



УКРАЇНА

(19) UA (11) 83790 (13) C2

(51) МПК (2006)

A61K 38/17

A61K 38/21

A61K 48/00

C07K 14/52 (2006.01)

C12N 15/19

A61P 17/02 (2008.01)

A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ SARP-1 ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ТА/АБО ПОПЕРЕДЖЕННЯ ФІБРОЗНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

1

2

(21) 2003076266

(22) 30.11.2001

(24) 26.08.2008

(86) PCT/EP01/13992, 30.11.2001

(31) 00126771.5

(32) 06.12.2000

(33) EP

(31) 01118888.5

(32) 17.08.2001

(33) EP

(46) 26.08.2008, Бюл.№ 16, 2008 р.

(72) ПЛАТЕР-ЗІБЕРК КРІСТІН, ПАУЕР КРІСТІН,
КОЛІНЖ ЖАК

(73) ЛАБОРАТУАР СЕРОНО С.А.

(56) WO 9835043 A, 13.08.1998

EP 0328255 A, 16.08.1989

WO 9801555 A, 15.01.1998

WO 9813493 A, 02.04.1998

US 5858715 A, 12.01.1999

S.D.SULE ET AL.: "Update on management of scleroderma." BULLETIN ON THE RHEUMATIC DISEASES, vol. 49, no. 10, February 2000 (2000-02), pages 1-4, XP002231752 Atlanta, GA,US

H. SCHUMANN ET AL.: "Altered expression of secreted apoptosis related proteins (SARPs) in failing human myocardium suggests autocrine modulation of Wnt/Frizzled signalling by cardiac overload." CIRCULATION, vol. 110, no. 18 suppl., 2 November 1999 (1999-11-02), page I-759 XP008013914

(57) 1. Застосування речовини, вибраної з групи, що складається з:

а) зрілого SARP-1;

б) фрагмента SARP-1, що містить багатий цистеїном "завитий" домен;

(с) поліпептиду, що містить SEQ ID NO: 2;

(d) поліпептиду, що містить амінокислоти з 21 по 295 SEQ ID NO: 2;

(e) поліпептиду, що містить амінокислоти з 24 по 295 SEQ ID NO: 2;

(f) поліпептиду, що містить амінокислоти з 25 по

295 SEQ ID NO: 2;

(g) поліпептиду, що містить амінокислоти з 26 по 295 SEQ ID NO: 2;

(h) поліпептиду, що містить амінокислоти з 27 по 295 SEQ ID NO: 2;

(i) поліпептиду, що містить амінокислоти з 28 по 295 SEQ ID NO: 2;

(j) поліпептиду, що містить амінокислоти з 37 по 295 SEQ ID NO: 2;

(k) мутеїну будь-якого з (a)-(j), в якому амінокислотна послідовність має принаймні 70 % або 80 %, або 90 % ідентичність принаймні з однією з послідовностей в (a)-(j);

(l) мутеїну будь-якого з (a)-(j), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з (a)-(j), при помірно жорстких умовах або при надзвичайно жорстких умовах;

(m) мутеїну будь-якого з від (a) до (j), в якому будь-які зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними заміщеннями в амінокислотних послідовностях в (a)-(j); і

(n) солі або ізоформи, злитого білка, функціонального похідного або активної фракції будь-якого з (a)-(m),

для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дюпюїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

2. Застосування за п.1, при якому речовина є глікозилюваною по одній або більше ділянках.

3. Застосування за будь-яким з пп.1-2, при якому злитий білок включає сполуку з імуноглобуліном (Ig).

4. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, при якому функціональне похідне містить що-

(13) C2

(11) 83790

(19) UA

найменше одну складову, приєднану до однієї або більше функціональних груп, які зустрічаються у вигляді одного або більше бічних ланцюгів на амінокислотних залишках.

5. Застосування за п.4, при якому складова являє собою поліетиленову складову.

6. Застосування молекули нуклеїнової кислоти для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу, причому молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, кодує поліпептид, який включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

(a) зрілого SARP-1;

(b) фрагмента SARP-1, що містить багатий цистеїном "завитий" домен;

(c) поліпептиду, що містить SEQ ID NO: 2;

(d) поліпептиду, що містить амінокислоти з 21 по 295 SEQ ID NO: 2;

(e) поліпептиду, що містить амінокислоти з 24 по 295 SEQ ID NO: 2;

(f) поліпептиду, що містить амінокислоти з 25 по 295 SEQ ID NO: 2;

(g) поліпептиду, що містить амінокислоти з 26 по 295 SEQ ID NO: 2;

(h) поліпептиду, що містить амінокислоти з 27 по 295 SEQ ID NO: 2;

(i) поліпептиду, що містить амінокислоти з 28 по 295 SEQ ID NO: 2;

(j) поліпептиду, що містить амінокислоти з 37 по 295 SEQ ID NO: 2;

(k) мутеїну будь-якого з (a)-(j), в якому амінокислотна послідовність має принаймні 70 % або 80 %, або 90 % ідентичність принаймні з однією з послідовностей в (a)-(j);

(l) мутеїну будь-якого з (a)-(j), який кодується послідовністю ДНК, яка гібридизується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з (a)-(j), при помірно жорстких умовах або при надзвичайно жорстких умовах;

(m) мутеїну будь-якого з від (a) до (j), в якому будь-які зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними заміщеннями в амінокислотних послідовностях в (a)-(j); і

(n) ізоформи, злитого білка або активної фракції будь-якого з (a)-(m).

7. Застосування вектора, що містить молекулу нуклеїнових кислот за п.6, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

8. Застосування за п.7, при якому вектор є експресуючим вектором.

9. Застосування за п.7 або 8, при якому вектор

являє собою вектор генної терапії.

10. Застосування вектора для індукції і/або збільшення ендогенної продукції поліпептиду за п.1 в клітині для одержання лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

11. Застосування клітини, що містить вектор за будь-яким з пп.7-10, для приготування лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

12. Застосування клітини, яка експресує речовину за будь-яким з пп.1-3, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

13. Застосування клітини, яка була генетично модифікована, щоб продукувати поліпептид за пп.1-3, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дисплазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (РДСД), контактури Дююїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу.

14. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де речовину вводять системно.

15. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де речовину вводять внутрішньом'язово, підшкірно або внутрішньовенною ін'єкцією або інгаляцією.

16. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, при якому лікарський засіб, додатково, містить інтерферон для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

17. Застосування за п.16, при якому інтерферон є інтерфероном-β.

18. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, при якому лікарський засіб, додатково, містить антагоніст фактора некрозу пухлини (TNF) для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

19. Застосування за п.18, при якому антагоніст TNF являє собою TBPI і/або TBPII.

20. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, при якому захворюванням є склеродермія та лікарський засіб, додатково, містить антисклеродермічний агент для одночасного, послідовного або роздільного застосування.

21. Застосування за п.20, при якому антисклеродермічний агент вибраний з групи, що складається з інгібіторів ACE (АПФ), блокаторів кальцієвих каналів, інгібіторів протонного насоса, NSAID, COX-інгібіторів, кортикостероїдів, тетрацикліну, пентоксифіліну, буциламіну, інгібіторів геранілгеранілтрансферази, ротерліну, інгібіторів проліл-4-гідроксилази, інгібіторів с-протеїнази, інгібіторів лізилоксидази, релаксину, галогенфугінону, простагландинів, простациклінів, ендотеліну-1, оксиду азоту, інгібіторів ангіотензину II і антиоксидантів.

22. Спосіб лікування і/або попередження фіброзного захворювання, вибраного з групи, яка складається зі склеродермії, цирозу печінки, інтерстиціального та ідіопатичного фіброзу легень, бронхопульмональної дистазії, саркоїдозу, фібропроліферативного ARDS (ПДСД), контакту Дюпюїтрена, келоїду, рубців та реактивного фіброзу, що включає введення пацієнту ефективної

кількості речовини за пп.1-10, необов'язково, разом з фармацевтично прийнятним носієм.

23. Спосіб за п.22, де речовину вводять системно.

24. Спосіб за п.22, де речовину вводять внутрішньом'язовою, підшкірною або внутрішньовенною ін'єкцією або інгаляцією.

25. Фармацевтична композиція, що містить речовину, як описано в пп.1-5, в комбінації з антисклеродермічним агентом, вибраним з групи, що складається з інгібіторів ACE, блокаторів кальцієвих каналів, інгібіторів протонного насоса, NSAID, COX-інгібіторів, кортикостероїдів, тетрацикліну, пентоксифіліну, буциламіну, інгібіторів геранілгеранілтрансферази, ротерліну, інгібіторів проліл-4-гідроксилази, інгібіторів с-протеїнази, інгібіторів лізилоксидази, релаксину, галогенфугінону, простагландинів, простациклінів, ендотеліну-1, оксиду азоту, інгібіторів ангіотензину II і антиоксидантів.

Даний винахід має відношення до склеродермії. Точніше, винахід стосується застосування SARP-1 для лікування і/або попередження склеродермії, особливо прогресуючого системного склерозу.

Склеродермія є захворюванням з'єднувальної тканини, яке характеризується, фіброзом шкіри і внутрішніх органів, що приводить до поразки органів і смерті [Black et al, 1998; Clements and Furst, 1996]. Склеродермія характеризується спектром симптомів і цілим рядом терапевтичних аспектів. Вона включає в себе осередкову склеродермію, прогресуючий системний склероз, склеродермія-подібні і порушення і безсимптомну склеродермію [Smith, 2000]. У той час як осередкова і склеродермія є рідкісним шкірним захворюванням, пов'язаним з фіброзом і виявами, обмеженими шкірою, прогресуючий системний склероз являє собою мультисистемне захворювання з мінливим ступенем ризику відносно поразки внутрішніх органів і коливаннями тяжкості захворювання шкіри. Системний склероз може бути дифузним або обмеженим. Обмежений прогресуючий системний склероз також називають CREST (кальциноз, езофагальна дисфункція Рейно, склеродактилія, телеангіектазії). Вважають, що склеродермія-подібні порушення пов'язані з впливом чинників, навколишнього промислового середовища. У випадку безсимптомного захворювання, має місце ураження внутрішніх органів без шкірних змін.

Основними виявами склеродермії і, зокрема, прогресуючого системного склерозу є невідповідні, надмірні синтез і відкладення колагену, ендотеліальна дисфункція, спазми, колапс і облітерація в результаті фіброзу.

Склеродермія є рідкісним захворюванням зі стабільною частотою захворюваності приблизно 19 випадків на 1 мільйон осіб. Причини склеродермії невідомі. Однак генетична схильність є важливою. Розлади включають в себе аутоімунну реакцію і зміну функції ендотеліальних клітин і

фібробластів. Дійсно, прогресуючий системний склероз ймовірно є найбільш тяжким аутоімунним захворюванням з 50% смертністю протягом 5 років після діагностики [Silman, 1991].

З точки зору діагностики важливим клінічним показником є шкірне ущільнення проксимально до п'ястково-фалангових суглобів. Феномен Рейно є частим, майже універсальним компонентом склеродермії. Феномен розпізнається по зміні кольору шкіри при впливі холоду. Ішемія і шкірне ущільнення є симптомами хвороби Рейно.

Деякі біологічні процеси, що лежать в основі, залучені до ініціації, тяжкості і прогресування захворювання і включають в себе судинну дисфункцію, активацію і пошкодження ендотеліальних клітин, акумуляцію лейкоцитів, продукцію аутоантитіл і вирішальну неконтрольовану фіброзну відповідь, які можуть привести до смерті [Clement and Furst, 1996]. Фібробласти грають центральну роль в патогенезі захворювання. Первинні фібробласти, одержані від хворих склеродермією, виявляють безліч характерних особливостей захворювання, що спостерігаються *in vivo*, значно підвищені синтез і відкладення позаклітинного матриксу, особливо колагену і фібронектину, і змінену продукцію фактора росту і цитокінів, таких як TGFβ і CTGF [Strehlow and Korn, 1998 і LeRoy, 1974].

Не існує ефективної терапії склеродермії. У новітній, але високого ризику, терапії запропонована трансплантація аутогенних стовбурових клітин [Martini et al., 1999]. Зокрема, в цей час немає ніякого лікування склеродермії, направлено на фіброзний процес [Wigley and Boling, 2000].

Ідентифікація генів, асоційованих з ризиком захворювання і прогресією склеродермії, може привести до розробки ефективної стратегії для втручання на різних стадіях захворювання.

SAEP-1 (пов'язаний з апоптозом білок 1, що секретується) є представником сімейства білків, що секретуються, відомих як секретовані родинні

"завиті" білки, на основі їх гомології з багатим на цистеїн доменом (CRD-домен), виявленим у "завитого" сімейства з 7 трансмембранних рецепторів [Rattner et al., 1997]. "Завиті" гени спочатку були ідентифіковані у плодової мушки і в контрольній тканинній полярності [Adler et al., 1987]. "Завиті" білки є рецепторами для висококонсервативного Wnt-сімейства з, принаймні, 16 сигнальних молекул, що секретуються, які регулюють взаємодії клітина-клітина під час ембріогенезу [Smalley and Dale, 1999]. Розуміння механізмів дії Wnt складалося за даними декількох систем: генетики *Drosophila* і *C.elegans*, біохімічних досліджень клітинної культури, і експресії ектопічного гена у *Xenopus embryos*. Здійснені мутації багатьох генів Wnt у миші, що привели до різних специфічних дефектів розвитку. Wnt-шлях передачі сигналу, який запускається взаємодією Wnt з "завитими" білками, опосередкований декількома цитоплазматичними компонентами перемикання і функціонує, щоб подавити активність мультибілкового комплексу обміну β -катеніну, таким чином сприяючи створенню цитозольного β -катеніну, який потім проникає в ядро і утворює комплекс з TCF, щоб активувати транскрипцію генів-мішеней Wnt [Miller et al., 1999; Kuhl et al., 2000].

Взаємодії Wnt -"завиті" білки можна модулювати за допомогою обмеженої експресії окремих Wnt-зв'язуючих білків, секретованих родинних "завитих" білків (sFRP). SFRPs здатні зв'язувати Wnt по N-кінцевому CRD-доміну. Тому вони можуть ізолювати Wnt від його рецепторів і, таким чином, протидіяти його ефектам [Bafico et al., 1999].

SARP-1 відомий під декількома альтернативними назвами, такими як SDF-5, PR0697, ATG-1622, HLHDY31, SFRP-2. Часткові або повномірні білкові послідовності і/або послідовності нуклеїнових кислот SARP-1 миші або людини описані в декількох патентних заявках, [наприклад WO 98/35043, WO 98/13493, EP 0 879887, WO 99/46281].

З точки зору функції, секретовані родинні "завиті" білки (SFRPs), мабуть, діють як розчинні модулятори передачі сигналу Wnt за допомогою конкурування з мембранозв'язаними "завитими" рецепторами за скріплення секретованих Wnt-лігандів. Крім SARP-1, відомі в цей час людські білки згаданого сімейства включають в себе SARP-2 (SFRP-1) і SARP-3 (SFRP-5). Описано, що мишачий SARP-1 і SARP-2 і -3 людини володіють здатністю або підвищувати чутливість клітин до апоптозу, або інгібувати апоптозну відповідь [Melkonyan et al., 1997]. Коли SARP-1 миші і SARP-2 людини експресували в клітинній лінії аденокарциноми молочної залози, вони надавали протилежних ефектів на клітинну чутливість до проапоптозного стимулу. Тоді як клітини з SARP-1 виявляли більш високу резистентність, клітини, що експресують SARP-2, виявилися чутливими до апоптозу, індукованому фактором некрозу пухлини і церамідом. Експресія SARP-1 або SARP-2 змінювала внутрішньоклітинні рівні β -катеніну, індикатора опосередкованої Wnt трансдукції сигналу, дозволяючи передбачити, що SARP є перешкодою для

Wnt - "завиті" білки шляхів передачі сигналу [Melkonyan et al., 1997].

Аналіз методом Нозерн-блотінгу показав, що гени SARP характеризуються індивідуальними особливостями експресії [Leimeister et al., 1998]. SARP-1 існує у вигляді транскриптів розміром 2,2- і 1,3-т.п.н. в деяких тканинах людини з найбільш високими рівнями в прямій кишці і тонкому кишечнику. [Chang et al., 1999], повідомили, що SARP-1 або SFRP-2 високо і переважно експресуються в сітківці бика по всьому внутрішньому нуклеарному шару. У сітчастій оболонці SARP-3 або SFRP-5 експресуються, в основному, в сітківчому пігментованому епітелії.

