °C po dobu přibližně 30 min a potom po ukončení reakce následuje oplach pufrů. Reakce však není  
5 na uvedené podmínky omezena. Výše popsané reakce umožňují vazbu komplexu protilátka - isoforma OPN - značená protilátka na nosič.

V kroku (e) se nakonec přidá roztok chromogenního substrátu reagující se značenou látkou v komplexu imobilizovaná protilátka -  
10 isoforma OPN - značená protilátka, aby bylo možno změřit absorbanci a vypočítat množství OPN na základě kalibrační křivky.

Jestliže se jako látka použitá pro značení protilátky použije enzym peroxidáza, může se použít jako chromogenní substrát roztok obsahující peroxid vodíku a 3,3',5,5'-tetramethylbenzin (TMB) nebo o-  
15 fenylendiamin (OPD). Bez omezení se chromogenní reakce provádí přidáním roztoku chromogenního substrátu k reakci při přibližně 25 °C po dobu přibližně 20 min, a potom se pro ukončení enzymatické reakce přidá 1N kyselina sírová. V případě použití TMB se průběh chromogenní reakce zjišťuje na základě absorbance při 450 nm.  
20 V případě, že se jako látka pro značení použije enzym AP, použije se například chromogenní reakce využívající kyseliny p-nitrofenylfosforečné (pNPP) jako substrátu, přidání 2N NaOH pro ukončení enzymatické reakce a měření absorbance při 415 nm.

Použitím kalibrační křivky předem připravené na základě  
25 absorbance reakčního roztoku s přidanými známými koncentracemi isoformy OPN se může vypočítat koncentrace isoformy OPN ve vzorku.

Způsob detekce isoformy OPN podle vynálezu se používá pro objasnění funkcí OPN a pro diagnózu a léčení onemocnění, za která je  
30 OPN odpovědný. Jeden příklad takového použití zahrnuje detekční kit zánětlivých abnormalit, kterým je možno například odlišit revmatismus

a revmatoidní artritidu, kde tento kit je založen na oddělené detekci N-koncového fragmentu thrombinem rozštěpeného OPN a OPN nerozštěpeného typu, takže se detekuje přítomnost nebo nepřítomnost zánětlivých abnormalit.

5            Jak bylo popsáno výše, N-koncový fragment thrombinem rozštěpeného OPN se pravděpodobně pozoruje s vysokými koncentracemi v kloubních dutinách zvláště pacientů s revmatoidní artritidou. U pacientů s osteoartritidou je však tato koncentrace nízká. Jak bylo popsáno výše, poměr N-koncového fragmentu OPN v kloubní  
10            dutině se u jednotlivých pacientů liší. Pro diagnostické odlišení revmatismu a osteoartritidy se proto může uspokojivě použít měření poměru N-koncového fragmentu k celkovému OPN.

             Jako konkrétnější příklad je možno získat protilátky proti  
             jednotlivým peptidům s následujícími třemi sekvencemi společnými  
15            všem třem isoformám OPN, tedy OPN-a, OPN-b a OPN-c.

CVDTYDGRGDSVVYGLRS

(C+V153 až S169) (1)

20            KSKKFRRPDIQYPDATDEC

(K170 až E187+C) (2)

IPVKQADSGSSEEKQC

(I17 až Q31+C) (3)

25

Mezi těmito sekvencemi je sekvence (1) přítomná na N-konci thrombinem rozštěpeného místa, a je přítomná společně v úplném OPN jako typ nerozštěpený thrombinem a N-koncový fragment.

Alternativně je sekvence (2) přítomná na C-konci místa rozštěpeného thrombinem a je přítomná v úplném OPN typu nerozštěpeného thrombinem, ale nikdy není obsažena v N-koncovém fragmentu. Sekvence (3) odpovídá aminokyselinovým zbytkům v polohách 17 až 5 31 N-koncového místa OPN a je přítomna v úplném OPN jako typ nerozštěpený thrombinem a N-koncový frgment. Diagnostický kit pro rozlišení mezi pacienty s revmatismem a pacienty s osteoartritidou může být složen ze dvou typů imunodetekčních činidel využívajících protilátky odpovídající těmto třem typům sekvencí. Jinak řečeno, první 10 imunodetekční činidlo používající dva typy protilátek proti peptidům reprezentovaným sekvencemi (3) a (2) provádí test thrombinem nerozštěpeného typu OPN běžně rozpoznávaného oběma protilátkami ve vzorku. Potom se může provádět detekce stejným způsobem jako je sendvičová metoda, která zahrnuje imobilizaci například protilátky proti 15 peptidu sekvence (3) na nosiči, což umožňuje reakci protilátky se vzorkem z pacienta, nosič se opláchne a potom se přidá protilátka proti peptidu sekvence (2) jako značící protilátka. V případě druhého imunodetekčního činidla se navíc používají dvě protilátky proti peptidům sekvencí (1) a (3) pro zjištění celkového množství 20 thrombinem nerozštěpeného typu OPN a N-koncového fragmentu vytvořeného štěpením thrombinem ve vzorku, které jsou běžně rozpoznávány oběma protilátkami. V takovém případě se detekce může provádět stejně jako při sendvičové metodě, která zahrnuje imobilizaci například protilátky proti peptidu sekvence (1) na nosiči, 25 ponechání protilátky reagovat se vzorkem z pacienta, opláchnutí nosiče a následné přidání protilátky proti peptidu sekvence (3) jako značící protilátky. Potom se vzájemně porovnají výsledků testů vzorku stejného pacienta s použitím těchto dvou typů imunodetekčních činidel, čímž se zjistí poměr thrombinem rozštěpeného vytvořeného N- 30 koncového fragmentu v celkovém OPN pacienta, který umožní rozlišení mezi revmatismem a osteoartritidou.

### Přehled obrázků na výkresech

- Obr. 1      ukazuje grafy znázorňující inhibici RGD-dependentní adheze buněk na OPN.
- 5      Obr. 2      ukazuje grafy znázorňující inhibici RGD-dependentní a RGD-indepeententní adheze buněk mezi nOPN a buňkami SW480 transformovanými  $\alpha 9$  protilátkou 2K1.
- Obr. 3a      ukazuje grafy znázorňující migraci buněk indukovanou OPN.
- Obr. 3b      ukazuje grafy znázorňující potlačení migrace buněk indukované OPN působením protilátek.
- 10      Obr. 4      ukazuje grafy znázorňující časový průběh změny hodnocení artritidy při podávání směsi artritogenní protilátky/LPS individuálně myším s defektním genem OPN a normálním myším.
- 15      Obr. 5      ukazuje grafy znázorňující srovnání otoku zápěstí při podávání směsi artritogenní protilátky/LPS myším s defektním genem OPN a normálním myším.
- Obr. 6      ukazuje grafy znázorňující adhezi mezi myším OPN a NIH3T3 v závislosti na koncentraci.
- 20      Obr. 7      ukazuje grafy znázorňující inhibici adheze mezi myším OPN a NIH3T3 působením peptidu GRGDSP.
- Obr. 8      ukazuje grafy znázorňující inhibici adheze mezi myším OPN a NIH3T3 působením protilátky M5.

### 25      Příklady provedení vynálezu

Vynález bude nyní podrobněji popsán na následujících příkladech a referenčním příkladu. Vynález však není na tyto příklady omezen.

### Příklad 1

#### Klonování, konstrukce, čištění a činidla pro fúzní protein GST-OPN

Klonování a čištění proteinu se provádělo v podstatě způsobem  
5 popsaným v dokumentu (S. Kon a další, (2000): J. Cell. Biochem. 77:  
487 - 498).

cDNA lidských isoformů OPN, tj. OPN-a a OPN-b, byly izolovány  
následujícím způsobem: použitím RNA připravené z buněk NRC-12  
buněčné linie lidského karcinomu ledviny jako templátu byla synteticky  
10 připravena cDNA; s použitím této cDNA jako templátu byla provedena  
PCR s použitím následujících primerů OPN-5 a OPN-3 pro izolaci  
cDNA kódujících úplný lidský OPN-a a OPN-b, individuálně obsahující  
příslušné oblasti signálních peptidů.

Způsobem popsaným v odkazu byly potom takto klonované  
15 cDNA pro OPN-a a OPN-b vloženy do vektoru pGEX4T (Amersham  
Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko) tak, že cDNA mohly být ve  
stejném čtecím rámci jako gen GST (glutathion S-transferáza;  
EC2.5.1.18), pro expresi ve formě fúzního proteinu s GST s použitím  
Escherichia coli JM109 (takto získané fúzní proteiny GST-OPN se dále  
20 označují jako „GST-OPN-a“ a „GST-OPN-b“).

OPN-5:

5'-CGGGATCCACTACCATGAGAATTGCAGTGATTTGC-3'

25 OPN-3:

5'-CCGCTCGAGTTAATTGACCTCAGAAGATGCACTATC-3'

cDNA kódující lidskou isoformu OPN-c byla připravena dvoustupňovou PCR s použitím OPN-a cDNA jako templátu. V prvním kroku byla individuálně provedena PCR s použitím OPN-5 a následujícího OPNct-3 primeru nebo následujícího OPNct-5 a OPN-3 primeru; získané dva produkty PCR byly smíseny, tepelně zpracovány a postupně ochlazeny pro hybridizaci a potom byl přidán enzym pro prodloužení. Ve druhém kroku byla potom provedena PCR s použitím primerů OPN-5 a OPN-3 pro získání cDNA kódující úplný lidský OPN-c včetně oblasti signálního peptidu. cDNA isoformy c byla integrována do vektoru pGEX4T stejným způsobem jako u isoformem a a b, pro přípravu fúzního proteinu s GST (označovaný zde dále jako „GST-OPN-c“).

OPNct-3:

5'-ACACAGCATTCTTTTCCACAGAACTTCCAGAATCAGC-3'

OPNct-5:

5'-TGAGGAAAAGAATGCTGTGTCCTCTGAAGAAAACC-3'

cDNA kódující poloviční část na aminovém konci (MI-R168) z thrombinem rozštěpeného místa OPN-a byla izolována PCR s použitím OPN-a cDNA jako templátu a OPN-5 s následujícím OPNnh-3 primerem popsaným níže. Stejným způsobem jako pro isoformy a a b byla získaná cDNA integrována do vektoru pGEX4T pro přípravu proteinu GST (označovaný dále jako „GST-Nhalf“).

OPNnh-3:

5'-GCCTCGAGTTACCTCAGTCCATAAACCACACT-3'

Protein osteopontinu (hOPN C half) na karboxylovém místě z thrombinem rozštěpeného místa OPN-a byl připraven dvoustupňovou PCR s použitím OPN-a cDNA jako templátu. V prvním kroku byla provedena PCR jednotlivě s použitím OPN-5, následujícího OPNch-3 primeru, následujícího OPNch-5 a OPN-3 primeru. Ve druhém stupni byla provedena PCR s použitím primerů OPN-5 a OPN-3 pro přípravu proteinu OPN na karboxylovém místě. Stejným způsobem jako pro isoformy a a b umožnila rekombinace do vektoru pGEX4T přípravu proteinu GST (označovaný dále jako „GST-Chalf“).

OPNch-3:

5'-TCTTAGATTTGGCACAGGTGATGCCTAGGAG-3'

OPNch-5:

5'-CACCTGTGCCAAATCTAAGAAGTTTCGCAGA-3'

Obecnou metodou byly připraveny různé rekombinantní fúzní proteiny GST-OPN v *Escherichia coli*, které potom byly čištěny s použitím kolony glutathion-Sepharose podle popisu v odkazu. Protein GST-Nhalf byl rozštěpen na vazebném místě proteázou prescission (PreScission; Amersham Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko), pro odstranění části proteinu GST a tím oddělení proteinu (dále označovaný jako „nOPN“) složeného z aminokoncové poloviční části (I17-R168) samotného OPN.

