HU 000222411 B1

(19) Országkód

HU

MAGYAR KÖZTÁRSASÁG

MAGYAR SZABADALMI HIVATAL

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

222 411 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 00 04099
(22) A bejelentés napja: 1998. 11. 06.
(30) Elsőbbségi adatok:
197 49 091.3 1997. 11. 07. DE
60/079,375 1998. 03. 26. US
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 98/07103
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 99/24473

(40) A közzététel napja: 2001. 03. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi Közlönyben: 2003. 06. 30.

(51) Int. Cl.[7]

C 07 K 16/18
G 01 N 33/68
A 61 K 39/395

(72) Feltalálók:
Eigenthaler, Martin, Würzburg (DE)
Hoschützky, Heinz, Denzlingen (DE)
Walter, Ulrich, Veitshöchheim (DE)

(73) Szabadalmas:
Vasopharm Biotech GmbH, Würzburg (DE)

(74) Képviselő:
dr. Svingor Ádám, DANUBIA Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54) **Foszforilált VASP elleni antitestek, hibridómasejtek előállításukra és az antitestek alkalmazása**

KIVONAT

A találmány tárgyát olyan, a VASP (vasodilator által serkentett foszfoprotein, *„vasodilator-stimulated phosphoprotein")* elleni antitestek képezik, melyek csak abban az esetben kötik a VASP-ot, ha az foszforilálva van a 157-es szerin aminosavon, azaz 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP. Továbbá, a találmány tárgyát képezik a 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP elleni antitestek előállítására szolgáló hibridómasejtek, az antitesteket vagy antitestfragmentumokat tartalmazó diagnosztikai reagenskészletek, valamint alkalmazásuk diagnosztikai és/vagy gyógyászati célra.

A találmány szerinti megoldás alkalmas az endothelium működésének vizsgálatára, *ex vivo* biológiai anyagból (például sejt- vagy vérminta), szokásos laboratóriumi eljárásokkal, miáltal az endothelium hibás működése által okozott károsodás visszafordítható.

HU 222 411 B1

A találmány tárgyát olyan, a VASP (vasodilator által serkentett foszfoprotein, *„vasodilator-stimulated phosphoprotein")* elleni antitestek képezik, melyek csak abban az esetben kötik a VASP-ot, ha az foszforilálva van a 157-es szerin aminosavon, azaz 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP. Továbbá, a találmány tárgyát képezik a 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP elleni antitestek előállítására szolgáló hibridómasejtek, az antitesteket vagy antitestfragmentumokat tartalmazó diagnosztikai reagenskészletek, valamint alkalmazásuk diagnosztikai és/vagy gyógyászati célra.

A találmány szerinti megoldás lehetővé teszi az endothelium működésének gyors és egyszerű vizsgálatát, *ex vivo* biológiai mintából (például sejt- vagy vérminta), szokásos laboratóriumi eljárásokkal.

Az érrendszer elváltozásai számos krónikus és életveszélyes betegség, mint például szívinfarktus, szívroham („stroke"), érelmeszesedés és a vesebetegségek számtalan formája, kialakulásáért felelősek.

Az endothelsejtek – melyek többek között szabályozzák a véralvadási rendszert, a trombociták működési állapotát, a gyulladásban lévő és a rákos sejtek vándorlását az érfalba, a simaizom-sejtek kontrakciós állapotát és növekedését, és ennek megfelelően a vérnyomást és az érfal szerkezetét, illetve az erek képződését – az érrendszer működésének szabályozásában különösen fontos szerepet töltenek be. A súlyos érrendszeri megbetegedések során az érfalnak ezek a funkciói olyan mérvű károsodást szenvednek, mely végül szívinfarktushoz, szívrohamhoz *(„strode")*, illetve a számtalan vesebetegség valamelyikének kialakulásához vezethet.

Az endothelium termeli az igen fontos szerepet betöltő *prostaciklint* (PG12) és a *nitrogén-monoxidot* (NO), mely utóbbit az *endotheliumeredetű relaxációs faktorok* (EDRF) közé sorolják. A PGL2 és az NO gátolja mind a trombocitákat, mind pedig az érfal izmait. Az endothelium működését az említett endothelialis eredetű faktorok – mint a prostaciklin (PG12) vagy EDRF, például NO – szabályozzák.

Tehát, az endothelium hibás működésével kapcsolatos betegségek meghatározott módon történő kezeléséhez szükség van olyan biológiai jellemzők meghatározására, amelyek lehetővé teszik az endothelium hibás működésének diagnosztizálását és a szükséges korrekciót.

Kívánatos az endothelium hibás működésének felismerése a lehető legkorábban, azaz abban a stádiumban, amikor az endothelium hibás működése által okozott visszafordíthatatlan károsodás – mint amilyen az atherosclerosis – még nem fejlődött ki.

Az endothelium hibás működésének korai stádiumban történő felismerése lehetővé teszi olyan új gyógyászati eljárások kifejlesztését, amelyek által az endothelium hibás működése okozta károsodás visszafordíthatóvá válik.

Az endothelium működésének meghatározására szolgáló ismert eljárások lehetnek behatoló *„invasive"* eljárások, mint például a kvantitatív angiográfia, vagy nem behatoló *„non-invasive"* eljárások, mint például a leképező *„image-providing"* eljárások. Ezeknek az eljárásoknak hátrányai azok, hogy a vizsgálatok közvetlenül a vizsgálandó személyen történnek, mennyiségi meghatározásuk pedig nehézkes és nagyon költségesek.

Ennek megfelelően olyan biokémiai/immunológiai eljárások kifejlesztése szükséges, amelyek az endothelium működésének gyors és egyszerű vizsgálatát, *ex vivo* biológiai mintából (például sejt- vagy vérminta), szokásos laboratóriumi eljárásokkal lehetővé teszik.

Az endothelium működése azokból a folyamatokból áll, amelyeket az endotheliumeredetű faktorok, így a prostaciklin (PGI2) vagy EDRF, például NO, szabályozhatnak.

A találmány célja reagensek biztosítása az endothelium működésének értékelésére és szabályozására. E szerint és a találmány egyéb céljainak megfelelően a találmány tárgyát olyan, a VASP *(„vasodilator-stimulated phosphoprotein")* elleni antitest képezi, melyek a VASP-ot csak abban az esetben kötik, ha az foszforilált formában van jelen.

A találmány szerinti megoldás egyik szempontja szerint egy olyan antitestet tárunk fel, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP a 157-es *szerin* aminosavon foszforilálva van (157-es foszfoszerint tartalmazó VASP, röviden: *„foszfoszerin 157 VASP")*.

A találmány különböző megvalósítási módjai magukban foglalják a poliklonális antitesteket, a monoklonális antitesteket és az antitestfragmentumokat. Más megvalósítási módok magukban foglalják a 16C2 – és különösen a Mab 16C2 – hibridóma-sejtvonal által termelt monoklonális antitestet.