За допомогою аналізу соматичних клітинних гібридів, [Melkonyan et al., (1997)] картували ген SARP-1 в хромосомі 4 людини. [Chang et al., (1999)] уточнили положення місця до 4q31.3, використовуючи радіаційний аналіз гібридів.

Також з'являються дані, які стосуються того, що змінена експресія SARP-1 пов'язана з раком [WO 98/13493].

Винахід базується на даних сприятливої дії SARP-1 на розробленій тваринній моделі склеродермії.

Тому, першим аспектом винаходу є застосування SARP-1 для приготування лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії і, зокрема, прогресуючого системного склерозу. Другий аспект винаходу полягає в застосуванні клітини, яка експресує SARP-1, або експресуючого вектора, що містить кодуєчу послідовність SARP-1, для одержання лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії, особливо, прогресуючого системного склерозу. Також в рамках інтересів даного винаходу розглядаються фармацевтичні композиції, що містять SARP-1, і способи лікування, що включають в себе введення SARP-1 в організм людини.

На Фіг.1 представлена експресія мРНК SARP-1 в нормальних і патологічних фібробластах від 7 хворих склеродермією за даними аналізу фільтрів з іммобілізованими генами. Середній рівень експресії для кожного класу зразків (нормальних або патологічних) представлений в (А) і медіана представлена в (В).

На Фіг.2 показане співвідношення експресії мРНК SARP-1 в патологічних/нормальних фібробластах (низька кількість пасажів, <5 пасажів) від 8 хворих склеродермією, встановлене за допомогою PCR (ПЛР) в реальному часі.

На Фіг.3 представлені результати аналізу за допомогою PCR в реальному часі експресії мРНК SARP-1 в нормальних фібробластах шкіри людини (NHDF) відносно експресії мРНК GAPDH.

На Фіг.4 представлені дані аналізу за допомогою PCR в реальному часі експресії мРНК SARP-1 в біопсіях клінічно нормальної шкіри людини (n=6), що порівнюється з біопсіями аномальних ділянок шкіри від хворих склеродермією (n=2), відносно GAPDH.

Фіг.5 А і В є наступними один за одним і являють собою нуклеотидну послідовність і виведену амінокислотну послідовність кДНК SARP-1. Пе-

редбачені ділянки розщеплення для сигнального пептиду вказані стрілками.

На Фіг.6 представлені дані порівняльного аналізу амінокислотних послідовностей SARP-1 людини і миші. Неідентичні залишки між двома послідовностями виділені (сірим).

На Фіг.7 показаний рівень апоптозу в SARP-1- і псевдотрансфікованих клітинах в порівнянні з контролями. *** означає статистично значуще зниження.

На Фіг.8 показаний вплив обробки SARP-1 на загальну активність mMP-1 в кондиціонованому середовищі, зібраному з культур фібробластів шкіри людини. Фібробласти були одержані з патологічних тканин (A, D, F) або від здорових індивідумів (B, C), або з неуразених областей хворого склеродермію (E).

На Фіг.9 показаний ефект котрансфекції SARP-1 на активність промотору колагену в нестимульованих і стимульованих TGFP клітинах NIH3T3. На Фіг.(A) вказані одиниці люмінесценції, виміряні в репортерному дослідженні, на Фіг.(B) представлені процент люмінесценції відносно контролю.

На Фіг.10 представлена величина фіброзу на легені на моделі фіброзу легенів, індукованого блеоміцином. Зони оцінювали у мишей, яким вводили звичайний наповнювач, трансформовані SARP-1 клітини, псевдотрансформовані клітини або анти-TGF-терапію. *** вказує на статистично значуще зниження.

Згідно з даним винаходом виявлено, що експресія білка SARP-1, що секретується, значно нижче в патологічних фібробластах, одержаних від хворих склеродермією в порівнянні з контрольними клітинами. Використали ДНК-технологію на мікропланшетних фільтрах з іммобілізованими генами, щоб ідентифікувати диференціально експресовані гени в шкірних фібробластах, ізольованих з ділянок фіброзного ураження, одержаних від хворих склеродермією, що порівнюються з фібробластами, ізольованими з клінічно неуразених областей шкіри від тих же самих хворих. Експресія SARP-1 придушувалася в патологічних фібробластах у 5 з 7 досліджених хворих. Крім того, аналіз за допомогою RT-PCR в реальному часі тотальної РНК, ізольованої з всіх біопсійних зразків патологічної шкіри від хворих склеродермією, виявив більш низькі рівні мРНК SARP-1 в порівнянні з підібраними контрольними біопсіями з клінічно нормальних анатомічних ділянок від пацієнтів відповідного віку і статі.

У підтвердження вище приведених результатів, за допомогою статистичного методу порівняння рівнів експресії всіх генів, що містяться на мікропланшетних фільтрах з іммобілізованими генами, показали, що є 95% імовірності, що зниження рівня регуляції SARP-1 асоційоване з фіброзними ураженнями у хворих, дозволяючи передбачити зв'язок з клінічною прогресією захворювання.

Лікувальна дія SARP-1 при склеродермії підтверджена на загальноприйнятій мишачій моделі склеродермії, моделі фіброзу легенів, індукованого блеоміцином. У згаданій моделі введення клітин,

які експресують SARP-1, значно зменшувало поширеність фіброзу легенів.

Тому винахід направлений на застосування речовини, яка зв'язується з рецептором SARP-1 людини і стимулює передачу сигналу через рецептор SARP-1, або речовини, яка стимулює вивільнення або потенціює активність ендогенного SARP-1, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії. Названа речовина може бути самим зрілим SARP-1 або будь-яким фрагментом SARP-1, що зв'язується з рецептором SARP-1 або стимулюючим передачу сигналу через рецептор SARP-1, а також будь-яким іншим агоністом рецептора SARP-1, таким як агоністичні антитіла, направлені на рецептор SARP-1, або хімічні агоністи, специфічні до рецептору.

Рецептор, який був запропонований для SARP-1, є Wnt-білком, що приблизно зв'язується з багатим на цистеїн "завитим" (frz) доменом SARP-1 [Lin et al., 1997]. Тому речовина згідно з винаходом також може бути фрагментом SARP-1, що містить його багатий цистеїном "завитий" домен.

Переважно, речовину, що використовується для лікування і/або попередження склеродермії, вибирають з групи, що складається з:

- (a) Зрілого SARP-1;
- (b) Поліпептиду, що містить SEQ ID NO:2;
- (c) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 21 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (d) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 24 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (e) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 25 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (f) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 26 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (g) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 27 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (h) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 28 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (i) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 37 по 295 з SEQ ID NO:2;
- (j) Мутеїну будь-якого з (a) до (i), в якому амінокислотна послідовність має, принаймні, 40% або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичності, принаймні, з однією з речовин (a)-(i);
- (k) Мутеїну будь-якого з (a) до (i), який кодується послідовністю ДНК, якою гібридується з комплементом послідовності нативної ДНК, що кодує будь-який з (a)-(i), при помірно жорстких умовах або надзвичайно жорстких умовах;
- (l) Мутеїну будь-якого з (a) до (i), в якому будь-які зміни в амінокислотній послідовності є консервативними амінокислотними заміщеннями в амінокислотних послідовностях в (a)-(i);
- (m) Солі або ізоформи, злитого білка, функціонального похідного, активної фракції або циркулярно пермутованого похідного будь-якого з (a)-(l);

Повномірну кДНК SARP-1 людини клонували і зобразили на Фіг.5, а також SEQ ID NO: 1 з прикладеного списку послідовностей. Відповідна амінокислотна послідовність подана на Фіг.5 і SEQ ID NO: 2 прикладеного списку послідовностей. Як видно з прикладів, приведених нижче, було вияв-

лено, що N-кінець SARP-1 є високогетерологічним. Передбачений сигнальний пептид SARP-1, який охоплює або амінокислоти від 25 до 295 SEQ ID NO: 2, або амінокислоти від 21 до 295. N-кінцеві послідовності очищеного рекомбінантного SARP-1 людини, експресованого в клітинах EEK 293, виявили інші N-кінцеві послідовності зрілого SARP-1, починаючи з амінокислот 24, 25, 26, 27, 28 або 37 SEQ ID NO: 2.

Термін "SARP-1", що використовується в описі, відноситься до будь-якої або до всіх речовин, розглянутих вище в (a)-(m).

Термін «лікування і/або попередження», що використовується тут, містить в собі будь-яке ослаблення, зменшення або часткове, істотне або повне попередження або блокаду виникнення, розвитку, прогресування захворювання або виникнення, вияву або прогресування будь-якого одного або декількох або всіх симптомів захворювання.

Термін «склеродермія», що використовується тут, включає в себе склеродермію за будь-якою класифікацією і визначенням, а також один або більше симптомів склеродермії, які описані детально у введенні. Крім того, термін «склеродермія» відноситься до захворювань, які, як відомо, пов'язані зі склеродермією, такими як захворювання, описані Смітом (Smith) (2000), які, наприклад, включені в опис за допомогою посилання в повному об'ємі.

Крім того, термін «склеродермія» включає в себе фіброзні захворювання, такі як цироз печінки, інтерстиціальний фіброз легенів, контрактура Дюпюїтрена, келоїдні і інші рубцювання/порушення загоєння ран, післяопераційні спайки і реактивний фіброз, а також хронічну серцеву недостатність, особливо після інфаркту міокарда. Винахід відноситься до застосування SARP-1 для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження фіброзних захворювань, таких як перераховані вище захворювання.

Інші захворювання і порушення, які лікуються SARP-1, включають в себе розлади загоєння ран, зокрема загоєння рани в легені, включаючи хронічне запалення легенів і, зрештою, фіброз або рубцювання поверхонь легенів. Порушення, що залучають до процесу запалення легена, включають в себе, наприклад, ідіопатичний фіброз легенів, саркоїдоз, бронхопультмональну дисплазію, фібропроліферативний ARDS (ПДСД), а також легеневі вияви або системні захворювання, такі як ревматоїдний артрит [Krein et al., 2001].

Переважно термін «склеродермія» відноситься до осередкової, системної, обмеженої і дифузної склеродермії, а також до частково співпадаючих синдромів.

Осередкова склеродермія спочатку вражає шкіру, але також може вражати розташовані під нею м'язи і кістки. Однак вона не вражає внутрішні органи. Осередкова склеродермія є відносно легкою, але може бути віднесена до системної склеродермії в залежності від схожих поверхневих симптомів, таких як вигляд шкірної біопсії під мікроскопом.

Системна склеродермія охоплює декілька типів симптомів або груп симптомів, таких як CREST,

обмежений або дифузний. Системна склеродермія також відома як системний склероз. Її також згадують як прогресуючий системний склероз, або сімейний прогресуючий склероз. Системна склеродермія може вражати, наприклад, шкіру, кровоносні судини і/або внутрішні органи. Коли системна склеродермія вражає шкіру, вона може спричинити ущільнення шкіри, звичайно на руках і/або обличчі. Коли системна склеродермія вражає кровоносні судини, вона може бути причиною хвороби Рейно. Найбільш серйозні форми системної склеродермії вражають внутрішні органи і можуть викликати втрату працездатності або навіть смерть. З числа інших системний склероз включає в себе: склеродермічне захворювання легенів, склеродермічний нирковий криз, кардіальні симптоми, м'язову слабкість, включаючи стомлення або обмежену CREST, порушення моторики шлунково-кишкового тракту і спазм, і порушення центральної, периферичної і вегетативної нервової системи. Відносно порушень нервової системи, найбільш загальним є зап'ястний синдром з подальшою невралгією трійчастого нерва.

Обмежена склеродермія може бути обмежена руками, хоча обличчя і шия також можуть бути залучені до процесу.

Дифузна склеродермія включає ущільнення шкіри і також виявляється вище за зап'ястки (або лікті). Виділяють декілька підкатегорій дифузного системного склерозу, такі як «склеродермія без склеродермії», де є фіброз внутрішніх органів, але немає ніякого шкірного ущільнення; і сімейний прогресуючий системний склероз, рідкісна форма, яка зустрічається в сім'ях.

Синдромами, що перекриваються, називають випадки, якщо у хворого склеродермією також є інше аутоімунне захворювання (таке як вовчак, ревматоїдний артрит і так далі), наприклад дифузна склеродермія співпадає з вовчаком. Симптоми склеродермії також можуть бути частиною змішаного захворювання з'єднувальної тканини (MCTD) або недиференційованого захворювання з'єднувальної тканини (UCTD).

Термін "SARP-1", що використовується, відноситься до білка, що містить всю або частину послідовності SEQ ID NO: 2 (людська) або SEQ ID NO: 5 (мишача) з прикладеного списку послідовностей, незалежно від позначення такого білка, включаючи, без обмеження, інші відомі позначення SDF-5, PRO697, ATG-1622, HLHDY31, SFRP-2 або FRP-2, а також до солей, ізоформ, мутантів, активних фракцій, функціональних похідних і їх циркулярно пермутованих похідних.

Переважно, термін «SARP-1» відноситься до зрілого білка, що не має сигнального пептиду. Передбачено, що сигнальний пептид містить перші 20 або перші 23, 24, 25, 26, 27 або 36 амінокислот SARP-1, які визначені в SEQ ID NO: 2, маючи на увазі, що зрілий білок буде містити або амінокислоти 21 - 295, або 24, 25, 26, 27, 28, або 37 - 295 SEQ ID NO: 2.

Як видно на Фіг.6 нижче, людська амінокислотна послідовність SARP-1 високо гомологічна до мишачої послідовності (SEQ ID NO: 5). Тому мишачий SARP-1 також можна використати згідно з

винаходом, а також білки, одержані з інших видів, доти, поки існує досить висока ідентичність між білками, що дозволяє білку виявляти його біологічну активність, не викликаючи значної імунної відповіді у людини, яку лікують.

Крім того, термін "SARP-1" відноситься до будь-якого фрагмента, частини, домену або субдомену SEQ ID NO: 2 або 5, що виявляє бажану активність при склеродермії. Білкові фрагменти або один або більше доменів білка можна використати згідно з винаходом, доти, поки вони надають яку-небудь сприятливу дію на склеродермію, переважною є та дія, яка, принаймні, порівнянна з дією повномірного білка. Лікувальний ефект може бути визначений в одному з тестів *in vitro* або *in vivo*, описаних в прикладах нижче, або в будь-якому іншому дослідженні придатному, щоб продемонструвати вплив на склеродермію. Наприклад, SARP-1 містить багатий на цистеїн "завитий" домен і нетринподібний домен, який також називається модуль NTR, який гомологічний тканинним інгібіторам металопротеїназ (TIMPs) [Banyai and Patthy, 1999]. Тому фрагмент, що містить "завитий" домен SARP-1, або фрагмент, що містить модуль NTR, є переважними фрагментами згідно з винаходом.

Відповідно до даного винаходу, SARP-1 може бути природного походження, тобто нативним білком або рекомбінантним білком. Рекомбінантна продукція може бути проведена в еукаріотичних клітинах, таких як дріжджові клітини або клітини CHO, в клітинах або в клітинних лініях фібробластів людини. Крім того, рекомбінантний білок може продукуватися в прокаріотичних клітинах, таких як *E. coli*.

Переважно, SARP-1 глікозилюваний по одній або більше ділянках. Він також може бути неглікозилюваним в залежності від даних потреб і джерела продукції або виділення білка.

Термін «солі», що використовується в описі, відноситься як до солей карбоксильних груп, так і до кислотно-адитивних солей аміногруп молекули SARP-1 або його аналога. Солі карбоксильної групи можуть бути утворені за способами, відомими в даній області, і включати в себе неорганічні солі, наприклад солі натрію, кальцію, амонію, заліза або цинку і тому подібного, і солі з органічними основами, як солі, утворені, наприклад з амінами, такими як триетаноламін, аргінін або лізин, піперидин, прокаїн і тому подібне. Адитивні солі кислот включають в себе, наприклад, солі мінеральних кислот, таких як, наприклад, хлористоводнева кислота або сірчана кислота, і солі органічних кислот, таких як, наприклад, оцтова кислота або щавлева кислота. Звичайно, будь-які такі солі повинні зберігати біологічну активність SARP-1, що відноситься до даного винаходу, тобто надавати лікувальної дії при склеродермії.

Згідно з даним винаходом також можна використати ізоформи або варіанти сплайсингу SARP-1, оскільки вони здатні інгібувати прогресію склеродермічного захворювання і/або симптоми такого захворювання. Виявлено, що два транскрипти розміром 1,3т.п.н. і 2,2т.п.н., які диференційно експресуються в тканинах людини, можуть, напри-

клад, представляти різні ізоформи SARP-1, які можна використати згідно з винаходом.

