(19) **RU** (11) **2 218 178** (13) **C2**

(51) МПК[7] **A 61 K 39/395, G 01 N 33/68, C 12 N 5/16**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21), (22) Заявка: 2000114841/14, 06.11.1998

(24) Дата начала действия патента: 06.11.1998

(30) Приоритет: 07.11.1997 DE 19749091.3
26.03.1998 US 60/079,375

(43) Дата публикации заявки: 20.06.2002

(46) Дата публикации: 10.12.2003

(56) Ссылки: EP 055863 A, 14.07.1982. EP 0075421 A, 30.03.1983. Blick, 1/97, Wiirzburg University, pp. 79-81.

(85) Дата перевода заявки PCT на национальную фазу: 07.06.2000

(86) Заявка PCT:
EP 98/07103 (06.11.1998)

(87) Публикация PCT:
WO 99/24473 (20.05.1999)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Н.Г.Лебедевой

(72) Изобретатель: АЙГЕНТАЛЕР Мартин (DE), ХОШЮТЦКИ Хайнц (DE), ВАЛЬТЕР Ульрих (DE)

(73) Патентообладатель:
ВАЗОФАРМ БИОТЕХ ГМБХ (DE)

(74) Патентный поверенный:
Лебедева Наталья Георгиевна

RU 2218178 C2

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО VASP (СТИМУЛИРОВАННОГО ВАЗОДИЛАТАТОРОМ ФОСФОПРОТЕИНА), ГИБРИДОМНЫЕ КЛЕТКИ ДЛЯ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(57)

Изобретение относится к медицине и касается моноклональных антител против VASP (стимулированного вазодилататором фосфопротеина), которые связывают VASP как антиген только тогда, когда VASP присутствует в фосфорилированной форме, к гибридомным клеткам для их получения и к применению антител или фрагментов антител в качестве диагностических средств и/или лечебных средств. Преимущество изобретения заключается в разработке новых подходов идентификации эндотелиальной дисфункции. 5 с. и 7 з.п. ф-лы, 1 табл.

RU 2218178 C2

(19) **RU** (11) **2 218 178** (13) **C2**

(51) Int. Cl.[7] **A 61 K 39/395, G 01 N 33/68, C 12 N 5/16**



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21), (22) Application: 2000114841/14, 06.11.1998

(24) Effective date for property rights: 06.11.1998

(30) Priority: 07.11.1997 DE 19749091.3
26.03.1998 US 60/079,375

(43) Application published: 20.06.2002

(46) Date of publication: 10.12.2003

(85) Commencement of national phase: 07.06.2000

(86) PCT application:
EP 98/07103 (06.11.1998)

(87) PCT publication:
WO 99/24473 (20.05.1999)

(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. N.G.Lebedevoj

(72) Inventor: AJGENTALER Martin (DE),
KhOShJuTTsKI Khajnts (DE),
VAL'TER Ul'rikh (DE)

(73) Proprietor:
VAZOFARM BIOTEKh GMBKh (DE)

(74) Representative:
Lebedeva Natal'ja Georgievna

(54) ANTIBODIES RAISED AGAINST PHOSPHORYLATED VASP (STIMULATED WITH PHOSPHOPROTEIN VASODILATING AGENT), HYBRIDOMA CELLS FOR THEIR PREPARING AND THEIR USING

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology, medicine. SUBSTANCE: invention relates to monoclonal antibodies raised against VASP (stimulated with phosphoprotein vasodilating agent) that bind VASP as antigen only when VASP presents in phosphorylated form. Invention relates also to hybridoma cells for their preparing and to using antibodies or fragments of antibodies as diagnostic agents and/or curative agents. The advantage of invention involves the development of new approaches for identification of endothelial dysfunction. EFFECT: valuable biological and medicinal properties of antibodies. 12 cl, 1 tbl, 10 ex

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Текст описания в факсимильном виде (см. графическую часть).

Формула изобретения:

1. Моноклональное антитело 16C2, которое продуцируется гибридомной клеточной линией, имеющей регистрационный номер DSM ACC 2330, или его фрагменты, способные связывать стимулированный вазодилататором фосфопротеин (VASP) только тогда, когда VASP фосфорилирован по положению серина-239 (фосфосерин-239 VASP).

2. Применение антитела 16C2 или его фрагментов, как определено в п.1, в качестве диагностического агента.

3. Применение по п.2 для качественного или количественного определения фосфосерина-239 VASP в биологическом материале.

4. Применение по п.3, где биологическим материалом являются тромбоциты человека или кровь человека.

5. Применение по п.3 или 4, где определение фосфосерина-239 осуществляют методом Вестерн-блоттинга.

6. Применение по п.3 или 4, где определение фосфосерина-239 осуществляют с помощью проточной цитометрии.

7. Применение по любому из пп.2-6 для обнаружения веществ, которые влияют на уровень cGMP и/или cAMP в биологическом материале.

8. Применение по любому из пп.2-6 для определения активности эндотелиальных факторов in vivo.

9. Применение по любому из пп.2-8 для обнаружения дисфункции эндотелия.

10. Гибридомная линия клеток DSM ACC 2330, которая продуцирует моноклональное антитело 16C2.

11. Диагностический набор, содержащий антитело 16C2 или его фрагмент, как определено в п.1.

12. Диагностический способ, который включает в себя применение антитела 16C2 или его фрагментов, как определено в п.1, для определения или влияния статуса фосфорилирования фосфосерина-239 VASP и/или белковых взаимодействий VASP в биологическом материале.

Приоритет по пунктам:

07.11.1997 по пп.1-12;

26.03.1998 - по внесенным изменениям в пункты формулы.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Описание

Изобретение относится к антителам против VASP (стимулированного вазодилататором фосфопротеина), которые связывают VASP как антиген только тогда, когда VASP присутствует в фосфорилированной форме, к гибридомным клеткам для их получения и к применению антител или фрагментов антител в качестве диагностических средств и/или терапевтических средств.

Заболевания сосудистой системы ответственны за большое число хронических и угрожающих жизни болезней, таких как сердечный инфаркт, удар, заболевание, связанное с артериальной окклюзией, и многие формы почечной недостаточности.

