

P9602952

KÖZZÉTÉTEL
PÉLDÁNY

5054

76095
"A"

ANGIOSZTATIN ÉS ELJÁRÁS ANGIOGENEZIS GÁTLÁSÁRA

KIVONAT

A találmány tárgyát endoteliális inhibitor és annak alkalmazási eljárása képezi. A találmány szerinti endoteliális inhibitor egy - vérből vagy vizeletből izolált - protein, amely C4 reverz fázisú HPLC oszlopról egyetlen csúcsként eluálódik. Az endoteliális inhibitor-protein molekulatömege - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézis alapján - 38 kD és 45 kD közé esik, aminosav-szekvenciája pedig lényegében hasonló az - egér plazminogén-molekula 98. aminosavával kezdődő - egér plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciájához.

jellemező elve

Benar

ANGIOSZTATIN ÉS ELJÁRÁS ANGIOGENEZIS GÁTLÁSÁRA

A találmány tárgyát endoteliális inhibitorok képezik, melyeket angiosztatinnak neveznek, és amelyek reverzibilisen gátolják az endotélsejtek (belhámsejtek) proliferációját. Közelebbről, a találmány tárgyát angiosztatin-proteinek képezik, amelyek testfolyadékokból, például vérből vagy vizeletből izolálhatók, illetve rekombináns, enzimatis és kémiai módszerekkel szintetizálhatók. Az angiosztatin képes az angiogenezissel (érképződéssel) kapcsolatos betegségek gátlására és az érképzési folyamatok módosítására. A találmány tárgyát képezik továbbá: diagnosztikai vizsgálatok és reagenskészletek angiosztatin mérésére; hisztokémiai reagenskészletek angiosztatin lokalizálására; DNS-szekvenciák, amelyek angiosztatint és - az angiosztatin-bioszintézis ellenőrzésére alkalmas - molekuláris próbákat kódolnak; antitestek, amelyek specifikusak az angiosztatinra; az angiosztatin-receptor vonatkozásában agonista és antagonistá peptidek; angiosztatin-receptor-specifikus antitest-agonisták és -antagonisták; valamint az angiosztatin-peptidekhez kapcsolt citotoxikus anyagok.

Ahogy a leírásban használjuk, az "angiogenezis" kifejezés új véredények - egy szövetben vagy szervben történő - kialakulására vonatkozik. Normális fiziológiai állapotban az angiogenezis emberekben vagy állatokban csak speciális esetekben fordul elő. Például, az angiogenezis normális esetben sebgyógyulásnál, magzati és embrionális fejlődésben, valamint a sárgatest, a méhnyálkahártya és a

84609-5147 TF

méhlepény kialakulásakor figyelhető meg. Az "endotélium" kifejezés lapos epitélisejtek vékony rétegét jelenti, amely a savós üregek, nyirok- és vérerek belső falát béleli.

Úgy véljük, hogy a szabályozott és szabályozatlan angiogenezis azonos módon játszódik le. Az endotélisejtek és a periciták (Rouget-sejtek) - alapmembránnal körülvéve - képezik a hajszálereket. Az angiogenezis azzal kezdődik, hogy az endotélisejtek és a leukociták által felszabadított enzimek kimarják az alapmembránt, ezután a vérerek üregét bélelő endotélisejtek kinyomulnak az alapmembránon keresztül. Az angiogenezist serkentő anyagok indukálják az endotélisejtek - kimart alapmembránon keresztül történő - vándorlását. A vándorló sejtek az eredeti véredényből kiálló "rügyet" képeznek, ahol az endotélisejtek mitózison esnek át, és proliferálódnak. Az endoteliális "rügyek" együtt kibújva kapilláris hurkokat képeznek, létrehozva ezáltal az új véredényt.

A perzisztens, szabályozatlan angiogenezis számos betegség, tumor metasztázis és az endotélisejtek abnormális növekedése esetében előfordul, és fokozza az ezen esetekben előforduló kóros károsodásokat. A különböző kóros állapotokat, amelyekben kimutatható a nem kontrollált angiogenezis, angiogenezis-dependens vagy angiogenezissel összefüggő betegségek néven csoportosították.

Először 1971-ben vetették fel azt az elképzelést, miszerint a tumornövekedés angiogenezis-dependens [Folkman, J.: N. Engl. Jour. Med. 285, 1182 (1971)]. Folkman megállapítja, hogy "ha egyszer egy tumor kialakult, a

tumorsejt-populáció növekedését minden esetben a tumoron összpontosuló új hajszálerek mennyiségének fokozódása előzi meg". A tumor kialakulásán - a jelenlegi értelmezés szerint - a tumornövekedés prevaszkuláris (érképződés előtti) fázisát értjük, melynek során a tumorsejtek (néhány mm^3 -t elfoglaló) populációja, amely legfeljebb néhány millió sejtből áll, fennmaradhat a létező mikrokapillárisokban. E fázist követően a tumor térfogatának növekedéséhez új hajszálerek indukálására van szükség. Például, egerekben, korai prevaszkuláris fázisban a tüdő mikrometasztázisok szövetmetszetekben csak nagyteljesítményű mikroszkóp alkalmazásával mutathatók ki.

A tumornövekedés angiogenezis-függőségét alátámasztó indirekt bizonyítékokként a következő példákat említjük.

(1) Egerekben a bőr alatti áttetsző kamrákba beültetett tumorok növekedési sebessége az új erek kialakulása ("neovascularization") előtt lassú és lineáris, míg az új erek kialakulása után gyors, és majdnem exponenciális [Algire, G.H. és mtsai.: J. Natl. Cancer Inst. 6, 73 (1945)].

(2) Izolált, perfúzióval átmosott szervekben (melyekben a vérerek száma nem nő) növekvő tumorok térfogata csupán $1-2 \text{ mm}^3$, de ez a térfogat gyorsan több, mint ezerszeresére is megnő, ha a tumorokat egerekbe ültetik be, és azokban új erek alakulnak ki [Folkman, J. és mtsai.: Annals of Surgery 164, 491 (1966)].

(3) Az ér nélküli szaruhártyában a tumornövekedés lassú és lineáris, de új erek kialakulásának hatására

exponenciálissá válik [Gimbrone, M.A. Jr. és mtsai.: J. Natl. Cancer Institute 52, 41 (1974)].

(4) Nyúl szemének elülső szemcsarnokában lévő folyadékban szuszpendált tumorok életképesek, vérerek nélküliek, és méretük 1 mm^3 alatti. Ha ezeket a szivárványhártya vérerekkel átszőtt rétegébe ültetik át, új erek alakulnak ki bennük és gyors növekedésnek indulnak, miáltal két héten belül eredeti térfogatuk 16000-szeresét érik el [Gimbrone, M.A. Jr. és mtsai.: J. Exp. Med. 136, 261].

(5) Ha tumorokat csirkeembriók embrionális bélzsák-membránjába ültetnek be, a tumorok a több, mint 72 óra hosszat tartó vérerek nélküli fázisban lassan növekednek, és átlagos átmérőjük nem haladja meg a $0,93 \pm 0,29 \text{ mm}$ -t. Az új erek kialakulását követő 24 órán belül gyors tumornövekedés indul meg, és a 7. napon az erekkel átszőtt tumorok $8,0 \pm 2,5 \text{ mm}$ -es átlagos átmérőt érnek el [Knighton, D.: British J. Cancer 35, 347 (1977)].

(6) Nyulak májában a metasztázisok erezettsége a metasztázisok méretét illetően heterogén, de az érképződés megjelenéséhez tartozó méret tekintetében viszonylag egységes képet mutat. A tumorok 1 mm -es átmérőig általában nem tartalmaznak ereket, de e határ átlépése után új erek alakulnak ki [Lien, W. és mtsai.: Surgery 68, 334 (1970)].

(7) Transzgénikus egerekben (amelyekben a Langerhans-szigetek β -sejtjeiben rák fejlődött ki) az érképződés előtti, hiperplasztikus szigetek mérete 1 mm alatti. 6-7 hetes korban a szigetek 4-10 %-ában új erek képződnek, s

ezekből a szigetekből nagy, vérerekkel ellátott tumorok alakulnak ki, melyek a vérerek nélküli szigetek méretéhez képest több, mint ezerszeres térfogatúak [Folkman, J. és mtsai.: Nature 339, 58 (1989)].

(8) A VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor) elleni specifikus antitest három humán tumorban (melyek egyetlen angiogenezis-mediátorát a VEGF képezi) csökkenti a hajszálerek sűrűségét, és "jelentős vagy drámai" mértékben gátolja növekedésüket (csupasz egerekben). Ez az antitest a tumorsejtek *in vitro* növekedését nem gátolja. [Kim, K.J. és mtsai.: Nature 362, 841 (1993)].

(9) A monoklonális anti-bFGF antitest egy egértumor (amely egyetlen angiogenezis-mediátoraként a bFGF szekréciójától függ) növekedésének 70 %-os gátlását eredményezi. Ez az antitest nem gátolja a tumorsejtek *in vitro* növekedését [Hori, A. és mtsai.: Cancer Research 51, 6180 (1991)].

(10) A bFGF intraperitoneálisan adott injekciója - a tumorban lévő hajszálér-endotélsejtek növekedésének serkentésével - fokozza egy primer tumor és metasztázisainak növekedését. A tumorsejtek önmagukban nem tartalmaznak bFGF-receptorokat, és a bFGF a tumorsejtekre *in vitro* nem mitogén hatású [Gross, J.L. és mtsai.: Proc. Amer. Assoc. Canc. Res. 31, 79 (1990)].

(11) Egy specifikus angiogenezis-inhibitor, az AGM-1470, *in vivo* gátolja a tumornövekedést és a metasztázisok kialakulását, de a tumorsejt-proliferáció *in vitro* gátlása

terén sokkal kevésbé aktív. Az érfali endotélsejtek proliferációjának 50 %-os gátlását 4 log-gal kisebb koncentrációnál eredményezi, mint a tumorsejt-proliferáció gátlását [Ingber, D. és mtsai.: Nature 48, 555 (1990)]. Rendelkezésre állnak indirekt klinikai bizonyítékok is arra vonatkozóan, hogy a tumornövekedés angiogenezis-függő.

(12) Az üvegtestbe metasztázissal áttevődött emberi retinoblastoma vérerek nélküli gömbökké fejlődik, amelyek - annak ellenére, hogy enucleatioval kifejtett szemből eltávolítva és *in vitro* vizsgálva életképesek és ³H-timidint vesznek fel - 1 mm³-nél kisebb térfogatúak.