Термін «мутеїни», що використовується в описі, відноситься до аналогів SARP-1, в яких один або більше амінокислотних залишків природного SARP-1 заміщені різними амінокислотними залишками або видалені, або один або більше амінокислотних залишків додані до природної послідовності SARP-1, що мають переважно, принаймні, таку ж активність як дикий тип SARP-1, або що мають навіть значно більш потужну активність. Названі мутеїни одержують за допомогою відомого синтезу і/або методом сайт-направленого мутагенезу або будь-яким іншим відомим способом, придатним для цього.

Переважно, будь-який такий мутеїн має послідовність амінокислот, що достатньо дублює послідовність SARP-1, представлену в SEQ ID NO: 2, так, щоб мати, принаймні, активність, по суті подібну SARP-1. Активність мутанта SARP-1 можна тестувати за допомогою способів, відомих в даній області, і, зокрема, використовуючи дослідження, описані в прикладах нижче. Наприклад, оцінка рівня синтезу колагену (приклад 7) в фібробластах є відповідним тестом для визначення активності мутеїнів SARP-1.

Згідно з даним винаходом мутеїни включають в себе білки, кодовані нуклеїновою кислотою, такою як ДНК або РНК, які гібридизують з ДНК або РНК, які кодуєть SARP-1, відповідно до даного винаходу, при жорстких умовах. Термін "жорсткі умови" відноситься до умов гібридизації і подальшого відмивання, які фахівці в даній області звичайно називають "жорсткими". [Дивись Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, supra, Interscience, N.Y., §§6,3 і 6,4 (1987, 1992) і Sambrook, J.C., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY].

Без обмеження приклади жорстких умов включають умови відмивання на 12-20°C нижче розрахованої T_m гібриду при дослідженні, наприклад, в 2×SSC і 0,5% SDS протягом 5 хвилин, 2×SSC і 0,1% SDS протягом 15 хвилин; 0,1×SSC і 0,5% SDS при 37°C протягом 30-60 хвилин, а потім 0,1×SSC і 0,5% SDS при 68°C протягом 30-60 хвилин. Фахівцям в даній області зрозуміло, що жорсткість умов також залежить від довжини послідовності ДНК, олігонуклеотидних зондів (таких як 10-40 основ) або змішаних олігонуклеотидних зондів. Якщо застосовують змішані зонди, виявляється переважним використати хлорид тетраметиламонію (TMAC) замість SSC. [Дивись Ausubel, supra].

Переважно, будь-який такий мутеїн має послідовність амінокислот, що достатньо дублює послідовність SARP-1, таку яка має по суті подібну біологічну активність як SARP-1, або навіть краще.

Однією активністю, що легко визначається SARP-1, є його здатність знижувати синтез колагену. Спосіб визначення названої активності детально описаний в прикладі 6 нижче. Доти, поки мутеїн характеризується значною активністю, що знижує колаген, можна вважати, що він, по суті, володіє активністю подібною до активності SARP-1. Таким чином, можна визначати, чи має який-

небудь даний мутеїн, принаймні, по суті таку ж активність як SARP-1, за допомогою звичайного дослідження, наприклад піддаючи такий мутеїн простому аналізу, який описаний в прикладі 7.

У переважному аспекті, будь-який такий мутеїн має, принаймні, 40% ідентичності або гомології з послідовністю SEQ ID NO: 2 з прикладеного списку послідовностей. Більш переважно, мутеїн має, принаймні, 50%, 60%, 70%, 80% або найбільш переважно, принаймні, 90% ідентичності або гомології.

Встановлена при порівнянні послідовностей ідентичність відображає спорідненість між двома або більше поліпептидними послідовностями або двома або більше полінуклеотидними послідовностями. Взагалі, ідентичність відображає точну відповідність нуклеотид до нуклеотиду або амінокислота до амінокислоти двох полінуклеотидів або двох поліпептидних послідовностей, відповідно, по довжині послідовностей, що порівнюються.

Для послідовностей, де немає точної відповідності, можна визначати "% ідентичності". Взагалі, дві послідовності, що порівнюються, вирівнюються, щоб одержати максимальну кореляцію між послідовностями. Це може включати в себе вставку "проломів" або в одну, або обидві послідовності, щоб збільшити ступінь вирівнювання. % ідентичності може бути визначений по всій довжині кожної з послідовностей (так званий загальний порівняльний аналіз первинної структури), що порівнюються, що особливо підходить для послідовностей однакової або дуже схожої довжини або з відносно більш короткою певною протяжністю (так званий локальний порівняльний аналіз первинної структури), що більше підходить для послідовностей нерівної довжини.

Способи порівняння ідентичності і гомології двох або більше послідовностей добре відомі в даній області. Так наприклад, програми, що є в Віконсинському пакеті програм для аналізу послідовностей, версія 9.1 [Devereux J et al., 1984], наприклад програми BESTFIT і GAP можуть бути використані для визначення % ідентичності між двома полінуклеотидами і % ідентичності, і % гомології між двома поліпептидними послідовностями. У BESTFIT використовують алгоритм "локальної гомології" Сміта і Ватермана [Smith і Waterman, (1981)] і виявляють кращу єдину область схожості між двома послідовностями. Інші програми для визначення ідентичності і/або схожості між послідовностями також відомі в даній області, наприклад сімейство програм BLAST [Altschul SF et al, 1990, Altschul SF et al., 1997, доступні через домашню сторінку NCBI в www.ncbi.nlm.nih.gov] і FASTA [Pearson WR, 1990; Pearson 1988].

Мутеїни SARP-1, які можна використати згідно з даним винаходом, або нуклеїнові кислоти, що кодують їх, включають в себе обмежений набір в основному відповідних послідовностей у вигляді пептидів заміщення або полінуклеотидів, які шаблонно може одержати будь-який з фахівців в даній області без надмірного експериментування, основуючись на рекомендаціях і керівництві, представлених в даному описі.

Переважними змінами для мутеїнів відповідно до даного винаходу є зміни, які відомі як «консервативні» заміщення. Консервативні амінокислотні заміщення поліпептидів або білків SARP-1 можуть включати синонімічні амінокислоти в межах групи, яка характеризується досить схожими фізико-хімічними властивостями, так що заміщення між представниками групи зберігають біологічну функцію молекули [Grantham, 1974]. Ясно, що вставки і делеції амінокислот також можна здійснювати у визначених вище послідовностях без зміни їх функції, особливо, якщо вставки і делеції залучають тільки декілька амінокислот, наприклад менше тридцяти, і більш переважно менше десяти, і не видаляти або замінювати амінокислоти, які є істотними для функціональної конформації, наприклад цистеїнові залишки. Білки і мутеїни, одержані за допомогою таких делецій і/або вставок, знаходяться в рамках даного винаходу.

Переважно, групами синонімічних амінокислот є групи, представлені в Таблиці I. Більш переважно, групами синонімічних амінокислот є групи, представлені в Таблиці II; і найбільш переважно, групами синонімічних амінокислот є групи, представлені в Таблиці III.

ТАБЛИЦЯ I

Переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser, Thr, Gly, Asn
Arg	Arg, Gln, Lys, Glu, His
Leu	Ile, Phe, Tyr, Met, Val, Leu
Pro	Gly, Ala, Thr, Pro
Thr	Pro, Ser, Ala, Gly, His, Gln, Thr
Ala	Gly, Thr, Pro, Ala
Val	Met, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val
Gly	Ala, Thr, Pro, Ser, Gly
Ile	Met, Tyr, Phe, Val, Leu, Ile
Phe	Trp, Met, Tyr, Ile, Val, Leu, Phe
Tyr	Trp, Met, Phe, Ile, Val, Leu, Tyr
Cys	Ser, Thr, Cys
His	Glu, Lys, Gln, Thr, Arg, His
Gln	Glu, Lys, Asn, His, Thr, Arg, Gln
Asn	Gln, Asp, Ser, Asn
Lys	Glu, Gln, His, Arg, Lys
Asp	Glu, Asn, Asp
Glu	Asp, Lys, Asn, Gln, His, Arg, Glu
Met	Phe, Ile, Val, Leu, Met
Trp	Trp

ТАБЛИЦЯ II

Більш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	His, Lys, Arg
Leu	Leu, Ile, Phe, Met
Pro	Ala, Pro
Thr	Thr
Ala	Pro, Ala
Val	Val, Met, Ile
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Phe, Val, Leu
Phe	Met, Tyr, Ile, Leu, Phe
Tyr	Phe, Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His, Gln, Arg
Gln	Glu, Gln, His
Asn	Asp, Asn
Lys	Lys, Arg
Asp	Asp, Asn
Glu	Glu, Gln
Met	Met, Phe, Ile, Val, Leu
Trp	Trp

ТАБЛИЦЯ III

Найбільш переважні групи синонімічних амінокислот

Амінокислота	Синонімічна група
Ser	Ser
Arg	Arg
Leu	Leu, Ile, Met
Pro	Pro
Thr	Thr
Ala	Ala
Val	Val
Gly	Gly
Ile	Ile, Met, Leu
Phe	Phe
Tyr	Tyr
Cys	Cys, Ser
His	His
Gln	Gln
Asn	Asn
Lys	Lys

Asp	Asp
Glu	Glu
Met	Met, Ile, Leu
Trp	Met

Приклади здійснення амінокислотних заміщень в білках, які можна використати для одержання мутеїнів поліпептидів або білків SARP-1, для застосування в даному винаході включають в себе будь-які стадії відомих способів, такі як представлені в [патентах США 4959314, 4588585 і 4737462 Mark et al., 5116943 Koths et al., 4965195 Namen et al., 4879111 Chong et al., і 5017691 Lee et al. і заміщені лізином білки, описані в патенті США No.4904584 (Shaw et al)].

Термін «злиті білки» відноситься до поліпептиду, що містить SARP-1, або його мутеїну, злитому з іншим білком, який, наприклад, характеризується тривалим часом перебування в рідинах організму. Згідно з винаходом переважними є злиті білки, що містять весь або функціональну частину SARP-1, злитого з цілим білком або його функціональною частиною, здатним поліпшити біологічну активність молекули, наприклад, подібні періоду напіврозпаду в організмі людини. У переважному аспекті злитий білок включає сполуку з імуноглобуліном (Ig). Білки злиття, що містять весь або частину SARP-1, злитого з цілим імуноглобуліном або його частиною, є найбільш переважними. Вони можуть бути мономерними або гетеро- або гомомультимерними. Доцільно, якщо злитий білок містить константну область імуноглобуліну, зокрема Fc-частину імуноглобуліну. Крім того, згідно з винаходом переважними є аспекти, в яких імуноглобулін являє собою ізотип IgG1 або IgG2.

Таким чином, SARP-1 може бути злитий з іншим білком, поліпептидом або тому подібним, наприклад з імуноглобуліном або його фрагментом. З'єднання може бути прямим або через короткий лінкерний пептид, який може бути настільки коротким, як 1-3 амінокислотних залишки по довжині, або довше, наприклад 13 амінокислотних залишків по довжині. Названий лінкер може бути, наприклад, трипептидом послідовності E-F-M (Glu-Phe-Met), або 13-амінокислотною лінкерною послідовністю, що містить Glu-Phe-Gly-Ala-Gly-Leu-Val-Leu-Gly-Gly-Gm-Phe-Met, введеної між послідовністю SARP-1 і послідовністю імуноглобуліну.

Термін "функціональні похідні", що використовується в описі, охоплює похідні SARP-1 і їх мутеїнів і злитих білків, які можуть бути одержані з функціональних груп, які існують у вигляді бічних ланцюгів на залишках або N- або C-кінцевих груп, способами, відомими в даній області, і включені у винахід доти, поки вони залишаються фармацевтично прийнятними, тобто вони не знищують активність білка, яка виявляється, принаймні, по суті, подібною активності SARP-1, і не надають токсичних властивостей композиції, що містить їх. Тому в переважному аспекті функціональне похідне містить, принаймні, одну складову, приєднану до однієї або більше функціональних груп, які існують у

вигляді одного або більше бічних ланцюгів на амінокислотних залишках.

Відповідно до даного винаходу, бічні ланцюги поліетиленгліколю (PEG) є надзвичайно переважними складовими. Бічні ланцюги PEG можуть приховувати антигенні ділянки і збільшувати тривалість перебування речовини, до якої вони приєднані, в рідинах організму. Інші похідні включають в себе складні аліфатичні ефіри карбоксильних груп, амідні карбоксильних груп внаслідок реакції з аміаком або з первинними або вторинними амінами, N-ацил-похідними вільних аміногруп амінокислотних залишків, утворених з ацил-радикалами (наприклад, групи алканолу або карбоциклічного ароїлу) або O-ацил-похідними вільних гідроксильних груп (наприклад, груп залишків серилу або треонілу), утворених з ацил-радикалами.

Термін «активні фракції» SARP-1 або його мутантів і злитих білків охоплює будь-який фрагмент або попередників поліпептидного ланцюга білкової молекули, одного або разом з асоційованими молекулами або залишками, які приєднані до неї, наприклад залишки цукру або фосфату, або агрегати білкової молекули або залишки цукрів самі по собі, при умові, що названа активна фракція має, принаймні, активність, по суті, подібну до активності SARP-1.

Крім того, винахід стосується застосування молекули нуклеїнової кислоти для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії, причому молекула нуклеїнової кислоти містить послідовність нуклеїнової кислоти, кодує поліпептид, що включає амінокислотну послідовність, вибрану з групи, що складається з:

- (a) Зрілого SARP-1;
- (b) Поліпептиду, що містить SEQ ID NO:2;
- (c) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 21 по 295 SEQ ID NO:2;
- (d) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 24 по 295 SEQ ID NO:2;
- (e) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 25 по 295 SEQ ID NO:2;
- (f) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 26 по 295 SEQ ID NO:2;
- (g) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 27 по 295 SEQ ID NO:2;
- (h) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 28 по 295 SEQ ID NO:2;
- (i) Поліпептиду, що містить амінокислоти з 37 по 295 SEQ ID NO:2;
- (j) Мутанту будь-якого з від (a) до (i), в якому амінокислотна послідовність має, принаймні, 40% або 50%, або 60%, або 70%, або 80%, або 90% ідентичності, принаймні, з однією з послідовностей в (a)-(i);
- (k) Мутанту будь-якого з (a)-(i), який кодується послідовністю ДНК, якою гібридується з комплементом нативної послідовності ДНК, що кодує будь-який з (a)-(i), при помірно жорстких умовах або при надзвичайно жорстких умовах;
- (l) Мутанту будь-якого з (a)-(i), в якому будь-які зміни в амінокислотній послідовності є консерва-

тивними амінокислотними заміщеннями в амінокислотних послідовностях в (a)-(i);

(m) Солі або ізоформи злитого білка, функціонального похідного, активної фракції або циркулярно пермутованого похідного будь-якого з (a)-(l).

Винахід в рівній мірі стосується застосування названих молекул нуклеїнових кислот для лікування і/або попередження склеродермії.

Відповідно до даного винаходу, SARP-1 також може бути введений в організм людини у вигляді вектора, що містить названу молекулу нуклеїнової кислоти. Тому винахід, крім того, стосується застосування вектора, що містить названу молекулу нуклеїнових кислот, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії. Переважно, вектор є експресуючим вектором, що містить промотор, функціонально пов'язаний з всією і частиною кодуєчої послідовності SARP-1. В іншому переважному аспекті, вектор є вектором генної терапії. Вектори генної терапії відомі в даній області, більшість з них являють собою вектори вірусного походження, такі як аденовірусний і лентивірусні вектори.

Згідно з винаходом, SARP-1 також може бути введений в організм людини у вигляді клітини, що продукує і/або секретує SARP-1. Тому винахід, крім того, стосується застосування клітини, яка експресує SARP-1, для виробництва лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії, тобто до клітинної терапії для лікування і/або попередження склеродермії. Клітина може бути такою, що природно продукує SARP-1 і/або трансфікованою клітиною, яка продукує рекомбінантний SARP-1. Переважними є клітини, які експресують і секретують високі кількості білка, такі як надпродукуючі клітини, що несуть велике число піків експресуючого вектора, який містить молекулу нуклеїнової кислоти, кодуєчої SARP-1.

Оскільки фібробласти втілюють механізм фіброзу, вони є найбільш відповідними клітинами для антифіброзної і антисклеродермічної терапії. Тому переважно використовують фібробласти, які експресують SARP-1, відповідно до даного винаходу.