Эндотелиальные клетки, которые, в частности, контролируют систему свертывания крови, функциональное состояние тромбоцитов, перемещение воспалительных и опухолевых клеток в сосудистую стенку, состояние сокращения и рост клеток гладких мышц и, следовательно, также кровяное давление и структуру сосудистой стенки и также реваскуляризацию, имеют особое значение для регулирования сосудистой системы. Многие из этих функций сосудистой стенки нарушены в случае серьезных сосудистых заболеваний, это - ситуация которая может в

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

конце концов привести к инфаркту сердца, удару и многим формам почечной недостаточности.

Эндотелий образует важные вещества простациклин (PGI_2) и окись азота (NO), которая также известна как производный от эндотелия фактор релаксации (EDRF), эти вещества ингибируют и тромбоциты, и клетки мышц сосудов. Эндотелиальные функции регулируются упомянутыми эндотелиальными факторами, такими как простациклин (PGI_2) или EDRF, например, NO.

Следовательно, для лечения заболеваний, связанных особым образом с эндотелиальной дисфункцией, необходимо разработать биохимические параметры, которые дают возможность диагностировать эндотелиальную дисфункцию и регулировать ее течение.

Желательно, чтобы эндотелиальные дисфункции распознавались насколько можно раньше, на той стадии, когда еще не проявили себя необратимые нарушения, как, например, атеросклеротические поражения, вызванные эндотелиальными дисфункциями.

Идентификация эндотелиальной дисфункции на ранней стадии делает возможным развить новые терапевтические подходы, которые могут послужить причиной восстановительного лечения эндотелиальной дисфункции.

Методы, известные для определения функций эндотелия in vivo, являются инвазивными методами детектирования, такими как количественная ангиография, или, кроме этого, неинвазивными, обеспечивающими изображение методами. Недостатками этих методов является то, что эти исследования проводятся

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

непосредственно на больном, с трудом поддаются количественной оценке и очень дороги.

Поэтому также желательно располагать доступными биохимическими/иммунобиологическими методами, которые дают возможность определить эндотелиальные функции быстро и просто в биологическом материале ex vivo, например, в клеточных образцах или образцах крови, с помощью обычных исследований в лаборатории.

Эндотелиальными функциями являются те функции, которые могут регулироваться эндотелиальными факторами, как, например, простациклин (PGI_2) или EDRF, например, NO.

Объектом изобретения является обеспечение реагентов для оценки и модуляции эндотелиальной функции. Согласно этому и другим объектам изобретения, предложено антитело против VASP (стимулированный вазодилататором фосфопротеин), которое связывается с VASP только тогда, когда VASP фосфорилирован.

В одном из аспектов согласно изобретению раскрывается антитело, которое связывает VASP только тогда, когда VASP фосфорилирован по серину в положении 239 (фосфосерин 239 VASP). В другом варианте предложено антитело, которое связывает VASP только тогда, когда VASP фосфорилирован по серину в положении 157 (фосфосерин 157 VASP).

Различные варианты осуществления данного изобретения включают в себя поликлональные антитела, моноклональные антитела и фрагменты антител. Другие варианты осуществления изобретения включают в себя моноклональное антитело, продуцируемое гибридомной линией клеток 16C2, и в частности, Mab

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

16C2.

Другим объектом изобретения являются предлагаемые гибридомные клетки, которые используются при получении антител согласно изобретению. Далее, этим объектом изобретения обеспечивается гибридомная клеточная линия, которая продуцирует моноклональное антитело против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован. В одном варианте осуществления изобретения предусматривается гибридомная линия клеток 16C2 (DSM ACC2330 /Германская коллекция микроорганизмов и клеточных культур/).

Еще один объект изобретения связан с обеспечением методов оценки функции эндотелия. Согласно этому объекту изобретения обеспечиваются методы определения состояния фосфорилирования VASP. В одном варианте изобретения биологический материал контактирует с антителом против VASP (стимулированного вазодилататором фосфопротеина), которое связывает VASP как антиген только тогда, когда VASP фосфорилирован.

В другом аспекте согласно изобретению обеспечивается количественный метод, который дополнительно включает в себя определение количества антитела против VASP, которое связывается с биологическим материалом. Особый вариант осуществления изобретения включает в себя Вестерн-блоттинг - метод, с помощью которого способствует разрешению VASP при электрофорезе и выявляет связывание VASP с антителом против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован. Другой вариант осуществления изобретения представляет

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

собой метод проточной цитометрии, который предусматривает контактирование образца с антителом против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован.

Еще в одном варианте изобретения представлены методы диагностики. Представленный метод связан с контактом образца с антителом против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован, и с оценкой состояния фосфорилирования VASP. В одном варианте осуществления изобретения этот метод включает в себя количественное определение фосфорилирования VASP в образце. В другом варианте осуществления изобретения описываются методы, где антитело связывает фосфосерин 239 VASP или фосфосерин 157 VASP. Еще в одном варианте осуществления изобретения образцом являются тромбоциты человека или цельная кровь человека.

Еще одним аспектом изобретения является обеспечение методами обнаружения маркеров эндотелиальной функции. С одной стороны представлен метод обнаружения веществ, влияющих на уровень циклического гуанозин-5'-монофосфата (cGMP) и/или аденозин-5'-монофосфата (cAMP), который включает в себя исследование образца, взятого у больного, подвергшегося воздействию вещества, влияющего на уровни cGMP и/или cAMP, контакт образца с антителом против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован, и оценку состояния фосфорилирования VASP относительно контрольного образца.

Еще в одном аспекте согласно изобретению детально рассмотрен метод обнаружения дисфункции эндотелия, включающий в себя контакт образца, взятого у больного, с антителом против

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован, и оценку состояния фосфорилирования VASP относительно нормального контрольного образца.

Другой объект изобретения представляет собой удобный набор для осуществления изложенных здесь диагностических методов. Дополнительно к этому объекту предоставляется набор для диагностики, содержащий антитело против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован.

Еще одним аспектом изобретения является обеспечение методов лечения больных, страдающих эндотелиальной дисфункцией. Согласно этому и другим терапевтическим аспектам изобретения описывается метод лечения, когда больному при необходимости лечения вводится терапевтически эффективное количество антитела против VASP, которое связывает VASP только тогда, когда он фосфорилирован.

Человеческий VASP (стимулированный вазодилататором фосфопротеин), который фосфорилируется в тромбоцитах и клетках стенок сосудов в ответ на гипотензивные (сосудорасширяющие) гормоны и лекарства, был недавно обнаружен, выделен и охарактеризован с точки зрения молекулярной генетики (Haffher et al., EMBOJ. 14, 19-27, 1995).