Alternativně byla cDNA kódující úplný OPN-a (M1-N314) dále vložena do vektoru pcDNA3.1 (+) (Invitrogen Corporation), pro transfekci do buněk CHO-K1 (vyráběné firmou Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.) (dále označované jako „buňka CHO/OPN-

a“). OPN-a typu s navázaným cukerným řetězcem (dále označovaný jako „CHO/OPN-a“) izolovaný z buněk byl čištěn následujícím způsobem. Supernatant z kultivace buněk CHO/OPN-a byl zpracován chromatografií na iontoměničové koloně s použitím kolony DEAE-Sepharose CL-6B column (Amersham Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko) a chromatografií gelovou filtrací na koloně Ultrogel AcA44 column (vyráběná firmou BioSeptra SA) a čištění pokračovalo kolonovou chromatografií s reverzními fázemi na koloně RESOURCE RPC column (Amersham Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko). Takto bylo čištění ukončeno. Pro výzkumné práce na imunitní senzitivaci a vazbě byly používány různé peptidy získané od firmy Sigma Genosis Japan; tyto peptidy byly jinak získány chemickou syntézou metodou Fmoc (N-(9-fluorenyl)methoxykarbonyl) na syntezátoru peptidů (model 432 A; vyráběný firmou PerkinElmer Life Science, Inc.) a čištěním chromatografií na koloně C18 s reverzními fázemi.

## Příklad 2

### Produkce monoklonální protilátky

Syntetické peptidy odpovídající vnitřním sekvencím lidského OPN byly připraveny způsobem ukázaným výše a tyto peptidy byly potom použity pro imunizaci.

Peptid 1:

CVDTYDGRGDSVVYGLRS (C+V153 až S169)

25

Peptid 2:

CIDSQELSKVSREFHSH (C+I261 až H276)

Peptid 1 má konkrétně sekvence RGD a SVVYGLR rozpoznávající integrinové receptory  $\alpha\beta3$ , popřípadě  $\alpha9\beta1$ .

Tyto peptidy byly navázány na thyroglobulin a potom byly použity pro imunizaci myší běžně používaným způsobem. Z imunizovaných myší byly potom izolovány splenocyty, se kterými byla provedena buněčná fúze s buňkami myšího myelomu P3-X63-Ag8-653 s použitím polyethylenglykolu. Způsobem popsáním v odkazu (M. Kinebuchi a další, (1991): J. Immunol., 146, 3721 - 3728) byl vybrán hybridom reagující s každým z peptidů použitých pro imunizaci.

Z myší imunizovaných peptidy 1 a 2 byly izolovány monoklonální protilátky označené 2K1 a 4C1. Hybridom tvořící monoklonální protilátku 2K1 byl uložen pod depozitním číslem FERM BP-7883 ve sbírce Patent Organism Depository Center, the National Institute of Advanced Industrial Science a Technology (AIST Tsukuba Central 6, 1-1-1, Higashi, Tsukubashi, Ibaraki 305 - 8566, Japonsko), 20. června 2001. Dále byla izolována monoklonální protilátka 53 (mAb53) imunizací úplným rekombinantním lidským OPN (D. S. Bautista a další, (1994): J. Biol. Chem., 269, 23280 - 23285).

### 20 Příklad 3

#### Reaktivita OPN a jeho thrombinovými štěpnými produkty s monoklonálními protilátkami

Vazebné vlastnosti monoklonálních protilátek 2K1 a 4C1 izolovaných v příkladu 2 proti OPN a jeho thrombinovým štěpným produktům byly testovány metodou westernového přenosu. Bylo zjištěno, že protilátka 2K1 reagovala s GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-c a GST-Nhalf. Protilátka 4C1 reagovala s GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-c a GST-Chalf. Tyto monoklonální látky se nevázaly pouze na rekombinantní OPN nenavázané na cukerné řetězce vytvářené v *Escherichia coli*, ale reagovaly také s proteinem

CHO/OPN-a s navázanými cukernými řetězci a jejich thrombinovými štěpnými produkty (dále označované jako „thrombinem rozštěpený OPN“).

#### 5 Příklad 4

##### Inhibice adheze buněk na OPN monoklonálními protilátkami

Následující metodou bylo zjišťováno, zda monoklonální protilátky inhibovaly adhezi buněk na OPN. Nejprve byla 96-jamková destička potažena různými koncentracemi CHO/OPN-a při 4 °C přes noc a potom byla ponechána inkubovat s 0,5 % BSA v PBS za podmínek 37 °C 10 min, pro blokování nespecifické adheze. Buňky lidských fibroblastů TIG-7 nebo SW480 transformované cDNA integrinové podjednotky  $\alpha 9$  (dále označované jako „ $\alpha 9$ -transformované buňky SW480“) byly suspendovány v médiu D-MEM obsahujícím 0,25 % BSA; 200  $\mu$ l získané buněčné suspenze (s koncentrací buněk  $5 \times 10^4$  buněk/jamku) bylo pipetováno na 96-jamkovou destičku předem potaženou CHO/OPN-a nebo nOPN, v přítomnosti nebo nepřítomnosti různých koncentrací monoklonálních protilátek nebo syntetických peptidů a destička byla inkubována 37 °C 1 h.

Kultivační médium bylo slito a všechny jamky byly dvakrát propláchnuty médiem D-MEM obsahujícím 0,25% BSA. Adherentní buňky byly fixovány a barveny 0,5% krystalovou violetí ve 20% methanolu 30 min.

Všechny jamky byly třikrát opláchnuty vodou a adherentní buňky byly potom solubilizovány do 20% kyseliny octové. Získaný supernatant z každé jamky byl analyzován čtecím zařízením pro imunologii pro měření absorbance při 590 nm pro zjištění relativního počtu buněk přichycených k jamce. Všechny tyto testy byly prováděny v triplikátech a byly prováděny alespoň tři nezávislé experimenty. Ukázané hodnoty představují průměr ze tří nezávislých experimentů.

Bylo zjištěno, že buňky TIG-7 mají vysokou adherenci k OPN, ale jak je ukázáno na obr. 1A, adheze je zřejmě inhibována peptidem GRGDSP (100 µg/ml), ale není inhibována kontrolním peptidem (C-koncová oblast K296-N314 OPN) (100 µg/ml). Adheze je tedy závislá na RGD. Jak je ukázáno na obr. 1B, protilátka 2K1 v koncentraci 200 µg/ml dále zřejmě inhibovala adhezi buněk na OPN. Jak je dále ukázáno na obr. 1C, vliv 2K1 na inhibici buněčné adheze je srovnatelný s vlivem protilátky mAb53, a je závislý na koncentraci. Ještě dále, 2K1 a mAb53 nikdy neinhibují adhezi buněk TIG-7 na vitronektin (VN) nebo fibronektin (FN).

Obr. 2 ukazuje inhibici monoklonálních protilátek adheze nOPN a vitronektinu na  $\alpha$ 9-transformované buňky SW480. Jak je ukázáno na obr. 2A, adheze mezi 1 µg/ml vitronektinu a  $\alpha$ 9-transformovanými buňkami SW480 byla inhibována 200 µM peptidem GRGDSP (peptid RGD), takže adheze je závislá na RGD. Adheze  $\alpha$ 9-transformovaných buněk SW480 na 3 µg/ml nOPN byla inhibována kombinací 200 µM GRGDSP a monoklonální protilátky proti  $\alpha$ 9 $\beta$ 1 Y9A2 (A. Wang a další, (1996): Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 15, 664 - 672), takže adheze je RGD-dependentní a RGD-independentní. Obr. 2B dále ukazuje vliv 2K1 na adhezi  $\alpha$ 9-transformovaných buněk SW480 na nOPN a vitronektin. Adheze mezi  $\alpha$ 9-transformovanými buňkami SW480 a vitronektinem nebyla inhibována v žádném případě 2K1, ale adheze mezi buňkami SW480 a nOPN byla působením 2K1 inhibována. To ukazuje, že 2K1 si zachovává schopnost inhibovat RGD dependentní adhezi.

### Příklad 5

#### Inhibice migrace monocytů indukované OPN pomocí monoklonálních protilátek

Test migrace buněk s použitím buněk U937 byl prováděn na  
5 systému ChemoTx101-8 (Neuro Probe Inc.). Koncentrace buněk byla  
nastavena na  $2 \times 10^6$  buněk/ml pufrém D-MEM obsahujícím 0,1% BSA  
a suspenze byla pak nanesena do horní vrstvy na filtr (s velikostí pórů  
8  $\mu$ m), zatímco protein OPN byl přidán do dolní vrstvy.

Destička ChemoTx byla ponechána stát v přítomnosti 5 % CO<sub>2</sub>  
10 při 37 °C 4 h. Po stání byl filtr fixován methanolem a potom obarven  
hematoxylinem a eosinem (H-E). Počet buněk migrujících do zadní  
plochy filtru byl zjišťován mikroskopem (zvětšení 400 x). Test byl  
prováděn v triplicátech a výsledky jsou vypočteny jako střední  
hodnota. Výsledky jsou uvedeny v obr. 3.

15 Obr. 3a ukazuje migraci buněk U937 směrem k CHO/OPN-a,  
thrombinem rozštěpenému OPN a GST-Nhalf v ukázané koncentraci.  
Obr. 3b dále ukazuje inhibiční testy použitím jednotlivých OPN při  
koncentraci 10  $\mu$ g/ml v přítomnosti neo nepřítomnosti 50  $\mu$ g/ml 2K1,  
mAb53 nebo kontrolního myšího IgG po antigenně specifickém čištění.

20 Jak je ukázáno na obr. 3a a 3b, CHO/OPN-a, thrombinem  
rozštěpený OPN a GST-Nhalf indukují migraci lidských monocytů U937  
v závislosti na koncentraci (A). Protilátka 2K1 zjevně inhibuje migraci  
monocytů indukovanou CHO/OPN-a, thrombinem rozštěpeným OPN a  
GST-Nhalf. Naopak protilátka mAb53 inhibuje pouze migraci monocytů  
25 indukovanou úplným OPN (B).

## Referenční příklad 1

### OPN a indukce artritidy

Pro objasnění funkce OPN při artritidě byla uměle připravena myš s defektním genem OPN (S. R. Rittling a další, (1998): J. Bone a Mminer. Res., 13 (7), 1101 - 1111) známým způsobem pro komparativní experimenty s normální myší.

Komerčně dostupný koktejl vyvolávající artritidu na bázi monoklonálních protilátek (dodávaný pod obchodním názvem ArthroGen-CIA® mAb, Arthritogenic mAb cocktail; vyráběný firmou Iwai Chemical Pharmaceutical Co., Ltd.) byl podáván myším s defektním genem OPN ( $OPN^{-/-}$ ) a normální myši ( $OPN^{+/+}$ ), individuálně podle instrukční příručky připojené k produktu, s cílem indukovat artritidu. Potom byla sledována vážnost vyvolaného stavu. Jako kontroly byly použity tyto dva typy myší, kterým byl podáván fyziologický roztok.

Srovnání vážnosti artritických příznaků bylo prováděno na základě hodnocení artritidy standardním testem otoku zápěstí 10. den po podání. Výsledky jsou uvedeny na obr. 4 a 5.