Крім того, винахід стосується клітини, яка включає вектор, що містить молекулу нуклеїнової кислоти, що кодує весь або частину SARP-1, для одержання лікарського засобу для лікування і/або попередження склеродермії. Клітина, яку генетично модифікували, щоб вона продукувала поліпептид згідно з винаходом, також знаходиться в рамках даного винаходу.

Застосування експресуючого вектора для індукції і/або збільшення ендогенної продукції SARP-1 в клітині, яка звичайно безмовна або експресує кількість інгібітору, яка недостатня, також розглядають згідно з винаходом. Таким чином, винахід використовує технологію, відому як ендогенна генна активація (EGA), для продукції необхідного білка.

Прогресуючий системний склероз являє собою одне з найбільш важких захворювань серед склеродермій, що часто приводять до втрати працездатності і смерті. Тому наступний перевалений аспект винаходу стосується прогресуючого системного склерозу, який входить до групи захворю-

вань склеродермією, який характеризується, головним чином, залученням внутрішніх органів, детально описаним вище.

Відповідно до даного винаходу переважними є деякі комбіновані терапії. Тому переважно лікарський засіб винаходу включає в себе ще:

інтерферон, зокрема інтерферон- β ,
антагоніст фактора некрозу пухлини (TNF), зокрема TBPI і/або TBP II,
іншу антисклеродермічну речовину,
антисклеродермічну речовину, вибрану з групи, що складається з інгібіторів АСОВІ (АПФ), блокаторів кальцієвих каналів, інгібіторів протонного насоса, NSAID, COX-інгібіторів, кортикостероїдів, тетрацикліну, пентоксифіліну, буциламіну, інгібіторів геранілгеранілтрансферази, ротерліну, інгібіторів проліл-4-гідроксилази, інгібіторів с-протеїнази, інгібіторів лізилоксидази, релаксину, галогенфугінону, простагландинів, простациклінів, ендотеліну-1, окислу азоту, інгібіторів ангіотензину II і антиоксидантів.

Всі терапії призначені для одночасного, послідовного або окремого застосування.

Хоча в цей час немає методу лікування склеродермії, деякі речовини або терапії застосовуються зараз для лікування симптомів склеродермії. Такі антисклеродермічні речовини, які можуть бути використані в комбінованій терапії згідно з винаходом, підсумовані, наприклад, [Leighton (2001) або Wigley and Sule (2001)], які введені в опис за допомогою посилання в повному об'ємі.

Інтерферони відомі переважно як інгібітори вірусної реплікації і клітинної проліферації. Інтерферон- γ , наприклад, грає важливу роль в стимулюванні імунної і запальної відповідей. Інтерферон- β (IFN- β , інтерферон I типу), як описано, грає проти-запальну роль.

Крім того, в іншому аспекті винаходу, SARP-1 використовують в комбінації з антагоністом TNF. Антагоністи TNF виявляють свою активність декількома способами. Передусім, антагоністи можуть зв'язуватися з самою молекулою TNF з достатньою спорідненістю і специфічністю або ізолювати її, щоб частково або значно нейтралізувати епітоп TNF або епітопи, відповідальні за скріплення рецептору TNF (який надалі називається "секвеструвальний антагоніст"). Секвеструвальний антагоніст, наприклад, може бути антитілом, направленим проти TNF.

Альтернативно, антагоністи TNF можуть інгібувати шлях передачі сигналу TNF, активований рецептором клітинної поверхні після скріплення TNF (який надалі називаються "антагоністи передачі сигналу"). Антагоністи TNF легко ідентифікують і оцінюють за допомогою звичайного скринінгу кандидатів по їх дії на активність нативного TNF на чутливих клітинних лініях *in vitro*, наприклад клітинах В людини, в яких TNF викликає проліферацію і секрецію імуноглобуліну. Для аналізу використовується TNF препарат при різному розведенні антагоніста-кандидата, наприклад від 0,1 до 100 разів молярної кількості TNF, що використовується в аналізі, і контролі без TNF або тільки з антагоністом [Tucci et al., 1992].

Секвеструвальні антагоністи є переважними антагоністами TNF, які потрібно використати згідно з даним винаходом. З числа секвеструвальних антагоністів переважними є ті поліпептиди, які зв'язують TNF з високою спорідненістю і володіють низької імуногенністю. Особливо переважними є розчинні молекули рецептору TNF і нейтралізуючі антитіла до TNF. Наприклад, розчинні форми TNF-R I (p55) і TNF-R II (p75) використовуються в даному винаході. Зрізані форми згаданих рецепторів, утримуючі позаклітинні домени рецепторів або їх функціональні ділянки, є особливо переважними антагоністами згідно з даним винаходом. Наприклад, зрізані розчинні рецептори TNF типу I і типу II описані в [EP 914431].

Зрізані форми рецепторів TNF є розчинними і були визначені в сечі і сироватці як TNF-зв'язуючі інгібіторні білки з М.м. 30кДа або 40кДа, які називають TBPI і TBP II, відповідно [Engelmann et al., 1990]. Згідно з винаходом переважним є одночасне, послідовне або окреме застосування SARP-1 з антагоністом TNF і/або інтерфероном.

Згідно з винаходом, TBPI і TBP II є переважними антагоністами TNF, які потрібно використати в комбінації з SARP-1. Також в даному винаході можна використати похідні, фрагменти, області і біологічно активні ділянки рецепторних молекул, що мають функціональну схожість з молекулами рецептора. Такий біологічно активний еквівалент або похідне молекули рецептора стосується частини поліпептиду або послідовності, що кодує молекулу рецептора, яка має достатній розмір і здатна зв'язувати TNF з такою спорідненістю, що взаємодія з мембранозв'язаним рецептором TNF інгібується або блокується.

В іншому переважному аспекті людський розчинний TNF-R I (TBPI) є антагоністом TNF, який використовують згідно з винаходом. Природні і рекомбінантні розчинні молекули рецептора TNF і способи їх продукції описані в Європейських патентах EP 308378, EP 398327 і EP 433900.

У той час як блокування TNF- α може бути корисним на ранніх стадіях захворювання, вважають, що на пізніх стадіях сам TNF може надавати лікувальної дії при склеродермії [Abraham et al., 2000]. Тому винахід, крім того, стосується комбінації SARP-1 і TNF- α для лікування або попередження склеродермії, особливо на стадіях прогресування захворювання.

Інгібітори COX відомі в даній області. Наприклад, специфічні інгібітори COX-2 розглянуті в [WO 01/00229].

Винахід ще стосується фармацевтичної композиції, що містить SARP-1, можливо разом з одним або більше фармацевтично прийнятним носієм, розріджувачем або наповнювачем, для лікування і/або попередження склеродермії, особливо прогресуючого системного склерозу. Ще фармацевтична композиція може містити будь-який з ідентифікованих вище компонентів, зокрема інтерферон, TBP або інгібітор COX.

Відповідно до винаходу фармацевтична композиція також може містити вектор, що включає молекулу нуклеїнової кислоти згідно з винаходом, або клітину, що експресує SARP-1.

Активні інгредієнти фармацевтичного препарату, тобто поліпептиди, нуклеїнові кислоти або клітини згідно з винаходом або їх комбінації, а також комбінації згаданих вище речовин можна вводити індивідууму різними способами. Способи введення включають в себе внутрішньошкірний, чрезшкірний (наприклад, композиції з пролонгованим вивільненням), внутрішньом'язовий, внутрішньочеревинний, внутрішньовенний, підшкірний, пероральний, епідуральний, місцевий і інтраназальний способи. Можна використати будь-який інший терапевтично ефективний спосіб введення, наприклад всмоктування через епітеліальні або ендотеліальні тканини або за допомогою генної терапії, при якій молекулу ДНК, що кодує активну речовину, вводять пацієнту (наприклад, за допомогою вектора), що примушує активну речовину експресуватися і секретуватися *in vivo*. Крім того, білок(и) згідно з винаходом може бути введений разом з іншими компонентами біологічно активних речовин, таких як фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини, наповнювачі, носії, розріджувачі і розчинники.

Визначення "фармацевтично прийнятний" означає включення будь-якого носія, який не перешкоджає ефективності біологічної активності активного інгредієнта і який нетоксичний для хазяїна, якому його вводять. Наприклад, для парентерального введення активний білок(и) може бути приготований в дозованій стандартній формі для ін'єкції в носії, такому як фізіологічний розчин, розчин декстрози, сироватковий альбумін і розчин Рінгера.

Для парентерального (наприклад, внутрішньовенного, підшкірного, внутрішньом'язового) введення, активний білок(и) можна приготувати у вигляді розчину, суспензії, емульсії або ліофілізованого порошку в з'єднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним розчином (наприклад, водою, фізіологічним розчином, розчином декстрози) і домішками, які підтримують ізотонічність (наприклад, маніт) або хімічну стабільність (наприклад, консерванти і буфери). Композицію стерилізують за допомогою способів, що звичайно використовуються.

Біодоступність активного білка(ів) згідно з винаходом також може бути поліпшена внаслідок використання способів кон'югації, що збільшує період напіврозпаду молекули в організмі людини, наприклад скріпленням молекули з поліетиленгліколем, як описано [в патентній заявці PCT WO 92/13095].

Терапевтично ефективна кількість активного білка(ів) буде функцією багатьох змінних величин, включаючи тип рецептора, спорідненість речовини згідно з винаходом до її рецептора, будь-яку залишкову цитотоксичну активність, що виявляється в зв'язку з цим, спосіб введення, клінічний стан пацієнта.

«Терапевтично ефективна кількість» є такою, що введення речовини згідно з винаходом приводить до активації рецептора SARP-1 або інактивації ліганду, стимулюючого рецептор *in vivo*. Дозування, що вводиться у вигляді однократних або багаторазових доз індивідууму, буде змінюватися

в залежності від цілого ряду чинників, включаючи фармакокінетичні властивості SARP-1, спосіб введення, стан і особливості (стать, вік, вага тіла, здоров'я і розмір) пацієнта, вираженість симптомів, супутнього лікування, частоти повторення лікування і бажаного ефекту. Регулювання і встановлення діапазонів розробленого дозування знаходиться в компетенції фахівців в даній області.

Необхідна доза поліпептиду згідно з винаходом буде коливатися приблизно від 0,0001 до 100мг/кг, або від 0,01 до 10мг/кг, або від 0,1 до 5мг/кг або приблизно від 1 до 3 мг/кг, хоча, як відмічено вище, доза зазнає дроблення в терапевтичних цілях.

Добову дозу звичайно призначають в роздільних дозах або в формі з пролонгованим вивільненням, ефективній для досягнення необхідних результатів. Друге або подальші введення можна проводити в дозуваннях, які є такими ж, меншими або більшими, ніж первинна або попередня доза, введена індивідууму. Друге або подальші введення можна здійснювати під час або до початку захворювання.

Крім того, винахід стосується способу лікування і/або попередження склеродермії, особливо прогресуючого системного склерозу, що включає в себе введення пацієнту ефективної кількості поліпептиду згідно з винаходом, необов'язково разом з фармацевтично прийнятним носієм, у разі необхідності такого лікування. Альтернативно або додатково, згідно з винаходом молено вводити клітину, яка продукує SARP-1, або молекулу нуклеїнової кислоти винаходу, що необов'язково міститься в експресуючому векторі.

Експресуючий вектор можна вводити системно. Переважно експресуючий вектор вводять за допомогою внутрішньом'язової ін'єкції. Іншим переважним способом введення є інгаляція, зокрема, якщо фіброз легені залучений до захворювання.

Крім того, винахід стосується способу одержання фармацевтичної композиції, що містить суміш ефективної кількості SARP-1 з фармацевтично прийнятним носієм, і до способу лікування і/або попередження артриту, що включає в себе введення хазяїну кількості SARP-1, що ефективно інгібує, у разі необхідності цього.

Всі посилання, приведені в описі, включаючи журнальні статті або резюме, опубліковані і неопубліковані патентні заявки США і інших країн, видані патенти США або інших країн або будь-які інші посилання, введені в опис за допомогою посилань в повному об'ємі, включаючи всі дані, таблиці, фігури і текст, представлені в приведених посиланнях. Крім того, повний зміст посилань, що згадуються в посиланнях, приведених тут в описі, також включені цитуванням в повному об'ємі.

Посилання на стадії відомих способів, стадії загальноприйнятих способів, відомі способи або звичайні способи не є жодним чином допущенням, що будь-який аспект, опис або втілення даного винаходу розкриті, викладені або запропоновані у відповідній області.

Попередній опис спеціальних аспектів настільки повно розкриває основну суть винаходу, що інші

дослідники, застосовуючи знання фахівців в даній області (включаючи зміст посилань, приведених в описі), легко зможуть модифікувати і/або пристосувати описані спеціальні аспекти для іншого застосування без надмірного експериментування, не відступаючи від основної концепції даного винаходу. Тому такі адаптації і модифікації призначені знаходитися в сфері еквівалентів спеціальних аспектів, оснований на поясненнях і рекомендаціях, представлених в описі. Зрозуміло, що фразеологія або термінологія даного опису відповідає цілям опису, а не обмеження його, так що термінологія і фразеологія даного опису повинні бути інтерпретовані кваліфікованим фахівцем в світлі пояснень і рекомендацій, представлених в описі, в поєднанні зі знаннями фахівця в даній області.

Описаний винахід значно легше зрозуміти за допомогою розгляду наступних прикладів, які є способом ілюстрації даного винаходу і не признаються для його обмеження.

Приклади

Приклад 1: SARP-1 диференціально експресується в фібробластах шкіри хворих склеродермією

Способи

Зразки від хворих

Дві біопсії по 3мМ взяті дерматом з ураженої і неуразеної ділянки шкіри (звичайно з шкіри передпліччя) у дев'яти хворих з дифузним шкірним системним склерозом (SSc), підібраних за віком і статтю. Всі пацієнти відповідали критеріям Американського коледжу ревматології відносно діагнозу системного склерозу.

Культури фібробластів

Фібробласти одержували з біопсій культивуванням *in vitro*, як було описано раніше [Abraham et al., 1991]. Коротко, біопсії розрізали на шматочки і вміщували в стерильні пластикові чашки або флакони. Після 15 хвилин висушування при кімнатній температурі, шматочки біопсії виявлялися прикріпленими до пластику для тканинної культури, а потім їх культивували в фібробластному ростовому середовищі (FGM), що складається з модифікованого за способом Дульбекко середовища Ігла (DMEM), що містить 10% фетальної телячої сироватки (FCS), 2мМ L-глутаміну, 1мМ пірувату натрію, 100 одиниць на мл пеніциліну, 100мкг на мл стрептоміцину, 50мкг на мл гентаміцину і 2,5мкг на мл амфотерицину В. Після 2-3 тижнів інкубації в зволоженій атмосфері 5% CO₂ в повітрі, фібробластне потомство відділяли короткою обробкою трипсином і повторно культивували в FGM без гентаміцину і амфотерицину В. В експериментах використовували фібробласти між 2 і 5 пассажами. Фібробластний фенотип підтверджували за їх типовою морфологією в моношарі і тривимірних колагенових гелевих культурах.

Виділення РНК

Тотальну РНК виділяли з конфлюентних склеродермічних фібробластів на ранніх пассажах або з первинних культур (пасажі 1-3) нормальних фібробластів шкіри (крайньої плоти) людини (придбаної у Promocell), використовуючи тризол (Life Technologies) відповідно до протоколу виробника. Кінцевий осад РНК повторно суспендували в сте-

рильній воді, оброблений DEPC, при концентрації 1мкг/мл і зберігали при -80°C.