A találmány további célja a találmány szerinti antitest előállítására alkalmas hibridómasejtek előállítása. Ezen célnak megfelelően a találmány további tárgya egy hibridóma-sejtvonal, mely termeli azt az antitestet, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a találmány tárgyát képezi a 16C2 hibridóma-sejtvonal (ACC2330).

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során az volt a további célunk, hogy az endothelium működésének kiértékelésére alkalmas eljárást fejlesszünk ki. Ezzel összhangban a találmány tárgyát képezik a VASP foszforiláltsági állapotának meghatározására szolgáló eljárások. A találmány szerinti megoldás egyik szempontja szerint biológiai anyagot olyan, a VASP *(„vasodilator-stimulated phosphoprotein")* elleni antitesttel hozunk kapcsolatba, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A találmány szerinti megoldás egy másik szempontja szerint a találmány tárgyát képezi egy mennyiségi eljárás, amely magában foglalja a biológiai anyaghoz kötött VASP-antitest mennyiségi meghatározását is. A találmány egy speciális megvalósítási módja például egy Western-blot-eljárás, mely a VASP elektroforetikus elválasztásából, és a VASP és annak a VASP elleni antitestnek a reakciójából áll, mely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van. A találmány egy másik megvalósítási módja egy áramlási citometriás *(„flow cytometry")* eljárás, amelyben a mintát olyan, a VASP elleni antitesttel hozzuk

kapcsolatba, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A találmány szerinti megoldás másik szempontja szerint a találmány tárgyát képezi egy diagnosztikai eljárás. Egy tipikus eljárás szerint a mintát olyan, a VASP elleni antitesttel hozzuk kapcsolatba, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van, és kiértékeljük a VASP foszforiláltsági állapotát. A találmány egy megvalósítási módja szerint ez az eljárás magában foglalja a mintában található VASP foszforiláltságának mennyiségei meghatározását. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint olyan eljárásokat dolgozunk ki, amelyekben az antitest a *foszfoszerin* 157 VASP-hoz kötődik. A találmány egy másik megvalósítási módja szerint a minta humán trombocita vagy humán teljes vérminta.

A találmány szerinti megoldás további célja az endothelium működését jellemző markerek azonosítására irányuló eljárások biztosítása. A találmány tárgya egy szempont szerint eljárás a cGMP- és/vagy a cAMP-szinteket befolyásoló anyagok azonosítására. Az eljárás szerint a cGMP- és/vagy cAMP-szinteket befolyásoló anyagokkal kezelt betegekből származó mintákat használunk. A mintákat olyan, a VASP elleni antitesttel hozzuk kapcsolatba, amely a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van, és a kontrollmintával összehasonlítva kiértékeljük a VASP foszforiláltsági állapotát.

Részletesen leírunk továbbá egy, az endothelium hibás működésének megállapítására szolgáló eljárást, amely során egy betegből származó mintát és egy olyan, a VASP elleni antitestet érintkeztetünk, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van, majd az egészséges (normális) mintával összehasonlítva kiértékeljük a VASP foszforiláltsági állapotát.

A találmány szerinti megoldás további célja egy olyan reagenskészlet előállítása, amely alkalmas az itt leírt diagnosztikai eljárás megvalósítására. Továbbá, a találmány tárgyát képezi egy reagenskészlet, amely egy olyan antitestet tartalmaz, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A találmány szerinti megoldás további célja az endothelium hibás működésétől szenvedő betegek kezelését szolgáló eljárások megalkotása. E szerint és a találmány szerinti megoldás más céljai szerint feltárunk egy kezelési eljárást, amelynek során a beteget gyógyászatilag hatásos mennyiségű olyan antitesttel kezelünk, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A hormonok és hatóanyagok hatására a trombociták és az érfal sejtjeiben foszforilálódó humán VASP-ot (*„vasodilator-stimulated phosphoprotein"*) nemrég azonosították, izolálták és jellemezték molekuláris genetikai szempontból [Haffner és munkatársai, EMBO J. *14,* 19–27 (1995)].

A VASP az ANF/NO/cGMP/cGMP proteinkináz szignálútvonal fontos komponense, mely útvonal élettani, kórélettani és gyógyászati szempontból, illetve a cAMP/cAMP proteinkináz szignálútvonalban rendkívül fontos szerepet tölt be [U. Walter, Blick 1/97 Würzburg University, 79–81 (1997)]. A VASP-ot csaknem minden humán és állati sejt expresszálja, azonban a trombocitákban, az erek sima izomzatában és a fibroblasztban különösen magas koncentrációban találták meg. Sejtkultúrákban a VASP a felületek találkozási gócaihoz (sejt/mátrix érintkezési felületei), sejt/sejt érintkezési pontjaihoz, mikrofilamentumokhoz és dinamikus membránterületekhez (például vezetőél, „leading edge") kapcsolódik [Walter és munkatársai, Agents and Actions *45S,* 255–268 (1995)].

Az érrendszerben a VASP foszforilációja a trombociták adhéziójával/aggregációjának gátlásával, a simaizom-összehúzódás/vándorlás gátlásával és a paracelluláris endothelium áteresztőképesség-gátlásával függ össze.

A VASP három különböző helyen foszforilálódik, illetve defoszforilálódik {157-es *szerin,* 239-es *szerin* és 278-as *treonin,* [ld. Horstrup és munkatársai, Eur. J. Biochem. *225,* 21–27 (1994)]}. A *239-es szerin* aminosavat esetenként *238-as szerin*nek nevezik, különösen akkor, ha a VASP aminosavsorrendjének számozásakor az első *metionin*t nem veszik figyelembe.

A VASP 239-es *szerin*je az egészséges humán keringési rendszer sejtjeiben (trombociták, endotheliumsejtek és simaizom-sejtek) élettani és gyógyászati NO-donorok, trombocitainhibitorok és értágítók hatására foszforilálódik.

A VASP 239-es *szerin*jét cGMP-függő proteinkinázok foszforilálják. A cGMP-függő proteinkinázokat – a cGMP-n keresztül – fontos hormonok, mint például nátrium vizeletürítését serkentő (natriureticus) peptidek, vagy NO-ot felszabadító anyagok és hatóanyagok aktiválják. A VASP 239-es *szerin*jét – emellett – a cAMP-szintet növelő hormonok és hatóanyagok által aktivált cAMP-függő proteinkinázok is foszforilálják.

Bár a cAMP-függő proteinkinázok főként a 157-es helyen található *szerin* aminosavat foszforilálják, a VASP aminosavsorrendjében a 239-es helyen található szerint is foszforilálják. Egyes megfigyelések szerint az emberi trombocitákban a VASP 157-es *szerin*jének foszforilációja szoros kapcsolatban van a fibrinogén és IIb–IIIa glikoprotein kapcsolatának gátlásával [Horstrup és munkatársai, Eur. J. Biochem. *225,* 21–27 (1994)].