(13) A petefészekrák metasztázis útján, fehér, erek nélküli magvakként (1-3 mm³) a hashártya-membránba tevődik át. Ezek a metasztázisok ritkán nőnek nagyobbra, mindaddig, amíg egy vagy több ilyen áttétben új erek nem alakulnak ki.

(14) Az új erek képződése emlőrákban [Weidner, N. és mtsai.: N. Engl. J. Med. 324, 1 (1991); és Weidner, N. és mtsai.: J. Natl. Cancer Inst. 84, 1875 (1992)] és prosztatákban [Weidner, N., Carroll, P.R., Flax, J., Blumenfeld, W. és Folkman, J.: American Journal of Pathology 143(2), 401 (1993)] nagymértékben összefügg a későbbi metasztázis kockázatával.

(15) Az emberi bőrmelanoma metasztázisa az új erek kialakulása előtt ritka. Az új erek kialakulásának megindulása a sérülés vastagságának növekedését és a metasztázis fokozott kockázatát eredményezi [Srivastava, A. és mtsai.: Amer. J. Pathol. 133, 419 (1988)].

(16) Hólyagrák esetében az érképző hatású bFGF peptid vizeletbeli mennyisége érzékenyebb indikátora a betegség stádiumának és súlyosságának, mint a citológia [Nguyen, M. és mtsai.: J. Natl. Cancer Inst. 85, 241 (1993)].

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy az angiogenezis jelentős szerepet játszik a rákok metasztázisában. Amennyiben ez az érképző aktivitás csökkenthető vagy megszüntethető, a tumor - bár jelen van - nem növekszik tovább. Beteg állapotban az angiogenezis megakadályozásával elhárítható az új hajszálér-rendszer elburjánzása okozta károsodás. Az érképző folyamatok szabályozására irányuló gyógykezelések e betegségek felszámolását vagy enyhítését eredményezhetik.

A fentiek értelmében olyan készítményre és eljárásra van szükség, amely gátolja a vérerek nem kívánt gyarapodását (különösen a tumorokban), továbbá szükség van a készítmény detektálására, mérésére és lokalizálására alkalmas eljárásra is. A készítménynek képesnek kell lennie a premetasztázisos tumorokban lévő endogén növekedési faktorok aktivitásának leküzdésére és a tumorokban a hajszálerek képződésének megakadályozására, gátolva ezáltal a tumorok növekedését. A készítménynek, a készítmény részleteinek és a készítményre specifikus antitesteknek képesnek kell lenniük befolyásolni a hajszálerek kialakulását más érképzési folyamatokban (mint pl. a sebgyógyulásban és regenerációban) is. Az angiogenezis gátlására alkalmas készítmény és eljárás nem lehet toxikus, és csak kevés mellékhatást okozhat. Szükség van olyan

eljárásra is, amellyel detektálhatók, mérhető és lokalizálhatók a készítmény kötőhelyei, illetve a készítmény bioszintézisének helyszínei. A készítménynek és a készítmény részleteinek (radioaktív és nem radioaktív jelölési célok érdekében) képesnek kell lenniük arra, hogy más molekulákhoz kötődjenek.

A találmány szerinti megoldás értelmében olyan készítményeket és eljárásokat tárunk fel, amelyek hatásosan alkalmazhatók az angiogenezis modulálására és a nem kívánt angiogenezis - különösen a tumornövekedéssel kapcsolatos angiogenezis - gátlására. A találmány tárgya az angiosztatin nevű protein, amely endogén növekedési faktorok (mint pl. a bFGF) érképző aktivitásának *in vitro* gátlására képes, és aminosav-szekvenciája homológ és strukturálisan hasonló a plazminogén egy - hozzávetőleg 98. aminosavával kezdődő - belső részével. Az angiosztatin egy (redukáló poliakril-amid-gélelektroforézises vizsgálat alapján) hozzávetőleg 38-45 kD molekulatömegű proteint tartalmaz, melynek aminosav-szekvenciája lényegében hasonló az egér plazminogén [a teljes egér plazminogén-molekula (2. azonosítószámú szekvencia) 98. aminosavánál kezdődő] fragmenséhez.

Az angiosztatin aminosav-szekvenciája a különböző fajok között csekély különbséget mutat. Például, a humán angiosztatin aminosav-szekvenciája lényegében hasonló a fentebb említett egér plazminogén-fragmens szekvenciájához, bár egy aktív humán angiosztatin-szekvencia a teljes humán plazminogén-szekvencia 97. vagy 99. aminosavánál kezdődhet.

A humán plazminogén fragmensei hasonló érképzés elleni aktivitást mutatnak (amint azt egy egértumor-modellel kimutattuk). Tudni kell, hogy az aktív angiosztatín-molekulában az aminosavak száma változó lehet, és valamennyi endoteliális gátló aktivitással rendelkező aminosav-szekvenciát a találmány tárgyának tekintünk.

A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások és készítmények olyan betegségek és folyamatok kezelésére, amelyek nem kívánatos és nem kontrollált angiogenezissel állnak kapcsolatban. A kezelés során embernek vagy állatnak alapvetően tisztított angiosztatint vagy angiosztatín-származékot tartalmazó készítményt adunk be, olyan adagolásban, amely elégséges az angiogenezis gátlásához. A találmány szerinti megoldás különösen előnyösen alkalmazható tumorok kezelésére és növekedésük gátlására. Vérerekkel még nem átszőtt, metasztázisos tumorokkal rendelkező embernek vagy állatnak angiosztatint beadva megakadályozható a tumorok növekedése, ill. szétterjedése.

Szintén a találmány tárgyát képezik az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciák, az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó expressziós vektorok, valamint az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciákat tartalmazó egy vagy több expressziós vektort hordozó sejtek. A találmány tárgyát képezik továbbá olyan génterápiás eljárások, melyek során egy páciensbe - az angiosztatín szintjének *in vivo* módosítása érdekében - angiosztatint kódoló DNS-szekvenciákat viszünk be.

Szintén a találmány tárgyát képezik diagnosztikai eljárások és reagenskészletek az angiosztatin testfolyadékokban és szövetekben történő detektálására és mérésére, valamint az angiosztatin szövetekben és sejtekben történő lokalizálására. A találmány szerinti diagnosztikai eljárás és reagenskészlet bármilyen, a szakemberek számára ismert módon kialakítható. A találmány tárgyát képezik továbbá az angiosztatin-molekulára és annak részleteire specifikus antitestek, valamint az angiosztatinra specifikus antitestek kötődését gátló antitestek. Ezek az antitestek poliklonálisak vagy monoklonálisak lehetnek. Az angiosztatinra specifikus antitestek diagnosztikai reagenskészletekben felhasználhatók az angiosztatin jelenlétének és mennyiségének kimutatására, ami a rák vagy más, angiogenezis-közvetítette betegség előfordulása vagy kiújulása szempontjából kórmeghatározó vagy előrejelző szerepet tölt be. Az angiosztatinra specifikus antitesteket embereknek vagy állatoknak az angiosztatinnal szembeni passzív immunizálás céljából is beadhatjuk, csökkentve ezáltal az angiogenezis gátlását.

A találmány tárgyát képezik továbbá diagnosztikai eljárások és reagenskészletek olyan antitestek jelenlétének és mennyiségének kimutatására, amelyek a testfolyadékokban angiosztatinhoz kötődnek. A találmány szerinti diagnosztikai eljárás és reagenskészlet bármilyen, a szakemberek számára ismert módon kialakítható.

Szintén a találmány tárgyát képezik az anti-angiosztatin-receptor-specifikus antitestek, amelyek

angiosztatin-receptorhoz kötődnek, a sejt számára megfelelő jelet továbbítanak, és agonistaként vagy antagonistaként működnek.

A találmány tárgyát képezik továbbá az angiosztatin peptid-fragmensek és -analógok, amelyek - az angiosztatin-kötőhelyek (többek között, pozitronemissziós tomográfiával, autoradiográfiával, áramlásos citometriával, radioreceptor-kötési vizsgálatokkal vagy immunhisztokémiai módszerrel végzett) detektálására és láthatóvá tételére történő alkalmazás érdekében - radioaktív izotópokkal vagy más molekulákkal, illetve proteinekkal jelölhetők.

A találmány szerinti angiosztatin-peptidek és -analógok az angiosztatin-receptor agonistáiként és antagonistáiként is működnek, s ezáltal fokozzák vagy blokkolják az angiosztatin biológiai aktivitását. Az ilyen peptideket angiosztatin-receptor izolálására alkalmazzuk.

A találmány tárgyát képezik továbbá a citotoxikus ágensekhez kapcsolt angiosztatin, angiosztatin-fragmensek, angiosztatin-antiszérumok, angiosztatin-receptor-agonisták és angiosztatin-receptor-antagonisták, melyek gyógyászati és kutatási területen alkalmazhatók. Más megvalósítási módokban, gyógyászati készítmények előállítására érdekében, az angiosztatint, angiosztatin-fragmenseket, az angiosztatin-antiszérumokat, az angiosztatin-receptor-agonistákat és az angiosztatin-receptor-antagonisták gyógyászati szempontból elfogadható hordozókkal - és adott esetben hosszan tartó kibocsátást biztosító vegyületekkel

vagy készítményekkel (pl. biológiailag lebontható polimerekkel) - elegyítjük.

Szintén a találmány tárgyát képezik az angiosztatin transzkripciójában és transzlációjában közreműködő ribonukleinsavak és dezoxiribonukleinsavak molekuláris próbái, amelyek lehetővé teszik az angiosztatin-bioszintézis szövetekben és sejtekben történő detektálását.

A fentiek értelmében, célul tűztük ki egy angiosztatint tartalmazó készítmény létrehozását.

Célul tűztük ki továbbá, hogy eljárást fejlesszünk ki angiogenezis által közvetített betegségek és folyamatok kezelésére.

További célul tűztük ki egy - az angiosztatin jelenlétének és mennyiségének testfolyadékban vagy szövetben történő kimutatására alkalmas - diagnosztikai vagy prognosztikus eljárás és reagenskészlet kialakítását.