Синтез зонда кДНК

2мкг тотальної РНК змішували з 1,3мкл цитокін-специфічних праймерів (R&D systems, каталожний №GAC11) і інкубували при 70°C протягом 2 хвилин в 0,5мл пробірці Eppendorf. Потім пробірки охолоджували до 50°C протягом 2 хвилин, час після якого додавали реакційну суміш, що містить 2мкл 5× реакційного буферу (250мМ Трис-HCl pH8,3, 375мМ KCl і 15мМ MgCl₂), 1мкл 10× суміші dNTP (5мМ dGTP, 5мМ dCTP і 5мМ dTTP), 3,5мкл а32P-dATP (3000Ки/ммоль, Amersham каталожний №PB10204), 0,5мкл DTT (100мМ) і 1мкл Superscript II (Life Technologies). Реакційну суміш швидко перемішували піпетуванням і інкубували при 50°C протягом 25 хвилин. Реакцію зупиняли додаванням 1мкл 0,1М EDTA pH8,0, що містить 1мг/мл глікогену. Потім мічену кДНК очищали від не включених дезоксинуклеотидів, використовуючи колонку Chromaspin-200 DEPC-H₂O (Clontech) відповідно до інструкцій виробника. Фракції, що містять кДНК, ідентифікували сутом випромінювання по Черенкову. Фракцію піка (звичайно фракція 2 з всіх зібраних 6 фракцій) обробляли 0,1 об'ємом 1М NaOH, що містить 1мМ EDTA, протягом 20 хвилин при 70°C, щоб гідролізувати РНК, а потім нейтралізували рівним об'ємом 1М NaH₂PO₄, утримуючим 2,5мкг ДНК Cot-1 людини (Life Technologies) протягом 20 хвилин при 70°C. Потім термооброблений нейтралізований зонд ДНК додавали безпосередньо в суміш для гібридизації.

Гібридизація до мікропланшетних фільтрів з іммобілізованими генами

Мікропланшетні фільтри з іммобілізованими генами (експресія цитокінів людини, R&D systems каталожний №GA001) передгібридизували при 68°C протягом 2 годин в 5мл розчині експрес-гібридизації (Clontech), що містить 0,5мкг/мл ДНК сперми лосося (Life Technologies) в циліндричних флаконах в гібридизаційній печі Хайбайда (Hybaid) (MWG Biotech). Потім передгібридизаційний розчин замінювали свіжим гібридизаційним розчином, що містить препарат зонда кДНК з питомою активністю між 0,25 - 1×10⁶ (імпульсів на хвилину)/мл. Гібридизацію проводили протягом 16-20 годин при 68°C. Після гібридизації фільтри промивали 4 рази 2 X SSC/1% SDS при 68°C протягом 20 хвилин на відмивання і двічі 0,1 X SSC/0,5% SDS протягом 15 хвилин на відмивання. Потім фільтри запечатували в Saran wrap™ і експонували екран для реєстрації і збереження зображення фосфору K-типу (Biorad) протягом різних періодів часу (від 4 годин до 4 днів) при кімнатній температурі.

Аналіз зображення

Екрани зображення сканували при розрізненні 50мкм, використовуючи фосфоіміджер Biorad Personal FX. Одержаний 16-бітний файл перетворювали в формат TIF і аналізували зображення, використовуючи програмне забезпечення Arrayvision (Imaging Research Inc). Для кожного зразка визначали інтенсивність елементів зображення 384 генів, нанесених на фільтр в двох примірниках. Віднімали фоновий сигнал і встановлювали середню інтенсивність елементів зображення

для кожної пари плям на мікропланшетному фільтрі (=рівень експресії).

Підтвердження одержаних результатів на мікропланшетних фільтрах, на вибраних генах з допомогою RT-PCR.

1мкг тотальної РНК для кожного зразка хворого зворотно транскрибували, використовуючи оліго-dT-праймер (Promega) в 20мкл-об'ємі реакційної суміші, що містить 5мМ $MgCl_2$, 10мМ Трис-HCl, 50мМ KCl, 0,1% Тритон X-100, 1мМ кожні з dATP, dGTP, dCTP, dTTP, 0,5 одиниць рекомбінантного РНКазину, інгібітору рибонуклеази (Promega) і 15 одиниць зворотної AMV-транскриптази (Promega). Реакційну суміш інкубували при 42°C протягом 60 хвилин, нагрівали при 95°C протягом 5 хвилин, потім розбавляли до 200мкл стерильною водою. Розведення реакційної суміші зворотної транскриптази потім піддавали аналізу за допомогою PCR в реальному часі на Taqman (PE Applied Biosystems 7700), використовуючи специфічні пари праймерів, складені для кожного гена, використовуючи програмне забезпечення Primer Express (PE Applied Biosystems), на основі номера надходження в базу даних, даного виробником фільтрів з іммобілізованими генами. Результати стандартизували до експресії контрольного гена (гена "домашнього господарства") гліцеральдегід-3-фосфат-дегідрогенази (GAPDH) в кожному зразку і виражали як кратні зміни, визначені діленням величини експресії патологічного зразка хворого на величину відповідного зразка здорового пацієнта.

Статистичний спосіб прогнозу генів, асоційованих зі склеродермією

Статистичний спосіб для прогнозу генів, асоційованих зі склеродермією, був здійснений за допомогою методу "сусідів" і "провісника класу", як детально описано [Golub et al., 1999], який в повному об'ємі включений тут в опис за допомогою посилання.

Результати

Аналіз мікропланшетних фільтрів з іммобілізованими генами здійснювали на зразках нормальних і патологічних фібробластів від 7 хворих склеродермією. Середній рівень експресії кДНК SARP-1 для зразка кожного пацієнта представлений на Фіг.1А, медіана експресії представлена на Фіг.1В. Середні значення і величини медіани значно відрізнялися між нормальними і патологічними клітинами, рівень нормальної експресії SARP-1 виявився вищим, ніж рівень патологічної експресії. Медіани звичайно використовували, якщо мали справу із зразками хворих, оскільки вони мінімізували ефект у великій мірі відмінного індивідуума в групі. У цьому випадку, патологічні фібробласти експресували значно більш низькі рівні мРНК SARP-1 в порівнянні з нормальними фібробластами у 5 з 7 досліджених хворих.

Результати, одержані на мікропланшетних фільтрах, далі підтверджували аналізом зразків пацієнтів за допомогою PCR в реальному часі, використовуючи SARP-1-специфічні праймери PCR. Результати подані на Фіг.2 і виражені як кратна зміна в рівні експресії (патологічний ділений на нормальний). У 6 з 8 тестованих хворих, SARP-1 придушувався, принаймні, в 2 рази в патологічних

фібробластах в порівнянні з нормальними фібробластами, одержаними від тих же самих хворих. У 2 пацієнтів, що залишилися, рівень експресії виявився порівняним в нормальних і патологічних фібробластах.

Відмінності в експресії, що спостерігаються, між нормальними і патологічними фібробластами від того ж самого пацієнта не зумовлені відмінностями в культуральних умовах між двома популяціями, оскільки експресія мРНК SARP-1 в первинних культурах нормальних фібробластів шкіри людини значно не змінювалася при пасируванні клітин (Фіг.3). До того ж аналіз методом RT-PCR в реальному часі тотальної РНК, виділеної з всіх біопсійних зразків патологічної шкіри від хворих склеродермією, показав більш низькі рівні мРНК SARP-1 в порівнянні з підібраними контрольними біопсіями клінічно нормальних анатомічних ділянок від пацієнтів відповідного віку і статі, (Фіг.4).

Крім того, використовуючи статистичні способи було показано, що є 95% імовірності, що зниження регуляції SARP-1 асоційоване з прогресуванням склеродермії.

Висновок

Описані вище результати демонструють, що є недолік SARP-1 в патологічній тканині, одержаній від хворих склеродермією в порівнянні зі здоровою тканиною, вказуючи, що відновлення нормального рівня SARP-1 може сприяти лікуванню захворювання. Таким чином, SARP-1 може являти собою новий лікарський засіб для досягнення часткового або повного інгібування захворювання, або, принаймні, одного або більше симптомів склеродермії, або для інгібування прогресування захворювання.

Приклад 2: Клонування повної кодуючої послідовності кДНК SARP-1 людини

Матеріали і способи

Послідовні BLAST-пошуки проводили на dbEST людини (відкрита база даних EST), починаючи з часткової кодуючої послідовності SARP-1 (EMBL номер надходження AF017986) і відповідні EST знаходили, використовуючи ENTREZ <http://www.ncbi.nlm.gov/Web/Search/index.html>. Потім наступні EST збирали з послідовністю AF017986, щоб утворити узгоджену повну кодуючу послідовність SARP-1: AW580647, AW608301, AA976403 і W92531.

Потім клонували повномірну кодуючу послідовність кДНК SARP-1 за допомогою PCR із зворотною транскриптазою, використовуючи наступні праймери, основані на узгодженій послідовності, одержаній вище: SARP-1F 5' GCC AAG CTT CCC ACG ATG CTG GAG GGC CCT (SEQ ID NO: 3) і SARP-1R 5' GCG CTC GAG CTA GCA CTG CAG CTT GCG GAT (SEQ ID NO: 4) при 50пмоль кожні в 50мкл реакційній суміші, що містить 0,3мМ dNTP, 1мМ $MgSO_4$, 5мкл матриці кДНК нормальних фібробластів шкіри (крайня плоть) людини (одержаної, як описано вище), 5мкл 10× ампліфікаційного буферу, високого ступеня чистоти (Life Technologies) і 1мкл ДНК-полімерази, високого ступеня чистоти, (Life Technologies). Реакційну суміш нагрівали при 94°C протягом 2 хвилин, потім піддавали 35 циклам PCR таким чином: 94°C

15сек., 55°C протягом 30сек. і 68°C протягом 1 хвилини. Продукти ампліфікації аналізували на 1% агарозних гелях в 1× TAE-буфері (Life Technologies) і продукти PCR, мігруючи з передбаченою молекулярною масою (906 пар основ), очищали з гелю, використовуючи набір для очищення PCR Wizard (Promega).

100нг гелю-очищеної ДНК розщеплювали рестрикційними ферментами HindIII і XhoI (Pharmacia) відповідно до умов виробника, повторно очищали, як описано вище, і лігували з HindIII/XhoI-гідролізованою плазмідною рсDNA3.1(+) (Invitrogen), використовуючи ДНК-лігазу T4 (New England Biolabs), по стандартних методах молекулярної біології. Продукти лігування трансформували в штам TOP 10F' E.coli (Invitrogen) електропорацією, використовуючи генний імпульсний генератор Biorad Gene Pulser. Плазмідну ДНК ізолювали з 5мл культур, вирощених з одержаних колоній, і піддавали автоматичному аналізу послідовності на секвенаторі Applied Biosystems 3700, використовуючи праймери T7 і рсDNA3.1AS (Invitrogen), щоб підтвердити послідовність SARP-1.

Результати

Для того, щоб охарактеризувати активність SARP-1 *in vitro* і *in vivo*, клонували повну кодуючу послідовність кДНК людини. Часткову послідовність кДНК SARP-1 людини (EMBL номер надходження AF017986) використали, щоб ідентифікувати EST, що перекриваються, у відкритій базі даних dbEST, використовуючи програму BLAST. Повну кодуючу послідовність кДНК збирали з послідовностей з наступними номерами надходжень: AF017986, AW580647, AW608301, AA976403 і W92531. Повномірну послідовність ДНК і виведена амінокислотна послідовність SARP-1 представлені на Фіг.5А і В (А і В потрібно читати безперервно). Кодуючу послідовність кДНК SARP-1 клонували за допомогою PCR із зворотною транскриптазою, використовуючи праймери, які фланкували передбачені ініціюючий і термінуючий кодони. Аналіз послідовностей одержаних клонів кДНК SARP-1 виявив 93% ідентичності на нуклеотидному рівні з опублікованою послідовністю SARP-1 миші [Melkonyan et al., 1997] і 95% ідентичності з послідовністю миші на амінокислотному рівні. Вибудовані амінокислотні послідовності SARP-1 людини і миші зображені на Фіг.6. Передбачена білкова послідовність складена з 295 амінокислот з передбаченим сигнальним пептидом з 20 або 24 амінокислот, використовуючи програми SIGNALASE [Von Heijne, 1986] або SIGNALP, відповідно, дивись стрілки на Фіг.5А. Амінокислотні відмінності між послідовностями людини і миші виділені на Фіг.6 і знаходяться в N-кінцевому сигнальному пептиді (4 амінокислоти) і в послідовності зрілого білка (2 амінокислоти).

SEQ ID NO: 1 з прикладеного списку послідовностей містить кодуючий ланцюг кДНК SARP-1

людини, а SEQ ID NO: 2 містить амінокислотну послідовність SARP-1 людини. Мишача амінокислотна послідовність проілюстрована в SEQ ID NO: 5 з прикладеного списку послідовностей.

Приклад 3: N-кінцева послідовність SARP-1 людини.

Передбачений сигнальний пептид SARP-1 має довжину 20 або 24 амінокислоти (дивись Фіг.5А). Для того, щоб перевірити відповідний N-кінець зрілого SARP-1, рекомбінантний SARP-1, що містить мітку з шести залишків гістидину, експресували в клітинах HEK-293 і очищали на нікель-хелатній колонці. Очищений білок мігрував у вигляді зони 32кДа при SDS-PAGE, відповідаючи масі, визначеній за допомогою MS (МС), яка виявилася 34313Да.

N-кінцеві послідовності очищеного рекомбінантного білка одержували, використовуючи імпульсний рідкофазний білковий секвенатор моделі 494 Applied Biosystems з амінокислотним аналізатором моделі 148C з оперативним фенілтіогідантоїном згідно з [Maundrell et al., (1997)]. Коротко, очищений SARP-1 переварювали за допомогою інкубації протягом ночі при 37°C в 90мкл 100мМ Трис-HCl pH8,5, що містить 1М сечовини, 20мМ метиламіну, 1мМ дитіотрейтолу і 5мкг трипсину (Boehringer Mannheim, чистий для секвенування). Пептиди розділяли за допомогою BEPX із оберненою фазою (Hewlett Packard HP 1090) на колонці C18 Brownlee (220×2,1мм). Пептиди елюювали градієнтом ацетонітрилу (в 0,1% трифтороцтової кислоти) від 0 до 55% протягом 60 хвилин з подальшим градієнтом 55-70% протягом 5 хвилин. Елюційні фракції збирали і радіоактивні ³³P-мічені фосфопептиди, ідентифіковані сцинтиляційною спектрометрією, секвенували деградацією за Едманом, використовуючи імпульсний рідкофазний білковий секвенатор моделі 494 Applied Biosystems з амінокислотним аналізатором моделі 148C з оперативним фенілтіогідантоїном.

Послідовність GLFLFGQPDFSYK одержували за допомогою тандемної мас-спектрометрії на трипсиновому гідролізаті відновленого і алкілованого білка. Аналіз проводили на мас-спектрометрі Q-TOF (Micromass UK Limited, Manchester, UK), оснащеному іонним джерелом Nano-Spray, по суті як описано [Cavalli et al., 2001]. Стисло, один мікрограм очищеного білка розділяли за допомогою 10% SDS-PAGE. Білкові зони вирізували із забарвленого сріблом гелю і гідролізували в гелі трипсином [Shevchenko et al., 1996]. Суміш екстрагованих пептидів аналізували за допомогою тандемного мас-спектрометричного секвенування [Wilm et al., 1996], використовуючи мас-спектрометр Q-TOF (Micromass, Manchester, UK), оснащений наноелектроспрейним джерелом іонів.

Результати

Теоретична N-кінцева послідовність незрілого SARP-1 являє собою наступне:

1	10	20	30	40	...
MLQPGSLLL LFLASHCCLG SARGLFLFGQ PDFSYKRSNC KPIPANLQLC ...					

Місце 2-ої передбаченої сигнальної ділянки розщеплення знаходиться між залишками 24 і 25 (GiL).

У проведених експериментах по секвенуванню виявлена значна гетерогенність N-кінця SARP-1.

В одному експерименті, виявлені дві головні послідовності, одна, що починається з FGQPD, тобто, що починається з амінокислоти 28 SEQ ID NO: 2, інша послідовність, що починається з LFGQPD, тобто, що починається з 27 амінокислоти SEQ ID NO: 2.

Однак крім того, в 4 послідовностях іншої очищеної партії виявлено:

LFLFGQPDFS (починається по 25 амінокислоті)

FLFGQPDFS (починається по 26 амінокислоті)

LFGQPD (починається по 27 амінокислоті)

FGQPD (починається по 28 амінокислоті)

Також є ще одна послідовність, що починається з 37 амінокислоти: RSNCKPIPAN. Ця послідовність є наслідком розщеплення після залишку лізину (розщеплення подібне до трипсинового).

Крім того, в іншому експерименті виявлена послідовність, що починається з положення 24:

GLFLFGQPDFSYK

Таким чином, виявилось, що N-кінець є дуже гетерогенним, що також зумовлено активністю ендопептидази або протеази, властиві SARP-1. Зрілий SARP-1 може зустрічатися в декількох різних варіантах з різними N-кінцями.