Biológiai mintákból, például szövetek és sejtek kivonatából, a VASP, különösen a VASP 239-es és/vagy 157-es *szerin*je, foszforilációs mértékének meghatározása egy igen jelentős biokémiai paraméter lehet. E biokémiai paraméter lehetővé teszi olyan diagnosztikai rendszer kifejlesztését, mellyel meg lehet határozni azokat a hormonokat vagy hatóanyagokat, melyek a cGMP- és/vagy a cAMP-szinteket növelik [például pitvari („atrial") nátriumürítő faktor (ANF), guanilin, NO-ot felszabadító anyagok és hatóanyagok], továbbá melynek segítségével következtetéseket vonhatunk le az endothelium *in vivo* működéseivel kapcsolatban.

A foszforilált fehérjéket reverzíbilisen kötő antitesteket már leírtak az 5,599681 számú amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratban, WO 93/21230 számú

nemzetközi közzétételi iratban, illetve leírt U. Walter [Blick 1/97 Würzburg University, 79–81 (1997)].

A találmány szerinti megoldás kidolgozása során célunk az volt, hogy olyan biokémiai/immunológiai eljárást fejlesszünk ki, amely biológiai mintában lehetővé teszi a VASP foszforilációs állapotának gyorsan és egyszerűen történő minőségi és/vagy mennyiségi meghatározását.

Ezt a célt egy olyan antitest előállításával értük el, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

Ezáltal a találmány tárgyát képezi – teljesen általánosan elfogadott módon – egy antitest, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A találmány szerinti antitesten értünk olyan poliklonális, monoklonális antitesteket *(Mabs)* és ezek fragmentumait, illetve az SCFV fragmentumokat vagy más szintetikus vagy rekombináns fehérjedoménokat, melyek a VASP foszforilálódott szakaszait specifikusan felismerik.

Az antitestfragmentumok magukban foglalják az antitest bármely részét, amely képes a célantigént – ez esetben a VASP-hoz vagy annak egy specifikus részéhez – megkötni. Az antitestfragmentumok különösen az $F(ab')_2$, Fab, Fab' és Fv fragmentumokat jelentik. Ezeket a fragmentumokat bármelyik antitestosztályból elő lehet állítani, de ezek jellemzően IgG-ből vagy IgM-ből készülnek. Ezeket a fragmentumokat elő lehet állítani a hagyományos rekombináns DNS-technikák alkalmazásával, vagy a klasszikus úton papainnal vagy pepszinnel végzett proteolitikus emésztéssel. [Lásd „Current protocols in immunology", II. fejezet, szerk.: Coligan és munkatársai, John Wiley and Sons (1991–1992)].

Az $F(ab')_2$ fragmentumok jellemzően körülbelül 110 kDa (IgG), illetve 150 kDa (IgM) méretűek és két antigénkötő részt tartalmaznak. Az antigénkötő régiók diszulfidhíddal (hidakkal) kapcsolódnak egymáshoz. Ezekből a fragmentumokból gyakorlatilag majdnem az összes, ha nem az összes Fc hiányzik. A Fab' fragmentumok jellemzően körülbelül 55 kDa (IgG), illetve 75 kDa (IgM). A Fab' fragmentumokat egy $F(ab')_2$ fragmentumból, a diszulfidkötés(ek) redukálásával lehet előállítani. A redukciót követően keletkezett szabad szulfhidrilcsoport(ok) felhasználásával a Fab' fragmentumokat könnyen lehet más molekulákkal, például az azonosításra alkalmas reagensekkel (például enzimekkel) konjugálni. A monovalens Fab fragmentumok általában, eredettől függetlenül körülbelül 50 kDa méretűek. A Fab fragmentumok magukban foglalják a könnyű *(„light")* és a nehéz *(„heavy")* láncokat, illetve az antitest antigénkötő részének változékony *(„variable")* (V_L és V_H) és állandó (C_L és C_H,) régióit. A H és L részek intramolekuláris diszulfidhíddal kapcsolódnak.

Az Fv fragmentumok – eredetüktől függetlenül – jellemzően körülbelül 25 kDa méretűek, és tartalmazzák mind a könnyű (V_L) és a nehéz (V_H) láncokat. Általában a V_L és a V_H láncokat nem kovalens kötések tartják össze, így könnyen disszociálódnak. A nagyobb Fab fragmentumokkal azonos kötési tulajdonságokkal rendelkeznek, azonban a méretük előnyösen kicsi. Eszerint, a V_L és a V_H láncok keresztkötésére különböző, például glutáraldehid (illetve más kémiai keresztkötés létrehozására alkalmas vegyületek) alkalmazásán, intramolekuláris diszulfidhíd kiépítésén (ciszteinek beépítése) vagy peptidlinkerek használatán alapuló eljárásokat fejlesztettek ki. Az így kapott Fv egy láncból áll (azaz SCFv; „single chain Fv").

Egy előnyös eljárás magában foglalja az SCFv-k előállítását rekombináns eljárások alkalmazásával. Az eljárás lehetővé teszi, hogy különböző antitestekből származó változékony láncokat keverve és illesztve, új tulajdonságokkal rendelkező Fv fragmentumokat állítsunk elő. Egy jellemző eljárás során olyan rekombináns vektort készíthetünk, mely egy megfelelő szabályozóelemekkel hajtott expressziós kazettát tartalmaz. A kazettarégió tartalmazhat egy, a fúziós fehérjék létrehozására alkalmas peptid-linkerszekvenciát kódoló, az 5' és 3' végein kényelmesen használható klónozóhelyeket tartalmazó DNS-szakaszt. Linkerrel ellátott fúziós fehérje készítése céljából a kívánt változékony régiót(kat) kódoló DNS-szakaszt a vektorba klónozva egy SCFv-t állíthatunk elő.

Egy példaképpen ismertetett alternatív megközelítés szerint, két Fv-t kódoló DNS-t a linkert tartalmazó DNS-hez ligáljuk, és a kapott tripla fúziós konstrukciót közvetlenül egy hagyományos expressziós vektorba ligáljuk. Ezen eljárások bármelyike szerint előállított DNS-t – a választott vektortól függően – eukarióta-, illetve prokariótasejtekben fejezhetjük ki.

A találmány előnyös megvalósítási módja szerint olyan monoklonális antitesteket alkalmazunk, amely antitest a VASP-ot csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van.

A találmányi leírásban használt értelemben a VASP kifejezésen a VASP-származékokat is értjük. Ilyenek például a funkcionálisan azonos részt tartalmazó származékok, a mutánsok, a VASP-fragmentumok és -változatok, például *foszfoszerin* 239 VASP, amely emellett a 157-es *szerin*en és/vagy 278-as *treonin*on foszforilálva van, ezenkívül például a glikozilációs mutánsok és egyéb kovalens változtatások, illetve az olyan strukturális elemek, melyek a fehérje/fehérje kölcsönhatás szempontjából jelentősek. A leírásban a VASP kifejezésen mind humán, mind pedig más fajokból, konkrétan emlősökből (például patkány, egér, nyúl, kutya, sertés és majom) származó VASP-ot értjük.