Jak je zřejmé z obr. 4, u normálních myší, kterým se podává arthritogenní koktejl protilátka/lipopolysacharid (dále označovaný jako „LPS“) dochází ke zvýšení výsledků hodnocení artritidy v den 4 a v dalších dnech, až do dne 10, kdy hodnocení dosáhne maxima (12 nebo více). Alternativně se hodnocení artritidy myší s defektním genem OPN zvyšovalo v den 5 a v dalších dnech, ale skóre dosáhlo maxima pouze 4 nebo méně. U žádné skupiny, které byl podáván fyziologický roztok, ke zvýšení hodnocení artritidy nedošlo.

Jak je ukázáno na obr. 5, u myší s defektním genem OPN je otok zápěstí poměrně slabý ve srovnání s normálními myšmi, u kterých se jasně ukazuje úloha OPN při artritidě.

## Příklad 6

### Inhibiční aktivita protilátky 2K1 na migraci lidských periferních leukocytů

Následující metodou byla zjišťována inhibiční aktivita protilátky 2K1 na migraci lidských periferních leukocytů aktivovanou cytokiny. Tabulka 1 ukazuje výsledky inhibiční aktivity na migraci neutrofilů, zatímco tabulka 2 ukazuje výsledky inhibiční aktivity na migraci monocytů.

### Experimentální metoda

Při dělení pomocí Ficollu byla z normální lidské periferní krve separována frakce monocytů a frakce neutrofilů (P. M. Daftarian a další, (1996): Journal of Immunology, 157, 12 - 20). Mezilehlá vrstva mezi Ficollem a sérem byla oddělena a kultivována v baňce při 37 °C 1 hodinu. Získané přichycené buňky byly použity jako monocyty. K vrstvě erythrocytů zbylých po oddělení frakce monocytů byl přidán pětinasobný objem 3% dextranu-PBS pro agregaci erythrocytů a potom se prováděla centrifugace při 150 x g a 4 °C 5 min.

Agregované erythrocyty byly vysráženy, přičemž výsledný supernatant obsahoval neutrofilů v suspendovaném stavu. Potom byla frakce centrifugována při 500 x g při laboratorní teplotě 20 min pro oddělení neutrofilů. Monocyty a neutrofilů získané tímto způsobem byly přes noc kultivovány s lidským TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) pro aktivaci. Potom byly získané aktivované monocyty a neutrofilů použity pro experimenty s migrací.

Experimenty s migrací byly prováděny s použitím 48-jamkové mikromůrky pro chemotaxi (vyráběná firmou Neuro Probe Inc.). Po přidání různých koncentrací protilátky 2K1 k OPN štěpenému thrombinem a stání při 37 °C 15 min byly směsi přidávány do dolní komůrky (konečná koncentrace lidského OPN 10  $\mu$ g/ml). Na komůrku

byl potom položen polykarbonátový filtr (velikost pórů 5  $\mu\text{m}$ ) a do horní komůrky bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  suspenze buněk ( $2 \times 10^6$  buněk/ml).

Po kultivaci v přítomnosti 5 %  $\text{CO}_2$  při 37  $^\circ\text{C}$  2 h byl polykarbonátový filtr odstraněn pro odstranění buněk na horním povrchu filtru; potom byly buňky, které pronikly do zadní části filtru, 5 barveny systémem Diff-Quick (vyráběný firmou Baxter, International Inc.). Obarvené buňky byly počítány při zvětšení 40 x. Výsledky jsou ukázány jako střední počty buněk (buněk/ $\text{mm}^3$ )  $\pm$  SD v 6 jamkách.

## 10 Výsledky experimentů

Protilátka 2K1 inhibovala migraci lidských periferních neutrofilů a monocytů aktivovaných  $\text{TNF-}\alpha$  směrem k OPN rozštěpenému thrombinem.

## 15 Inhibice migrace neutrofilů

Tabulka 1

Koncentrace thrombinem rozštěpeného OPN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Koncentrace 2K1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Střední počet migrujících buněk na 1 $\text{mm}^3$
0	0	400,0 $\pm$ 67,8**
10	0	581,7 $\pm$ 67,1
10	0,4	566,7 $\pm$ 60,2
10	2	550,0 $\pm$ 49,0
10	10	450,0 $\pm$ 90,8**
10	50	426,7 $\pm$ 30,8**

\*\*  $P < 0,01$  (jednosměrný ANOVA, Dunnettův test)

Inhibice migrace monocytůTabulka 2

Koncentrace thrombinem rozštěpeného OPN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Koncentrace 2K1 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Střední počet migrujících buněk na $1 \text{ mm}^3$
0	0	$58,3 \pm 50,8^{**}$
10	0	$285,0 \pm 49,3$
10	0,4	$258,0 \pm 71,9$
10	2	$256,7 \pm 66,5$
10	10	$160,0 \pm 56,9^{**}$
10	50	$75,0 \pm 55,4^{**}$

\*\*  $P < 0,01$  (jednosměrný ANOVA, Dunnettův test)

5 Příklad 7Příprava protilátky M5

Pro použití při imunizaci byl připraven následující syntetický peptid odpovídající vnitřní sekvenci (C+V138 až R153) myšního OPN.

10 Peptid M5:

CVDVPNGRGDSLAYGLR

15 Peptid byl navázán na thyroglobulin pro následné použití pro imunizaci králíka známým způsobem. Z imunizovaného králíka bylo odebíráno antisérum pro přípravu protilátky M5 použitím kolony naplněné peptidem M5 navázaným přes N-koncový cystein prostřednictvím disulfidické vazby na kuličky thiol Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko).

### Příklad 8

#### Reaktivita protilátky M5 s OPN a produkty jeho štěpení thrombinem

Vazebná schopnost protilátky M5 získané v příkladu 7 s OPN a produkty jeho štěpení thrombinem byla testována metodou westernového přenosu. Jako OPN byl použit rekombinantní myší OPN z glykosylované formy vytvářené v buňkách CHO. Protilátka M5 reagovala s OPN a jeho štěpnými produkty.

### Příklad 9

#### Inhibice adheze buněk na OPN prostřednictvím protilátky M5

Způsobem popsáním v dokumentu (S. Kon a další, (2002): J. Cell. Biochem., 84 (2), 420 - 432) bylo zjišťováno, zda by mohla protilátka M5 inhibovat adhezi buněk na OPN. Jako OPN byl použit úplný myší OPN, ze kterého byla předem odstraněna část GST proteázou PreScission protease (Amersham Pharmacia Biotech, Tokio, Japonsko) (dále označovaný jako „mOPN/de-GST“). Jako buňky byly použity myší buňky NIH3T3.

Jak je ukázáno na obr. 6, buňky NIH3T3 se přichytávají na mOPN/de-GST v závislosti na koncentraci. Jak je ukázáno na obr. 7, adheze je zjevně inhibována peptidem GRGDSP (100 µg/ml), takže adheze závisí na RGD. Jak je ukázáno na obr. 8, protilátka M5 v koncentraci 200 µg/ml zjevně inhibovala adhezi buněk na OPN.

### Příklad 10

#### Inhibiční aktivita protilátky M5 vůči migraci myších slezinných monocytů

Inhibiční aktivita protilátky M5 na migraci myších monocytů odvozených ze sleziny aktivovanou cytokiny byla testována následujícím způsobem. Výsledky jsou ukázány v tabulce 3.

Experimentální metoda

Splenocyty myši CS7BL/6 byly rozdrobeny krycím sklem na jednotlivé buňky, které byly potom kultivovány v baňce při 37 °C 1 h.

5 Získané adherentní buňky byly použity jako monocyty. Monocyty byly kultivovány přes noc a aktivovány lidským TNF- $\alpha$  (20 ng/ml). Výsledné aktivované monocyty byly použity při experimentu s migrací. Experiment s migrací byl prováděn stejným způsobem jako v případě lidského vzorku v příkladu 6 výše.

10

Výsledky experimentů

Protilátka M5 inhibovala migraci monocytů aktivovaných TNF- $\alpha$  odvozených z myši sleziny směrem k myšimu OPN štěpenému thrombinem získaného štěpením úplného myšního OPN (vyráběného firmou Genzyme Corporation) hovězím thrombinem (vyráběný firmou Sigma).

15

Tabulka 3

Koncentrace thrombinem rozštěpeného myšního OPN ( $\mu\text{g/ml}$ )	Koncentrace M5 ( $\mu\text{g/ml}$ )	Střední počet migrujících buněk na 1 mm <sup>3</sup>
0	0	428,3 $\pm$ 52,7**
10	0	556,7 $\pm$ 46,3
10	0,8	570,0 $\pm$ 75,6
10	4	536,7 $\pm$ 60,6
10	20	461,7 $\pm$ 104,4
10	100	468,3 $\pm$ 67,9

\*\* P<0,05(jednosměrný ANOVA, Dunnettův test)

20

## Příklad 11

### Účinek protilátky M5 na potlačení poškození kostí

Následujícím způsobem byl vyšetřován účinek protilátky M5 na potlačení poškození kostí v systému orgánové kultury části lebky calvarium myši. Výsledky jsou ukázány v tabulce 4.

### Experimentální metoda

Z novorozené myši jeden den po narození byla vyjmuta lebeční kost; po úpravě velikosti byla její polovina vložena do každé jamky 24-jamkové destičky. Do každé jamky byl potom přidán lidský parathyroidní hormon (PTH) (1 - 34) s koncentrací upravenou přidáním kultivačního média D-MEM (s 10% bovinním sérem) na konečnou hodnotu 10 nM pro dosažení indukce poškození kosti. Protilátka M5 byla přidána na konečnou koncentraci 200 µg/ml. Po kultivaci 1 týden při 37 °C bylo testováno množství vápníku uvolněného z kosti do kultivačního média testem Calcium E Test WAKO (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.).

### Výsledky experimentů

Bez přidání PTH byla koncentrace vápníku 7,02 mg/ml. S přidáním PTH však byla koncentrace vápníku 9,11 mg/ml. Bylo tedy ukázáno, že dojde k podpoře uvolňování vápníku z kostí. Když byla přidána protilátka M5 v koncentraci 200 µg/ml, bylo ověřeno, že absorpce kosti byla inhibována o přibližně 70 %.

Tabulka 4

	Množství uvolněného vápníku (mg/dl)
Médium	7,02 ± 0,18**
Kontrola PTH	9,11 ± 0,17
M5	7,65 ± 0,25**

\*\* P<0,01(jednosměrný ANOVA, Dunnettův test)

### Příklad 12

#### 5 Vliv protilátky M5 na model myší kolagenní artritidy indukované

Následující metodou byl zjišťován vliv protilátky M5 na model myší kolagenní artritidy. Tabulka 5 ukazuje výsledky hodnocení artritidy; tabulka 6 ukazuje výsledky hodnocení otoku nohy; tabulka 7 ukazuje změnu tělesné hmotnosti; a tabulka 8 ukazuje výsledky  
10 hodnocení změny v přijímání potravy.

### Experimentální metoda

Pro indukci artritidy byl použit koktejl artritogenní protilátky (s obchodním názvem koktejlu pro vyvolání artritidy Arthrogen-CIA®  
15 mAb, Arthritogenic mAb cocktail; vyráběný firmou Iwai Chemical Pharmaceutical Co., Ltd.) rozpoznávající čtyři epitopy specifické pro kolagen. Myším byl intravenózně podán artritogenní koktejl; o 3 dny později byl intraperitoneálně podán LPS (100 µg) pro vyvolání artritidy. Artrtida byla pozorována v den 3 po podání LPS a dosáhla maxima  
20 v den 6.