Приклад 4: Трансфекція SARP-1 індукуює апоптоз *in vitro*

Способи

Клітинні лінії фібробластів (клітини NIH3T3 миші і клітини AG1518 людини) і культури первинних фібробластів (нормальні фібробласти шкіри людини, пасаж 1-5) трансфікували плазмідною pcDNAS.1, що містить кодуючу послідовність кДНК SARP-1, або одну pcDNA3.1 (пустий вектор - псевдотрансфікований, як негативний контроль), використовуючи реагенти для трансфекції або Geneporter 2 (Gene Therapy Systems, San Diego), або Eugene 6 (Life Technologies) відповідно до рекомендацій виробника. Апоптоз визначали через 24 години після трансфекції, використовуючи набір для дослідження апоптозу з 96 ямками TiterTacs від фірми R&D systems, і рахували клітини, використовуючи фарби CyQuant (Molecular Probes) відповідно до інструкцій виробника.

Результати

Для оцінки впливу SARP-1 на фібробласти, клітинну лінію фібробластів трансфікували кДНК SARP-1 і визначали ступінь апоптозу. Результати подані на Фіг.7. Апоптоз в трансфікованих SARP-1 клітинах значно знижувався ($P=0,0009$) в порівнянні з псевдотрансфікованими (pcDNA3.1) клітинами, що свідчить про те, що SARP-1 людини виявляє активність, подібну до активності, описаній для його мишачого гомолога. Базовий рівень апоптозу визначали в нетрансфікованих клітинах. Оброблені нуклеазою клітини NIH3T3 служили як позитивний контроль. «Немічена» колонка показує фоновий рівень фарбування, а обробка нуклеазою

(«оброблені нуклеазою») служила як позитивний контроль.

Приклад 5: Вплив SARP-1 на продукцію TGFβ1

TGFβ1 є профіброзним цитокином, який активується при склеродермії і, як заздалегідь було показано, асоційований з патогенезом склеродермії [Kawakami et al., 1998]. Для того щоб визначити, чи знижує SARP-1 регуляцію або чи інгібує продукцію TGFβ1 або секрецію фібробластами, SARP-1 можна додавати в культури фібробластів у вигляді очищеного білка. Альтернативно, експресуючий вектор, що містить кДНК SARP-1, можна трансфікувати в клітини, щоб одержати достатню кількість SARP-1 в клітинній культурі. Інша можливість полягає в доданні середовища від експресуючих SARP-1 клітин, яке може бути концентрованим, щоб одержати достатню кількість SARP-1, в культури фібробластів. Для згаданого експерименту можна використати клітинні лінії фібробластів або первинні фібробласти, одержані від здорових або уражених індивідумів або з нормальних або патологічних ділянок шкіри хворого склеродермією.

Кількість TGFβ1 може бути виміряна за допомогою ELISA (твердофазного імуоферментного аналізу) в кондиціонованому середовищі культивованих клітин, з використанням системи ELISA Quantikine для TGFβ1 від R&D systems (каталожний №DB100).

Приклад 6: Вплив введення SARP-1 на активність MMP-1 в фібробластах людини *in vitro*

Способи

кДНК для SARP-1 людини, що містить кодуючу послідовність для мітки 6XHis на 3' кінці, субклонували у вектор pDEST Fastbac перенесення бакуловірусу. 6XHis-мічений на C-кінці SARP-1 продукували в клітинах Sf5 комах, інфікованих рекомбінантним баківірусом, і очищали методом афінної хроматографії на Ni-NTA.

Фібробласти людини з низькою кількістю пасажів (2-5), одержані з уражених або неуразених ділянок шкіри хворих склеродермією або від здорових суб'єктів, обробляли рекомбінантним SARP-1 0, 100 або 1000нг/мл протягом 24 годин. Збирали кондиціоноване середовище, а клітинні залишки видаляли центрифугуванням при 1200 обертів на хвилину протягом 10 хвилин при 4°C. Активність MMP-1 визначали в нерозведеному культуральному середовищі, використовуючи флуоресцентний набір MMP-1 (придбаний у R&D systems) відповідно до протоколу виробників. У тих же зразках також визначали активність MMP-9.

Результати

MMP-1 відповідальна за деградацію колагену I типу, означаючи, що зниження активності MMP-1 є чинником, сприяючим одному з основних порушень при склеродермії, яке викликає надмірне відкладення колагену.

Шкірні фібробласти від хворих склеродермією знижували експресію MMP-1 як на рівні мРНК, так і на рівні білка в порівнянні з нормальними і неуразеними фібробластами шкіри, одержаними від тих же самих хворих. Хоч загальна активність MMP-1, що визначається, значно відрізнялася від пацієнта

до пацієнта, оброблені SARP-1 фібробласти виявляли більш високу активність MMP-1, чим необроблені фібробласти, як в патологічних фібробlastах від хворих склеродермією (Fig.8A, D, F), так і в фібробlastах, одержаних з неуразжених, здорових ділянок шкіри від хворого склеродермією (Fig.8E) і в фібробlastах від клінічно здорових контрольних індивідуумів (Fig.8B і C). Представлені результати є середніми значеннями з визначень в трьох повторях. На відміну від MMP-1, не спостерігали ніякого впливу SARP-1 на активність MMP-9 (дані не представлені).

Приклад 7: Трансфекція кДНК SARP-1 знижує активність промотору колагену типу 1a2 в фібробlastах NIH3T3

Матеріали і методи

Клітини NIH3T3, що підтримуються в DMEM, що містить 2мМ глутаміну, 100одиниць/мл пеніцилін/стрептоміцину і 10% FCS, вміщували при 50% конфлюентності в 96-ямковий планшет для тканинної культури з білими стінками і прозорим дном (Wallac). На наступний день, клітини котрансфекували pcDNA3.1 SARP-1 і вектором pGL3 (Promega), що містить промотор колагену 3,5 (т.п.н.) і люциферазний ген-репортер (люб'язно надані Dr. David Abraham, Royal Free Hospital), використовуючи реагент для трансфекції Geneporтер відповідно до інструкцій виробника. Через 30 годин після трансфекції додавали TGFβ (R&D systems 5нг/мл). Через 24-36 годин визначали активність люцифери безпосередньо в кожній ямці, використовуючи систему для дослідження Bright-Glo, придбану від Promega.

Результати

Для того щоб визначити, чи існує яка-небудь залежність між високою експресією SARP-1 і синтезом колагену, досліджували вплив трансфекції кДНК SARP-1 на активність промотору колагену в фібробlastах NIH3T3, ко-трансфєкованих промотором Co11a2-люциферазною репортеркою конструкцією.

Котрансфекція кДНК SARP-1 промотором колаген-люциферазною репортерною плазмідною показала, що SARP-1 здатний придушувати не тільки базальну активність промотору колагену, але також індуковане TGFβ збільшення активності промотору колагену (Fig.9). Приведені результати дозволяють передбачити, що продукт гена SARP-1 може бути залучений до регуляції активності промотору колагену *in vitro* або безпосередній або не безпосередній через опосередковані SARP-1 події передачі сигналу.

Інший спосіб тестування впливу SARP-1 на відкладення колагену і/або синтез, і/або секрецію в фібробlastах полягає в доданні очищеного SARP-1 в культури фібробlastів. Альтернативно, експресуючий вектор, що містить кДНК SARP-1, може бути трансфєкований в фібробlastи для досягнення достатньої концентрації SARP-1 в клітинній культурі.

Інша можливість полягає в доданні середовища від експресуючих SARP-1 клітин, яке може бути концентрованим для досягнення відповідної концентрації SARP-1, в культури фібробlastів. Для цього експерименту можна використати клітинні

лінії фібробlastів або первинні фібробlastи, одержані від здорових і хворих індивідуумів, або з нормальних або патологічних ділянок шкіри хворого склеродермією.

Синтез колагену можна визначати *in vitro* в культивованих фібробlastах людини, використовуючи систему захоплення ELISA (антитіла одержані від Southern Biotechnology Associates Inc), як описано [Shi-wen et al., 1997].

Приклад 8: Фібробlastи шкіри людини, надекспресуючі SARP-1 або оброблені рекомбінантним SARP-1 людини, змінюють експресію мРНК генів, асоційованих з патологічним процесом склеродермії.

Матеріали і способи

Нормальні фібробlastи шкіри (крайньої плоти) людини підтримували в фібробlastному культуральному середовищі (Promocell). Фібробlastи обробляли рекомбінантним SARP-1 людини (100нг/мл) протягом 4 або 24 годин в присутності і за відсутності TGFβ1 людини. Клітини збирали після періоду обробки і виділяли тотальну РНК, використовуючи реагент тризол™ (Life Technologies) відповідно до інструкцій виробника. ³²P-dATP-мічений зонд кДНК одержували з РНК, як описано вище, і гібридизували на фільтрах з іммобілізованими генами цитокінів людини від R&D systems і обробляли, як описано вище.

Результати

Хоч SARP-1 спочатку був описаний як білок, пов'язаний з апоптозом, його точна функція невідома. Для того щоб зрозуміти роль SARP-1 в склеродермії, визначали вплив обробки за допомогою SARP-1 фібробlastів шкіри людини, заздалегідь оброблених TGFβ, які імітують склеродермічний фенотип, на експресію гена фібробlastів.

У Таблиці IV приведені. мРНК, порушені обробкою фібробlastів рекомбінантним SARP-1 після попередньої стимуляції протягом 4 годин TGFβ, який використали, щоб імітувати склеродермічний фенотип. Клітини обробляли SARP-1 протягом 24 годин. При приведених умовах, TGFα, і FGF5 були інгібовані. Спостерігали знижену експресію ендогліну, TGFβ1-зв'язуючого білка, і збільшену експресію фуруну, протеази, асоційовану з активацією матриксних металопротеїназ. Іншою мРНК, яка придушувалася, виявилася TARC. Названий хемокін пов'язаний з рекрутментом Т клітин шкірного хомінгу в ділянках запалення. Тому можливо, що введення SARP-1 може надавати протизапальні ефекти. Також спостерігали збільшення регуляції мРНК субодиниць TNFR1. Значення цього спостереження не ясне, оскільки виявилось, що є значні протиріччя в науковій літературі відносно того, чи грає TNF патогенну або захисну роль в склеродермії.

В окремому експерименті (не показано), аналізували регуляцію генів в фібробlastах від хворих склеродермією в порівнянні зі здоровими контрольними фібробlastами. Цікаво, виявлено, що регульовані гени, представлені в Таблиці IV, регулюються в склеродермічних зразках. Ті гени, які виявлені як активовані в склеродермічних фібробlastах, інгібувалися після експресії SARP-1 у вищевказаній моделі, і ті гени, які були інгібовані

ми, активувалися після експреси SARP-1 у вище описаній моделі, вказуючи, крім того, що SARP-1 може надавати сприятливої дії при лікуванні склеродермії.

Таблиця IV

Співвідношення *	TGFβ-оброблені	TGFβ+SARP-1-оброблені	Ген
-1,6	1346	830	FGF-5
-2,7	788	297	ендоглин
3,3	157	515	TNFR1
3,3	128	428	фурин
-4,6	275	60	TGFα
-4,7	164	34	TARC

* Співвідношення SARP-1-/псевдооброблені являє собою співвідношення TGFα+SARP-1-оброблені/TGFα один.

Представлені результати є результатами двох незалежних експериментів.

Приклад 9: Оцінка впливу SARP-1 *in vivo* на мишачій моделі захворювання

Індуковане блеоміцином ураження легенів є визнаною моделлю склеродермії. Захворювання викликається внутрішньотрахеальним введенням блеоміцину [Fattori et al., 2000]. В обробленій миші розвивається запальна відповідь в легенях (максимально близько 7 дня) з подальшим фіброзом, піки якого мають місце близько 14 дня після індукції. Згадану модель використали, щоб оцінити вплив введення SARP-1 на розвиток фіброзу легенів *in vivo*. Використали систему клітина-доставка (клітини NIH3T3, трансфіковані повномірною кДНК SARP-1), щоб генерувати SARP-1 *in vivo*.

Способи

Обробки тварин

Фіброз легенів індукували у мишей (20-25г) внутрішньотрахеальним введенням блеоміцину (0,075 МЕ) в фізіологічному розчині протягом 1 дня. Мишей розділяли на 4 окремі групи з 10 тварин. Одна група одержувала внутрішньочеревинну ін'єкцію 10^6 клітин NIH3T3, трансфікованих SARP-1/pcDNA3.1. Другій групі вводили 10^6 псевдотрансфікованих (вектор pcDNA3.1) клітин NIH3T3. Третя група одержувала 250мкг антитіл проти TGFβ (Anti Rα TGFβ: Sigma каталожний №T9429), і мишам останньої групи вводили фізіологічний розчин. Всіх мишей умертвляли на 14 день і легені фіксували формаліном і просочували парафіном для гістології. Зрізи легенів забарвлювали трихромом або пікросиріусом червоним на колаген (Bancroft J.D. and Stevens A. Theory and Practice of Histological Techniques) і відмічали співвідношення фіброз/легеня.

Трансфекція клітин NIH3T3

Клітини NIH3T3 трансфікували SARP-1/pcDNA3.1 або pcDNA3.1, використовуючи реагент Geneporter 2, як описано раніше. Через двадцять чотири години після трансфекції культуральне середовище видаляли, а клітини обробляли забу-

ференим фосфатом фізіологічним розчином (PBS), що містить 1мМ EDTA, протягом 5 хвилин при 37°C. Клітини м'яко відділяли клітинною скребачкою (Costar), центрифугували протягом 5 хвилин при 4°C для осадження клітин, і повторно суспендували в фізіологічному розчині з ступенем чистоти для ін'єкцій, при концентрації 10^7 клітин/мл.

Результати

SARP-1 захищає проти індукованого блеоміцином фіброзу легенів.

У тварин, оброблених одним блеоміцином або псевдотрансфікованими клітинами NIH3T3, розвивався значний фіброз легенів (дані не представлені). Вважають, що TGFβ1 є одним з ключових агентів, відповідальних за патологічні зміни, які ведуть до фіброзу. Заздалегідь було показано, що поліклональні антитіла проти TGFβ1 захищають проти розвитку фіброзу легенів, коли їх вводили профілактично [Yamamoto et al., 1999], а також знижують фіброз шкіри на GvHD-моделі склеродермії [McComick et al., 1999]. Тому ці антитіла використали як позитивний контроль в цих експериментах. У анти-TGFβ-оброблених мишей не розвивався великий фіброз легенів. Однак у мишей, оброблених трансфікованими SARP-1 клітинами, відмічали значно знижену кількість фіброзних уражень в легенях, коли порівнювали з мишами, обробленими одним блеоміцином або псевдотрансфікованими клітинами. Дія виявилася порівнянною або навіть кращою, ніж ефект, що спостерігається при анти-TGFβ-обробці (не представлено).

Гістологічний аналіз легенів показав, що оброблені SARP-1 тварини мали близьку до нормальної морфологію легенів з невеликою запальною інфільтрацією і, здебільшого, нормальною альвеолярною архітектурою. Така морфологія нагадує морфологію анти-TGFβ-оброблених тварин і різко відрізняється від аномальної морфології, що спостерігається в легенях від псевдооброблених і необроблених тварин. В останніх 2 групах, альвеолярні простори виявилися заповненими клітинними інфільтратами і відкладенням колагену (не представлено).

Кількості фіброзних уражень в легенях різних експериментальних груп зображено на Фіг.10. У оброблених SARP-1 мишей відмічали значно менше фіброзних уражень в порівнянні з мишами, обробленими фізіологічним розчином або анти-TGFβ.

Введення блеоміцину може приводити до підвищеної смертності. Крім захисної дії введення SARP-1 проти фіброзу також було зазначено, що більше число мишей виживало (8/10) в порівнянні з мишами, обробленими фізіологічним розчином (6/10), мишами, обробленими анти-TGFβ (4/10), і псевдообробленими мишами (3/10). Тому обробка SARP-1 навіть запобігала смерті на моделі фіброзу легенів, вказуючи, що лікування SARP-1 є безсумнівно кращим за лікування анти-TGFβ в описаній експериментальній серії.

Резюме, на описаній загальноприйнятій моделі склеродермії *in vivo* продемонстрована лікувальна дія SARP-1.

Інші моделі *in vivo* можна використати для тестування впливу введення SARP-1, такі як мишає склеродерматозне захворювання трансплантат-проти-хазяїна (Scl GVHD) модель склеродермії. Названа модель відтворює важливі особливості склеродермії, що включають ущільнення шкіри, фіброз легенів і збільшення регуляції мПНК шкірного колагену, яким передують моноцитарна інфільтрація і збільшена регуляція мПНК шкірного TGF-бета1. Модель детально описана [McCormick LL et al., 1999].