Célul tűztük ki továbbá, hogy eljárást és készítményt fejlesszünk ki angiogenezis-közvetítette betegségek és folyamatok - pl., többek között, hemangioma, kemény tumorok, vérből származó tumorok, leukémia, metasztázis, hajszálértágulat (telangiectasia), pikkelysömör, scleroderma, gennykeltő granuloma, miokardiális angiogenezis, Crohn-betegség, plakk-neovaszkularizáció ("plaque neovascularization"), szívkoszorúér-oldalágak ("coronary collaterals"), agyi oldalágak ("cerebral collaterals"), arteriovenosus képződési zavarok ("malformation"), isémiás végtag angiogenezis, szaruhártya-betegségek, rubeosis, neovascularis glaucoma, retinopathia

diabetica, retrolentalis fibroplasia, arthritis, diabetes-es neovascularisatio, foltos degeneráció ("macular degeneration"), sebgyógyulás, gyomor-nyombél-nyelőcső-fekély, *Helicobacter*-rel kapcsolatos betegségek, törések, keloidok, érképződés, vérképződés, ovuláció, menstruáció, placentáció és "macskakarmolás láz" ("cat scratch fever") - kezelésére.

További célul tűztük ki, hogy készítményeket alakítsunk ki rák növekedésének kezelésére vagy gátlására.

Célul tűztük ki továbbá olyan vegyületek előállítását, amelyek modulálják vagy utánozzák az angiosztatint *in vivo* vagy *in vitro* termelő enzimek termelődését, illetve aktivitását.

Egy másik célként angiosztatin vagy anti-angiosztatin antitestek kialakítását tűztük ki célul, melyet oly módon végzünk, hogy olyan emberbe vagy állatba, akinek (amelynek) ilyen angiosztatin vagy anti-angiosztatin antitestre van szüksége, közvetlenül angiosztatin-DNS-t injektálunk.

Célul tűztük ki továbbá, hogy eljárást fejlesszünk ki angiosztatinra specifikus antitest testfolyadékban való jelenlétének kimutatására és mennyiségi meghatározására.

További célul tűztük ki olyan készítmény előállítását, amely angiosztatin elleni - az angiosztatin-molekula specifikus régióira szelektív - antitesteket tartalmaz, melyek a plazminogént nem ismerik fel.

Célul tűztük ki továbbá, hogy eljárást fejlesszünk ki rák detektálására és előrejelzésére.

További célul olyan készítmény előállítását tűztük ki, amely az angiosztatin kötődési helyeinek *in vivo* és *in vitro* láthatóvá tételére és mennyiségi meghatározására alkalmazható.

Célul tűztük ki továbbá, hogy olyan készítményt állítsunk elő, amely az angiosztatin-bioszintézis kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmazható.

Célul tűztük ki továbbá egy olyan terápia kifejlesztését, amely rák gyógyítására alkalmas, és amely minimális mellékhatásokkal jár.

Célul tűztük ki továbbá, hogy előállítsunk egy készítményt, amely citotoxikus ágenshez kapcsolt angiosztatint vagy angiosztatin-peptidet tartalmaz, és amely rák növekedésének kezelésére vagy gátlására alkalmazható.

További célul tűztük ki, hogy eljárást fejlesszünk ki az angiosztatinnal kapcsolatos készítmények specifikus helyszínekre történő, irányított bevitelére.

Célul tűztük ki továbbá, hogy olyan készítményeket és eljárásokat dolgozzunk ki, amelyek hatásosan alkalmazhatók az érképző folyamatok befolyásolását célzó génterápiában.

A találmány tárgyai, sajátosságai és előnyei a feltárt megvalósítási módok részletes leírása, illetve az igénypontok alapján nyilvánvalóak lesznek.

A következőkben az ábrák rövid ismertetését írjuk le.

Az 1. ábrán a teljes egér plazminogén aminosav-szekvenciáját (1. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be.

A 2. ábrán az egér angiosztatin szekvenciájának elejét (2. azonosítószámú szekvencia) mutatjuk be, és összehasonlításként, egymás alatt elrendezve, bemutatjuk a megfelelő humán (3. azonosítószámú szekvencia), rhesus-majom (4. azonosítószámú szekvencia), sertés (5. azonosítószámú szekvencia) és szarvasmarha (6. azonosítószámú szekvencia) plazminogén-peptidfragmenseket.

A 3. ábrán a tüdőben lévő tumorsejtek BrdU jelölőindexét mutatjuk be (primer tumor jelenlétében, ill. hiányában).

A 4. ábrán a Lewis-féle primer tüdőtumor bFGF-fel serkentett angiogenezisre gyakorolt *in vivo* hatásának "Matrigel"-analízissel kapott eredményét mutatjuk be.

Az 5. ábrán Lewis-féle tüdőrákban (LLC-Low) szenvedő egerekből illetve egészséges egerekből származó szérumból dózis-reakció görbét mutatjuk be. Szarvasmarha hajszálér endoteliáris sejteket 72 órás bFGF-fel serkentett proliferációs vizsgálatban teszteltünk.

A 6. ábrán látható, hogy mind a kismértékben, mind a nagymértékben metasztatizáló tumorokat hordozó egerek hasvizében található endoteliális mitogén-aktivitás, de csak a kismértékben metasztatizáló tumort hordozó egerek szérumban található endoteliális inhibitor-aktivitás.

A 7. ábrán daganatos betegségben szenvedő állatok részlegesen tisztított szérumának vagy vizeletének C4 reverz fázisú kromatográfiával kapott profilját mutatjuk be.

A 8. ábrán az egerekben teljes plazminogén-molekulával, a humán plazminogén I. lizin-kötőhelyének aktív frakciójával, daganatos egerek koncentrált vizeletével, illetve egészséges egerek koncentrált vizeletével 13 napig kezelt egerekben a felületi tüdő metasztázisok számát mutatjuk be.

A 9. ábrán teljes humán plazminogén-molekulával, az I. lizin-kötőhely készítmény aktív frakciójával, daganatos egerek koncentrált vizeletével, illetve egészséges egerek koncentrált vizeletével 13 napig kezelt egerek tüdejének tömegét mutatjuk be.

A 10. ábrán a pTrcHis vektor vázlatos szerkezetét mutatjuk be.

A 11. ábrán a (10 literes fermentációban) *E. coli* által expresszált humán angiosztatin "immunoblot"-analízisének eredményét mutatjuk be. A vizsgálat során próbaként a humán plazminogén 1-3. "kringle"-régiója elleni monoklonális antitestet alkalmaztunk. A nyíl a rekombináns humán angiosztatint mutatja. A: 0,2 M amino-kaprónsavval eluált rekombináns angiosztatin; B: a lizin-oszlop 1 x PBS-sel végzett utolsó mosása; C: a feltárt sejtekből származó, tisztított lizátum.

A 12. ábrán a növekvő szarvasmarha endotélsejtek százalékos gátlását a törzsoldat függvényében bemutató grafikon látható. Az "A1", "A2", "B1", "B2" és "E" rekombináns klónok, melyek humán angiosztatin anti-angiogenezis aktivitást expresszálnak; A "C1", "C2", "D1" és "D2" kontrollok negatív kontroll klónok, amelyek az

angiosztatint kódoló humán DNS-szekvencia nélküli vektort tartalmazzák.

A 13. ábrán a rekombináns humán angiosztatin - szarvasmarha hajszálér endotélsejtek proliferációjára *in vivo* gyakorolt - hatását mutatjuk be.

A 14. ábrán - a primer tumor eltávolítása és sóoldattal vagy érképződést gátló aktivitású fumagillin-analóggal végzett kezelés utáni - növekedési proliferációs indexet és "apoptózis" indexet mutatjuk be.

A 15. ábrán az egerekben lévő T241 primer tumor növekedésének humán angiosztatinnal *in vivo* végzett kezeléssel (naponta két dózis, dózisonként 40 mg/kg, összesen 80 mg/kg/nap) történő gátlását mutatjuk be.

A 16. ábrán az egerekben lévő LLC-LM primer tumor növekedésének humán angiosztatinnal *in vivo* végzett kezeléssel (naponta két dózis, dózisonként 40 mg/kg, összesen 80 mg/kg/nap) történő gátlását mutatjuk be.

A 17. ábrán egy Lewis-féle tüdőrákos primer tumor eltávolításának tüdő metasztázisok növekedésére gyakorolt hatását mutatjuk be.

A 18. ábrán a tumor kivágása utáni növekedési proliferációt és apoptózis indexet mutatjuk be.

A 19. ábrán az angiosztatin-protein - beültetett T241 fibroszarkóma-sejteket hordozó - egereknek történő beadásának a teljes tumortérfogatra gyakorolt hatását mutatjuk be (az idő függvényében).

A 20. ábrán az angiosztatin-protein - beültetett Lewis-féle tüdőrák (LM) sejteket hordozó - egereknek

történő beadásának teljes tumortérfogatra gyakorolt hatását mutatjuk be (az idő függvényében).

A 21. ábrán az angiosztatin-protein - beültetett retikulum-szarkómasejteket hordozó - egereknek történő beadásának teljes tumortérfogatra gyakorolt hatását mutatjuk be (az idő függvényében).

A 22. ábrán az angiosztatin-protein - beültetett PC-3 humán prosztatarák-sejteket hordozó - immunhiányos SCID egereknek történő beadásának a teljes tumortérfogatra gyakorolt hatását mutatjuk be (24 napos időszakban az idő függvényében).

A 23. ábrán az angiosztatin-protein - beültetett MDA-MB humán emlőrák-sejteket hordozó - immunhiányos SCID egereknek történő beadásának a teljes tumortérfogatra gyakorolt hatását mutatjuk be (24 napos időszakban az idő függvényében).

A 24. ábrán az egér plazminogén-cDNS-ből származó - egér angiosztatin-proteint kódoló - egér DNS-szekvencia klónozását mutatjuk be vázlatosan. Az egér angiosztatin az egér plazminogén 1-4. "kringle"-régióit foglalja magában. A "PCR" jelentése polimeráz-láncrakció; "P1" jelentése a PCR láncindító oligonukleotid 5'-vége; "P2" jelentése a PCR láncindító oligonukleotid 3'-vége; "SS" jelentése szignálszekvencia; az "ATG" a transzlációs kezdőkodon; "TAA" a transzlációs stopkodon; "HA" jelentése a hemagglutinin-epitóp toldalék (YPYDVPDYASL); "K1", "K2", "K3" és "K4" jelentése az egér plazminogén 1., 2., 3., illetve 4. "kringle"-régiója; a "CMV" a citomegalovírus-

promóter; "T7" a baktérium fág promóter; "PA" jelentése az aktiválás előtti peptid; és "SP6" jelentése az Sp6 promóter.