VASP является важным компонентом пути передачи сигнала с участием ANF/NO/cGMP/cGMP - протеинкиназы, который очень важен физиологически, патофизиологически и фармакологически, а также пути передачи сигнала с участием cAMP/cAMP - протеинкиназы (U. Walter, Blick 1/97 Wurzburg University, pp. 79-81, 1997). VASP экспрессируется почти во всех клетках чело-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

века и животного, особенно высокие концентрации обнаружены в тромбоцитах, клетках гладких мышц сосудов и фибробластах. В культивируемых клетках VASP связан с фокальными контактами (участки контакта клетка/матрица), с контактами клетка/клетка, микрофиламентами и динамическими мембранными областями (например, отводящий край) (Walter et al., Agents and Actions 45S, 255-268, 1995).

Фосфорилирование VASP в сосудистой системе коррелирует с ингибированием адгезии/агрегации тромбоцитов, ингибированием сокращения/перемещения гладких мышц и ингибированием парацеллюлярной эндотелиальной проницаемости.

VASP фосфорилируется и дефосфорилируется по трем различным участкам (серин 157, серин 239 и треонин 278, см. Horstrup et al., Eur. J. Biochem. 225, 21-27 (1994)). Серин 239 иногда также обозначается серином 238, особенно, когда первый метионин в VASP не учитывается при счете.

Серин 239 в VASP фосфорилируется в интактных сосудистых клетках человека (тромбоциты, эндотелиальные клетки и клетки гладких мышц) в ответ на физиологические и фармакологические доноры NO и ингибиторы тромбоцитов и вазодилататоры.

Фосфорилирование серина 239 в VASP опосредовано, в частности, cGMP-зависимыми протеинкиназами, которые активируются под действием cGMP, важными гормонами, как, например, натрийуретические пептиды, или высвобождающими NO веществами и лекарствами. Фосфорилирование серина 239 в VASP дополнительно опосредовано cAMP - зависимыми протеинкиназами, которые активируются гормонами и лекарствами, повышающими уро-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

вень cAMP.

В то время как cAMP - зависимые протеинкиназы в принципе фосфорилируют серин в положении 157, они также фосфорилируют серин в положении 239 в VASP. Также наблюдали, что фосфорилирование VASP в положении серина 157 тесно коррелирует с ингибированием присоединения фибриногена к гликопротеину IIb-IIIa в тромбоцитах крови человека (Horstrup et al., Eur. J. Biochem. 225, 21-27 (1994)).

Определение степени, до которой фосфорилируется VASP в биологическом материале, например, в экстрактах тканей и клеток, в частности, определение фосфорилирования VASP по положению 239 и/или по положению 157, было бы важным биохимическим параметром, измерение которого сделало бы возможным разработку системы диагностики для обнаружения всех повышающих уровень cGMP и/или cAMP гормонов или лекарств, как, например, натрийуретический фактор предсердий (ANF), гуанилин, вещества, выделяющие NO, и лекарства и, кроме того, позволило бы сделать заключения относительно эндотелиальных функций in vivo.

Антитела, которые специфически присоединяются к обратимо фосфорилируемым протеинам, были описаны в патенте США № 5599681, в международной заявке на патент 93/21230 и U. Walter, Blick 1/97 Wurzburg University, pp. 79-81, 1997.

Объектом настоящего изобретения была разработка биохимических/иммунобиологических методов, которые дают возможность быстро и просто определить качественно и/или количественно состояние фосфорилирования VASP в биологическом мате-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

риале.

Эта цель была достигнута путем получения антител, которые связывают VASP как антиген только тогда, когда VASP присутствует в фосфорилированной форме.

Изобретение, следовательно, несомненно относится в общем плане к антителам, которые связывают VASP как антиген только тогда, когда VASP находится в фосфорилированной форме.

В рамках изобретения под антителами подразумевают и поликлональные антитела, и моноклональные антитела (Mab) и их фрагменты, и также фрагменты одноцепочечного Fv (SCFv) или другие синтетические или рекомбинантные области протеинов, которые специфически распознают фосфорилированные участки в VASP.

Фрагменты антител включают в себя любой участок антитела, способный связывать целевой антиген, в данном случае VASP или его специфический участок. Фрагменты антител специфически включают в себя $F(ab')_2$- Fab-, Fab'- и Fv- фрагменты. Они могут быть генерированы из антитела любого класса, но обычно получаются из IgG или IgM. Они могут быть получены с использованием общепринятых методов рекомбинантной ДНК или с использованием классического способа, путем протеолитической ферментации с папаином или пепсином. Смотрите CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, chapter 2, Coligan et al., eds., (John Wiley & Sons 1991-92).

$F(ab')_2$-фрагменты обычно характеризуются молекулярной массой около 110 кДа(IgG) или около 150 кДа (IgM) и содержат

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

два связывающих антиген участка, соединенных, как шарниром, дисульфидной связью (связями). Практически все, на самом деле все, из Fc отсутствует в этих фрагментах. Fab'-фрагменты обычно имеют массу около 55 кДа (IgG) или около 75 кДа (IgM) и могут быть образованы, например, путем восстановления дисульфидной связи (связей) $F(ab')_2$-фрагмента. Образующаяся в результате свободная сульфгидрильная группа (группы) может быть использована для удобного соединения Fab'-фрагментов с другими молекулами, такими, например, как реагенты для определения (например, ферменты). Fab-фрагменты являются одновалентными и обычно характеризуются массой около 50 кДа (из любого источника). Fab-фрагменты включают в себя легкую (L) и тяжелую (H) цепи вариабельные (V_L и V_H, соответственно) и постоянные (C_L и C_H, соответственно) участки связывающей антиген части антитела. Части H и L связаны внутримолекулярным дисульфидным мостиком.

Fv-фрагменты обычно характеризуются молекулярной массой около 25 кДа (независимо от источника) и содержат вариабельные участки как легких, так и тяжелых цепей (V_L и V_H, соответственно). Обычно цепи V_L и V_H удерживаются вместе только за счет нековалентных взаимодействий, и поэтому они легко распадаются. Они, однако, действительно обладают преимуществом малого размера, и они сохраняют такие же связывающие свойства, как и более крупные Fab-фрагменты. Соответственно, были разработаны способы соединения цепей V_L и V_H поперечными связями использующие, например, глутаровый альдегид (или другие химические средства для поперечной сшивки), межмоле-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

кулярные дисульфидные связи (при включении цистеинов) и пептидные линкеры. Получающийся в результате Fv является теперь одноцепочечным (то есть, SCFv).