Приклад 10: Системна доставка SARP-1 внутрішньом'язовою ін'єкцією експресуючої плазмідної ДНК

Для демонстрації ролі SARP-1 як захисного чинника при склеродермії, мишей трансфікували *in vivo* плазмідною, що кодує кДНК SARP-1, і порівнювали з мишами, трансфікованими порожньою плазмідною, як контрольними.

Плазмідні вводили в обидва передні великого-мілкові м'язи анестезованої миші, як описано раніше [Dimmeler et al., 1997; Mir et al., 1999]. Стисло, крізьшкірні електричні імпульси (8 прямокутних електричних імпульсів 200 Вт/см, тривалість 20мсек. при 2Гц) доставляли з допомогою електропультатора PS-15, використовуючи два електроди-пластини з нержавіючої сталі, вміщені на 4,2-5,3мм окремо на кожній стороні ноги.

Індукований блеоміцином фіброз легенів був моделлю склеродермії, як описано в попередніх прикладах, а за розвитком захворювання стежили як у трансфікованих SARP-1, так і псевдотрансфікованих тварин.

Список літератури:

1. Abraham D., Lupoli S., McWhirter A., Plater-Zyberk C., Piela T.H., Korn J.H., Olsen I. and Black C. (1991) Expression and function of surface antigens on scleroderma fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 34, 1164-1172.
2. Abraham D.J., Shiwen X., Black C.M., Sa S., Xu Y., Leask A.J. *Biol. Chem.* 2000 May 19; 275 (20): 15220-5.
3. Adler P.N., Charlton J and Vinson C. (1987) *Dev. Genet.* 8, 99-119.
4. Altschul SF et al., *J Mol Biol*, 215, 403-410, 1990, Altschul SF et al, *Nucleic Acids Res.*, 25:389-3402, 1997.
5. Bafico B.A., Gazit A., Pramila T., Finch P.W., Yaniv A. and Aaronson S.A. (1999) Interaction of frizzled related protein (FRP) with Wnt ligands and the frizzled receptor suggests alternative mechanisms for FRP inhibition of Wnt signalling, *J.Biol. Chem.* 274, 16180-16187.
6. Bancroft J.D. and Stevens A. *Theory and Practice of Histological Techniques.* Churchill Livingstone, England.
7. Banyai L. and Patthy L. (1999) The NTR module: domains of netrins, secreted frizzled related proteins and type I procollagen C-proteinase enhancer protein are homologous with tissue inhibitors of metalloproteases. *Protein Sci.* 8, 1636-1642.
8. Black C.M and Denton C.P. (1998) Systemic sclerosis and related disorders. "In Oxford textbook of Rheumatology" (P.O. Maddison, D.A. Isenberg,

P.Woo and D.N. Glass, Eds.) pp.771-789, Oxford Univ. Press, New York.

9. Cavalli V, Vilbois F, Corti M, Marcote MJ, Tamura K, Karin M, Arkinstall S, Graenberg J. *Mol Cell* 2001 Feb;7(2): 421-32.

10. Chang, Esumi, N.; Moore, K.; Li, Y.; Zhang, S.; Chew, C.; Goodman, B.; Rattner, A.; Moody, S.; Stetten, G.; Campochiaro, Zack, Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum. Molec. Genet.* 8: 575-583, 1999

11. "Clements P.J. and Furst D.E. (1996) *Systemic Sclerosis*" Williams and Williams, Baltimore.

12. Devereux J et al. *Nucleic Acids Res*, 12, 387-395, 1984. 7. Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* 1997; 95: 1760-3.

13. Finch P.W., He X., Kelley M.J., Uren A., Schaudies R.P., Popescu N.C., Rudikoff S., Aaronson S.A., Varmus H.E. and Rubin J.S. (1997) Purification and molecular cloning of a secreted frizzled related antagonist of Wnt action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 6770-6775.

14. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Collier H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri, MA, Bloomfield CD, Lander ES (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286, 531-7.

15. Grantham (1974), *Science*, 185. 862-864.

16. Hattori N., Degen J.L., Sisson T.H., Liu H., Moore B.B., Pandrangi R.G., Simon R.H. and Drew A.F. (2000) Bleomycin induced pulmonary fibrosis in fibrinogen null mice. *J. Clin. Invest.* 106, 1341-135

17. Kawakami T., Ihn H., Xu W., Smith E., LeRoy C. and Trojanowska M (1998) Increased expression of TGF beta receptors by scleroderma fibroblasts: evidence for contribution of autocrine TGF-beta signalling to scleroderma phenotype. *J. Invest. Dermatol.* 10, 47-51.

18. Krein, PM, Huang Y and Winston BW (2001). *Expert Opin. Ther. Patents* 11(7): 1065-1079.

19. Leighton, C. *Drugs* 2001 61(3), 419-427.

20. Leimeister C, Bach A, Gessler M. *Mech Dev* 1998 Jul; 75(1-2): 29-42.

21. LeRoy E.C. (1974) Increased collagen synthesis by scleroderma skin fibroblasts *in vitro*. *J. Clin. Invest.* 54, 880-889.

22. Lin K, Wang S, Julius MA, Kitajewski J, Moos M Jr, Luyten FP, *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 Oct 14; 94 (21): 11196-200.

23. Martini, Maccario, Ravelli et al., *Arthritis Rheum.* 1999, 42, 807-811.

24. McCormick LL, Zhang Y, Tootell E, Gilliam AC *J. Immunol.* 163(10), 5693 (1999).

25. Melkonyan H.S., Chang W.C., Shapiro J.P., Mahadevappa M., Fitzpatrick P.A., Kiefer M.C., Tomei L.D. and Umansky S.R. (1997) SARPs: a family of secreted apoptosis-related proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 13696-13641.

26. Miller J.R., Hocking A.M., Brown J.D. and Moon R.T. (1999) Mechanism and function of signal

transduction by the Wnt/D catenin and Wnt/Ca2+ pathways. *Oncogene* 18, 7860-7872.

8. Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Dellere P, Branellec D, Schwartz B, Scheman D. High efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4262-7.

9. Pearson WR, *Methods in Enzymology*, 183, 63-99, 1990

10. Pearson WR and Lipman DJ, *Proc Nat Acad Sci USA*, 85, 2444-2448, 1988

27. Rattner A, Hsieh J-C, Smallwood P.M., Gilbert D.J., Copeland N.G., Jenkins N.A., Nathans J. (1997) A family of secreted proteins contain homology to the cysteine rich ligand binding domain of frizzled receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 2859-2863.

28. Shevchenko A, Wilm M., Vorm O. and Mann M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.*, 68: 850-858

29. Silman A.J. (1991) Moratlity from sderodema in England and Wales 1968-1975. *Ann. Rheu. Dis.* 50, 95-96.

30. Shi-wen X, Denton C.P., McWhirter A., Bou-Gharios G., Abraham D.J., du Bois R.M. and Black C.M. (1997) Sclerodema lung fibroblasts exhibit elevated and dysregulated collagen type I biosynthesis. *Arthritis Rheum.* 40, 1237-1244.

31. Shi-wen X, Denton C.P., Dashwood M.R., Holmes A, Bou-Gharios G., Pearson J.D., Black C.M. and Abraham DJ. (2000) Fibroblast matrix gene

expression and connective tissue remodelling: role of endothelin-1. *J. Invest. Dermatol.* (in press).

32. Smalley MJ. and Dale T.C (1999) Wnt signalling in mammalian development and cancer. *Cancer and Metastasis Rev.* 18, 215-230.

33. Smith and Wateman J. *Mol. Biol.*, 147,195-197, 1981, *Advances in Applied Mathematics*, 2, 482-489, 1981.

34. Strehlow D. and Korn J. (1998) Biology of the sclerodema fibroblast. *Curr. Opin. Rheumatol.* 10, 572-578.

35. Smith, *Textbook of the Autoimmune Diseases*, Edited by Lahita, Chiorazzi and Reeves, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000.

36. Von Heijne G. (1986) *Nucleic Acids Res.* 14, 4683-4690.

37. Wigley F.M. and Sule S.D. (2001) *Expert Opinions on Investigational Drugs* 10(1)31-48.

38. Wigley F.M. and Boling CL. (2000) The treatment of sclerodema. 2, 276-292.

39. Wilm M., Shevchenko A, Houthaeve T., Breit S., Schweigerer L., Fotsis T. and Mann M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature*, 379: 466-469

40. Yamamoto T.S., Takagawa L., Katayama I. and Nishioka K. (1999) Anti-sderotic effect of transforming growth factor-D antibody in a mouse model of bleomycin induced sderodema. *Clin Immunol.* 92, 6.

СПИСОК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> Applied Research Systems ARS Holding N.V.

<120> Застосування SARP-1 для лікування і/або попередження склеродермії

<130> EP 469 Y

<160> 5

<170> Патент в версії 3.0

<210> 1

<211> 912

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

gccaaagcttc ccacgatgct gcagggccct ggctcgctgc tgctgctctt cctcgctctg
60

cactgctgcc tgggctcggc gcgcgggctc ttctctttg gccagcccgga cttctcctac
120

aagcgcagca attgcaagcc catcccgcc aacctgcagc tgtgccacgg catcgaatac
180

cagaacatgc ggctgcccac .cctgctgggc cagcagacca tgaaggaggt gctggagcag
240

gccggcgctt ggatcccgct ggtcatgaag cagtgccacc cggacaccaa gaagtctctg
300

tgctcgtctt tgcgccccgt ctgcctcgat gacctagacg agaccatcca gccatgccac
 360
 tgcgtctgcg tgcaggtgaa ggaccgctgc gccccgggtca tgcccgccctt cggcttcccc
 420
 tggcccgaca tgcttgagtg cgaccgtttc cccaggaca acgacctttg catccccctc
 480
 gctagcagcg accacctcct gccagccacc gaggaagctc caaaggtatg tgaagcctgc
 540
 aaaaataaaa atgatgatga caacgacata atggaaacgc tttgtaaaaa tgattttgca
 600
 ctgaaaataa aagtgaagga gataacctac atcaaccgag ataccaaaat catcctggag
 660
 accaagagca agaccattta caagctgaac ggtgtgtccg aaagggacct gaagaaatcg
 720
 gtgctgtggc tcaaagacag ctgacagtgc acctgtgagg agatgaacga catcaacgcg
 780
 ccctatctgg tcatgggaca gaaacagggg ggggagctgg tgatcacctc ggtgaagcgg
 840
 tggcagaagg ggcagagaga gttcaagcgc atctcccgca gcatccgcaa gctgcagtgc
 900
 tagctcgagc gc
 912

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Gln Gly Pro Gly Ser Leu Leu Leu Leu Phe Leu Ala Ser His
 1 5 10 15
 Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
 35 40 45
 Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
 50 55 60
 Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
 85 90 95
 Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
 100 105 110
 Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
 115 120 125

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
 290 295

<210> 3

<211> 30

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 3

gccaaagcttc ccacgatgct gcagggccct
 30

<210> 4

<211> 30,

<212> ДНК

<213> homo sapiens

<400> 4

gcgctcgagc tagcactgca gcttgcggat
 30

<210> 5

<211> 295

<212> PRT

<213> Мишині м'язи

<400> 5

Met Pro Arg Gly Pro Ala Ser Leu Leu Leu Leu Val Leu Ala Ser His
 1 5 10 15

Cys Cys Leu Gly Ser Ala Arg Gly Leu Phe Leu Phe Gly Gln Pro Asp
 20 25 30
 Phe Ser Tyr Lys Arg Ser Asn Cys Lys Pro Ile Pro Ala Asn Leu Gln
 35 40 45
 Leu Cys His Gly Ile Glu Tyr Gln Asn Met Arg Leu Pro Asn Leu Leu
 50 55 60
 Gly His Glu Thr Met Lys Glu Val Leu Glu Gln Ala Gly Ala Trp Ile
 65 70 75 80
 Pro Leu Val Met Lys Gln Cys His Pro Asp Thr Lys Lys Phe Leu Cys
 85 90 95
 Ser Leu Phe Ala Pro Val Cys Leu Asp Asp Leu Asp Glu Thr Ile Gln
 100 105 110
 Pro Cys His Ser Leu Cys Val Gln Val Lys Asp Arg Cys Ala Pro Val
 115 120 125
 Met Ser Ala Phe Gly Phe Pro Trp Pro Asp Met Leu Glu Cys Asp Arg
 130 135 140
 Phe Pro Gln Asp Asn Asp Leu Cys Ile Pro Leu Ala Ser Ser Asp His
 145 150 155 160
 Leu Leu Pro Ala Thr Glu Glu Ala Pro Lys Val Cys Glu Ala Cys Lys
 165 170 175
 Thr Lys Asn Glu Asp Asp Asn Asp Ile Met Glu Thr Leu Cys Lys Asn
 180 185 190
 Asp Phe Ala Leu Lys Ile Lys Val Lys Glu Ile Thr Tyr Ile Asn Arg
 195 200 205
 Asp Thr Lys Ile Ile Leu Glu Thr Lys Ser Lys Thr Ile Tyr Lys Leu
 210 215 220
 Asn Gly Val Ser Glu Arg Asp Leu Lys Lys Ser Val Leu Trp Leu Lys
 225 230 235 240
 Asp Ser Leu Gln Cys Thr Cys Glu Glu Met Asn Asp Ile Asn Ala Pro
 245 250 255
 Tyr Leu Val Met Gly Gln Lys Gln Gly Gly Glu Leu Val Ile Thr Ser
 260 265 270
 Val Lys Arg Trp Gln Lys Gly Gln Arg Glu Phe Lys Arg Ile Ser Arg
 275 280 285
 Ser Ile Arg Lys Leu Gln Cys
 290 295

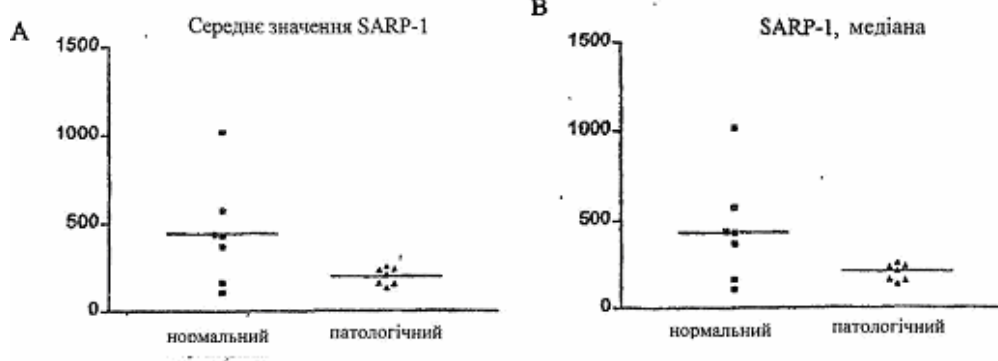
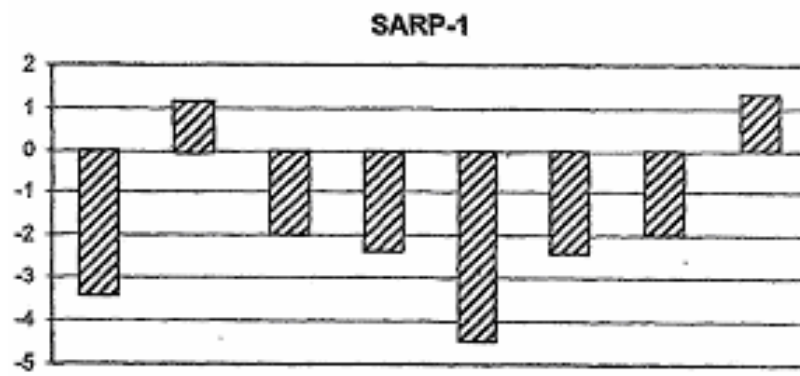
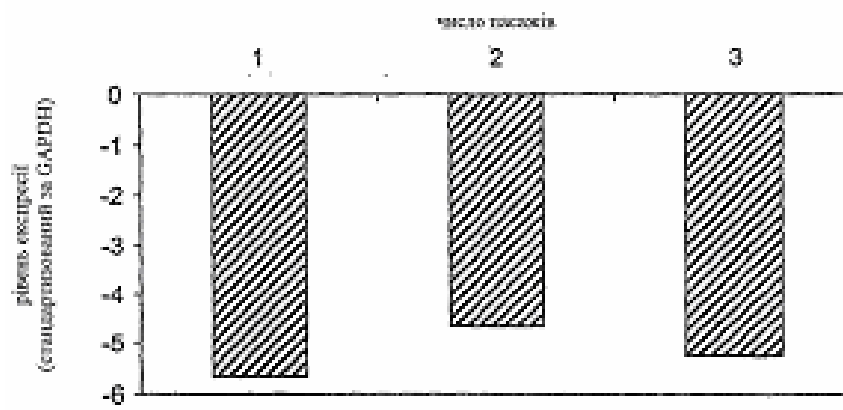