Az antitestek bármilyen hagyományos eljárással előállíthatók. Ilyen például a Köhler és Milstein által leírt eljárás [Köhler és Milstein, Nature *256,* 495 (1975)]. Amennyiben az antitest szelektivitásának a foszforilációs állapottól kell függenie, az antitestet foszforilált VASP ellen termeljük. Az izolált antitesteket hagyományos módon, egy meghatározott szelektivitásra nézve válogatjuk. Az antitesteket előnyösen a VASP 157-es *szerin*t, 239-es *szerin*t és/vagy 278-as *treonin*t tartalmazó fragmentuma ellen termeljük.

A VASP-antigén hosszúsága mindaddig jelentéktelen, amíg képes humorális választ kiváltani. A jellemző peptidek 50 aminosavnál rövidebbek. Néhány előnyös

peptid körülbelül 20 aminosavnál rövidebb. A legelőnyösebb peptidek hosszúsága körülbelül 6 és körülbelül 12 aminosav közötti. Az előnyös peptidek magukban foglalják a *KLRKVS*^{239}*KQ* és a *RKVS*^{239}*KQE* szakaszt. A peptid előnyösen foszforilált a 15-ös *szerin*en, a 239-es *szerin*en és/vagy a 278-as *treonin*on. A peptidek lehetnek rekombináns eredetűek. A peptideket jellemzően a VASP proteolitikus lebontásával vagy *in vitro* szintézissel és foszforilációval állítják elő.

Előnyösek továbbá azok a monoklonális antitestek, melyek a fent említett tulajdonságokat mutatják, és melyeket az áramlási citometriában alkalmazni lehet. Ehhez az új antitestnek meg kell őriznie specificitását abban az esetben is, amikor az antitestet olyan körülményeknek tesszük ki, amely az antitest konformációjának megváltozását okozhatja. Ilyen körülmény lehet például az áramlási citometriában alkalmazott rögzítési lépésben. Ezért az új antitestet tesztelhetjük például az áramlási citometriára való alkalmasság oldaláról is.

A 16C2 jelzésű monoklonális antitest különösen előnyös.

Az új antitesteket a szakember által önmagában ismert eljárásokkal készíthetjük el. A monoklonális antitestek termeléséhez a hibridómasejtek előállítására előnyösen alkalmazható a Köhler és Milstein által leírt technika [Köhler és Milstein, Nature *256,* 495 (1975)]. A tisztított antitestek specificitását az alábbi teszteljárásokkal vizsgálhatjuk:

a) Western-blot-eljárás cAMP- vagy cGMP-függő proteinkinázokkal különböző mértékben foszforilált rekombináns VASP felhasználásával, azzal az asszociációval, hogy csak foszforilált VASP esetében szabad pozitív jelet kapnunk.

b) Western-blot-eljárás olyan sejtextraktumok, például Pkt2 sejtek kivonatai felhasználásával, melyeket humán cGMP proteinkinázzal, humán VASP-pal vagy különböző úton létrehozott VASP-mutánsokkal transzfektáltunk. A mutánsok mindegyikében a mutáció a három foszforilációs hely valamelyikében történt, és a mutáció – (S157A) VASP, (S239A) VASP és (T278A) VASP – a foszforilációs hely törlését eredményezte. Alkalmasak azok az antitestek, melyek felhasználásával kapott pozitív jelet az S239A mutáció törölte, de a másik két mutáció nem.

c) Western-blot-eljárás különböző értágító szerekkel (például prostaciklin vagy NO-donorok), vagy cAMP-, illetve cGMP proteinkináz-aktivátorokkal kezelt humán trombociták felhasználásával. Alkalmas az az antitest, amivel az extraktumban csak foszforilált VASP esetében azonosítható egy specifikus sáv. Hasonló módon, humán fibroblaszt, illetve patkány- és egértrombocita felhasználásával is lehet az antitesteket szűrni.

d) Immunfluoreszcens vizsgálat rögzített humán trombociták és endotheliumsejtek felhasználásával. Pozitív jelet akkor kapunk, ha a VASP foszfoprotein formában van jelen.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy hibridómasejtvonal, mely az új, monoklonális antitestet termeli. Különösen előnyös a 16C2 jelű monoklonális antitestet termelő 16C2 jelű hibridóma-sejtvonal.

A 16C2 jelű monoklonális antitestet termelő 16C2 jelű hibridóma-sejtvonalat, az 1997. november 6-án, a Budapesti Egyezmény szabályai szerint, *DSM ACC2330* azonosítási számon letétbe helyeztük a *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen* intézményben (A mikroorganizmusok és sejtkultúrák németországi gyűjteménye), Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, Németország.

Az új antitest alkalmas a VASP *in vivo* és *in vitro* foszforilációjának minőségi és/vagy mennyiségi – előnyösen mennyiségi – meghatározására, előnyösen a VASP 239-es *szerin*jén és/vagy a 157-es *szerin*jén bekövetkező foszforiláció meghatározására, különösen előnyösen a VASP 239-es *szerin*je foszforilációjának meghatározására.

Az antitestek felhasználásán alapuló kvantitatív eljárások a technika állása szerint jól ismertek. Ilyen eljárások találhatók például a *„Current protocols in immunology"* [II. fejezet, szerk.: Coligan és munkatársai, John Wiley and Sons (1991–1992)] c. kiadványban. Ezek az eljárások az enzimhez kapcsolt immunoszorbens esszéket *(Enzyme-linked Immunosorbant Assay, ELISA),* radioimmunoesszéket *(Radioimmunoassay, RIA)* és hasonlókat foglalják magukban.

Az új antitestek emellett alkalmasak biológiai anyagban a VASP foszforilációjának minőségi és/vagy mennyiségi, előnyösen mennyiségi meghatározására, előnyösen a VASP 239-es *szerin*jén és/vagy a 157-es *szerin*jén bekövetkező foszforiláció meghatározására, különösen előnyösen a VASP 239-es *szerin*je foszforilációjának meghatározására.

A biológiai anyag kifejezésen például a következőket értjük: sejtkivonatok, szövetkivonatok, sejtmetszetek, sejtszövet és sejt, például trombocita, leukocita, endotheliumsejt, simaizom-sejt és fibroblaszt. A biológiai anyag lehet humán vagy más emlős-, például patkány-, egér-, nyúl-, kutya-, sertés- és majomeredetű. Előnyös a humán eredetű biológiai anyag.

Az új antitestek alkalmasak biológiai anyagban a foszforilált VASP, különösen a *foszfoszerin* 157 VASP és/vagy a *foszfoszerin* 239 VASP mennyiségi meghatározására a Western-blot során kapott autoradiogramok, a szakember számára ismert eljárásokkal történő – például a *NIH gel blotting image 1.6.* szofver, vagy más, immunfluoreszcencián alapuló – kvantitatív kiértékelésével.

A VASP 239-es és 157-es *szerin*jén történő foszforiláció és a cGMP- és/vagy cAMP-függő proteinkinázok aktivitása közötti összefüggés miatt az új antitestek reagensként alkalmazhatók a cGMP szignálútvonalak és a cAMP szignálútvonalak, különösen a cGMP szignálútvonalak diagnosztizálására.