Один предпочтительный способ включает в себя получение SCFv рекомбинантными методами, что дает возможность получать Fv с новой специфичностью при смешении и сочетании вариабельных цепей из различных источников антител. В типичном способе представляется рекомбинантный вектор, который включает в себя подходящие регуляторные элементы, вызывающие экспрессию кассетного участка. Кассетный участок обычно содержит ДНК, кодирующую пептидный линкер, с подходящими сайтами на обоих 5'- и 3'-концах линкера для получения слитых белков. ДНК, кодирующая представляющий интерес вариабельный участок (участки), может быть клонирована в вектор для образования составных белков с линкером, генерируя таким образом SCFv.

При альтернативном подходе в качестве примера дезоксирибонуклеиновые кислоты, кодирующие два Fv, могут быть лигированы с ДНК, кодирующей линкер, и образующееся в результате трехчастное слияние может быть непосредственно лигировано в подходящий экспрессирующий вектор. Дезоксирибонуклеиновые кислоты SCFv, полученные любым из этих способов, могут быть экспрессированы в прокариотических или эукариотических клетках в зависимости от выбранного вектора.

Предпочтение отдается моноклональным антителам и их фрагментам, которые связывают VASP как антиген только тогда, когда VASP присутствует в фосфорилированной форме.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Особое предпочтение, кроме того, отдается моноклональным антителам и их фрагментам, которые связывают VASP или пептиды, которые заключают в себе пептидную последовательность вокруг серина 239 в составе VASP, как антиген, только тогда, когда серин в положении 239 фосфорилирован (фосфосерин 239 VASP).

В пределах существа изобретения под термином VASP также следует подразумевать имеющие значение производные VASP, т.е. функционально эквивалентные части, мутанты, фрагменты вариантов VASP, например, фосфосерин 239—VASP, который дополнительно фосфорилирован в положении серина 157, и/или треонина 278, а также, например, мутанты гликозилирования и другие ковалентные модификации и структурные элементы, которые важны для взаимодействия протеин/протеин. В пределах существа изобретения термин VASP охватывает как VASP человека, так и VASP из других видов, в частности, из млекопитающих, как, например, крыса, мышь, кролик, собака, свинья или обезьяна.

Антитела могут быть получены с помощью общепринятых методов, например, согласно методике, описанной Köhler и Milstein (Kohler und Milstein, Nature 256; 495, 1975). Обычно, когда желательна селективность, основанная на состоянии фосфорилирования, получают антитела против фосфорилированных форм VASP. Выделенные антитела могут быть подвергнуты скринингу с использованием принятых методов с тем, чтобы убедиться в селективности. Предпочтительно образуются антитела против пептидных фрагментов VASP, которые содержат серин

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

157, серин 239 и/или треонин 278.

Длина антигенного пептида VASP не важна до тех пор, пока он способен вызывать гуморальный ответ. Типичные антигенные пептиды имеют длину примерно менее 50 аминокислот. Некоторые предпочтительные пептиды короче по длине, чем примерно 20 аминокислот. Длина наиболее предпочтительных пептидов составляет примерно около 6 и около 12 аминокислот. Предпочтительные пептиды включают в себя KLRKVS^{239}KQ или RKVS^{239}KQE. Пептид предпочтительно фосфорилирован по серину 157, серину 239 и/или треонину 278. Пептиды могут быть получены с помощью рекомбинантных средств. Как правило, их получают либо при протеолитическом разложении VASP, либо при синтезе in vitro и фосфорилировании.

Предпочтение, кроме того, отдается моноклональным антителам, которые проявляют вышеупомянутые свойства и которые могут быть использованы при проточной цитометрии. Это требует того, чтобы специфичность новых антител сохранялась даже тогда, когда антиген находится в условиях, которые могут изменить конформацию антигена, как это можно ожидать на этапах фиксации, которые обычно применяются в проточной цитометрии. Новые антитела могут, например, быть изучены на их пригодность для использования в проточной цитометрии просто путем отбора их при тестировании.

Особо предпочтительно моноклональное антитело 16C2.

Новые антитела могут быть получены с использованием методов, которые сами по себе известны специалисту. Получение гибридомных клеток с использованием методики, описанной

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Köhler и Milstein (Köhler and Milstein, Nature 256; 495, 1975), может, в частности быть упомянуто для получение моноклональных антител. Специфичность очищенных антител может быть проверена, например, при использовании следующих методов исследования:

a) Вестерн-блоттинг, использующий рекомбинантный VASP, который фосфорилирован в различной степени с помощью cAMP-зависимых или cGMP-зависимых протеинкиназ, только в сочетании с которым должно стать возможным наблюдение положительного сигнала с фосфорилированным VASP.

b) Вестерн-блоттинг, использующий экстракты клеток, например, клеток Pkt2, которые были трансфицированы человеческим VASP или VASP, который был видоизменен различными путями и в котором в каждом случае один из трех сайтов фосфорилирования был видоизменен и, таким образом, элиминирован ((S157A) VASP, (S239A) VASP и (T278A) VASP), и в каждом случае cGMP -протеинкиназу человека. Подходят те антитела, в которых положительные сигналы в Вестерн-блоте устраняются при мутации S239A, но не при двух других мутациях.

c) Вестерн-блоттинг, использующий тромбоциты человека, обработанные различными вазодилататорами (например, простациклин или доноры NO) или активаторами cAMP - протеинкиназы или cGMP - протеинкиназы. Антитело подходит тогда, когда специфическая полоса обнаруживается в экстракте только с фосфорилированным VASP. Антитела могут также быть подвергнуты скринингу аналогичным способом с использованием фибробластов человека и также тромбоцитов крысы и мыши.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

d) исследования иммунофлуоресценции с использованием фиксированных тромбоцитов человека и эндотелиальных клеток. Положительный сигнал наблюдают, когда VASP присутствует в виде фосфопротеина.

Изобретение, кроме того, относится к гибридомным линиям клеток, которые продуцируют новые моноклональные антитела, и особенно предпочтительной является гибридомная линия клеток 16C2, которая продуцирует моноклональное антитело 16C2.