Bezprostředně před podáním LPS a o tři dny později byla intravenózně podána protilátka M5 v dávce 40 µg, 150 µg nebo 400 µg. Jako kontrolní skupina byla použita skupina, které byl podán králičí IgG (v dávce 400 µg). Dále byla intravenózně podána protilátka  
25 proti myšimu TNF-α v dávce 200 µg/myš bezprostředně před podáním

LPS a o tři dny později. Jako kontrolní skupina byly použity myši, kterým byl podán krysí IgG (v dávce 200  $\mu$ g). Dále byl orálně podáván MTX (v dávce 3,2 mg/kg) jednou denně v den podání LPS a později. Byl používán MTX rozpuštěný v 5 ml 0,5% methylcelulózy. V případě kontrolní skupiny bylo podáváno 5 ml 0,5% roztoku methylcelulózy.

Hodnocení se provádělo pro skupiny pěti zvířat, přičemž se provádělo hodnocení artritidy, otoku nohy, změna tělesné hmotnosti a změna příjmu potravy.

## 10 Výsledky experimentů

Jak je ukázáno v tabulkách 5 až 8, protilátka M5 měla určitý potlačující účinek na zlepšení hodnocení artritidy, opoždění nástupu artritidy a zlepšení stavu u otoku nohy v modelu myší artritidy (terapeutický účinek). Nástup artritidy byl potlačován v závislosti na koncentraci tak, že efekt převyšoval účinek podané protilátky proti myšimu TNF- $\alpha$  (v dávce 200  $\mu$ g/myš). Naopak MTX neměl téměř žádný farmaceutický účinek.

V normální skupině v rámci modelu byl navíc pozorován určitý úbytek tělesné hmotnosti o přibližně 3 g tři dny po podání LPS; tento sklon pokračoval v den 3 až den 6, ačkoli pokles hmotnosti byl více nebo méně omezen. Ve skupinách, kterým byla podána protilátka M5 (150  $\mu$ g, 400  $\mu$ g) a skupinám, kterým byla podána protilátka proti myšimu TNF- $\alpha$ , bylo pozorováno zjevné zlepšení hodnocení úbytku hmotnosti. Co se týče příjmu potravy, pro všechny farmaceutické látky byl pozorován rychlý pokles tělesné hmotnosti až do dne 3 po podání LPS; v den 3 až den 6 však došlo ke zmenšení poklesu ve všech skupinách, kterým byla podána protilátka M5, i ve skupině ošetřené protilátkou proti myšimu TNF- $\alpha$ . Tabulka 5 ukazuje účinek na hodnocení artritidy; tabulka 6 ukazuje potlačení otoku nohy; a tabulky 7 a 8 ukazují vliv na změnu tělesné hmotnosti, popřípadě příjem potravy.

**Tabulka 5**

Dny	Skupina, které byl podán králičí IgG (dávka 400 µg/myš)	Skupina, které byla podána protilátka M5 (dávka µg/myš)		
		40	150	400
3	1,2±1,1	2,4±1,7	1,0±1,2	0,0±0,0
4	1,8±1,3	3,4±1,1	1,4±0,5	0,2±0,4*
5	5,0±1,6	6,0±2,0	3,0±1,2*	1,8±0,4**
6	5,4±1,3	7,2±1,3	4,6±1,5	3,0±1,0*

\*\* P<0,01, \*P<0,05 (neparametrický test Mann-Whitney)

Dny	Skupina, které byl podán krysí IgG (dávka 200 µg/myš)	Skupina, které byla podána protilátka proti myšimu TNF-α (dávka 200 µg/myš)
3	0,8±0,4	1,0±0,6
4	2,4±0,2	1,0±0,5
5	5,8±0,4	3,2±0,5*
6	6,6±0,4	5,8±0,5

5

\* P<0,05 (neparametrický test Mann-Whitney)

Dny	Kontrolní skupina	Skupina, které byl podán MTX (dávka 3,2 mg/kg)
3	1,0±0,3	0,8±0,4
4	1,8±0,6	1,8±0,7
5	4,0±0,9	6,0±0,6
6	5,2±0,9	6,0±0,6

Tabulka 6

Místo	Objem otoku nohy (ml)				
	Normální skupina	Skupina, které byl podán králičí IgG (dávka 400 µg/myš)	Skupina, které byl podán M5 (dávka µg/myš)		
			40	150	400
Přední noha	0,041 ±0,003**	0,051 ±0,004	0,055±0,004	0,041±0,004**	0,038±0,001**
Zadní noha	0,117±0,004**	0,138±0,005	0,140±0,010	0,127±0,006	0,121±0,009**

\*\* P<0,01, \* P<0,05 (jednosměrný ANOVA, Dunnettův test)

Místo	Objem otoku nohy (ml)		
	Normální skupina	Skupina, které byl podán krysí IgG (dávka 200 µg/myš)	Skupina, které byla podána protilátka proti myššímu TNF-α (dávka 200 µg/myš)
Přední noha	0,041±0,003**	0,044±0,003	0,041±0,002
Zadní noha	0,117±0,004**	0,127±0,004	0,130±0,006

Místo	Objem otoku nohy (ml)		
	Normální skupina	Kontrolní skupina	Skupina, které byl podán MTX (dávka 3,2 mg/kg)
Přední noha	0,041±0,003**	0,044±0,002	0,047±0,003
Zadní noha	0,117±0,004**	0,129±0,005	0,132±0,003

Tabulka 7

	Změna tělesné hmotnosti (g)				
	Normální skupina	Skupina, které byl podán králičí IgG (dávka 400 µg/myš)	Skupina, které byl podán M5 (dávka µg/myš)		
			40	150	400
Den 0 až den 3 po podání	0,1	-2,8	-2,4	-1,6	-1,5
Den 3 až den 6 po podání	0,5	1,8	1,0	0,8	1,5

	Změna tělesné hmotnosti (g)		
	Normální skupina	Skupina, které byl podán krysí IgG (dávka 200 µg/myš)	Skupina, které byla podána protilátka proti myšimu TNF- $\alpha$ (dávka 200 µg/myš)
Den 0 až den 3 po podání	0,1	-2,9	-1,7
Den 3 až den 6 po podání	0,5	-1,7	-0,1

	Změna tělesné hmotnosti (g)		
	Normální skupina	Kontrolní skupina	Skupina, které byl podán MTX (dávka 3,2 mg/kg)
Den 0 až den 3 po podání	0,1	-2,9	-1,5
Den 3 až den 6 po podání	0,5	-2,7	-1,8

Tabulka 8

	Množství přijaté potravy (g/myš/den)				
	Normální skupina	Skupina, které byl podán králičí IgG (dávka 400 µg/myš)	Skupina, které byl podán M5 (dávka µg/myš)		
			40	150	400
Den 0 až den 3 po podání	2,7	1,0	0,9	1,4	1,1
Den 3 až den 6 po podání	2,9	2,4	2,3	2,4	2,8

	Množství přijaté potravy (g/myš/den)		
	Normální skupina	Skupina, které byl podán krysí IgG (dávka 200 µg/myš)	Skupina, které byla podána protilátka proti myšimu TNF- $\alpha$ (dávka 200 µg/myš)
Den 0 až den 3 po podání	2,7	1,0	1,3
Den 3 až den 6 po podání	2,9	2,5	2,8

	Množství přijaté potravy (g/myš/den)		
	Normální skupina	Kontrolní skupina	Skupina, které byl podán MTX (dávka 3,2 mg/kg)
Den 0 až den 3 po podání	2,7	0,9	0,8
Den 3 až den 6 po podání	2,9	2,4	2,1

### Příklad 13

#### Dostupnost peptidových fragmentů příbuzných OPN

Fragmenty peptidů příbuzných s OPN ve stavu vyčištěném chromatografií HPLC byly zakoupeny od firmy Auspep Inc., Parkiville, Austrálie. Jejich aminokyselinové sekvence jsou ukázány jako (1) až (3).

hOPN5:

CVDTYDGRGDSVVYGLRS (C+V153 až S169) (1)

10

hOPN3:

KSKKFRRPDIQYPDATDEC (K170 až E187+C) (2)

hOPN1:

IPVKQADSGSSEEKQC (I17 až Q31+C) (3)

15

### Příklad 14

#### Příprava antigenů pro imunizaci

Fragmenty peptidů příbuzných s OPN navázané na thyroglobulin byly připraveny procesem EMCS (N-(6-maleimidokaproyloxy)-sukcinimid) následujícím způsobem. Pro přípravu těchto produktů byl použit molární poměr thyroglobulinu, peptidového fragmentu příbuzného s OPN a EMCS 1 : 300 : 400.

Čtyři miligramy každého peptidového fragmentu příbuzného s OPN z příkladu 13 byly rozpuštěny v destilované vodě 1 ml. Alternativně bylo smíšeno 5 mg thyroglobulinu rozpuštěného v 1 ml 0,01M fosfátového pufru, pH 7,0 a EMCS rozpuštěný v koncentraci 80 µg/µl v dimethylformamidu, jednotlivě v množstvích odpovídajících

25

molárním poměrům, pro přípravu roztoku komplexu thyroglobulin-EMCS. Roztok komplexu byl rozdělen na tři části. Ke každé části byl přidán roztok fragmentu peptidu příbuzného s OPN v množství odpovídajícím molárním poměrům za získání roztoku produktu  
5 zesíťeného EMCS peptidového fragmentu příbuzného s OPN navázaného na thyroglobulin.

Roztok takto navázaného produktu byl dialyzován s použitím PBS pro upravení koncentrace produktu na 10 µg/µl. Navázaný produkt peptidového fragmentu příbuzného s OPN a thyroglobulinu byl  
10 použit jako antigen pro imunizaci.

#### Příklad 15

##### Příprava antigenů pro screening

Proteiny OPN pro screening, tedy fúzní proteiny mezi GST a  
15 isoformami lidského OPN, jmenovitě GST-OPN-a, GST-OPN-b a GST-OPN-c, a fúzní proteiny mezi GST a fragmentem OPN na straně aminoskupiny (GST-Nhalf) z místa štěpeného thrombinem a fragmentem OPN na straně karboxylové skupiny (GST-Chalf) ze stejného místa štěpeného thrombinem byly připraveny metodou  
20 popsanou v příkladu 1, pro použití v testu reaktivity antiséra s OPN.

#### Příklad 16

##### Imunitní senzitivace

Králík byl imunizován s použitím navázaných produktů  
25 peptidových fragmentů příbuzných s OPN a thyroglobulinu připravených v příkladu 14 jako antigenů pro imunizaci. Imunizace byla prováděna použitím posilovací dávky 100 µl (100 µg) roztoku navázaného produktu každý týden nebo každé dva týdny. Antigeny byly smíseny s Freundovým kompletním adjuvans pro první imunizaci  
30 a potom byly smíseny s Freundovým nekompletním adjuvans pro

druhou a následující imunizaci. Po osminásobné imunizaci bylo ze vzorku krve odděleno sérum, které potom bylo použito jako antisérum.

### Příklad 17

#### 5 Reaktivita antiséra s OPN

Peptidové fragmenty příbuzné s OPN připravené v příkladu 13 byly zředěny 0,1M karbonátovým pufrům, pH 9,5, na koncentraci 10 µg/ml, a roztoky byly potom imobilizovány v množství 50 µl/jamku na 96-jamkové destičce. Po opláchnutí PBS a blokování roztokem  
10 0,1% BSA/PBS/0,05% NaN<sub>3</sub>, byla v množství 50 µl/jamku vložena dvojnásobná sériová ředění stonásobného ředění antiséra získaného v příkladu 16 a reakce byla ponechána probíhat při 37 °C 30 min.