Az új antitestek felhasználása a *foszfoszerin* 239 VASP biológiai anyagokból, Western-blot-technikával és immunofluoreszcenciával történő meghatározására lehetővé teszi a cGMP-szintet növelő anyagok, hormonok és gyógyszerek azonosítására szolgáló diagnosztikai eljárások kifejlesztését. Ilyen anyagok például a következők lehetnek: ANF, guanilin, NO-felszabadító anyagok vagy gyógyszerek. Például a NO-dono-

rok terápiájának és annak lefolyásának szabályzását nyomon lehet követni, amely – többek között – az esetleg kifejlődő nitráttoleranciára jellemző tünetekkel kapcsolatban adatokat szolgáltat.

A VASP 157-es *szerin*jén történő foszforiláció és a cAMP-függő proteinkinázok aktivitása közötti összefüggésből következik, hogy az új antitestek reagensként alkalmasak lehetnek a cAMP-szintet növelő anyagok, hormonok és gyógyszerek diagnosztizálására.

Következésképpen a találmány tárgyát képezi a diagnózis vagy terápia, mely az új antitesteket vagy annak fragmentumait hasznosítja.

Az új eljárások olyan eljárások, melyeket laboratóriumban, az emberi testen kívül *(ex vivo)* lehet végrehajtani.

Az új antitesteket a VASP foszforilációs fokozatának megállapítására lehet felhasználni különböző fajokból származó biológiai anyagokban. Ilyen fajok például a következők lehetnek: ember, patkány, egér, nyúl, kutya, sertés vagy majom. Előnyös az új antitest felhasználása a foszforilált VASP meghatározására emberi, patkány-, egér- vagy kutyaeredetű biológiai anyagokban. Különösen előnyös új antitest felhasználása a foszforilált VASP meghatározására emberi eredetű biológiai anyagokban.

Az új antitestek vagy annak fragmentumai bioszenzorként is felhasználhatók. A bioszenzorok ismertek a szakember számára. Különösen előnyös az az eljárás, mely egy specifikus másodlagos kötőtársat – egy antitestet, egy lektint vagy egy receptort – alkalmaz. Ebben az esetben az azonosításhoz és a mennyiségi meghatározáshoz szükséges azonosítható jelzést a specifikus kötőtárs hordozza. A jelzések a szakember számára önmagukban ismertek. Jelzés lehet például egy kromofór-, egy luminofór-, egy fluoroforcsoport, egy enzim, egy radioaktív izotóp, vagy egy színtelen vagy színes részecske. Előnyös az olyan eljárás, melyben a jelöletlen specifikus kötőtársat közvetlenül vagy közvetve – például egy másik antitest vagy avidin/biotin híd segítségével – a szakember számára önmagában ismert eljárásokkal szilárd fázishoz rögzítik.

Az új antitestet vagy annak fragmentumait a szakember számára ismert eljárások használatával radioaktív jelzéssel el lehet látni. A jelzett új antitestet vagy annak fragmentumait immunoszcintigráfiában, illetve immunterápiás célokra fel lehet használni. Emellett az endothelium hibás működésének következtében kialakult betegségek gyógyításában ezeket a monoklonális antitesteket hatóanyag-szállítóként is lehet alkalmazni.

A Mab 16C2 „V" gén teljes nukleotidsorrendjének meghatározását követően, technikailag szintén lehetséges olyan antitestkonstrukciók előállítása, melyekben a humán Mab-vázba hipervariábilis régiókat inzertálunk [Jones és munkatársai, Nature *321,* 522–525 (1986); Verhoyen és munkatársai, Science *239,* 1534–1536 (1988)].

Előnyös az antigén által megkötött antitest mennyiségi meghatározása trombocitákban áramlásicitometria-eljárással, például a teljes vérminta megfelelő részének, a szakember számára ismert eljárásokkal rögzítését követően. A szakember számára ismert áramlásicitometria-eljárásokat például G. Otten és W. M. Yokohama leírása szerint [G. Otten és W. M. Yokohama, „Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. Current protocols in immunology, 5.4.1–5.4.19 (1992)] használják.

Az új antitestek alkalmazásával a VASP foszforilációjának, különösen a VASP 239-es szerinje foszforilációjának, áramlási citometriás vizsgálata nem korlátozódik a humán trombocitákra. A vizsgálatot más sejttípusokon, például limfocitákon, monocitákon, leukocitákon, endotheliumsejteken és simaizom-sejteken is végre lehet hajtani.

Az új antitestek segítségével, a frissen gyűjtött humán trombocitákban a VASP foszforilációjának, különösen a foszfoszerin 239 VASP foszforilációjának, áramlási citometriás vizsgálata lehetővé teszi, hogy endotheliumeredetű faktorok – például NO és prostaciklin – aktivitását meghatározzuk, következésképpen meg tudjuk állapítani az endothelium működésének, illetve hibás működésének szerepét például az arteriosclerosis, a magas vérnyomás, a cukorbetegség, szívműködési elégtelenség és veseelégtelenség során tapasztalt szív- és érkeringési rendellenességekben.

Az új antitestek segítségével, a VASP foszforilációjának, különösen a VASP 239-es *szerin*je foszforilációjának meghatározása lehetővé teszi a fent említett betegségek gyógyításának szabályozását. A terápia során kialakuló rezisztencia – mint például a nitráttolerancia – szintén meghatározható.

Az új antitesteket alkalmazni lehet gyógyszerhatóanyagokként is. Biológiai anyagokban hatóanyagként befolyásolják a VASP foszforiláltsági állapotát és/vagy a kapcsolatát fehérjékkel.

Következésképp a találmány tárgyát képezik azok a gyógyszerkészítmények, melyek legalább egy új antitestet tartalmaznak.

Az új készítmények felhasználhatók belsőleg (orálisan), a szülőket kezelve (intravénásan), a végbélnyíláson keresztül vagy helyileg (topikálisan). Adagolni lehet ezeket a készítményeket oldat, por (tabletták vagy kapszulák, a mikrokapszulákat is beleértve), liposzómakészítmények, lipidkomplexek, kolloid diszperziók, injekciós oldatok vagy kúpok formájában. A szokásos gyógyszerészeti oldatok vagy szilárd adalék anyagok és kiegészítők, oldatok, emulgeálók, „glidant"-ok, ízkiegészítők, színezékek és/vagy pufferként használt anyagok az ilyen természetű kiszerelésekhez alkalmas anyagok. Testtömegkilogrammonként 0,1–100 mg adagolása célszerű. Ezeket olyan dózisegységekben célszerű adagolni, melyek az új antitesteket legalább a napi effektív mennyiségben – például 30–3000 mg – tartalmazzák.

A napi adagolható dózis a testtömegtől, a kortól, a nemtől és az emlősalany állapotától függ. Azonban magasabb vagy alacsonyabb napi dózisok is alkalmazhatók. A napi dózist lehet egy alkalommal egy dózisegységben vagy több kisebb dózisegységben, illetve több alkalommal – előre meghatározott időközökben – felosztott dózisokban adagolni.