Гибридомная линия клеток 16C2, продуцирующая моноклональное антитело 16C2, была депонирована в Германской Коллекции Микроорганизмов и Клеточных культур (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen), Mascheroder Weg Ib, D-38124 Braunschweig, Германия, в соответствии с правилами Будапештского соглашения 6 ноября 1997 года, под следующим номером: DSM ACC2330.

Новые антитела подходят для качественного и/или количественного, предпочтительного количественного, определения как фосфорилирования VASP, происходящего в условиях in vitro, так и фосфорилирования, которое происходит в условиях in vivo, предпочтительно для определения фосфорилирования VASP по серину 239 и/или по серину 157, особенно предпочтительно для определения фосфорилирования VASP по серину 239.

Количественные методы с использованием антител хорошо известны специалистам и могут быть найдены, например, в CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, см. выше. Эти методы включают в себя ферментные иммуносорбентные анализы (ELISA), радиоиммунные анализы (RIA) и им подобное.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Новые антитела, кроме того, годятся для качественного и/или количественного, предпочтительно количественного, определения в биологическом материале фосфорилированного VASP, предпочтительно фосфосерин 239-VASP и/или фосфосерин 157-VASP, особенно предпочтителен фосфосерин 239-VASP.

Под биологическим материалом, например, имеют в виду экстракты клеток, экстракты тканей, клеточные срезы, клеточную ткань и клетки, например, тромбоциты, лейкоциты, эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц и фибробласты. Биологический материал может быть получен от людей или от других млекопитающих, как, например, крыса, мышь, кролик, собака, свинья или обезьяна. Предпочтителен биологический материал человеческого происхождения.

Новые антитела могут быть использованы для количественного определения в биологическом материале фосфорилированного VASP, в частности, фосфорилированного по серину 157 VASP и/или фосфорилированного по серину 239 VASP, с помощью количественной оценки авторадиограмм Вестерн-блота согласно известным специалистам методам, например, используя программу Национального института здравоохранения (США) для гель-блоттинга Image 1.6, или с помощью иммунофлуоресценции.

Благодаря корреляции, существующей между фосфорилированием серина 239 и серина 157 в VASP и активностью cGMP - зависимых и/или cAMP - зависимых протеинкиназ, новые антитела также годятся для использования в качестве средств для установления путей передачи сигнала cGMP и путей передачи сигнала cAMP, в особенности для установления путей передачи сиг-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

нала cGMP.

Использование новых антител для определения фосфосерин 239—VASP в биологическом материале при помощи методики Вестерн-блоттинга и иммунофлуоресценции также делает возможным развитие диагностических методов для определения повышающих уровень cGMP веществ, гормонов или лекарств. Примерами, которые могут быть упомянуты, являются: ANF, гуанилин, высвобождающие NO вещества или лекарства. Например, контроль за течением и лечение донорами NO может отслеживаться, что, среди прочего, предоставляет информацию о любых явлениях переносимости нитратов, которые могут развиться.

Благодаря корреляции, существующей между фосфорилированием серина 157 в VASP и активностью cAMP-зависимых протеинкиназ, новые антитела могут также быть применены как средства для обнаружения повышающих уровень cAMP веществ, гормонов или лекарств.

Изобретение, следовательно, также относится к применению новых антител или их фрагментов для диагностики и/или лечения.

Новыми диагностическими методами являются методы, которые могут проводиться в лаборатории, вне организма человека (ex vivo).

Новые антитела могут быть использованы для определения степени

фосфорилирования VASP в биологическом материале, который получен у различных видов. Примерами, которые можно упомянуть, являются человек, крыса, мышь, кролик, собака, сви-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

нья или обезьяна. Предпочтение отдается использованию новых антител для определения фосфорилированного VASP в биологическом материале от человека, крысы, мыши или собаки. Особое предпочтение отдается использованию новых антител для определения фосфорилированного VASP в биологическом материале, полученном у человека.

Новые антитела или их фрагменты могут также быть использованы как биологические датчики. Биологические датчики сами по себе известны специалисту. Особое предпочтение отдается методу, в котором используется второй участник специфического связывания, как, например, антитело, лектин или рецептор. Для обнаружения и количественной оценки этого случая один из участников специфического связывания может иметь детектируемую метку. Такие метки сами по себе известны специалисту и могут, например, быть хромофором, люминофором, флуорофором, ферментом, радиоактивным изотопом или окрашенной или бесцветной частицей. Предпочтение отдается методу, в котором немеченный участник специфического связывания соединяется прямо или непрямо, например, с помощью другого антитела или мостика биотин/авидин, с твердой фазой, при использовании известных самих по себе специалисту способов.

Новые антитела или их фрагменты могут также быть радиоактивно меченными с помощью известных специалисту способов, так что они могут быть использованы для иммуносцинтиграфии или еще для иммунотерапии. Дополнительно эти моноклональные антитела могут быть использованы как носители активных соединений и применены для лечения заболеваний, вызванных дис-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

функциями эндотелия.

Как следует из анализа полной нуклеотидной последовательности V-генов моноклонального антитела 16C2, также технически возможно получать конструкции антител путем, например, встраивания гипервариабельных участков в скелет моноклонального антитела человека (Jones et al., Nature 321, 522-525, 1986; Verhoyen et al., Science 239, 1534-1536, 1988).

Предпочтение отдается количественной оценке связанного с антигеном антитела в тромбоцитах крови с помощью проточной цитометрии, например, проводимой на образцах цельной крови, которые были, если нужно, фиксированы, с использованием известных специалисту способов. Методы проточной цитометрии известны специалисту и могут быть осуществлены, как описано, например, в G. Otten and W.M. Yokoyama (1992) Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan, Current Protocols in Immunology, 5.4.1-5.4.19.

Анализ фосфорилирования VASP с применением проточной цитометрии, в частности, фосфорилирования VASP по серину 239, использующий новые антитела, не ограничивается тромбоцитами человека и может быть также проведен на других типах клеток, как, например, лимфоциты, моноциты, лейкоциты, клетки эндотелия и клетки гладких мышц.

Использование проточной цитометрии для определения фосфорилирования VASP, в частности, фосфосерина 239 VASP, в свежеизолированных тромбоцитах человека с помощью новых антител дает возможность определить ex vivo активность эндоте-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

лиальных факторов in vivo, как, например, NO и простациклина и, следовательно, оценить эндотелиальную функцию или эндотелиальную дисфункцию в случае сердечнососудистых нарушений, которые наблюдаются, например, при артериосклерозе, гипертонии, диабете, сердечной недостаточности и почечной недостаточности.