Po ukončení reakce byla jamka čtyřikrát propláchnuta 0,05% Tween 20-PBS. Potom bylo do každé jamky přidáno vždy 50 µl HRP-  
15 značené protilátky proti králičímu IgG (vyráběná firmou IBL Co., Ltd.) a reakce byla ponechána probíhat při 37 °C 30 min. Po ukončení reakce bylo do každé jamky přidáno 100 µl vždy 0,05M citrátového pufru, pH 4,5 s obsahem 0,4 mg/ml orthofenylendiaminu (OPD) a vodného  
20 0,03% peroxidu vodíku. Potom byla destička ponechána stát v temnu při laboratorní teplotě 15 min, přičemž probíhala chromogenní reakce. Po ukončení chromogenní reakce bylo do každé jamky přidáno 100 µl 1N kyseliny sírové pro ukončení reakce a byla měřena absorbance při 492 nm.

Použitím proteinů OPN připravených v příkladu 15 byla  
25 alternativně testována reaktivita antiséra metodou westernového přenosu. antiséra proti peptidovým fragmentům příbuzným s OPN, hOPN1 a hOPN5 reagovala s GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-c a GST-Nhalf, ale nikdy nereagovala GST-Chalf. Alternativně reagovala antiséra proti peptidovému fragmentu příbuznému s OPN, hOPN3,

s GST-OPN-a, GST-OPN-b, GST-OPN-c a GST-Chalf, ale nikdy nereagovala s GST-Nhalf.

### Příklad 18

#### 5 Příprava produktů protilátek proti peptidovým fragmentům příbuzným s OPN s navázanou HRP

Produkty protilátek proti peptidovým fragmentům příbuzným s OPN s navázanou HRP, hOPN3 a hOPN1, byly připraveny následujícím způsobem. 20 mg každé protilátky proti peptidovému  
10 fragmentu příbuznému s OPN bylo štěpeno pepsinem a potom byla provedena gelová filtrace pro vyčištění fragmentu F(ab')<sub>2</sub> protilátky proti peptidovému fragmentu příbuznému s OPN. Potom byl fragment F(ab')<sub>2</sub> převeden na fragment Fab' použitím 2-merkptoethanolu. HRP byla ponechána reagovat s EMCS při 37 °C 60 min a potom byla  
15 provedena gelová filtrace pro přípravu navázaného produktu HRP-EMCS, který dále reagoval s fragmentem Fab' protilátky proti peptidovému fragmentu příbuznému s OPN při 4 °C přes noc a potom byla provedena gelová filtrace pro přípravu produktu protilátky proti peptidovému fragmentu příbuznému s OPN s navázanou HRP  
20 zesítnou EMCS.

### Příklad 19

#### Konstrukce sendvičových systémů ELISA

Z kombinací sendvičové destičky ELISA a značených protilátek  
25 byly připraveny dva typy systémů, totiž 1 - 3 a 5 - 1. Systém 1 - 3 byl připraven následovně. 10 µg/ml protilátky proti peptidovému fragmentu hOPN1 příbuznému s OPN bylo přidáno množství 100 µl do každé jamky 96-jamkové destičky ELISA. Po reakci přes noc při 4 °C bylo provedeno blokování roztokem 10% BSA/PBS/NaN<sub>3</sub>. Získaná destička  
30 v tomto stavu byla použita jako destička pro sendvičovou ELISA. Jako

značená protilátka byl definován produkt protilátky proti peptidovému fragmentu hOPN3 příbuznému s OPN s navázanou HRP získaný v příkladu 18. Jak bylo popsáno výše, kombinace mezi imobilizační destičkou s použitím protilátky proti hOPN1 a značenou protilátkou s použitím protilátky proti hOPN3 byla definována jako systém 1 - 3.

Stejným způsobem byla zkonstruována kombinace imobilizační destičky s použitím protilátky proti hOPN5 a značené protilátky s použitím protilátky proti hOPN1 jako systém 5 - 1.

## 10 Příklad 20

### Test na osteopontin v systémech sendvičové ELISA

Protein OPN byl zjišťován následujícím způsobem. 100 µl roztoku obsahujícího vzorek plasmy nebo tekutiny z kloubní dutiny testovaného subjektu bylo přidáno na destičky pro sendvičovou ELISA systémů 1 - 3 a 5 - 1 a byla ponechána probíhat reakce při 37 °C 1 h. Po reakci byly destičky 4 x opláchnuty 0,05% Tween 20-PBS a potom bylo přidáno 100 µl každé ze značených protilátek specifických pro jednotlivé systémy pro reakci při 4 °C 30 min. po ukončení reakce byly destičky 6 x opláchnuty pufrem 0,05 % Tween 20-PBS a potom bylo přidáno 100 µl roztoku TMB (tetramethylbenzidin). Potom byly získané destičky ponechány stát v temnu při laboratorní teplotě 30 min. Pro ukončení reakce byla použita 1N kyselina sírová a absorbance byla měřena při 450 nm.

Tabulka 9 ukazuje hodnoty množství OPN v tekutinách kloubních dutin pacientů (13 případů) s revmatismem s použitím této metody měření a tabulka 10 ukazuje hodnoty množství OPN v tekutinách kloubní dutiny u pacientů (12 případů s osteoartritidou). Dále ukazuje tabulka 11 hodnoty množství OPN v plasmě pacientů s revmatismem (16 případů); tabulka 12 ukazuje hodnoty OPN v

plasmě pacientů s osteoartritidou (7 případů); a tabulka 13 ukazuje hodnoty OPN v plasmě normálních pacientů (6 případů).

Z těchto výsledků je jasně vidět, že srovnání systému 1 - 3 z hlediska hodnoty OPN v plasmě mezi pacienty s revmatoidní artritidou, pacienty s osteoartritidou a normálními pacienty neukazuje žádný významný rozdíl.

Srovnání provedené s pomocí systému 5 - 1 z hlediska hodnot OPN v plasmě mezi pacienty s revmatoidní artritidou, pacienty s osteoartritidou a normálními pacienty však ukázalo podstatně vyšší hodnoty OPN v plasmě u pacientů s revmatoidní artritidou a pacientů s osteoartritidou než je hodnota OPN u normálních osob. Hladina významnosti byla vyšší u pacientů s revmatoidní artritidou. To ukazuje, že celkové množství OPN zjišťované v případě systému 5 - 1, je vhodné pro diagnostiku obecné kategorie artritidy.

Hodnoty OPN v tekutinách kloubní dutiny pacientů s revmatoidní artritidou a pacientů s osteoartritidou jsou vyšší než hodnoty OPN v jejich plasmě, což ukazuje na lokální tvorbu OPN.

Porovnání se systémy 1 - 3 a 5 - 1 z hlediska hodnoty OPN v kapalině kloubní dutiny u pacientů s revmatoidní artritidou a pacientů s osteoartritidou ukázalo, že hodnota OPN u pacientů s revmatoidní artritidou byla významně vyšší než hodnota OPN u pacientů s osteoartritidou, jestliže bylo použito kteréhokoli systému 1 - 3 a 5 - 1.

Jako nový indikátor byl vyšetřován poměr hodnot OPN u těchto systémů 1 - 3 a 5 - 1. Tento indikátor může být použit pro srovnání poměru thrombinem rozštěpeného OPN. Hodnoty OPN v plasmě tekutin kloubní dutiny pacientů s revmatoidní artritidou byly 1 nebo nižší, a hodnoty OPN u pacientů s osteoartritidou byly 2 nebo vyšší, takže byl pozorován významný rozdíl. Tyto hodnoty OPN u systému 1 - 3/5 - 1 mohou být použity pro diagnostické rozlišení pacientů s revmatismem od pacientů s osteoartritidou v časném stadiu.

Tabulka 9

Vzorek	Systém 1 - 3 (ng/ml)	Systém 5 - 1 (ng/ml)	Systém 1 - 3/ systém 5 - 1
RA 1	8498	2932	2,898
RA 2	22715	26223	0,866
RA 3	2659	1905	1,396
RA 4	20186	94430	0,214
RA 5	1520	2002	0,759
RA 6	5870	2238	2,623
RA 7	7303	56753	0,129
RA 8	2200	6268	0,351
RA 9	18344	59873	0,306
RA10	2133	2002	1,065
RA11	26804	33036	0,811
RA12	18868	32824	0,575
RA13	3633	6067	0,599
Střední hodnota	10825,6	25119,5	0,969

Tabulka 10

Vzorek	Systém 1 - 3 (ng/ml)	Systém 5 - 1 (ng/ml)	Systém 1 - 3/ systém 5 - 1
OA 1	1520	3471	0,438
OA 2	9957	14374	0,693
OA 3	6595	2932	2,249
OA 4	3523	237	14,865
OA 5	8619	28483	0,303
OA 6	1926	896	2,150
OA 7	653	850	0,768
OA 8	6490	7814	0,831
OA 9	4750	1987	2,391
OA10	6830	2932	2,329
OA11	386	181	2,133
OA12	1621	356	4,553
Střední hodnota	4405,8	5376,1	2,808

Tabulka 11

Vzorek	Systém 1 - 3 (ng/ml)	Systém 5 - 1 (ng/ml)	Systém 1 - 3/ systém 5 - 1
RA 1	1621	1379	1,175
RA 2	532	845	0,630
RA 3	132	617	0,214
RA 4	142	1758	0,081
RA 5	624	2089	0,299
RA 6	341	1990	0,171
RA 7	152	845	0,180
RA 8	671	224	2,996
RA 9	543	557	0,975
RA10	947	431	2,197
RA11	935	1794	0,521
RA12	1008	1650	0,611
RA13	636	678	0,938
RA14	464	545	0,851
RA15	683	488	1,400
RA16	1057	597	1,771
Střední hodnota	6555	1030,4	0,938

Tabulka 12

Vzorek	Systém 1 - 3 (ng/ml)	Systém 5 - 1 (ng/ml)	Systém 1 - 3/ systém 5 - 1
OA 1	695	302	2,301
OA 2	1094	412	2,655
OA 3	1070	557	1,921
OA 4	75	1129	0,066
OA 5	814	356	2,286
OA 6	959	276	3,475
OA 7	983	311	3,161
Střední hodnota	812,9	477,6	2,267

Tabulka 13

Vzorek	Systém 1 - 3 (ng/ml)	Systém 5 - 1 (ng/ml)	Systém 1 - 3/ systém 5 - 1
Normální 1	475	199	2,387
Normální 2	578	249	2,321
Normální 3	802	232	3,457
Normální 4	983	384	2,560
Normální 5	520	284	1,831
Normální 6	624	215	2,902
Střední hodnota	663,7	260,5	2,576

**Zastupuje:**

## PATENTOVÉ NÁROKY

1. Protilátka proti osteopontinu která může inhibovat vazbu mezi  
5 integrinem rozpoznávajícím místo aminokyselinové sekvence  
RGD a osteopontinem nebo jeho fragmentem, a která může také  
inhibovat vazbu mezi integrinem rozpoznávajícím místo  
aminokyselinové sekvence SVVYGLR nebo odpovídající  
ekvivalentní sekvencí a osteopontinem nebo jeho fragmentem.  
10
2. Protilátka proti osteopontinu která může inhibovat vazbu mezi  
integrinem rozpoznávajícím místo aminokyselinové sekvence  
RGD a osteopontinem nebo jeho fragmentem, a která může také  
inhibovat vazbu mezi  $\alpha 9\beta 1$  integrinem a osteopontinem nebo  
15 jeho fragmentem.
3. Protilátka proti osteopontinu která může inhibovat vazbu mezi  
integrinem rozpoznávajícím místo aminokyselinové sekvence  
RGD a osteopontinem nebo jeho fragmentem, a která může také  
20 inhibovat vazbu mezi  $\alpha 4$  integrinem a osteopontinem nebo jeho  
fragmentem.
4. Protilátka proti osteopontinu která může inhibovat vazbu mezi  
integrinem rozpoznávajícím místo aminokyselinové sekvence  
25 RGD a osteopontinem nebo jeho fragmentem, a která může také  
inhibovat vazbu mezi  $\alpha 9\beta 1$  integrinem a osteopontinem nebo  
jeho fragmentem, a vazbu mezi  $\alpha 4$  integrinem a osteopontinem  
nebo jeho fragmentem.

5. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 4, kde tímto fragmentem je N-koncový fragment osteopontinu.
  
- 5 6. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 5, kde tato protilátka je vytvořena proti peptidu obsahujícímu částečnou aminokyselinovou sekvenci RGDSVVYGLR jako antigenu.
  
- 10 7. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 6, kde tato protilátka je vytvořena proti peptidu obsahujícímu částečnou aminokyselinovou sekvenci RGDSVVYGLRS jako antigenu.
  
- 15 8. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 7, kde tato protilátka je vytvořena proti peptidu VDTYDGRGDSVVYGLRS jako antigenu.
  
- 20 9. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 5, kde tato protilátka je vytvořena proti peptidu obsahujícímu částečnou aminokyselinovou sekvenci RGDSLAYGLR jako antigenu.
  
- 25 10. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 5, kde tato protilátka je vytvořena proti peptidu CVDVPNGRGDSLAYGLR jako antigenu.

11. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 10, kde tato protilátka je monoklonální protilátka.
12. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 8, kde tato protilátka je humanizovaná protilátka.
13. Protilátka proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 8, kde tato protilátka je protilátka lidského typu.
14. Farmaceutický prostředek pro léčení autoimunitních onemocnění, vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahuje protilátku proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13.
15. Farmaceutický prostředek pro léčení revmatismu, vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahuje protilátku proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13.
16. Farmaceutický prostředek pro léčení revmatoidní artritidy, vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahuje protilátku proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13.
17. Farmaceutický prostředek pro léčení osteoartritidy, vyznačující se tím, že jako účinnou látku obsahuje protilátku proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13.

18. Způsob léčení autoimunitních onemocnění, který zahrnuje podávání protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pacientovi s autoimunitními onemocněními.
- 5
19. Způsob léčení revmatismu, který zahrnuje podávání protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pacientovi s revmatismem.
- 10
20. Způsob léčení revmatoidní artritidy, který zahrnuje podávání protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pacientovi s revmatoidní artritidou.
- 15
21. Způsob léčení osteoartritidy, který zahrnuje podávání protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pacientovi s osteoartritidou.
- 20
22. Způsob screeningu na léčivo pro léčení autoimunitních onemocnění, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje vyhodnocení testované sloučeniny z hlediska stupně inhibice vazby mezi místem sekvence RGD osteopontinu a integrinem a/nebo vazby mezi místem sekvence SVVYGLR a integrinem.
- 25
23. Způsob screeningu na léčivo pro léčení revmatismu, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje vyhodnocení testované sloučeniny z hlediska stupně inhibice vazby mezi místem sekvence RGD osteopontinu a integrinem a/nebo vazby mezi místem sekvence SVVYGLR a integrinem.

24. Způsob screeningu na léčivo pro léčení revmatoidní artritidy, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje vyhodnocení testované sloučeniny z hlediska stupně inhibice vazby mezi 5 místem sekvence RGD osteopontinu a integrinem a/nebo místem sekvence SVVYGLR a integrinem.
25. Způsob screeningu na léčivo pro léčení osteoartritidy, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e zahrnuje vyhodnocení 10 testované sloučeniny z hlediska stupně inhibice vazby mezi místem sekvence RGD osteopontinu a integrinem a/nebo místem sekvence SVVYGLR a integrinem.
26. Protilátka proti isoformě OPN, která je připravena ponecháním 15 peptidového fragmentu odpovídajícího isoformě OPN navázat se na biopolymerní sloučeninu, imunizací zvířete získaným navázaným produktem a izolací protilátky ze zvířete.
27. Protilátka proti isoformě OPN podle nároku 26, kde uvedeným 20 peptidovým fragmentem odpovídajícím isoformě OPN je peptid následujícího vzorce (1), (2) nebo (3):
- CVDTYDGRGDSVVYGLRS (1)
- KSKKFRRPDIQYPDATDEC (2)
- IPVKQADSGSSEEKQC (3).
- 25
28. Diagnostická metoda pro rozlišení zánětlivých abnormalit mezi 25 revmatoidní artritidou a osteoartritidou, která zahrnuje detekci N-koncového fragmentu OPN, a detekční kit pro provádění této metody.

29. Metoda rozlišení zánětlivých abnormalit podle nároku 28, kde tato metoda zahrnuje použití tekutiny z kloubní dutiny nebo plasmy, a detekční kit pro provádění této metody.
- 5
30. Detekční kit pro zjišťování zánětlivých abnormalit, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e obsahuje kombinaci prvního imunodetekčního činidla využívajícího sady dvou ze tří typů uvedených protilátek proti isoformě OPN podle nároku 27 s druhým imunodetekčním činidlem využívajícím další sady dvou ze tří typů uvedených protilátek.
- 10
31. Detekční kit pro zjišťování zánětlivých abnormalit podle nároku 29, v y z n a č u j í c í s e t í m , ž e uvedené dva typy protilátek pro použití v prvním imunodetekčním činidle jsou protilátky proti peptidům individuálně reprezentovaným následujícími vzorci (3) a (2):
- 15
- IPVKQADSGSSEEKQC (3)
- KSKKFRRPDIQYPDATDEC (2); a
- 20
- uvedené dva typy protilátek pro použití v druhém imunodetekčním činidle jsou protilátky proti peptidům individuálně reprezentovaným následujícími vzorci (1) a (3):
- CVDTYDGRGDSVVYGLRS (1)
- IPVKQADSGSSEEKQC (3).
- 25
32. Použití protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení autoimunitních onemocnění.

33. Použití protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení revmatismu.

5

34. Použití protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení revmatoidní artritidy.

10 35. Použití protilátky proti osteopontinu podle některého z nároků 1 až 13 pro výrobu farmaceutického prostředku pro léčení osteoarthritis.

15

**Zastupuje:**

05.11.03

PV 2003-2697

- 1/6 -

VÝPIS SEKVENCÍ

<110> Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd.  
Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd.

<120> Anti-osteopontin antibody and use thereof

<130> PF-020002-WO

<140>

<141>

<150> JP 2001-290700

<151> 2001-09-25

<150> JP 2001-107578

<151> 2001-04-05

<160> 18

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: (1) hOPN5

<400> 1

Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu  
1 5 10 15

Arg Ser

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: (2) hOPN3

- 2/6 -

&lt;400&gt; 2

Lys Ser Lys Lys Phe Arg Arg Pro Asp Ile Gln Tyr Pro Asp Ala Thr  
 1 5 10 15

Asp Glu Cys

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:(3)hOPN1

&lt;400&gt; 3

Ile Pro Val Lys Gln Ala Asp Ser Gly Ser Ser Glu Glu Lys Gln Cys  
 1 5 10 15

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:OPN-5

&lt;400&gt; 4

cgggatccac taccatgaga attgcagtga tttgc

35

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence:OPN-3

&lt;400&gt; 5

ccgctcgagt taattgacct cagaagatgc actatc

36

- <210> 6  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:OPNct-3  
  
 <400> 6  
 acacagcatt cttttccaca gaacttcag aatcagc 37
- <210> 7  
 <211> 35  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:OPNct-5  
  
 <400> 7  
 tgaggaaaag aatgctgtgt cctctgaaga aaacc 35
- <210> 8  
 <211> 32  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:OPNnh-3  
  
 <400> 8  
 gcctcgagtt acctcagtc ataaaccaca ct 32
- <210> 9  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:OPNch-3  
  
 <400> 9  
 tcttagattt ggcacaggtg atgcttagga g 31

<210> 10  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:OPNch-5

<400> 10  
 cacctgtgcc aaatctaaga agtttcgcag a 31

<210> 11  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:peptide1

<400> 11  
 Cys Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu  
 1 5 10 15

Arg Ser

<210> 12  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:peptide2

<400> 12  
 Cys Ile Asp Ser Gln Glu Leu Ser Lys Val Ser Arg Glu Phe His Ser  
 1 5 10 15

His

<210> 13  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:M5peptide

<400> 13  
 Cys Val Asp Val Pro Asn Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu  
   1                  5                  10                  15

Arg

<210> 14  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:fragment  
           peptide

<400> 14  
 Ser Val Val Tyr Gly Arg Leu  
   1                  5

<210> 15  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence:fragment  
           peptide

<400> 15  
 Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg Ser  
   1                  5                  10

<210> 16  
 <211> 17

- 6/6 -

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:fragment  
peptide

&lt;400&gt; 16

Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Val Val Tyr Gly Leu Arg  
1 5 10 15