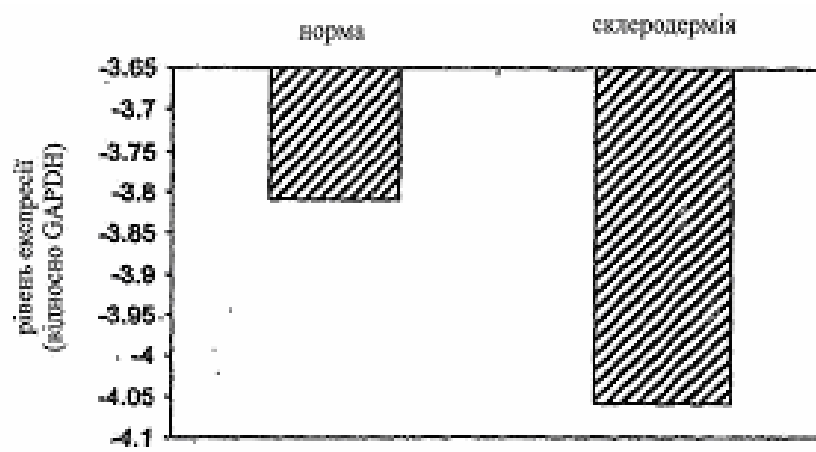
Fig. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

GCCAAGCTTCCCACGATGCTGCAGGGCCCTGGCTCGCTGCTGCTCTTCCTCGCCTCG
 1 -----+-----+-----+-----+-----+ 60
 CGGTTTGAAGGGTGCTACGACGTCCCGGGACCGAGCGACGACGAGAGAAGGAGCGGAGC

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

 CACTGCTGCCTGGGCTCGGCGCGCGGGCTCTTCCTCTTTGGCCAGCCCGACTTCTCCTAC
 61 -----+-----+-----+-----+-----+ 120
 GTGACGACGGACCCGAGCCGCGCGCCCGAGAAGGAGAAACCGGTCGGGCTGAAGAGGATG

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

 a K R S N C K P I P A N L Q L C H G I E Y -
 CAGAACATGCGGCTGCCAACCTGCTGGGCCACGAGACCATGAAGGAGGTGCTGGAGCAG
 181 -----+-----+-----+-----+-----+ 240
 GTCTTGACGCCGACGGTTGGACGACCCGGTGCTCTGGTACTTCTCCACGACCTCGTC

 a Q N M R L P N L L G H E T M K E V L E Q -
 GCCGGCGCTTGGATCCCGCTGGTCATGAAGCAGTGCCACCCGGACACCAAGAAGTTCTCTG
 241 -----+-----+-----+-----+-----+ 300
 CGGCCGCGAACCTAGGGCGACCACTTCTGTCACGGTGGGCCTGTGGTTCTTCAAGGAC

 a A G A W I P L V M K Q C H P D T K K F L -
 TGCTCGCTCTTCGCCCCGTCTGCCTCGATGACCTAGACGAGACCATCCAGCCATGCCAC
 301 -----+-----+-----+-----+-----+ 360
 ACGAGCGAGAAGCGGGGGCAGACGGAGCTACTGGATCTGCTCTGGTAGGTCCGGTACGGTG

 a C S L F A P V C L D D L D E T I Q P C H -
 TCGCTCTGCGTGACGGTGAAGGACCGCTGCGCCCCGGTCATGTCCGCCTTCGGCTTCCCC
 361 -----+-----+-----+-----+-----+ 420
 AGCGAGACGCACGTCCACTTCTGCGGACGCGGGGCCAGTACAGGCGGAAGCCGAAGGGG

 a S L C V Q V K D R C A P V M S A F G F P -
 TGGCCCGACATGCTTGAGTGCAGACCGTTTCCCCCAGGACAACGACCTTTGCATCCCCCTC
 421 -----+-----+-----+-----+-----+ 480
 ACCGGGCTGTACGAACTCACGCTGGCAAAGGGGTCCTGTTGCTGGAAACGTAGGGGGAG

 a W P D M L E C D R F P Q D N D L C I P L -
 GCTAGCAGCGACCACTCCTGCCAGCCACCGAGGAAGCTCCAAAGGTATGTGAAGCCTGC
 481 -----+-----+-----+-----+-----+ 540
 CGATCGTCGCTGGTGGAGGACGGTCGGTGGCTCCTTCGAGGTTTCCATACACTTCGGACG

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

Fig. 5A

```

AAAAATAAAATGATGATGACAACGACATAATGGAAACGCTTGTAAAAATGATTTTGCA
541 -----+-----+-----+-----+-----+ 600
TTTTTATTTTTACTACTACTGTTGCTGTATTACCTTTGCGAAACATTTTTACTAAACGT

a      K N K N D D D N D I M E T L C K N D F A -

CTGAAAATAAAAGTGAAGGAGATAACCTACATCAACCGAGATACCAAATCATCCTGGAG
601 -----+-----+-----+-----+-----+ 660
GACTTTTATTTTCACTTCCTCTATTGGATGTAGTTGGCTCTATGGTTTTAGTAGGACCTC

a      L K I K V K E I T Y I N R D T K I I L E -

ACCAAGAGCAAGACCATTACAGCTGAACGGTGTGTCCGAAAGGGACCTGAAGAAATCG
661 -----+-----+-----+-----+-----+ 720
TGGTTCTCGTTCTCGTAAATGTTGACTTGCCACACAGGCTTTCCTGGACTTCTTTAGC

a      T K S K T I Y K L N G V S E R D L K K S -

GTGCTGTGGCTCAAAGACAGCTTGCACTGCACCTGTGAGGAGATGAACGACATCAACGGC
721 -----+-----+-----+-----+-----+ 780
CACGACACCGAGTTTCTGTGACGTCACGTGGACACTCCTCTACTTGCTGTAGTTGCGC

a      V L W L K D S L Q C T C E E M N D I N A -

CCCTATCTGGTCATGGGACAGAAACAGGGTGGGGAGCTGGTGATCACCTCGGTGAAGCGG
781 -----+-----+-----+-----+-----+ 840
GGGATAGACCGTACCCTGTCTTTGTCCCACCCCTCGACCACTAGTGGAGCCACTTCGCC

a      P Y L V M G Q K Q G G E L V I T S V K R -

TGGCAGAAAGGGGAGAGAGAGTTCAAGCGCATCTCCCGCAGCATCCGCAAGCTGCAGTGC
841 -----+-----+-----+-----+-----+ 900
ACCGTCTTCCCGTCTCTCTCAAGTTTCGCGTAGAGGGCGTCGTAGGCGTTTCGACGTCACG

a      W Q K G Q R E F K R I S R S I R K L Q C -

TAGCTCGAGCGC
901 -----+----- 912
ATCGAGCTCGCG

```

Fig. 5B

MLQGPGLLLFLASHCCLGSAAGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQCHGIEYQNMRL
 MERGPASLLLVASHCCLGSAAGLFLFGQPDFSYKRSNCKPIPANLQCHGIEYQNMRL
 * ** *****

PNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDLDDETIQPCHSCLVQ
 PNLLGHETMKEVLEQAGAWIPLVMKQCHPDTKKFLCSLFAPVCLDDLDDETIQPCHSCLVQ

VKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKKND
 VKDRCAPVMSAFGFPWPDMLECDRFPQDNDLCIPLASSDHLLPATEEAPKVCEACKKNE

DDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIILETKSKTIYKINGVSEDLKKSVMWLK
 DDNDIMETLCKNDFALKIKVKEITYINRDTKIILETKSKTIYKINGVSEDLKKSVMWLK

DSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGGELVITSVKRWQKGQREFKRISSIRKLQC
 DSLQCTCEEMNDINAPYLVMGQKQGGELVITSVKRWQKGQREFKRISSIRKLQC

Fig. 6

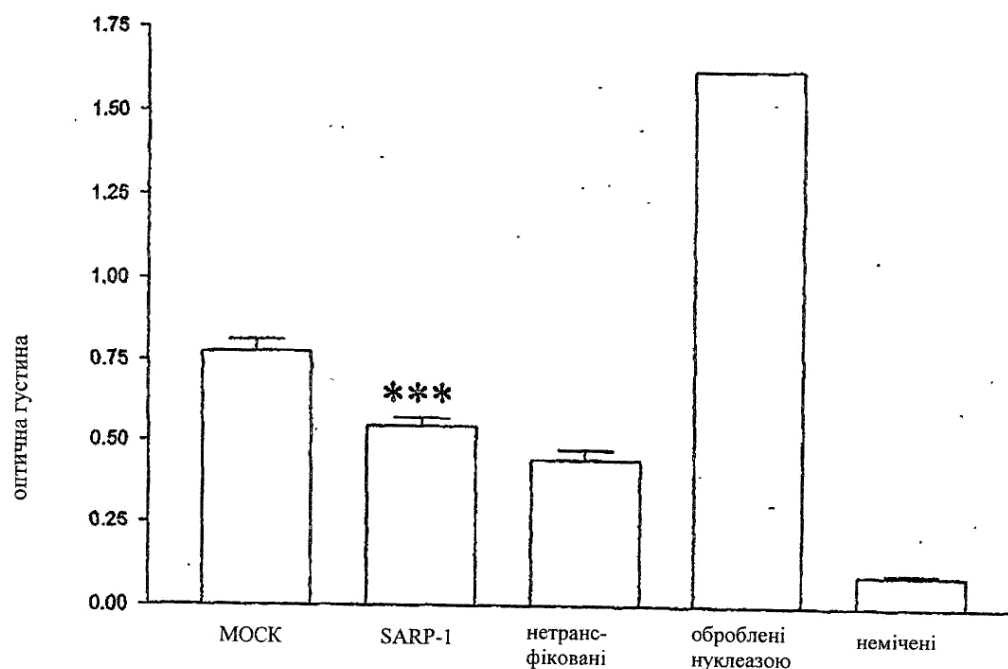


Fig. 7

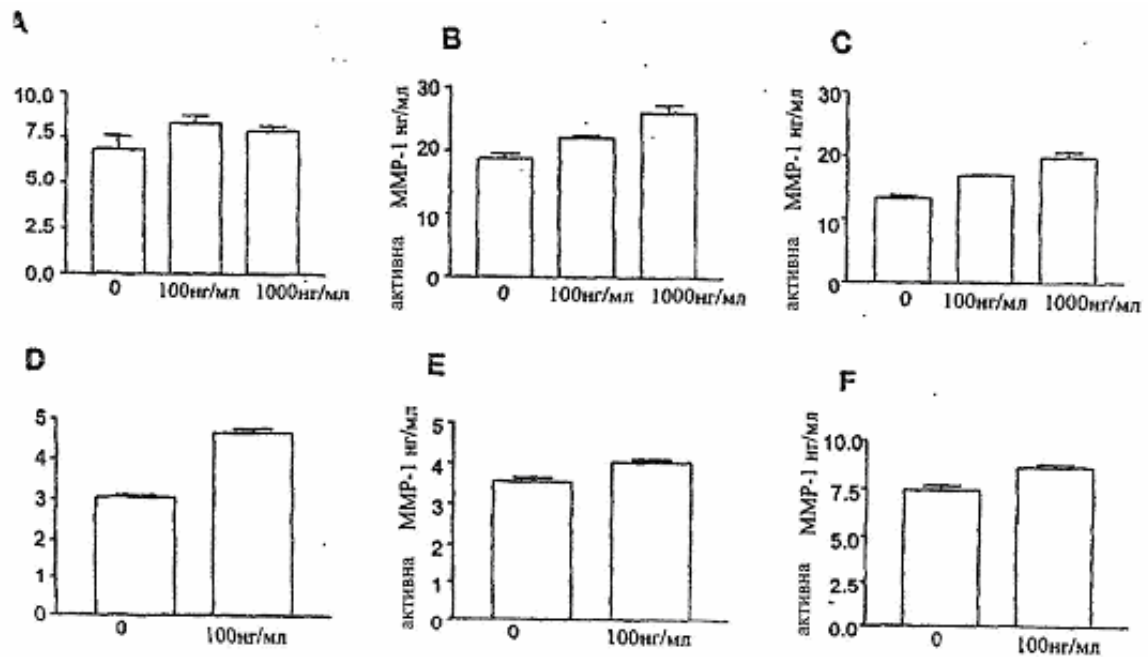


Fig. 8

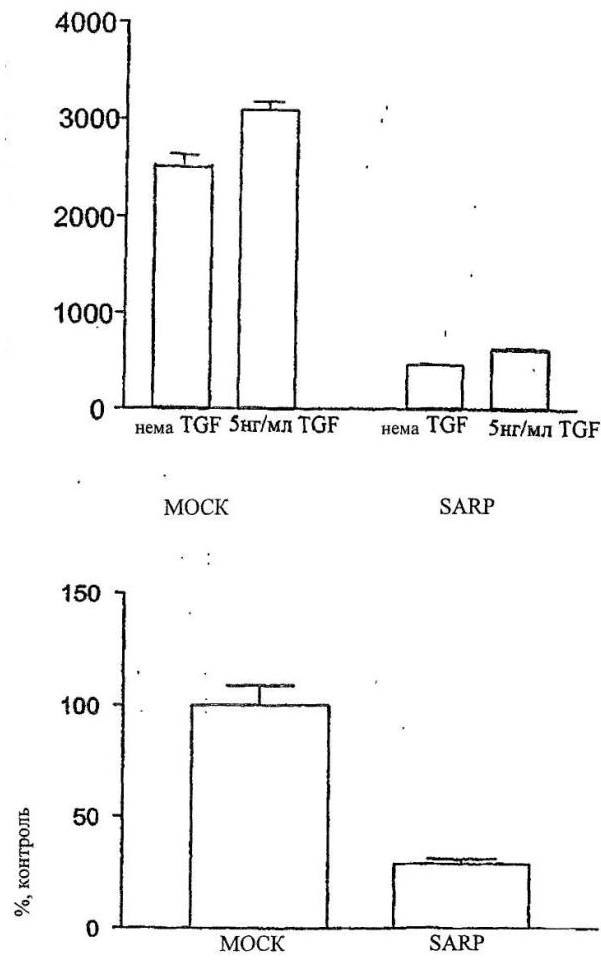
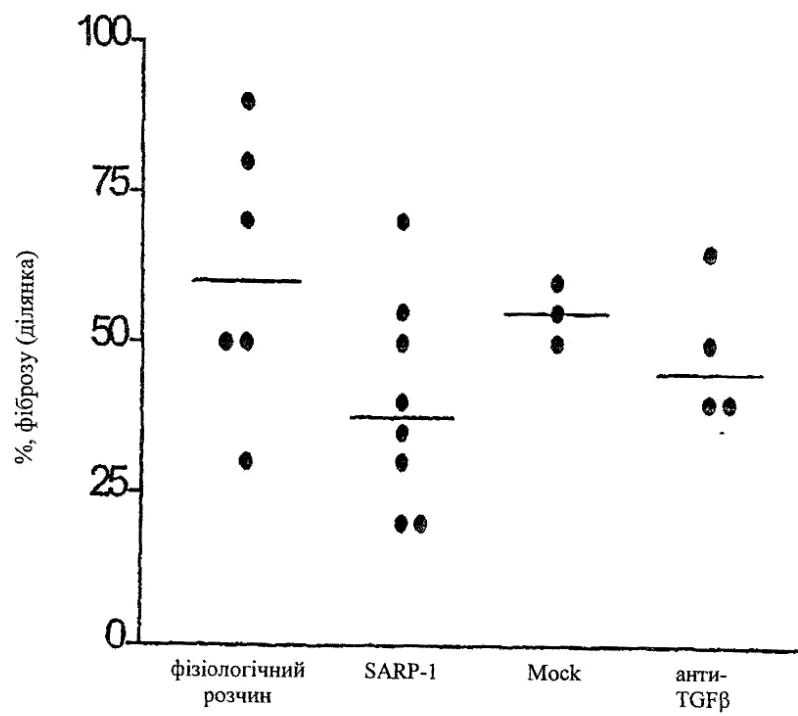


Fig. 9



Фіг. 10