Gyógyszerkészítmények előállítása esetén az új antitesteket gyógyszerészetileg inaktív szerves vagy szervetlen adalék anyagokkal dolgozzák el. A tabletták, bevont tabletták és keményzselatin-kapszulák elkészítéséhez alkalmas adalékanyagok például a laktóz, a kukoricakeményítő vagy ennek származékai, faggyú és sztearinsav (és palmitinsav), illetve ennek sói. Az oldatok készítéséhez alkalmas adalékanyagok a víz, többértékű alkoholok, szacharóz, inverz cukor és glükóz. Az injekciók készítéséhez alkalmas adalékanyagok a víz, többértékű alkoholok, glicerin és zöldségolajok. A kúpok készítéséhez alkalmas adalékanyagok a zöldségolajok és a keményített olajok, viaszok, zsírok és félig szilárd többértékű alkoholok. A gyógyszerkészítmények tartalmazhatnak tartósítószereket, oldatokat, stabilizálókat, nedvesítőanyagokat, emulgeálókat, édesítőket, színezékeket, ízesítőanyagokat, az ozmotikus nyomás megváltoztatására alkalmas sókat, puffereket, bevonóanyagokat, antioxidánsokat, és ahol szükséges, más gyógyászatilag aktív vegyületeket.

A találmány tárgyát képezi az új gyógyszer előállítási folyamata, mely során gyógyászatilag alkalmas – és fiziológiailag tolerálható adalék anyagokkal, illetve ahol szükséges, más alkalmas aktív vegyületekkel, adalékokkal vagy kiegészítő anyagokkal, legalább egy új antitestet adagolásra alkalmas formulációba visznek.

A találmány tárgyát képezi, eléggé általánosan, egy diagnosztikai eljárás, mely alkalmas a VASP foszforilációjának, előnyösen a VASP 239-es *szerin*je foszforilációjának meghatározására, más specifikus szondák, például monoklonális antitestek, poliklonális antitestek, SCFV fragmentumok vagy más szintetikus vagy rekombináns fehérjedoménok, melyek specifikusan azonosítják a VASP, különösen a *foszfoszerin* 239 VASP foszforilált szekvenciáit.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy diagnosztikai eljárás, mely alkalmas a VASP 157-es *szerin*je és/vagy a 278-as *treonin*ja foszforilációjának meghatározására, más specifikus szondák, például monoklonális antitestek, poliklonális antitestek, SCFv fragmentumok vagy más szintetikus vagy rekombináns fehérjedoménok, melyek specifikusan azonosítják a VASP azon szekvenciáit, melyek a foszforilált 157-es *szerin*t és/vagy a *-treonin*t tartalmazzák.

A prolingazdag fehérjékhez, például zyxin és vinculin, és egyidejűleg a saját prolingazdag doménjének profilinhez való kötődésének révén a VASP lehetővé teszi aktinszálak kialakulását, melyekben a VASP adapter molekulaként vesz részt. E fehérje/fehérje kapcsolat zavara gyakran hibás trombocitaaggregációhoz vagy -izom-összehúzódáshoz vezet. Így például a sima izmok összehúzódásának előfeltétele az aktin/miozin hidak létrejötte. A VASP 157-es *szerin*jének foszforilációja és a fibrinogén receptor glikoprotein IIb/IIIa gátlása között összefüggést tapasztaltak [Horstrup és munkatársai, Eur. J. Biochem., *225*, 21–27 (1994)]. A VASP 157-es *szerin*je foszforiláltságának meghatározása tehát lehetővé teszi az olyan anyagok vagy gyógyszerek szisztematikus keresését, melyek a VASP és a VASP intracelluláris kötőtársa közötti kapcsolatra hatást gyakorolnak, és – például – alkalmasak a keringés károsodásával kapcsolatos szív- és érkeringési betegségek gyógyítására.

A találmány előnyös megvalósítási módjait az alábbi, leírást kiegészítő példákban írjuk le.

A következő példák – anélkül, hogy bármennyire is korlátoznák azt – a találmány szerinti megoldás világosabb megértését szolgálják.

Példák

1. példa

A foszfoszerin 239 VASP elleni monoklonális antitest izolálása

Egy foszforilált és egy nem foszforilált, a 239-es *szerin* környezetében található *KLRKVS*^{239}*KQ*-t és a *RKVS*^{239}*KQE* peptidszekvencia-szakaszt tartalmazó peptidet szintetizáltunk egy *Applied Biosystems* peptidszintetizátor segítségével a szakember számára ismeretes Fmoc-reakció szerint.

A foszforilált peptidbe a *foszfoszerin*t a peptidszintézis közben Fmoc-szerin [PO(Obzl)OH–OH] (Calbiochem) segítségével építettük be. A tömegspektrométerrel igazolt peptideket fordított fázisú oszlopkromatográfiával (RPC), *Vydac 218TP* oszlopon, >98% tisztaságig tisztítottuk.

A bróm-ecetsavval vagy bróm-ecetsav-N-hidroxiszukcimid észterrel (Sigma) aktivált peptideket tiolált KLH-val *(Keyhole limpet hemocyanin,* nanoTools) kapcsoltuk össze. Nőstény Balb/c egereket (6 hetes) 4 alkalommal, 14 naponként KLH-foszfopeptiddel (10 μg/egyed) szubkután immunizáltunk. Az első injekció esetében a foszfopeptidet komplett, a további három injekciónál inkomplett Freund-féle adjuvánssal kevertük el. Az utolsó injekciót követő második hét eltelté-vel az egerek PBS-ben (foszfátpufferelt sóoldat *„Phosphate Buffered Saline")* feloldott, 10 μg immunogént tartalmazó „megerősítő" injekciót kaptak három napon keresztül naponta. A legutolsó *„booster"* injekciót követő napon az egereket elöltük és a lépet eltávolítottuk. A lépsejteket elkülönítettük és nem termelő mielomasejtekkel fuzionáltattuk [például: PAI–Zellen, J. W. Stocker és munkatársai (1982) Res. Disclosure, 21713] a Köhler/Milstein által megalapozott módszertan szerint.

A *foszfoszerin* 239 VASP elleni antitesteket termelni képes hibridóma sejteket megkülönböztető szkrínelési eljárásokban foszforilált/nem foszforilált peptideket és foszforilált/nem foszforilált rekombináns emberi VASP-ot is használtunk.

Foszforilált/nem foszforilált peptidekkel folytatott tesztekben a peptideket kovalensen DNA-BIND-ELISA lemezekhez (Costar) kötöttük, és a hibridóma-felülúszókat ELISA-eljárással szűrtük.

Azokat a felülúszókat, melyek a foszfopeptidet azonosítani tudták, megvizsgáltuk, hogy képesek-e a teljesen foszforilált, *E. coli*-rendszerben előállított, rekombináns VASP és a megfelelő defoszforilált VASP között különbséget tenni.