A 25. ábrán a nem transzfektált sejtek (kontroll); az angiosztatint kódoló DNS-szekvencia nélküli vektorral transzfektált sejtek (vektor 5); és két, angiosztatint expresszáló klón (AST 31 és AST 37) esetében a sejtek számának - idő függvényében történő - változását mutatjuk be. A 25/A ábrán a T241 sejtek transzfektálásának eredményei, a 25/B ábrán pedig az LL2 sejtek eredményei láthatók.

A 26. ábrán az angiosztatin-klónt tartalmazó *E. coli* sejtek tenyészetéből származó tápközeg sejtszámra gyakorolt hatását mutatjuk be. A kísérlet során transzfektálatlan sejteket (kontroll); az angiosztatint kódoló DNS-szekvencia nélküli vektorral (vektor 5) transzfektált sejteket; és három angiosztatin-expresszáló klónt (AST 25, AST 31 és AST 37) vizsgáltunk. A 26/A ábrán a kontroll sejtekből és az angiosztatin-klónokból (expresszáló és nem expresszáló együtt) származó tenyésztő tápközeggel végzett inkubálás sejtszámra gyakorolt hatásait mutatjuk be. A 26/B ábrán a kontroll sejtekből; a csak vektorral transzfektált sejtekből (vektor 6) és - az egér angiosztatint expresszáló angiosztatin klónokból származó tenyésztő tápközeggel végzett inkubálás sejtszámra gyakorolt hatását mutatjuk be. A 26/C ábrán a kontroll sejtekből; és - az egér angiosztatint expresszáló - angiosztatin klónokból származó tisztított tenyésztő tápközeggel végzett inkubálás

sejtszámra gyakorolt hatását mutatjuk be (ebben a kísérletben - a lizinkötő-komponensek kinyerése érdekében - lizin-"Sepharose" oszlopon tisztított tenyésztő tápközeget alkalmaztunk).

A 27. ábrán az idő függvényében mutatjuk be - az előzetesen angiosztatint kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó, és az angiosztatin-protein expresszálására képes vektorral transzfektált - T241 fibroszarkóma-sejtek egerekbe történő beültetésének össz-tumortérfogatra gyakorolt hatását. A "nem transzfektált" csoportban változtatás nélküli T241 fibroszarkóma sejteket ültettünk az egerekbe. A "vektor 6" csoportban - az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciát nem tartalmazó - vektorral transzfektált T241 fibroszarkóma sejteket ültettünk az egerekbe. A "klón 25", "klón 31" és "klón 37" csoportban az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektált T241 fibroszarkóma-sejtek klónjait ültettük be az egerekbe.

A találmány tárgyát készítmények és eljárások képezik, melyek angiogenezis által közvetített vagy azzal kapcsolatos betegségek vagy folyamatok detektálására és kezelésére alkalmazhatók. A készítmény angiosztatinból áll, amely testfolyadékokból, többek között vérszérumból, vizeletből és hasvízből izolálható, illetve kémiai vagy biológiai eljárásokkal (pl. sejtenyésztés, rekombináns génexpresszió, peptidszintézis, a plazminogén vagy a plazmin *in vitro* enzimatis katalízise aktív angiosztatin előállítására érdekében) szintetizálhatók. A rekombináns technikák közé tartozik a DNS-forrásokból polimeráz-

láncreakcióval (PCR) végzett génamplifikáció, és az RNS-forrásokból reverz-transzkriptázos polimeráz-láncreakcióval végzett génamplifikáció. Az angiosztatin gátolja vérerek szövetekbe (pl. erek nélküli vagy erekkel átszőtt tumorokba) történő benövését.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy olyan készítmény, amely angiosztatint kódoló DNS-szekvenciát hordozó vektort tartalmaz, mely vektor - ha jelen van egy sejtben - képes az angiosztatin expresszáására. A találmány tárgyát képezi továbbá egy olyan készítmény, amely egy vektort hordozó sejtet tartalmaz, amely vektor - angiosztatint vagy annak fragmenseit vagy analógjait kódoló - DNS-szekvenciát tartalmaz, és amely - ha jelen van a sejtben - képes az angiosztatin expresszáására. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás, melynek során emberbe vagy állatba egy vektort tartalmazó sejtet ültetünk be, amelyben a vektor - angiosztatint vagy annak fragmenseit vagy analógjait kódoló - DNS-szekvenciát tartalmaz, és amely - ha jelen van a sejtben - képes az angiosztatin expresszáására.

Szintén a találmány tárgyát képezik azok a gyógyászati készítmények, amelyek angiosztatint, angiosztatin-fragmenseket, angiosztatin-antiszérumot, angiosztatin-receptor-agonistát vagy angiosztatin-receptor-antagonistát gyógyászati szempontból elfogadható hordozóval - és adott esetben tartós kibocsátást biztosító vegyületekkel vagy készítményekkel, pl. biológiailag lebontható polimerekkel - elegyítve tartalmaznak.

Közelebbről, a találmány tárgya az angiosztatin elnevezésű protein, amelynek molekulatömege hozzávetőleg 38-45 kD, és amely képes az endogén növekedési faktorok (mint pl. a bFGF) érképző aktivitásának *in vitro* gátlására. Az angiosztatin egy 38-45 kD molekulatömegű protein (redukáló poliakril-amid-gélelektroforézis alapján), és aminosav-szekvenciája lényegében hasonló a teljes egér plazminogén-molekula 98. aminosavánál kezdődő egér plazminogén-fragmenséhez. A "lényegében hasonló" kifejezés - az angiosztatin aminosav-szekvenciájára vonatkozóan - olyan aminosav-szekvenciát jelent, amely érképződést gátló (anti-angiogén) aktivitású, és molekulatömege hozzávetőleg 38-45 kD, továbbá nagyfokú szekvencia-homológiát mutat az egér plazminogén - 98. aminosavánál kezdődő - peptid-fragmensével, melynek molekulatömege 38-45 kD. A nagyfokú homológia legalább kb. 60 %-os aminosav-homológiát, előnyösen legalább kb. 70 %-os aminosav-homológiát, még előnyösebben legalább kb. 80 %-os aminosav-homológiát jelent. Ahogy a leírásban használjuk, az "endoteliális gátló aktivitás" egy molekula általános érképződést (angiogenezist) gátló képességét jelenti (például tenyészetben, fibroblaszt növekedési faktor jelenlétében szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek növekedésének gátlása).

A teljes egér plazminogén-molekula aminosav-szekvenciáját az 1. ábrán, illetve az 1. azonosítószámú szekvenciaként mutatjuk be. Az angiosztatin szekvenciája hozzávetőleg a plazminogén-molekula 98. aminosavánál

kezdődik. Az aktív humán angiosztatin a teljes humán plazminogén-molekula 97. vagy 99. aminosavánál kezdődhet. Az egérből származó angiosztatin első 339 aminosavából álló szekvenciát a 2. ábrán mutatjuk be (2. azonosítószámú szekvencia), és ezt összehasonlítjuk az emberből, rhesus-majomból, sertésből és szarvasmarhából származó plazminogének megfelelő fragmenseinek szekvenciáival (sorrendben 3., 4., 5. és 6. azonosítószámú szekvencia). Mivel e szekvenciák jóval 50 % feletti aminosav-homológiát mutatnak, érthető, hogy az angiosztatin aminosav-szekvenciája a különböző fajok között lényegében hasonló. Az angiosztatinban lévő aminosavak összes száma nem ismert pontosan, de ezt meghatározza az aktív molekula molekulatömege. A találmány szerinti angiosztatin aminosav-szekvenciája attól függően változó, hogy a plazminogén-molekula melyik fajból származik. Ilyenformán, a találmány szerinti angiosztatin, amely a humán plazminogénből származik - bár némileg más szekvenciát tartalmaz, mint az egérből származó angiosztatin - érképződést gátló (anti-angiogén) aktivitást mutat, amint azt az egér tumor modellben kimutattuk.

Az angiosztatinról kimutattuk, hogy képes az endotélsejtek növekedését *in vitro* gátolni, eközben azonban nem gátolja az egyéb sejttípusokba tartozó sejtvonalak növekedését. Részletesebben, az angiosztatinnak nincs hatása a Lewis-féle tüdőrák sejtvonalakra, a vidramenyét (*Mustela vison*) tüdő epitheliumra, a 3T3 fibroblasztokra, a szarvasmarha aorta símaizomsejtjeire, a szarvasmarha retina

pigment-epitheliumra, az MDCK sejtekre (kutyavese epithelium), WI38 sejtekre (humán magzati tüdőfibroblasztok), EFN sejtekre (egér magzati fibroblasztok) és LM sejtekre (egér kötőszövet). Daganatot hordozó egérben az endogén angiosztatin hozzávetőleg 10 mg/testtömeg-kilogramm szisztémás koncentrációban hatásos a metasztázisok gátlásában.

Az angiosztatin specifikus háromdimenziós konformációjú, melyet a plazminogén-molekula "kringle"-régiója határoz meg [Robbins, K.C.: "The plasminogen-plasmin enzyme system" Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Practice, 2. kiadás, szerk.: Colman, R.W. és mtsai., J.B. Lippincott Company, 340-357. old., (1987)]. A plazminogén-molekula N-terminális részében öt ilyen "kringle"-régió található, melyek konformációs szempontból rokon motívumok. Úgy tartjuk, hogy az angiosztatin háromdimenziós konformációja az 1., 2. és 3. "kringle"-régiót, valamint a 4. "kringle"-régió egy részét foglalja magában. A plazminogén-molekula minden egyes "kringle"-régiója hozzávetőleg 80 aminosavat és 3 diszulfidkötést tartalmaz. Erről a cisztein-motívumról ismeretes, hogy más - biológiai aktivitást mutató - proteinekben is megtalálható. E proteinek közé tartozik - többek között - a protrombin, a hepatocita növekedési faktor, a "scatter" faktor és a makrofágstimuláló protein [Yoshimura, T. és mtsai.: J. Biol. Chem. 268(21), 15461 (1993)]. Valamennyi olyan - *in vivo* érképződést gátló aktivitást mutató - izolált proteint vagy peptidet a találmány tárgyának

tekintünk, amelyre háromdimenziós "kringle"-szerű konformáció vagy cisztein-motívum jellemző.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás az angiosztatin testfolyadékokban és szövetekben (betegségek, pl. rák diagnosztizálása és előrejelzése céljából) történő detektálására. A találmány tárgyát képezi továbbá egy eljárás az angiosztatin kötőhelyeinek és receptorainak sejtekben és szövetekben történő detektálására. A találmány tárgyát képezik továbbá eljárások érképzési betegségek és folyamatok (például, többek között arthritis és tumorok) kezelésére vagy megelőzésére, melyek során serkentjük az angiosztatin termelődését, és/vagy a páciensnek lényegében tisztított angiosztatint vagy angiosztatin-agonistát vagy angiosztatin-antagonistát és/vagy angiosztatin antiszérumot vagy angiosztatin antiszérum elleni antiszérumot adunk be. Az egyéb kezelési módszerek közé tartozik a - citotoxikus ágensekhez kapcsolt - angiosztatin, angiosztatin-fragmensek, angiosztatin-analógok, angiosztatin antiszérum vagy angiosztatin-receptor-agnisták vagy -antagonisták beadása. Tudni kell, hogy az angiosztatin egyaránt lehet állati vagy humán eredetű. Az angiosztatint kémiai úton vagy (expressziós rendszerekkel kombinált) rekombináns technológiával mesterségesen is előállíthatjuk, ezenkívül, előállíthatjuk enzimátikus módszerekkel is, melyek során az izolált plazminogént vagy plazmint enzimátikusan hasítva érképződést gátló aktivitást mutató peptideket állítunk elő. Az angiosztatin a plazminogént angiosztatinná hasító endogén enzimek működését utánzó vegyületek alkalmazásával

is előállítható. Az angiosztatin termelődését a plazminogénhasító enzimek aktivitását befolyásoló vegyületekkel is módosíthatjuk.