Ser

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence:fragment  
peptide

&lt;400&gt; 17

Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg Ser  
1 5 10

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

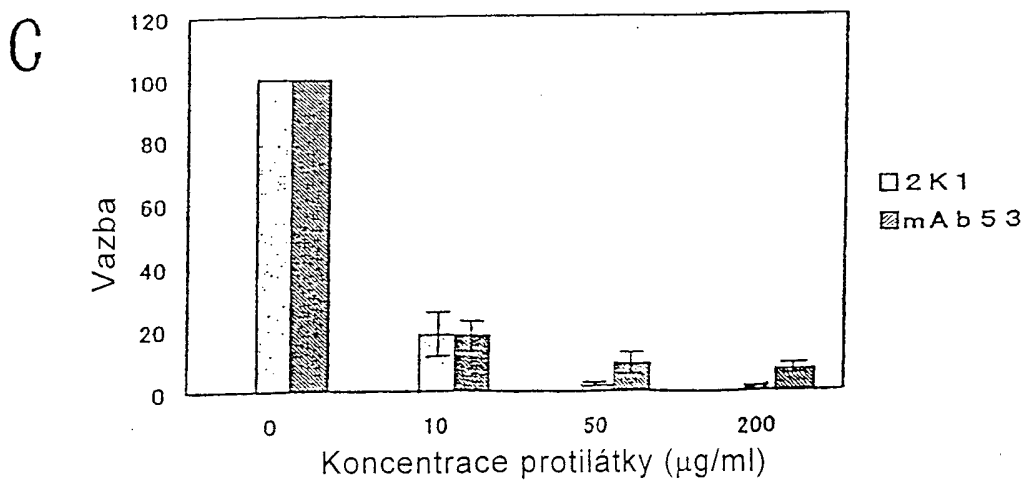
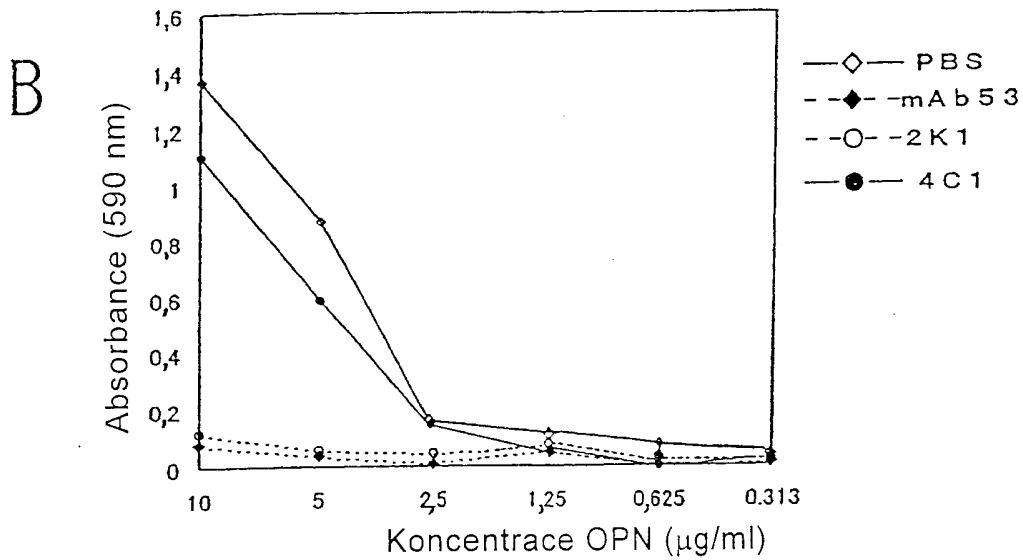
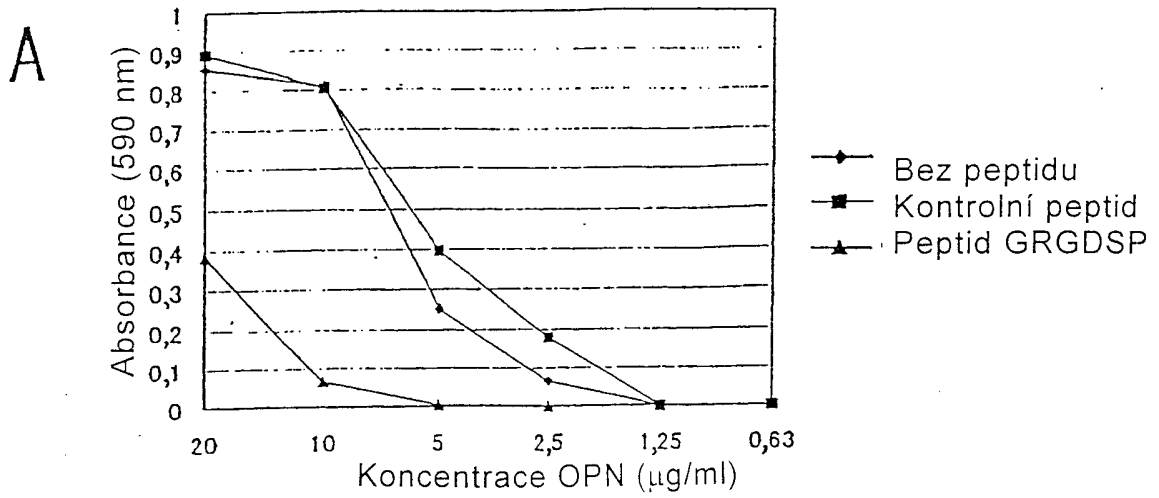
<223> Description of Artificial Sequence:fragment  
peptide

&lt;400&gt; 18

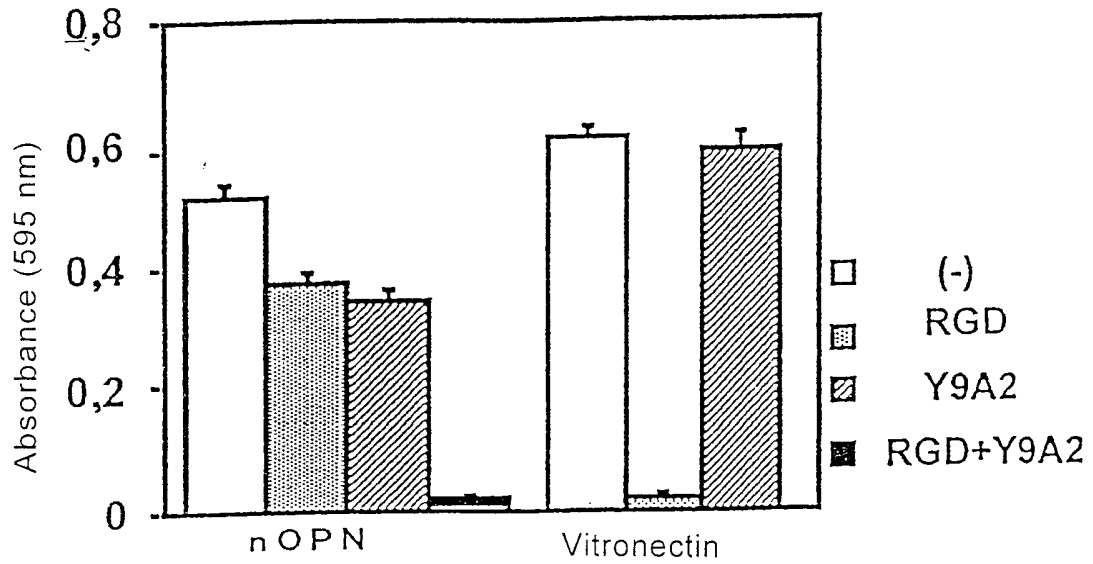
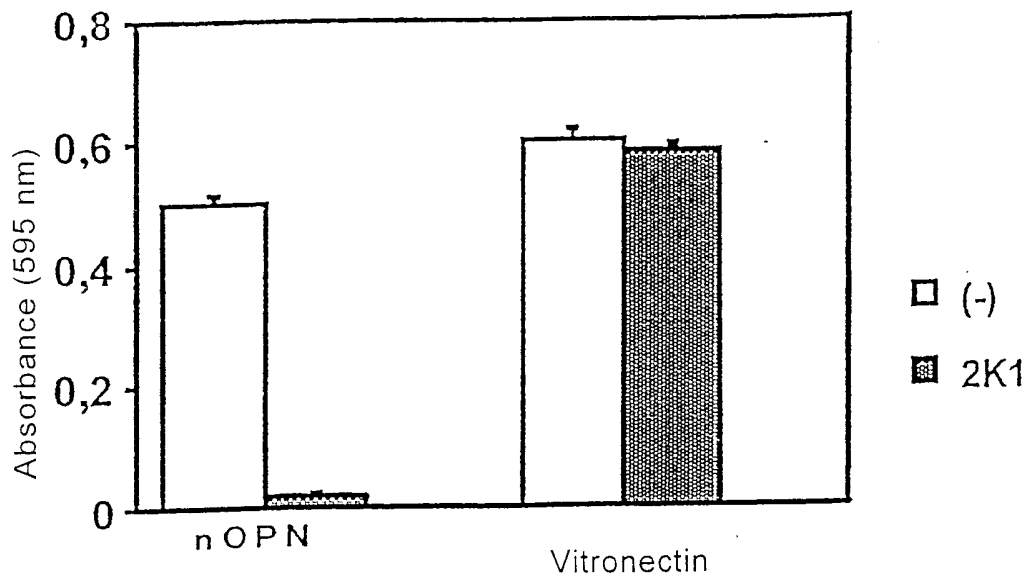
Val Asp Thr Tyr Asp Gly Arg Gly Asp Ser Leu Ala Tyr Gly Leu Arg  
1 5 10 15

Ser

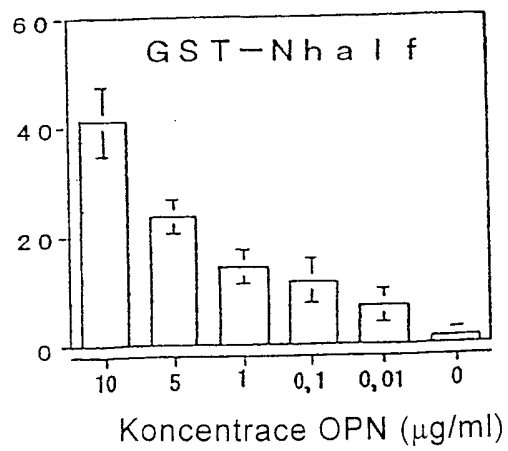
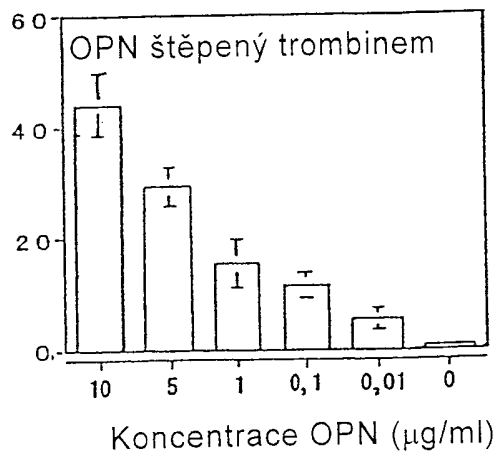
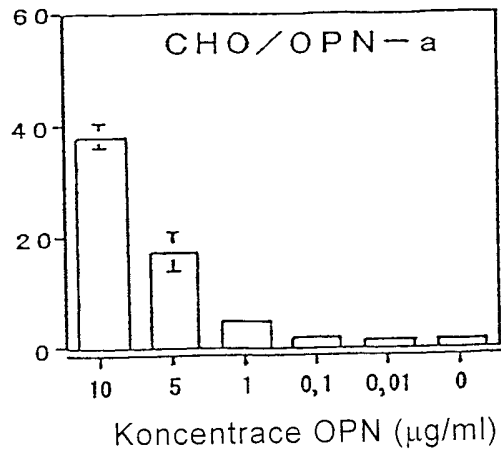
Obr. 1



Obr. 2

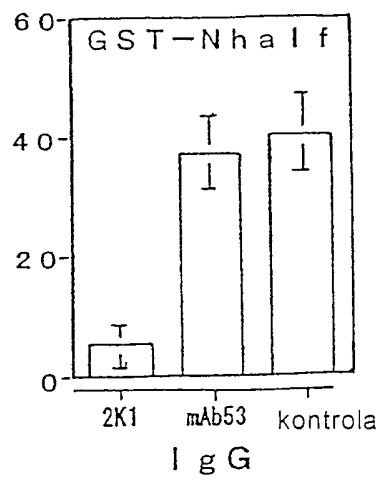
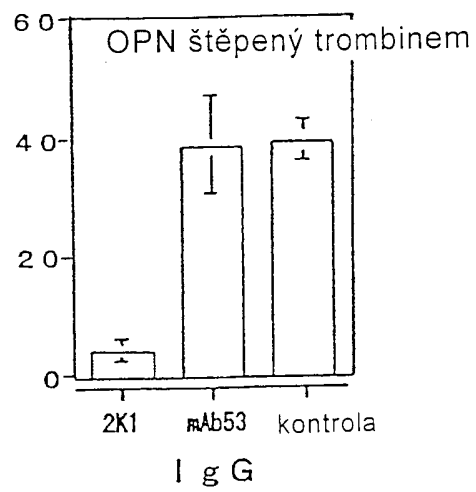
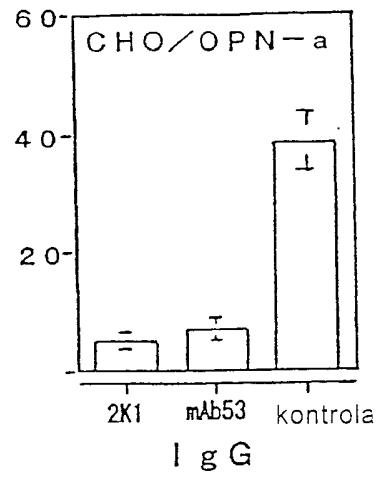
**A****B**