A fent említett eljárásban pozitívnak talált hibridómasejtek felülúszójából azonosított monoklonális an-

titesteket, előnyösen tiofiladszorpciós kromatográfiával (POROS 50-OH, nanoTools) szérummentes hibridóma-felülúszóból lehet tisztítani.

Különböző teszteljárásokkal sikerült azonosítani és karakterizálni az egyik izolált antitestet (16C2 klón), mint olyan, az $IgG1_K$ osztályba tartozó monoklonális antitestet, mely csak akkor ismeri fel a VASP-ot, ha e fehérje a 239-es *szerin*je foszforilálva van. Az alkalmazott körülmények mellett, a 16C2 antitest más fehérjét és más VASP-foszforilációs helyet nem ismer fel.

Az olyan monoklonális antitesteket, melyek specifikusan felismerik a *foszfoszerin* 157 VASP-ot vagy a *foszfotreonin* 278 VASP-ot, kifejleszthetők a fent említett eljárás analógiájára. Ez esetben antigénként a VASP 157-es *szerin*je vagy 278-as *treonin*ja környékén található ismert peptidszakaszt tartalmazó, foszforilált peptideket alkalmazunk.

A 239-es helyen foszforilált VASP-ot felismerő monoklonális antitestek előállítását Smolenski és munkatársai közleményükben [J. Biol. Chem. *237*, 20029–20035 (1998)] is leírták.

2. példa

A VASP 239-es szerinje foszforilációjának áramlási citometriás vizsgálata

A VASP 239-es szerinje foszforilációjának vizsgálata mosott emberi trombocitában

Eigenthaler és munkatársai által leírtak [Eur. J. Biochem., *205*, 471–481 (1992)] szerint emberi trombocitákat preparáltunk, illetve a VASP foszforilációját a keringési rendszerre ható anyagokkal serkentettük. A reakciót formaldehiddel (végkoncentráció körülbelül 3,5%) történt rögzítéssel (10 perc, szobahőmérsékleten) állítottuk le. A választható mosást követően a sejteket Triton X–100-zal permeabilizáltuk, majd mostuk. A festést a megfelelő antitesttel (amely vagy közvetlenül volt fluoreszcens jelzéssel ellátva, vagy pedig egy szekunder antitestet láttunk el fluoreszcens jelzéssel) történt inkubálással végeztük. E célra a primer antitest koncentrációja célszerűen 0,5–5 μg/ml, előnyösen 1–2 μg/ml. Például, a Mab 16C2 primer antitestet 1,7 μg/ml koncentrációban használjuk. A 16C2 antitest kötődését azután, például G. Otten és W. M. Yokohama [Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan. Current protocols in immunology, 5.4.1–5.4.19 (1992)] által leírtak szerinti eljárással, áramlási citométerben meghatározzuk és tanulmányozzuk.

3. példa

A Western-blot használata a VASP 239-es szerinje foszforilációjának meghatározásában, sejtkivonatokban

Sejtkivonatokban a VASP foszforilációjának meghatározására az áramlási citometriás mérésekkel (2. példa) párhuzamosan a szakember számára ismert, például Eigenthaler és munkatársai [Eur. J. Biochem., *205*, 471–481 (1992)] által leírt, Western-blot-eljárást alkalmazzák. Az alkalmazott antitestkoncentráció, a mintában meghatározandó VASP-tartalom függvényében, célszerűen 0,1 és 5 μg/ml, előnyösen 0,5–1,0 μg/ml közötti. Például amíg humán, illetve patkánytrombociták vizsgálatára előnyös a 0,5 μg/ml koncentráció, addig humán köldökzsinórból származó endotheliumsejtek vizsgálatára az 1,0 μg/ml antitestkoncentráció az előnyös. Elvben, a VASP 239-es *szerin*je foszforilációjának meghatározásakor a sejtkivonatokkal végzett Western-blot-vizsgálat és a rögzített sejtekkel történt áramlási citometriás analízis azonos eredménnyel végződött.

4. példa

VASP 239-es szerinje foszforilációjának meghatározása teljes vérmintában vagy trombocitában gazdag plazmában (PRP)

Teljes vérmintát, illetve PRP-t keringési rendszerre ható anyagokkal inkubáltuk. A reakciót formaldehiddel (végkoncentráció körülbelül 3,5%) történt rögzítéssel (10 perc, szobahőmérsékleten) állítottuk le. A PRP-t teljes vérből, Eigenthaler és munkatársai [Eur. J. Biochem., *205*, 471–481 (1992)] által leírtak szerint állítottuk elő. A PRP-ből a trombocitákat centrifugálással ülepítettük le, majd fiziológiás pufferben felszuszpendáltuk [Eigenthaler és munkatársai, (1992) lásd fent]. A trombocitákat permeabilizáltuk, majd a mosott trombocitáknál leírtak szerint festettük.

5. példa

Mosott emberi trombocitákban a VASP 239-es szerinje foszforilációjának időfüggése nitroprusszid-nátriummal (SNP) történt serkentést követően

Emberi trombocitákat kezeltünk 100 μM SNP-mal. A sejtekből mintát vettünk 0., 1., 3. és 5. percben. A VASP 239-es szerinje foszforilációjának meghatározásához a 16C2-es antitestet használtuk. A méréseket egyrészt gyűjtött sejtkivonatokból Western-blot-analízissel, másrészt ezzel párhuzamosan, a fent említettek szerint rögzített és permeabilizált emberi trombocitákon, áramlási citometriás eljárással végeztük. A Western-blot-eljárás során kapott autoradiogramokat *NIH gel-blotting image 1.6* szoftverrel mennyiségi szempontból elemeztük. Az 16C2 antitest és a *foszfoszerin* 239 VASP kötődésének növekedését [%-ban kifejezett növekedés (5 min érték=maximális hatás=100%)] az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat

t (min)	%-os növekedés	
	trombocitán	sejtkivonaton
	citometria	Western-blot
0.	0	0
1.	62,5	83,5
3.	89,3	95,2
5.	100,0	100,0

6. példa

A 16C2 antitest felhasználása a rekombináns VASP c-AMP-függő proteinkinázok és a c-GMP-függő proteinkinázok által végzett foszforilációjának analízisére

25 μg/ml tisztított, rekombináns, hexahisztidinnel jelzett VASP-ot 11 μg/ml cAMP proteinkináz tisztított katalitikus alegységével (cAPK), illetve 24 μg/ml tisztított cGMP proteinkinázzal (cGPK) foszforiláltuk. A reakcióelegyből meghatározott időpontokban mintát vettünk, SDS-t tartalmazó stopoldattal azonnal összekevertük, felforraltuk és SDS-PAGE-sel frakcionáltuk. A VASP foszforilációját Coomassie Blue-val történt festéssel és Western-blottal analizáltuk. A Western-blothoz M4 poliklonális VASP-antitestet [Halbrüge M. és munkatársai, J. Biol. Chem. *265,* 3088–3093 (1990)] (beszerezhető az *Alexis Corporation*tól, Alte Hauensteinstrasse 4, CH–4448 Läufelfingen, Svájc), illetve 16C2 monoklonális VASP-antitestet használtunk. A Coomassie Blue-val festett gélben a VASP alatti sáv a cAPK, míg a VASP fölötti sáv a cGMP-PK. Az SDS-PAGE-vizsgálat kimutatta, hogy a cAPK által előnyben részesített 157-es *szerin* foszforilációját követően, a VASP migrációjában változás (46 kDA-ról 50 kDA-ra) következett be. Foszforilálás során a cGMP-PK előnyben részesíti a 239-es *szerin* aminosavat (amit a 16C2 antitesttel lehet kimutatni).