Az érképződés-függő folyamatok (pl. a reprodukció, fejlődés, sebgyógyulás, szövetregeneráció) módosítása érdekében - az angiosztatint specifikusan kötő antitestek alkalmazásával - passzív antitest-terápia alkalmazható. Ezenkívül, az endogén angiosztatin-antiszérum angiosztatint kötő képességének blokkolása érdekében az angiosztatin-antitestek Fab-régiói ellen irányuló antiszérumok alkalmazhatók.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy génterápiás eljárás, melynek során egy páciensben az angiosztatint kódoló gént szabályozzuk. A DNS - géntermék protein expresszálása érdekében - sejtekbe történő bevitelének (más néven a génterápia) különböző módszereit ld.: Yang, N.: Crit. Rev. Biotechn. 12(4), 335 (1992); melyet teljes egészében a kitanítás részének kell tekinteni]. A génterápia során - ex vivo vagy in vivo terápiában történő alkalmazáshoz - a DNS-szekvenciákat szomatikus sejtekbe vagy csíravonal sejtekbe visszük be. A génterápia célja a gének helyettesítése, normális vagy abnormális génfunkciók fokozása és fertőző betegségek vagy más kóros állapotok leküzdése.

Az ilyen orvosi problémák génterápia alkalmazásával történő megoldásának stratégiái közé tartoznak az olyan gyógyászati stratégiák, melyek során azonosítjuk a hibás gént, majd - a hibás gén funkciójának pótlása vagy egy

csekély mértékben működőképes gén működésének fokozása érdekében - egy működőképes gént viszünk be; illetve a megelőzési stratégiák, melyek során egy kívánt proteint kódoló gént viszünk be, s az általa kódolt géntermék "kezeli" a betegséget vagy fogékonyabbá teszi a szövetet vagy szervet a kezelésre. A megelőzési stratégia egyik példaként említjük azt az esetet, amikor egy gént, pl. angiosztatint kódoló gént viszünk be a páciensbe, s ezáltal megakadályozzuk az érképződés előfordulását. Egy másik példa szerint olyan gént viszünk be a páciensbe, amely a tumorsejteket érzékenyebbé teszi a sugárzásra, s ezt követően a tumor besugárzásával a tumorsejtek fokozott mértékű pusztulása érhető el.

A találmány leírásában az angiosztatin-DNS vagy az angiosztatin regulátor-szekvenciák bevitelének számos eljárását megemlítjük. Az angiosztatinnal normális esetben specifikusan kapcsolatban állótól eltérő promóter-szekvenciák vagy más (az angiosztaton-protein termelődését fokozni képes) szekvenciák transzfekcióját szintén a génterápiás eljárások közé soroljuk. E technológia egyik példája a Transkaryotic Therapies, Inc.-nél (Cambridge, Massachusetts) található, ahol egy "genetikai kapcsoló" (amely a sejtekben egy eritropoietin-gént kapcsol be) inszertálása érdekében homológ rekombinációt alkalmaznak [ld. Genetic Engineering News (1994. április 15.)]. Az ilyen "genetikai kapcsolók" felhasználhatók az angiosztatin (vagy az angiosztatin-receptor) aktiválására olyan

sejtekben, amelyek nem expresszálják normálisan az angiosztatint (vagy az angiosztatin-receptort).

A génterápiás célokra alkalmas génbeviteli eljárások három nagy csoportba sorolhatók: fizikai (pl. elektroporáció, közvetlen génbevétel és részecskebombázás); kémiai (lipid alapú hordozók vagy más, nem virális vektorok alkalmazása); és biológiai eljárások (víruseredetű vektor és receptor felvétel). Nem virális vektorokként például DNS-sel bevont liposzómák alkalmazhatók. Az ilyen liposzóma/DNS-komplexek intravénásan közvetlenül a páciensbe injektálhatók. Úgy tartjuk, hogy a liposzóma/DNS-komplexek a májban koncentrálnak, ahol a DNS-t átadják a makrofágoknak és a Kupffer-sejteknek. Ezek a sejtek hosszú életűek, így a bevitt DNS hosszan tartó expresszióját biztosítják. Ezenkívül, a gént tartalmazó vektorok vagy a "csupasz" DNS (irányított bevétel céljából) közvetlenül a kívánt szervbe, szövetbe vagy tumorba injektálható.

A génterápiás eljárások a bevétel helye alapján is jellemezhetők. A génbevétel alapvető módjai az *ex vivo*, az *in vivo* és az *in vitro* génbevétel. Az *ex vivo* génbevétel esetében a sejteket kivesszük a páciensből, és sejttenyészetben növesztjük, majd a DNS-t a sejtekbe transzfektáljuk, a transzfektált sejteket felszaporítjuk, majd visszaültetjük a páciensbe. Az *in vitro* génbevétel esetében transzformált sejtekként tenyészetben növesztett sejteket alkalmazunk, amelyek nem az adott páciens sejtjei. Ezeket a "laboratóriumi sejteket" transzfektáljuk, és a

transzfektált sejteket a páciensbe történő beültetésre vagy más alkalmazásokra szelektáljuk, és szaporítjuk.

Az *in vivo* génbevétel során a DNS-t a páciens sejtjeibe visszük be, mely sejtek a páciens testében helyezkednek el. Az e célra alkalmas módszerek közé tartozik a vírusközvetítette génbevétel, amikor a gén bejuttatásához nem fertőző vírust alkalmazunk; illetve a csupasz DNS - a páciens egy adott testrészébe vagy szervébe történő - injektálása. Ezen eljárások eredményeként a DNS-t a sejtek egy bizonyos hányada veszi fel, és ezekben a sejtekben a géntermék protein expresszálódik. Ezenkívül, az itt leírt egyéb eljárások (mint például a "génágyú" alkalmazása) szintén felhasználhatók az angiosztatin-DNS vagy az angiosztatin regulátor-szekvenciák *in vitro* inszertálásához.

A génterápia kémiai eljárásai közé tartozik a lipidalapú vegyületek - nem feltétlenül liposzómák - alkalmazása a DNS sejtmembránon történő átjuttatása céljából. A lipofektinek vagy citofektinek (lipidalapú pozitív ionok, amelyek negatív töltésű DNS-hez kötődnek) olyan komplexet alkotnak, amely képes áthatolni a sejtmembránon, és a DNS-t a sejt belsejébe juttatja. Egy másik kémiai eljárás a receptoron alapuló endocitózist foglalja magában, melynek során egy specifikus ligandumot egy sejtfelületi receptorhoz kötünk, beburkoljuk, és átvisszük a membránon. A ligandum kötődik a DNS-hez, és a teljes komplex bejut a sejtbe. A ligandum/gén-komplexet a véráramba injektáljuk, és a receptort hordozó célsejtek

specifikusan megkötik a ligandumot, és a ligandum/DNS-komplex bejut a sejtbe.

Sok génterápiás eljárásban a gének sejtekbe történő bevitele céljából vírusvektorok alkalmazhatók. Például, a módosított retrovírus-vektorokat *ex vivo* eljárásokban gének perifériás és tumorba beszivárgó limfocitákba, hepatocitákba, epidermális sejtekbe, miocitákba vagy más szomatikus sejtekbe történő bevitelére alkalmazhatók. Ezek a módosított sejtek később bevihetők a páciensbe, hogy a bevitt DNS génterméke expresszáldjon.

A gének *in vivo* módszerekkel történő bevitele céljából vírusvektorok is alkalmazhatók. Az idegen gének szövet-specifikus expressziójának irányítása érdekében cisz-működésű regulátor-elemek vagy promóterek (melyekről ismert, hogy szövet-specifikusak) alkalmazhatók. Ez más módon a DNS vagy a vírusvektorok specifikus anatómiai helyszínekre *in vivo*, *in situ* bevitelével valósítható meg. Például, a véredényekben *in vivo* történő génbevittelt úgy valósítottuk meg, hogy az artéria falának kiválasztott helyeire *in vitro* transzdukált endotélsejteket ültettünk be. A vírus megfertőzte a környező sejteket, melyek ezután szintén expresszálták a génterméket. Az *in vivo* helyszínen közvetlenül vírusvektort is bevihetünk, például katéter alkalmazásával, ami lehetővé teszi, hogy a vírus csupán bizonyos területeket fertőzzön meg, és hogy hosszú időtartamú, hely-specifikus génexpresszió következzen be. A retrovírus-vektorokkal végzett *in vivo* génbevittelt emlőszövetben és májszövetben is alkalmazható (a módosított

vírus szóban forgó szervekbe vezető vérerekbe történő injektálásával).