Определение фосфорилирования VASP, в частности, фосфорилирования серина 239 в VASP, с помощью новых антител делает возможным контроль лечения вышеуказанных заболеваний. Также может быть определено развитие устойчивости к лечению, как, например, толерантность к нитратам.

Новые антитела могут также быть использованы в качестве терапевтических средств благодаря тому, что они в биологическом материале влияют на состояние фосфорилирования VASP и/или его взаимодействие с протеинами.

Изобретение, соответственно, также относится к фармацевтическим препаратам, которые включают в себя, как минимум, одно из новых антител.

Новые препараты могут быть использованы через пищеварительный тракт (через рот), парентерально (внутривенно), ректально или локально (местно). Они могут быть введены в виде растворов, порошков (таблеток или капсул, включая микрокапсулы), липосомных препаратов, липидных комплексов, коллоидных дисперсий, инъекционных растворов или суппозиториев. В качестве вспомогательных веществ для готовых форм такого типа годятся фармацевтически привычные жидкие или твердые наполнители и специальные материалы для увеличения объема,

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

растворители, эмульгаторы, скользящие вещества, исправители вкуса, красители и/или забуферивающие вещества. В качестве подходящей дозы вводят 0,1 - 100 мг на кг массы тела. Их целесообразно вводить в дозированных единицах, включающих, как минимум, эффективное дневное количество новых антител, например, 30 - 3000 мг.

Дневная доза, которую следует ввести, зависит от массы тела, возраста, пола и условий, в которых находится млекопитающее. Однако более высокие или более низкие дневные дозы могут также быть востребованы. Дневная доза может быть введена либо сразу в виде разовой дозы, либо в виде нескольких меньших доз или еще может вводиться в некоторых случаях через заданные интервалы в виде поделенных доз.

Для приготовления фармацевтических препаратов новые антитела могут быть внесены в терапевтически инертные органические или неорганические наполнители. Лактоза, кукурузный крахмал или их производные, твердый жир и стеариновая кислота или ее соли являются примерами таких наполнителей для таблеток, таблеток с покрытием и твердых желатиновых капсул. Вода, полиолы, сахароза, инвертный сахар и глюкоза являются подходящими наполнителями для приготовления растворов. Вода, спирты, полиолы, глицерин и растительные масла являются подходящими наполнителями для инъекционных растворов. Растительные масла и гидрогенизированные масла, воски, жиры и полутвердые полиолы являются подходящими наполнителями для суппозиториев. Фармацевтические препараты могут также включать в себя консерванты, растворители, стабилизаторы, смачи-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

вающие средства, эмульгаторы, подсластители, красители, вкусовые вещества, соли для изменения осмотического давления, буферы, средства для покрытия, антиоксиданты и, если требуется, другие терапевтически активные соединения.

Изобретение также относится к способу получения нового фармацевтического средства, в которое, как минимум, одно из новых антител внесено в подходящей для введения форме вместе с фармацевтически подходящим и физиологически переносимым наполнителем и, если необходимо, с другими подходящими активными соединениями, добавками или вспомогательными веществами.

Изобретение, кроме того, относится обычно к диагностическому способу для определения фосфорилирования VASP, предпочтительно фосфорилирования VASP по серину 239, с помощью других специфических проб, как, например, поликлональные антитела, фрагменты SCFv или другие участки синтетических или рекомбинантных протеинов, которые специфически распознают фосфорилированные последовательности в VASP, в частности, в фосфосерин 239-VASP.

Изобретение, кроме того, также относится к диагностическому способу для определения фосфорилирования серина 157 и/или треонина 278 в VASP с помощью специфических проб, как, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, фрагменты SCFv или другие участки синтетических или рекомбинантных протеинов, которые специфически распознают последовательности в VASP, которые содержат фосфорилированный серин 157 и/или треонин 278.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Путем присоединения к обогащенным пролином пептидам, как, например, зиксин и винкулин, и одновременно присоединения своей собственной обогащенной пролином аминокислотной области к профилину, VASP делает возможным образование фибриллярного актина, при этом VASP функционирует в качестве молекулы-адаптера. Нарушение этого белок-белкового взаимодействия может привести к патологической агрегации тромбоцитов или сокращению сосудов. Таким образом, образование мостиков актин/миозин является, например, предпосылкой для сокращения клеток гладких мышц. Было обнаружено, что фосфорилирование VASP по серину в положении 157 коррелирует с ингибированием гликопротеина фибриногенового рецептора IIb/IIIa (Horstrup et al., Eur. J. Biochem., 225, 21-27, 1994). Определение фосфорилирования VASP по положению серина 157, следовательно, делает возможным систематический поиск веществ или лекарств, которые влияют на взаимодействие VASP с его внутриклеточными партнерами по связыванию и являются, например, подходящими для лечения сердечно-сосудистых заболеваний, которые связаны с поражением сосудов.

Особое предпочтение отдается также вариантам осуществления изобретения, которые описываются в примерах осуществления.

Следующие примеры служат для разъяснения изобретения и не ограничивают его тем или иным вариантом.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Выделение моноклонального антитела против фосфосерин

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

239-VASP

Фосфорилированный пептид и нефосфорилированный пептид, каждый из которых охватывает пептидную последовательность KLRKVS^{239}KQ или RKVS^{239}K-QE вокруг серина 239, синтезируют, используя синтезатор пептидов фирмы Applied Biosystems (модель 431 A), в соответствии с химическими реакциями с применением 9-флуоренилметилоксикарбонильной (Fmoc) защитной группировки, что известно специалистам.

Фосфосерин в фосфорилированный пептид включают при пептидном синтезе, используя Fmoc-серин [PO(Obzl)OH-OH] фирмы Calbiochem. Охарактеризованные данными масс-спектров пептиды очищают с применением хроматографии с обращенной фазой и колонки с VYDAC218TP (чистота > 98%).