7. példa

A foszforiláció analízise különböző foszforilációs mutációkat tartalmazó VASP-pal transzfektált Ptk2 sejtekben

Transzfektált humán VASP és VASP-mutánsok foszforilációját vizsgáltuk Ptk2 sejtekben. Vad típusú és mutáns (inaktivált) foszforilációs helyeket (módosított 157-es *szerin,* 238-as *szerin,* illetve 277-es *treonin)* tartalmazó VASP-pal és a CMV promoter szabályozásával kifejezett emberi cGMP proteinkináz 1β-val együtt Ptk2 sejteket transzfektáltunk. A Ptk2 sejtek igen kevés belső eredetű, kötött VASP-ot és cGMP proteinkinázt tartalmaznak. A transzfekciót követő 2 nap múlva a sejteket 30 percig 30 μM 8pCPT-cGMP-vel inkubáltuk és elkülönítettük a sejtkivonatokat. Ezután a sejtkivonatokban a VASP foszforilációját vizsgáltuk Western-blottal. A Western-blothoz M4 poliklonális és 16C2 monoklonális antitesteket használtunk. A 157-es *szerin* inaktiválása (S157A mutáció) esetén a 46kDA-ról 50 kDA-ra történő, foszforilációfüggő változás nem volt jelen. A 16C2 antitest által felismert jel a 239-es *szerin* inaktiválását (S239A) követően nem volt jelen. E vizsgálatok során a 277-es *treonin* mutánsai vad típusú VASP-ként viselkedtek.

8. példa

A VASP foszforilációjának analízise különböző értágítókkal és cAMP/cGMP analógokkal történt serkentést követően emberi trombocitákban

Mosott humán trombocitákat ($0,7 \times 10^9$ sejt/ml) 1 μM Pg-I_2-vel (prostaciklin), 0,5 mM 5,6-DCI-cBIMPS-sel (sejtmembránon átjutni képes cAMP-analóg), 10 μM SNP-mal (nitroprusszid-nátrium) vagy 1 mM 8pCPTcGMP-vel (sejtmembránon átjutni képes cGMP-analóg) inkubáltunk. Adott időpontokban mintákat ($2,8 \times 10^7$ sejt) vettünk. Az SDS stopoldattal összekevert és felforralt mintákban Western-blot-eljárással a VASP foszforilációját vizsgáltuk. A vizsgálatban M4 poliklonális és 16C2 monoklonális antitesteket használtunk. A 157-es *szerin* foszforilációjának mennyiségi értékelése a VASP-ot tartalmazó sáv 46 kDA-ról 50 kDA-ra tolódásával, míg a 239-es *szerin* foszforilációjának mennyiségi értékelése a 16C2 antitest által adott jelzés segítségével történt.

9. példa

A VASP foszforilációja patkánytrombocitákban

Patkánytrombocitákat ($0,7 \times 10^9$ sejt/ml) 100 μM SNP-mal (nitroprusszid-nátrium) vagy 10 μM prostaglandin E1-gyel (PGE1), illetve ezek nélkül 5 percig inkubáltunk. E trombociták kivonatait Western-blottal analizáltuk. A blot kimutatta, hogy a VASP sáv 46kDA-ról 50 kDA-ra történő, foszforilációfüggő (157-es *szerin* foszforilációja) eltolódása és a 16C2 antitest által adott jel a patkánytrombocitákban szintén jelen van. Egértrombociták használatakor hasonló eredményt kaptunk.

10. példa

Humán trombocitákon végzett immunfluoreszcens VASP- és foszfo-VASP-vizsgálatok

Humán trombocitákat (trombocitában gazdag plazma, PRP) üveg mikroszkóplemezre helyeztünk, és 45 percig kötődni és szélesztődni hagytuk. Az üveglemezen levő trombocitákat 15 percig inkubáltuk 100 μM 8pCPTcGMP hiányában (A és C), illetve jelenlétében (B és D). A sejteket ezután 4%-os paraformaldehiddel rögzítettük és 0,2% Triton X–100-zal permeabilizáltuk. A lemezeket előbb M4 poliklonális antitesttel (1:1000) vagy 16C2 monoklonális antitesttel, majd a szokásos második antitesttel inkubáltuk. A fényképeken látható a 16C2 antitest használatakor tapasztalható foszforilációfüggő szignál megjelenése. Az M4 antitesttel kapható jel (az immunfluoreszcenciás vizsgálatok során, mivel nincs elválasztás, a 46 kDA és az 50 kDA összegződik) a foszforilációtól független.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. VASP elleni antitest vagy annak fragmense, amely a VASP-ot antigénként csak abban az esetben köti, ha a VASP foszforilálva van a 157-es *szerin* aminosavon, azaz 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP.

2. Az 1. igénypont szerint meghatározott antitest vagy antitestfragmens *in vitro* történő alkalmazása diagnosztikai anyagként.

3. A 2. igénypont szerinti alkalmazás 157-es foszfoszerint tartalmazó VASP minőségi vagy mennyiségi meghatározására biológiai mintában.

4. A 3. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a biológiai mintát emberi trombociták vagy teljes vér alkotják.

5. A 3. vagy 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a 157-es foszfoszerin meghatározása Western-blot-módszerrel történik.

6. A 3. vagy 4. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a 157-es foszfoszerin meghatározása áramlási citometriával történik.

7. A 2–6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás biológiai mintában cGMP- és/vagy cAMP-szintjét befolyásoló anyagok kimutatására.

8. A 2–6. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás endothelialis faktorok *in vivo* aktivitásának meghatározására.

9. A 2–8. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás endothelium hibás működésének kimutatására.

10. Hibridóma-sejtvonal, amely az 1. igénypont szerinti meghatározott antitestet termel.

11. Az 1. igénypont szerint meghatározott antitestet vagy antitestfragmenst tartalmazó diagnosztikai reagenskészlet.

12. *In vitro* diagnosztikai eljárás, *azzal jellemezve,* hogy 1. igénypont szerint meghatározott antitestet vagy antitestfragmenst alkalmazzuk VASP 157-es foszfoszerinje foszforilációs állapotának és/vagy VASP fehérjekölcsönhatásainak meghatározására vagy befolyásolására biológiai anyagban.

Kiadja a Magyar Szabadalmi Hivatal, Budapest
A kiadásért felel: Törőcsik Zsuzsanna főosztályvezető-helyettes
Windor Bt., Budapest