A génterápiás eljárásokban alkalmazott vírusvektorok közé tartoznak - nem kizárólagosan - a retrovírusok, egyéb RNS-vírusok (pl. poliovírus vagy Sindbis-vírus), adenovírus, adenovírussal rokon vírusok, herpes-vírusok, SV40, vaccinia-vírus és más DNS-vírusok. A replikáció tekintetében hibás eger retrovírus-vektorok a legszélesebb körben alkalmazott génbeviteli vektorok. Az eger leukémia retrovírusok egyszálú RNS-t tartalmaznak, amely sejtmagi "core"-proteinnel és polimeráz (pol) enzimekkel alkotott komplexként van jelen, és amelyet egy protein-"core" burkol be és glikoprotein-burok ("envelope") (env) vesz körül, ami meghatározza a lehetséges gazdákat. A retrovírusok genomiális struktúrája gag-, pol- és env-génekből áll, melyeket az 5' és 3' hosszú terminális ismétlődés ("long terminal repeat"; LTR) szegélyezi. A retrovirális vektorrendszerek azt a tényt használják ki, hogy egy - az 5'- és 3'-LTR-t, valamint a "csomagoló" ("packaging") szignált tartalmazó - minimálvektor elégséges a vektor csomagolásához, a fertőzéshez és a célsejtekbe történő beépüléshez, feltéve, hogy a virális strukturális proteinek a "packaging" sejtvonalban *in trans* vannak biztosítva. A génbevétel szempontjából a retrovírus-vektorok alapvető előnyei közé tartozik a hatékony fertőzés és génexpresszió (a legtöbb sejttípusban), a vektor pontos, egykópiás integrálódása a célsejt kromoszómális DNS-ébe, valamint a retrovírus genom egyszerű manipulálhatósága.

Az adenovírus lineáris, kétszálú DNS-t tartalmaz, amely "core"-proteinekkal alkot komplexet, és "capsid"-proteinek veszik körül. A molekuláris virológia eredményei lehetővé tették, hogy ezen organizmusok biológiáját - új genetikai szekvenciák *in vivo* célsejtekbe történő transzdukciójához alkalmas - vektorok előállításához használjuk ki. Az adenovíruson alapuló vektorok a géntermékeket magas szinten expresszálják. Ezek a vektorok - alacsony vírustiter esetében is - igen hatékony fertőzőképességet mutatnak. Ezenkívül, a vírus sejtmentes virionként teljes mértékben fertőzőképes, így termelő sejtvonalak injektálására nincs szükség. Az adenovírus-vektorok egy másik előnye azon képességük, hogy a heterológ gének hosszú időtartamú expresszióját képesek megvalósítani *in vivo*.

A DNS-bevitel mechanikai eljárásai közé tartozik a fúzióra képes lipidgömbök (pl. liposzómák vagy más, membránfúzióra képes gömbök) alkalmazásával vagy kationos lipidet (pl. lipofektin) tartalmazó lipid/DNS-részecskék alkalmazásával végzett bevitel; a DNS polilizin-közvetítette bevitele; a DNS közvetlen injektálása (pl. a DNS csírasejtekbe vagy szomatikus sejtekbe történő mikroinjektálása); DNS-sel bevont részecskék pneumatikus módszerrel történő bevitele (pl. aranyrészecskék génágyúval végzett bevitele; valamint a szervetlenkémiai módszerek, mint pl. a kalcium-foszfátos transzfekció. Egy másik eljárás, a ligandum-közvetítette génterápia során a DNS-t specifikus ligandumokkal komplexé alakítva ligandum/DNS-

konjugátumokat hozunk létre, s ezek alkalmazásával a DNS-t specifikus sejtekbe vagy szövetbe irányítjuk.

Azt találtuk, hogy plazmid-DNS izomsejtekbe történő injektálása nagy százalékban eredményez transzfektált sejteket, és a markergének hosszan tartó expresszióját biztosítja. A plazmid DNS-e vagy beépül a sejt genomjába, vagy nem. Ha a transzfektált DNS nem integrálódik, a transzfekció és a géntermék expressziója a véglegesen differenciált, nem proliferálódó szövetekben hosszú idő át játszódik le, anélkül, hogy tartani kellene a celluláris vagy mitokondriális genomban előforduló inszercióktól, delécióktól vagy más változásoktól. A gyógyhatású gének hosszú ideig tartó - de nem feltétlenül állandó - bevitele a specifikus sejtekbe genetikai betegségek kezelésére vagy megelőzési célokra alkalmazható. A géntermék szintjének fenntartása érdekében - a recipiens sejtek genomjában előforduló mutációk kiküszöbölésével - a DNS adott időközönként újrainjektálható. Amennyiben az idegen DNS-ek nem integrálódnak, lehetőség nyílik arra, hogy egyetlen sejten belül több különböző, exogén DNS-konstrukció legyen jelen, melyek mindegyike különböző géntermékeket expresszál.

A részecske-közvetítette génbeviteli eljárásokat először növényi szövet transzformálásához alkalmazták. A DNS-sel bevont, nagy denzitású részecskék (pl. arany vagy volfrám) nagy sebességre (ami lehetővé teszi a megcélzott szervekbe, szövetekbe vagy sejtekbe való behatolást) történő felgyorsításához részecskebombázó berendezéssel

vagy "génagyúval" hajtóerőt hozunk létre. A részecskebombázás - a DNS sejtekbe, szövetekbe vagy szervekbe történő bejuttatása céljából - *in vitro* rendszerekben vagy *ex vivo* és *in vivo* technikák felhasználásával alkalmazható.

A génbevitelhez alkalmazott elektroporáció során elektromos áramot használunk, hogy a sejteket vagy szöveteket fogékonnyá tegyük az elektroporációs génbevitelre. Egy membrán permeabilitásának (a DNS-molekulák sejtbe történő bejutásához megfelelő mértékű) növelése érdekében adott térerejű, rövid elektromos impulzust alkalmazunk. Ez az eljárás - a DNS sejtekbe, szövetekbe vagy szervekbe történő bevitele céljából - *in vitro* rendszerekben, valamint *ex vivo* és *in vivo* technikákkal együtt alkalmazható.

A hordozó-közvetítette génbevétel *in vivo* idegen DNS sejtekbe történő bejuttatására alkalmazható. A hordozó/DNS-komplex könnyen bejuttatható a testfolyadékokba vagy a véráramba, majd helyspecifikusan a megcélzott szervbe vagy szövete irányítható. Erre a célra liposzómák és polikationok (pl. polilizin, lipofektinek vagy citofektinek) egyaránt alkalmazhatók. Kialakíthatunk sejt- vagy szövetspecifikus liposzómákat, ami lehetővé teszi, hogy a liposzóma által szállított idegen DNS-t a célsejtek vegyék fel. Az immun-liposzómák - melyek bizonyos sejteken található specifikus receptorra irányulnak - injektálása kényelmes eljárásként alkalmazható a DNS - receptort hordozó - sejtekbe történő juttatására. Hordozórendszerként

az asialoglikoprotein/polilizin-konjugátumrendszer is alkalmazható, amely a DNS hepatocitákba *in vivo* történő bejuttatására alkalmas.

A transzfektált DNS egyéb típusú hordozókkal is komplexé alakítható, oly módon, hogy a DNS a recipiens sejtbe szállítódjon, és a citoplazmában vagy a nukleoplazmában maradjon. A DNS - speciálisan kialakított vezikula-komplexekben - sejtmagi hordozóproteinekhez kapcsolható, és közvetlenül a sejtmagba vihető be.

Az angiosztatin génszabályozása olyan vegyületek beadásával valósítható meg, amelyek kötődnek az angiosztatin-génhez, az angiosztatin-génnel kapcsolatos szabályozórégiókhoz vagy a megfelelő RNS-transzkriptumhoz, módosítva ezáltal a transzkripciót vagy a transzlációt. Ezenkívül, angiosztatint kódoló DNS-szekvenciával transzfektált sejteket is beadhatunk a páciensnek, hogy *in vivo* angiosztatin-forrást biztosítsunk. E célból, például, a sejtek angiosztatint kódoló nukleinsav-szekvenciát tartalmazó vektorral transzfektálhatók.

Az itt használt "vektor" kifejezés olyan hordozót jelent, amely olyan specifikus nukleinsav-szekvenciákat tartalmaz (vagy olyan specifikus nukleinsav-szekvenciákkal áll kapcsolatban), amelyeknek az a funkciója, hogy a specifikus nukleinsav-szekvenciákat egy sejtbe szállítsák. A vektorok példái közé tartoznak a plazmidok és a fertőzőképes mikroorganizmusok (pl. vírusok), illetve a nem virális vektorok (mint pl. a ligandum/DNS-konjugátumok, liposzómák és lipid/DNS-komplexek). Az angiosztatin

expresszálására képes expressziós vektor kialakításához szükség lehet arra, hogy az angiosztatin DNS-szekvenciáját tartalmazó rekombináns DNS-molekula expressziós szabályozó-szekvenciákhoz működőképesen legyen kapcsolva. Transzfektált sejtekként alkalmazhatók a páciens normális szöveteiből vagy beteg szöveteiből származó sejtek, illetve nem a páciensből származó sejtek is.

Például, egy páciensből eltávolított tumorsejtek a találmány szerinti angiosztatin expresszálására képes vektorral transzfektálhatók, majd visszajuttathatók a páciensbe. A transzfektált tumorsejtek olyan mennyiségű angiosztatint termelnek a páciensben, ami gátolja a tumor növekedését (a páciens lehet ember vagy állat). A sejtek vektor alkalmazása nélkül, illetve ismert fizikai és kémiai eljárásokkal (pl. elektroporációval, ionoporációval vagy "génágyú" alkalmazásával) is transzfektálhatók. Az angiosztatin-DNS-t - hordozó nélkül - közvetlenül is injektálhatjuk a páciensbe, közelebbről, bőrbe, izomba vagy vérbe.

Az angiosztatin páciensbe történő transzfektálásával végzett génterápiás eljárás során az angiosztatin-DNS-t beépíthetjük a sejtek genomjába, minikromoszómákba, illetve - a sejt citoplazmájában vagy nukleoplazmájában elkülönülten elhelyezkedő - replikálódó vagy nem replikálódó DNS-konstrukcióként vihetjük be a sejtbe. Az angiosztatin-expresszió hosszú ideig folytatódhat, illetve - a sejtben, szövetben, szervben vagy a vérben - az angiosztatin-protein kívánt szintjének fenntartása

érdekében az angiosztatin-DNS szabályos időközönként injektálható.

Az angiosztatin HPLC-C4 oszlopon izolálható (ld. 3. táblázat). Az angiosztatin-protein acetonitril-gradiensben 30-35 %-nál eluálódik. Redukáló feltételekkel végzett nátrium-dodecil-szulfát-poliakril-amid-gélelektroforézissel (SDS-PAGE) az aktivitást mutató proteinsáv egyetlen, hozzávetőleg 38 kD-nak megfelelő csúcsként eluálódik.