Obr. 3a

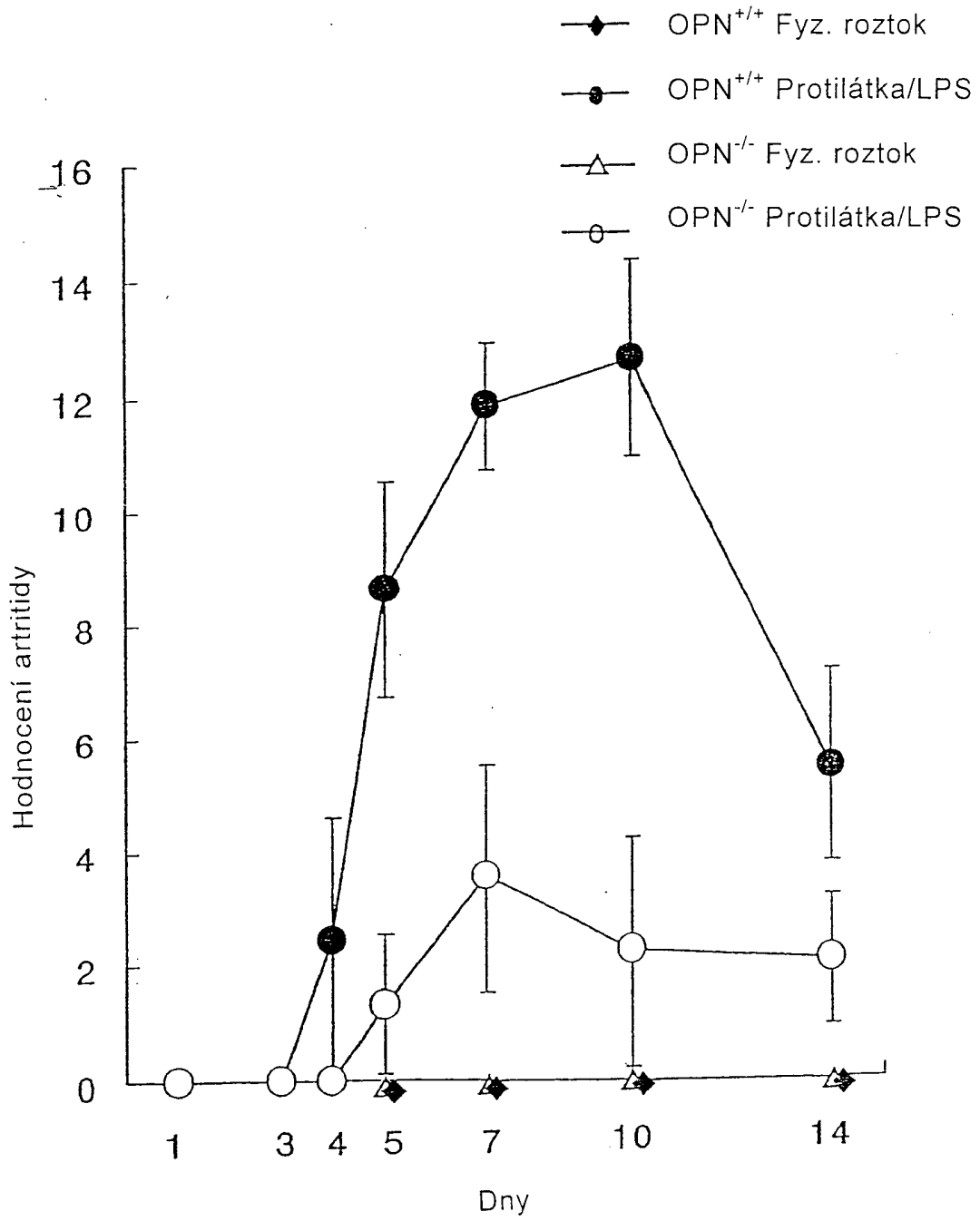


A  
Migrace monocyty indukovaná OPN

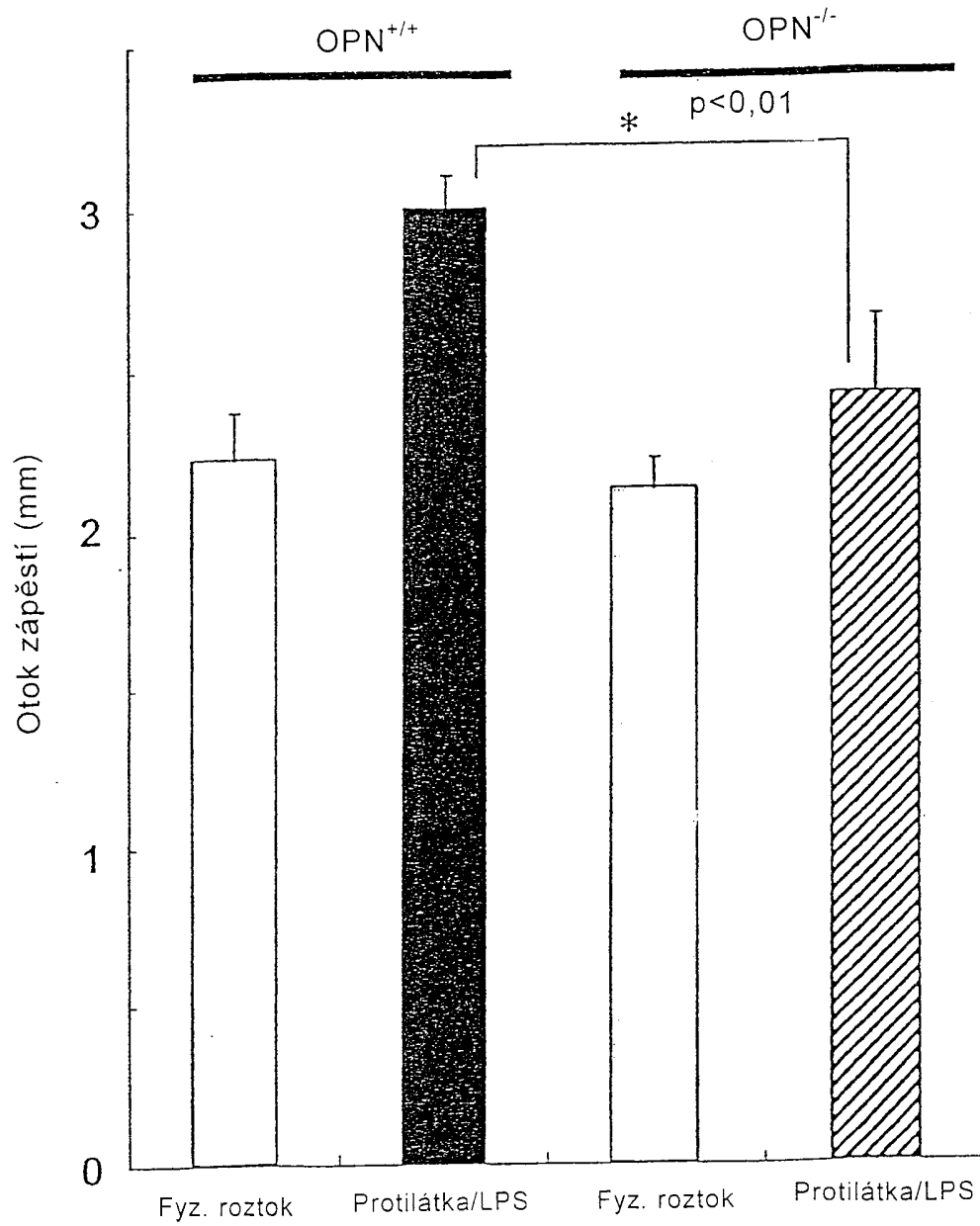
Obr. 3b

B  
Inhibice migrace monocytů indukované OPN

Obr. 4



Obr. 5



- 7/8 -

Obr. 6

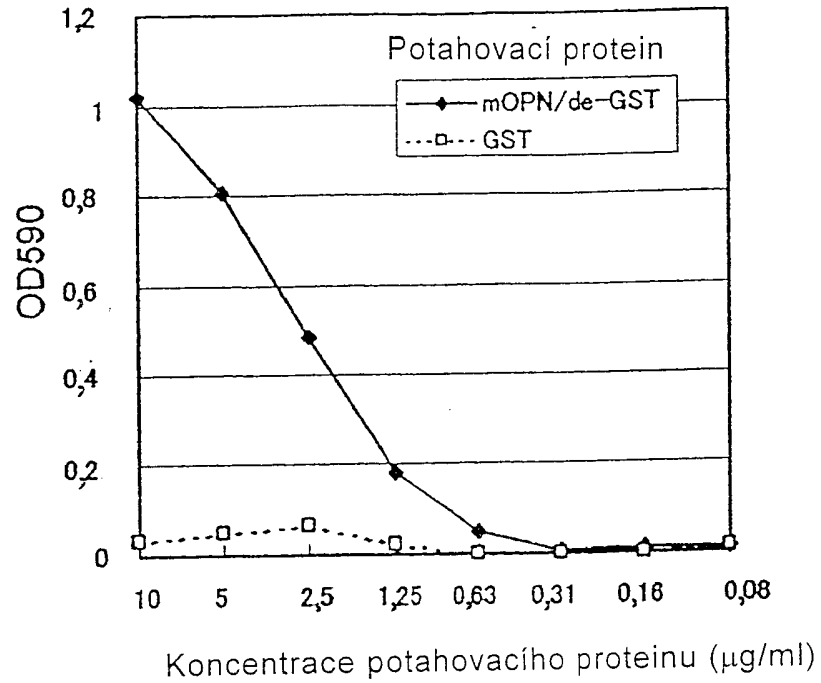
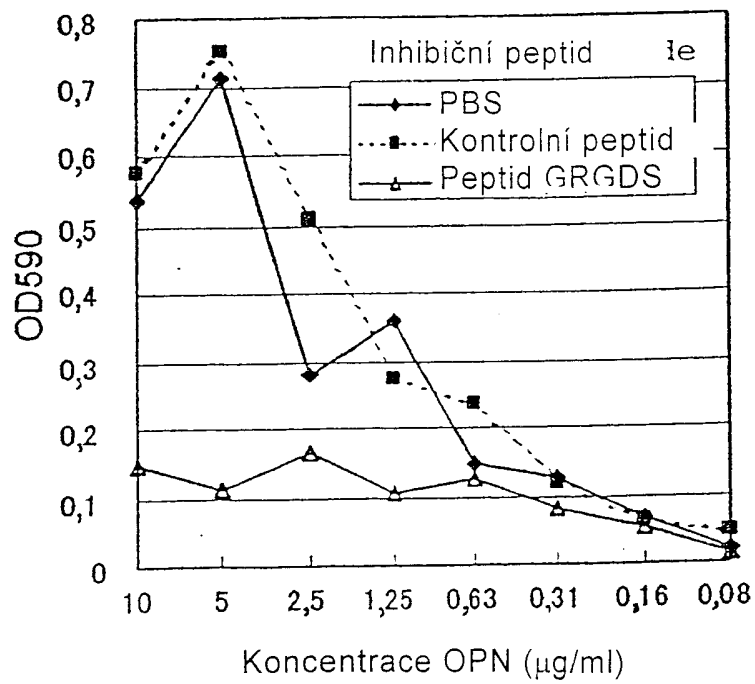


Fig. 7



Obr. 8