После активирования бромуксусной кислотой или сложным эфиром бромуксусной кислоты и N-гидроксисукцинимида (фирмы Sigma) пептиды, полученные таким путем, конъюгируют с тиолированным KLH (гемоцианином из Megathura crenulata, фирма nanoTools). Самок мышей Balb/c (возраст 6 недель) иммунизируют подкожно 4 раза с интервалами в 14 дней KLH-фосфопептидом (10 мкг/мышь), содержащим полный адъювант Фрейнда в первой инъекции и неполный адъювант в 3 последующих инъекциях. Затем мышей (через 2 недели) подвергают активной иммунизации 10 мкг иммуногена в забуференном фосфатом физиологическом растворе (ЗФР) в течение трех последующих дней. Через 1 день после последней активной иммунизации мышей убивают и удаляют селезенки. Клетки селезенки выделяют и сливают с непродуцирующими миеломными клетками (например,

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

PAI - клетками, J.W. Stocker et al. (1982) Res. Disclosure, 21713), используя разработанную Köhler/Milstein методологию.

Дифференциальный способ скрининга, использующий фосфорилированные/нефосфорилированные пептиды, а также фосфорилированный/нефосфорилированный рекомбинантный VASP человека, применяется для тестирования гибридомных клеток на их способность выделять антитела против фосфосерин 239-VASP.

Использующиеся для испытания фосфорилированные/нефосфорилированные пептиды ковалентно связываются с DNA-BIND-ELISA - планшетами (от фирмы Costar) и гибридомные надосадочные жидкости подвергаются скринингу с применением метода-ELISA.

Надосадочные жидкости, которые распознают фосфопептиды, дополнительно исследуют на их способность распознавать полностью фосфорилированный рекомбинантный (система E. coli) VASP человека, но не соответственно дефосфорилированный VASP.

Моноклональные антитела из надосадочных жидкостей гибридомных клеток, идентифицированные вышеописанными способами как позитивные, могут предпочтительно быть очищены от бессывороточных гибридомных клеточных культур с помощью тиофильной адсорбционной хроматографии (POROS 50-OH, фирма nano-Tools).

С использованием различных методов тестирования стало возможным идентифицировать и охарактеризовать одно из выделенных антител (клон 16C2) как моноклональное антитело мышиного IgG 1k- класса, которое распознает VASP только тогда,

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

когда этот протеин фосфорилирован по положению серина 239. Антитело 16C2 не распознает в применяемых условиях другие протеины и другие сайты фосфорилирования VASP.

Моноклональные антитела, которые специфически распознают фосфосерин 157-VASP или фосфотреонин 278 — VASP, могут быть выделены по аналогии с вышеописанным способом путем использования фосфорилированных пептидов, которые заключают в себе известные пептидные последовательности вокруг серина 157 или треонина 278 белка VASP, соответственно, в качестве антигена.

Генерация моноклональных антител, распознающих фосфорилированный в положении Ser 239 VASP, также описывается Smolenski et al., J. Biol. Chem., 237, 32, 20029-20035(1998).

Пример 2

Анализ фосфорилирования серина 239 в VASP с помощью проточной цитометрии

Анализ фосфорилирования серина 239 в VASP в промытых тромбоцитах человека

Готовят тромбоциты человека, и фосфорилирование VASP стимулируют при инкубировании с вазоактивными веществами, как описано (Eigenthaler et al., Eur. J. Biochem., 205, 471-481, 1992). Реакцию останавливают, фиксируя при комнатной температуре в течение 10 минут формальдегидом при конечной концентрации примерно в 3,5%. После процедуры промывки (необязательной) клетки делают проницаемыми с помощью тритона X-100 и затем промывают. На окрашивание влияет инкубиро-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

вание с подходящим антителом, которое либо непосредственно имеет флуоресцентную метку, либо является окрашенным с использованием второго антитела, которое имеет флуоресцентную метку. Целесообразно использовать для этой цели 0,5 - 5 мкг, предпочтительно 1-2 мкг первичного антитела на мл. Подходит, например, величина 1,7 мкг/мл, когда в качестве первичного антитела используется моноклональное антитело 16C2. Связывание антитела 16C2 затем определяют и анализируют в приборе для проточной цитометрии, как описано, например, в G. Otten and W.M. Yokoyama (1992) Flow cytometry analysis using the Becton Dickinson FACScan, Current Protocols in Immunology, 5.4.1-5.4.19.

Пример 3

Использование Вестерн-блоттинга для определения фосфорилирования серина 239 в VASP в клеточных экстрактах

Параллельно с проточной цитометрией (пример 2) используется Вестерн-блоттинг для определения фосфорилирования VASP в клеточных экстрактах с применением известных специалисту методов, которые описаны, например, Eigenthaler et al. (Eur. J. Biochem., 205, 471-481, 1992). Целесообразно, чтобы концентрация используемого антитела была между 0,1 и 5, предпочтительно от 0,5 до 1,0 мкг/мл, в зависимости от содержания VASP в определяемом образце. Например, для тромбоцитов человека и тромбоцитов крысы выгодно использовать 0,5 мкг антитела/мл, в то время как для эндотелиальных клеток пуповины человека целесообразно использовать 1,0 мкг антитела/мл. В принципе анализ фосфорилирования серина 239 в VASP

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

в клеточных экстрактах посредством анализа Вестерн-блотом и анализ на фиксированных клетках с помощью проточной цитометрии показывали идентичные результаты.

Пример 4

Анализ фосфорилирования серина 239 в VASP в цельной крови или обогащенной тромбоцитами плазме (PRP)

Цельную кровь или обогащенную тромбоцитами плазму (PRP) инкубируют с влияющими на сосуды веществами, и инкубирование прекращают, фиксируя при комнатной температуре в течение 10 минут формальдегидом при конечной концентрации около 3,5%. PRP получают из цельной крови, как описано Eigenthaler et al. (Eur. J. Biochem., 205, 471-481, 1992). Тромбоциты в PRP осаждают при центрифугировании и повторно суспендируют в физиологическом буфере (Eigenthaler et al., 1992, см. выше). Тромбоциты делают проницаемыми и затем окрашивают, как описано выше для промытых тромбоцитов.

Пример 5

Время протекания стимуляции фосфорилирования серина 239 в VASP в промытых тромбоцитах человека после обработки нитропруссидом натрия (SNP)

Тромбоциты человека обрабатывали 100 мкМ SNP. Образцы клеток отбирали в моменты 0, 1, 3 и 5 минут. Антитело 16C2 использовали для определения фосфорилирования серина 239 в VASP параллельно с анализом с помощью Вестерн-блота экстрактов образцов отобранных клеток и с определением путем проточной цитометрии, проводимым на тромбоцитах человека, которые были фиксированы и превращены в проницаемые, как описано

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

выше. Радиоавтограммы Вестерн-блотов анализировали количественно, используя программу Image 1.6 Национального института здравоохранения (США) для гель-блоттинга.