Kimutattuk, hogy egy növekvő primer tumor kapcsolatban áll az endoteliális sejtproliferáció specifikus inhibitora(i) - köztük az angiosztatin, amely egy metasztázison belül képes az angiogenezis gátlására, s ezáltal a metasztázis növekedésének gátlására - véráramba történő felszabadulásával. A primer tumorról összefüggő angiosztatin forrását nem ismerjük; termelődhet a plazminogén - specifikus proteáz általi - lebontásával vagy egy angiosztatint kódoló specifikus gén expressziójával.

Egy primer tumor angiogén fenotípusa az angiogén peptidek endotélsejt-inhibitorokhoz (melyeket a normális sejtek feldolgoznak, de a daganatképződés során termelődésük alulszabályozott) képest feleslegben történő termelődése esetében valósul meg. Míg az angiosztatin termelődése egy adott tumorsejtben - a eredeti sejttípusban megfigyelhető termelődéshez képest - alulszabályozott lehet, a teljes tumor által feldolgozott inhibitor összes mennyisége elegendő lehet ahhoz, hogy bejusson a keringésbe, s ezáltal távoli mikrometasztázisokban gátolja az endoteliális növekedést. Az angiosztatin lényegesen

hosszabb ideig marad a keringésben, mint a primer tumor által kibocsátott angiogén peptid(ek). Ennek megfelelően, úgy tűnik, hogy az angiogén peptidek lokálisan, míg az angiosztatin globálisan hat, és viszonylag hosszú felezési idővel a vérben kering. Az angiosztatin felezési ideje hozzávetőleg 12 órától 5 napig terjed.

Bár nem kívánunk a következő feltevéshez ragaszkodni, úgy véljük, hogy amikor egy tumor angiogén fenotípusúvá válik, egy vagy több angiogén peptidet (pl. aFGF, bFGF, VEGF, IL-8, GM-CSF, stb.) szabadít fel, melyek lokálisan hatnak, extravaszkuláris irányból a primer tumor közelében lévő endotéliumot célozzák meg, és nem keringenek (vagy rövid felezési idővel keringenek) a véráramban. Ezeknek az angiogén peptideknek olyan mennyiségben kell termelődniük, hogy képesek legyenek az endotélsejt-inhibitorok (az angiogenezis inhibitorai) működésének elfojtására, ami lehetővé teszi, hogy egy primer tumor növekedhessen. Amikor egy ilyen primer tumor jól növekszik, folyamatosan endotélsejt-inhibitorokat bocsát ki a keringésbe. E feltevés szerint ezek az inhibitorok a primer tumortól bizonyos távolságban hatnak, a metasztázisok hajszálér-endotéliumát intravaszkuláris irányból célozzák meg, és folyamatosan keringenek a véráramban. Ilyenformán, amikor egy távoli metasztázisban beindul az angiogenezis, a közelében lévő hajszálér-endotéliumot gátolhatja a beáramló angiosztatin.

Amikor egy primer tumor megfelelő méretet ért el ahhoz, hogy folyamatosan angiosztatint bocsásson ki a

vérkeringésbe, egy második metasztázis (vagy mikrometasztázis) már nehezen jön létre, illetve nehezen fokozza saját angiogenezisét. Amennyiben - röviddel a primer tumor áttételeződése után - egy második metasztázis jön létre (például a bőr alatti térben, a szaruhártyában vagy intravénásan a tüdőben), a primer tumor nem lesz képes gátolni a szekunder tumort, mivel a szekunder tumorban az angiogenezis már megindult. Ha egyszerre két tumorból alakul ki áttétel (pl. ellenkező oldalon), az inhibitorok egyforma gátló hatást fejthetnek ki egymásra.

A találmány szerinti angiosztatin

(i) érképződés elleni terápiaként beadható daganatos betegségben szenvedő embereknek vagy állatoknak;

(ii) előrejelző (prognózis) markerként emberi vagy állati szérumban, vizeletben vagy szövetekben nyomon követhető; és

(iii) felhasználható rákos páciensek szérumának és vizeletének hasonló angiosztatikus molekulákra történő vizsgálatára.

Az angiosztatin a páciensek testfolyadékaiból, például véreből vagy vizeletéből is izolálható, továbbá előállítható rekombináns DNS-technikák vagy szintetikus peptidkémiai eljárások alkalmazásával is, melyek a szakemberek számára jól ismertek. A proteintisztítási eljárások szintén jól ismertek. Az angiosztatin tisztításának és inhibitor-aktivitása vizsgálatának speciális példáját az alábbi példákban írjuk le. Az endogén

humán angiosztatin izolálását hasonló eljárásokkal valósítjuk meg.

Az angiosztatin rekombináns DNS-technikák alkalmazásával végzett előállításának egyik eljárása a következő lépésekből áll: (1) a fentebb leírt (és az alábbiakban részletezett) módon angiosztatint azonosítunk és tisztítunk; (2) meghatározzuk a tisztított inhibitor N-terminális aminosav-szekvenciáját; (3) az angiosztatin-szekvenciához szintetikus módszerekkel 5'- és 3'-primereket (láncindító oligonukleotidokat) állítunk elő; (4) az angiosztatin génszekvenciát polimeráz enzim alkalmazásával amplifikáljuk; (5) az amplifikált szekvenciát megfelelő vektorba, például expressziós vektorba inszertáljuk; (6) a gént tartalmazó vektort bevisszük egy organizmusba vagy más - a gént expresszálni képes - expressziós rendszerbe; és (7) izoláljuk a rekombináns módon termelődött inhibitort. Az alkalmas vektorok közé virális, bakteriális és eukarióta (pl. élesztő) vektorok tartoznak. A fenti eljárás részletesebb leírása laboratóriumi kézikönyvekben található meg [ld. pl. Sambrook és mtsai.: "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. kiadás, Cold Spring Harbor Press (1989)]. A humán plazminogén DNS-szekvenciáját már korábban leírták [Browne, M.J. és mtsai.: Fibrinolysis 5(4), 257 (1991)], és azt a kitanítás részének kell tekinteni.

Az angiosztatint kódoló gén - nagy mennyiségű angiosztatint expresszáló sejtekből vagy szövetből (pl. tumorsejtekből) - is izolálható; ennek során (1) a szövetből hírvivő-RNS-t (mRNS) izolálunk; (2) reverz

transzkriptáz alkalmazásával előállítjuk a megfelelő DNS-szekvenciát; és (3) az aktív angiosztatin aminosav-szekvenciáját kódoló DNS-szekvenciát - megfelelő láncindítók alkalmazásával - polimeráz-láncreakcióval (PCR) amplifikáljuk.

Az angiosztatin vagy biológiailag aktív fragmensei előállításának további módszere a peptidszintézis. Ha - az alábbiakban részletesebben leírt - vizsgálati rendszer alkalmazásával biológiailag aktív angiosztatin-fragmenst találunk, szekvenciáját, például automatizált peptid-szekvenálási eljárásokkal meghatározhatjuk. Más módon, az angiosztatint kódoló gén vagy DNS-szekvencia izolálása esetén a DNS-szekvenciát határozhatjuk meg, például jól ismert manuális vagy automatizált szekvenálási eljárásokkal. A nukleinsav-szekvencia végül is az aminosav-szekvenciára vonatkozó információkat nyújt. Ilyenformán, ha a biológiailag aktív fragmenst specifikus eljárásokkal (pl. tripszines emésztéssel) előállítottuk vagy a fragmens N-terminálisát megszekvenáltuk, a maradék aminosav-szekvencia a megfelelő DNS-szekvencia alapján határozható meg.

Ha a peptid aminosav-szekvenciája ismert, a fragmenst jól ismert eljárások alkalmazásával szintetizálhatjuk [ld. pl. E. Atherton és R.C. Sheppard: "Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, Oxford, Anglia]. Hasonlóan, előállíthatunk több fragmenst is, melyeket azután nagyobb fragmensekké kapcsolunk össze. Az ilyen szintetikus peptid-fragmensek - az agonista- vagy antagonistá-aktivitás *in vitro* vagy *in vivo* tesztelése

érdekében - különböző aminosav-szubsztitúciók beiktatásával is előállíthatók. A szövetekhez való kötődés tekintetében nagy affinitást mutató peptid-fragmensek az angiosztatin-receptor affinitási oszlopon végzett izolálásához alkalmazhatók. Az angiosztatin-receptor izolálása és tisztítása alapvető lépést képez az angiosztatin hatásmechanizmusának értelmezése felé. Az angiosztatin-receptor izolálása és az angiosztatin-agonisták és antagonisták azonosítása elősegíti az angiosztatin-receptor aktivitást módosító gyógyszerek kifejlesztését. A receptor izolálása eredményeként olyan nukleotid-próbák állíthatók elő, amelyekkel - *in situ* és oldathibridizációs technika alkalmazásával - nyomon követhető a receptor elhelyezkedése és szintézise. Ezenkívül, az angiosztatint kódoló gén izolálható, expressziós vektorba foglalható és sejtekbe (például a páciens tumorsejtjeibe) transzfektálható, ami fokozza a sejttípus, szövet vagy tumor angiosztatint megkötő és helyi angiogenezist gátló képességét.

Az angiosztatin hatásosan alkalmazható olyan betegségek vagy folyamatok kezelésére, amelyeket az angiogenezis közvetít vagy amelyekben az angiogenezis szerepet játszik. A találmány tárgyát képezi egy eljárás angiogenezis-közvetítette betegség kezelésére, melynek során az angiosztatin vagy biológiailag aktív fragmense vagy az angiosztatin-fragmensek kombinációi (melyek együttesen érképződést gátló aktivitást mutatnak) vagy az angiosztatin-agonisták és -antagonisták hatásos mennyiségét alkalmazzuk. Az angiogenezis-közvetítette betegségek közé

tartoznak - nem kizárólagosan - a kemény tumorok; a vérből származó tumorok, mint pl. a leukémia; a tumor metasztázisok; a jóindulatú tumorok, pl. a hemangiomák, a hallóideg daganatai, neurofibromák, trachomák és gennykeltő granulomák; rheumatoid arthritis; pikkelysömör; szemmel kapcsolatos érképzési betegségek, pl. retinopathia diabetica, koraszülöttséggel kapcsolatos retinopathia, foltos degeneráltság; beültetett idegen szaruhártya kilökődése, neovaszkuláris glaucoma, retrolentális fibroplasia, rubeosis; Osler-Weber szindróma; szívizom angiogenezis: plakk neovaszkularizáció; telangiectasia; vérzékeny ízületek; angiofibroma; és sebgranuláció. Az angiosztatin hatásosan alkalmazható az endotélsejtek felesleges vagy abnormális serkentésével kapcsolatos betegségek kezelésére. E betegségek közé tartoznak - nem kizárólagosan - a béladhéziók, Crohn-betegség, atherosclerosis, scleroderma és a hipertrófiás hegek, azaz a keloidok. Az angiosztatin születésszabályozó szerként is alkalmazható, mivel megakadályozza az embrió beágyazódásához szükséges érképződést. Az angiosztatin hatásosan alkalmazható olyan betegségek kezelésére is, amelyekben az angiogenezis kóros következményként van jelen; ilyen például a "macskakarmolás" betegség (*Rochele minalia quintosa*) és a fekélyek (*Helicobacter pylori*).