Увеличение в связывании антитело 16C2/фосфосерин 239-VASP (% увеличения (величина за 5 минут=максимальный эффект=100%)) представлено в таблице 1.

Таблица 1

время(мин)	% увеличения	тромбоциты цитометрия	клеточный экстракт Вестерн-блоттинг
0		0	0
1		62,5	83,5
3		89,3	95,2
5		100,0	100,0

Пример 6

Применение антитела 16C2 для анализа фосфорилирования рекомбинантного VASP с помощью cAMP-зависимой протеинкиназы или cGMP-зависимой протеинкиназы

Очищенный рекомбинантный меченный гексагистидином VASP (25 мкг/мл) фосфорилировали с помощью очищенной каталитической субъединицы (11 мкг/мл) cAMP-протеинкиназы (cAPK) или с помощью очищенной cGMP-протеинкиназы (cGPK; 24 мкг/мл).

Аликвотные пробы отбирали из реакционной смеси через заданные промежутки времени, немедленно смешивали с содержащим додецилсульфат натрия останавливающим реакцию раствором, кипятили и фракционировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия. Фосфорилирование VASP анализировали путем окрашивания красителем

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

кумасси синий и путем Вестерн-блоттинга, используя либо поликлональное антитело против VASP (M4, Halbrügge M. et al., J. Biol. Chem. 265, 3088-3093 (1990), полученное от: Alexis Corporation, Alte Hauensteinstraβe 4, CH-4448 Läufelfingen, Switzerland), или моноклональное антитело 16C2 против VASP. Полоса ниже VASP при окрашивании кумасси синим соответствует cAPK, в то время, как полоса выше VASP означает cGMP-протеинкиназу. Проведенный электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия демонстрировал изменение миграционного поведения VASP от 46 до 54 кДа, благодаря фосфорилированию серина 157, которому отдает предпочтение cAPK. Фосфорилирование серина 239 (обнаруживаемое с помощью антитела 16C2) предпочтительно осуществляется с участием cGMP-протеинкиназы.

Пример 7

Анализ фосфорилирования в клетках Ptk2 трансфицированного VASP, содержащего различные мутации фосфорилирования

Фосфорилирование трансфицированного человеческого VASP и мутантов VASP исследовали в клетках Ptk2. VASP немутантного типа и мутанты VASP, каждый из которых содержал измененные (инактивированные) сайты фосфорилирования (изменение серина 157, серина 238 или треонина 277), были трансфицированы в клетки Ptk2 вместе с человеческой cGMP-протеинкиназой 1β и экспрессированы под контролем промотора вируса мозаики цветной капусты. Клетки Ptk2 удерживают очень мало эндогенного VASP и cGMP-протеинкиназы. Через два дня после трансфекции клетки инкубировали в течение 30 минут с 30 мкМ 8pCPT-cGMP и

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

клеточные экстракты затем выделяли. Фосфорилирование VASP в этих клеточных экстрактах затем исследовали в Вестерн-блотах, используя поликлональное антитело M4 и моноклональное антитело 16C2. Зависимое от фосфорилирования изменение VASP от 46 кДа до 50 кДа больше не обнаруживалось, когда серин 157 был инактивирован (мутация S157A). Сигнал, узнаваемый антителом 16C2, больше не обнаруживали, когда серин 239 был инактивирован (S239A). В этих анализах мутации треонина 277 вели себя как VASP немутантного типа.

Пример 8

Анализ фосфорилирования VASP в тромбоцитах человека после стимуляции различными вазодилататорами и аналогами cAMP/cGMP

Промытые тромбоциты человека (0,7 x 10^9 клеток/мл) инкубировали с 1 мкМ простагландином I_2 (простациклином), 0,5 мМ 5,6-DCI-cBIMPS (проникаемый через клеточную мембрану аналог cAMP), 10 мкМ нитропруссидом натрия или 1 мМ 8pCPT-cGMP (проникаемый через клеточную мембрану аналог cGMP). Аликвотные пробы (2,8 x 10^7 клеток) отбирали через заданное время, смешивали с останавливающим реакцию раствором додецилсульфата натрия и кипятили, и затем исследовали фосфорилирование VASP, используя метод Вестерн-блоттинга. Анализы проводили с использованием поликлонального антитела M4 или моноклональных антител 16C2. Фосфорилирование серина 157 количественно оценивали по сдвигу VASP от 46 до 50 кДа, в то время как фосфорилирование серина 239 оценивали количественно с помощью сигнала, даваемого антителом 16C2.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

Пример 9

Фосфорилирование VASP в тромбоцитах крысы

Тромбоциты крысы (0,7 x 10^9 клеток/мл) инкубировали 5 минут с 100 мкМ нитропруссидом натрия, с 10 мкМ простагландином E_1 (PGE_1) или без любой из этих добавок. Экстракты этих тромбоцитов крысы анализировали с использованием Вестерн-блоттинга. Блот продемонстрировал, что зависимый от фосфорилирования сдвиг VASP от 46 кДа до 50 кДа (фосфорилирование серина 157) и зависимый от фосфорилирования сигнал, даваемый антителом 16C2 (фосфорилирование серина 239), также имели место в тромбоцитах крыс. Похожие результаты получены также при использовании тромбоцитов мыши.

Пример 10

Исследования иммунофлуоресценции VASP и фосфо-VASP, проводимые на тромбоцитах человека

Тромбоциты человека (в обогащенной тромбоцитами плазме, PRP) осаждали на стеклянном предметном стекле и давали возможность сцепиться и распространиться в течение 45 мин. Эти тромбоциты затем инкубировали на стеклянном предметном стекле в течение 15 мин без (A и C) или с 100 мкМ 8pCPT-cGMP (B и D). Затем клетки немедленно фиксировали 4% параформальдегидом и делали их проницаемыми, используя 0,2% тритон X-100. Затем их инкубировали с поликлональным антителом M4 (1:1000) или с моноклональным антителом 16C2, сопровождаемыми обычными вторичными антителами. Фотографии показывают появление зависимого от фосфорилирования сигнала, когда используют антитело 16C2, в то время, как сигнал с поликлональным антите-

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2

лом M4 (при иммунофлуоресценции сумма 46 кДа и 50 кДа VASP, поскольку нет фракционирования) не зависит от фосфорилирования.

RU 2218178 C2

RU 2218178 C2