Az angiosztatin szintetikus peptidfragmensei számos alkalmazási területen felhasználhatók. Az angiosztatin-receptorhoz nagy specifitással és aviditással kötődő peptidet radioaktív izotóppal jelöljük, és -

autoradiográfiás és membránkötési technikák alkalmazásával - a kötőhelyek láthatóvá tételére és mennyiségi meghatározására alkalmazzuk. Ez az alkalmazás jelentős diagnosztikai és kutatási eszközt biztosít. Az angiosztatin-receptor kötődési tulajdonságainak ismerete elősegíti a receptorral kapcsolatos transzdukciós mechanizmus vizsgálatát.

Ezenkívül, a rövid felezési idejű izotópokat tartalmazó jelölő angiosztatin-peptidek - pozitronemissziós tomográfia vagy más modern radiográfiás technikák alkalmazásával - lehetővé teszik a receptorkötő-helyek *in vivo* láthatóvá tételét, miáltal lokalizálhatók az angiosztatin-kötőhelyeket tartalmazó tumorok.

A szintetizált peptidekben az aminosavak szisztematikus szubsztitúciója az angiosztatin-receptor nagy affinitású peptid-agonistáit és -antagonistáit eredményezi, melyek fokozzák vagy csökkentik az angiosztatin receptorához történő kötődését. Az ilyen agonistákat a mikrometasztázisok növekedésének gátlására alkalmazzuk, ami korlátozza a rák elterjedését. Az angiosztatin antagonistáit elégtelen érképződés esetében - az angiosztatin gátló hatásainak blokkolása és az érképződés fokozása érdekében - alkalmazzuk. Például, ez a kezelés gyógyászati hatást biztosíthat cukorbetegség sebgyógyulásában.

Az angiosztatin-peptideket a tenyésztet tumorsejtekből származó angiosztatin-receptor izolálására alkalmas affinitási oszlopok kifejlesztésére is felhasználjuk. Az

angiosztatin-receptor izolálása és tisztítása után meghatározzuk aminosav-szekvenciáját, és az így kapott információk alapján azonosíthatjuk és izolálhatjuk az angiosztatin-receptort kódoló gént vagy géneket. Ezután, a receptor expresszálására képes vektorokba történő inszertáláshoz klónozott nukleinsav-szekvenciákat alakítunk ki. Ezek a technikák a szakemberek számára jól ismertek. Az angiosztatin-receptort kódoló nukleinsav-szekvencia (szekvenciák) tumorsejtekbe történő transzfekciója és a receptor - transzfektált tumorsejtekben bekövetkező - expressziója fokozza e sejtek fogékonyságát az endogén vagy exogén angiosztatinra, s ezáltal csökkenti a metasztázisok növekedésének sebességét.

Az angiosztatinhoz és a nagy affinitású angiosztatin-peptidfragmensekhez citotoxikus ágenseket (pl. ricinust) kapcsolhatunk, miáltal eszközt biztosítunk az angiosztatint megkötő sejtek elpusztítására. Az ilyen sejtek számos helyszínen megtalálhatók, például - nem kizárólagosan - a mikrometasztázisokban és primer tumorokban. A citotoxikus ágensekhez kapcsolt peptideket infúzióval, a kívánt helyre történő maximális bevitelhez kialakított módon adjuk be. Például, a ricinushoz kötött, nagy affinitású angiosztatin-fragmenseket a megcélzott helyet ellátó erekbe (vagy közvetlenül a célzott helyre) csatlakoztatott kanülön keresztül adjuk be. Az ilyen szereket - infúziós kanülökhöz csatlakoztatott - ozmotikus pumpák alkalmazásával, szabályozott módon is beadhatjuk. A szövet érzékelésének fokozása érdekében angiosztatin-antagonisták kombinációját

az angiogenezis stimulátoraival együttesen alkalmazhatjuk. Ez a gyógykezelési mód hatásos eszközt biztosít a metasztázisos rák elpusztítására.

Az angiosztatint - betegségek kezelése céljából - más készítményekkel és eljárásokkal együtt is alkalmazhatjuk. Például, egy tumort hagyományos módon, sebészeti úton, sugárkezeléssel vagy angiosztatinnal kombinált kemoterápiával kezelhetünk, majd a páciensnek - a mikrometasztázisok nyugvó állapotának meghosszabbítása, valamint a maradék primer tumor stabilizálása és növekedésének gátlása érdekében - angiosztatint adhatunk be. Ezenkívül, az angiosztatin, angiosztatin-fragmensek, angiosztatin-antiszérum, angiosztatin-receptor-agonisták, angiosztatin-receptor-antagonisták vagy ezek kombinációi gyógyászati szempontból elfogadható hordozókkal - és adott esetben tartós kibocsátást biztosító anyaggal, pl. biológiailag lebontható polimerekkel - kombinálva gyógyászati készítmények előállításához alkalmazható.

Ahogy itt használjuk, a "tartós kibocsátást biztosító anyag" kifejezés olyan anyagot jelent, amely enzimátikus vagy savas/bázisos hídolízissel vagy oldódással lebontható anyagokból, rendszerint polimerekből áll. Amikor ezt az anyagot bevisszük a testbe, az enzimek és a testfolyadékok kifejtik rá hatásukat. Tartós kibocsátást biztosító anyagként előnyösen biokompatibilis anyagokat alkalmazunk, például liposzómákat, polilaktidokat (a tejsav polimerei), poliglikolidokat (a glikolsav polimerei), polilaktid-koglikolidot (tejsav és glikolsav kopolimere),

polianhidrideket, poli(orto)észtereket, polipeptideket, hialuronsavat, kollagént, kondroitin-szulfátot, karbonsavakat, zsírsavakat, foszfolipideket, poliszacharidokat, nukleinsavakat, poliaminosavakat, aminosavakat (pl. fenilalanint, tirozint, izoleucint), polinukleotidokat, polivinil-propilént, polivinil-pirrolidont és szilikont. Biológiaiilag lebontható anyagként előnyösen polilaktidot, poliglikolidot vagy polilaktid-koglikolidot (tejsav és glikolsav kopolimere) alkalmazunk.

A találmány szerinti, angiogenezist módosító gyógyászati készítmény előállítható szilárd, folyékony vagy aeroszol alakban, és bármilyen ismert beadási módon adagolható. A szilárd gyógyászati készítmények példái közé tartoznak a pirulák, krémek és a nem beültethető egységdózisok. A pirulák orálisan, a gyógyászati krémek helyileg alkalmazhatók. A nem beültethető egységdózisokat helyileg, például a tumorba adhatjuk be. A beültethető egységdózisokat - az angiogenezist módosító gyógyászati készítmény szisztémás kibocsátása érdekében - például szubkután ültethetjük be. A folyékony készítmények példái közé tartoznak a szubkután, intravénás vagy intraartériás injektáláshoz kialakított készítmények, illetve a helyi és intraokuláris beadáshoz alkalmas készítmények. Az aeroszol készítmények példái közé tartozik a tüdőbe történő beadáshoz alkalmas inhaláló készítmények.

A találmány szerinti angiosztatin felhasználható az angiosztatinra és receptorára specifikus antitestek előállítására is. Az antitestek egyaránt lehetnek

poliklonálisak vagy monoklonálisak. Ezek az antitestek, melyek specifikusan kötődnek az angiosztatinhoz vagy az angiosztatin-receptorokhoz, a szakemberek által jól ismert diagnosztikai eljárásokban és reagenskészletekben az angiosztatin vagy angiosztatin-receptorok testfolyadékban vagy szövetben történő detektálására és mennyiségi meghatározására alkalmazhatók. Az ilyen tesztekben származó eredmények felhasználhatók egy rák vagy más, angiogenezis-közvetítette betegség előfordulásának vagy visszatérésének diagnosztizálására, illetve előrejelzésére.

Az angiosztatin alkalmazható az angiosztatinhoz kötődni képes antitestek kimutatására és mennyiségi meghatározására alkalmas diagnosztikai eljárásban és reagenskészletben is. Az ilyen reagenskészletek lehetővé teszik a vérkeringésben lévő - a primer által *in situ* szekretált angiosztatin jelenlétében a mikrometasztázisok elterjedését jelző - angiosztatin-antitestek kimutatását. A keringésükben ilyen anti-angiosztatin-antitesteket hordozó páciensekben nagyobb valószínűséggel alakulnak ki többszörös tumorok és rákok, és a kezelések vagy az átmeneti javulás után nagyobb valószínűséggel újul ki a rák. Az ilyen anti-angiosztatin-antitestek Fab-fragmensei antigénekként alkalmazhatók az anti-angiosztatin Fab-fragmens antiszérum előállításához, amely viszont az anti-angiosztatin-antitestek semlegesítésére alkalmazható. Az ilyen eljárással csökkenthető a keringésben lévő angiosztatin - anti-angiosztatin-antitestek hatására

történő - megsemmisülése, ezáltal hatásosan növelhető a keringésben lévő angiosztatin szintje.

Szintén a találmány tárgyát képezi egy eljárás a feleslegben lévő endogén angiosztatin működésének blokkolására, melynek során egy embert vagy állatot a rendszerben nem kívánatos angiosztatinra specifikus antitestekkel passzívan immunizálunk. Ez a kezelés abnormális ovuláció, menstruáció, méhlepényképződés és érképződés kezelésében jelentős, továbbá hatásos eszközt biztosít az angiosztatin eltávolításának metasztázisos folyamatokra gyakorolt hatásának vizsgálatában. Az angiosztatin-antitestek Fab-fragmense tartalmazza az angiosztatinkötő-helyet. Ezt a fragmenst a szakemberek számára jól ismert eljárásokkal izolálhatjuk az angiosztatin-antitestekből. Az angiosztatin antiszérum Fab-fragmenseit anti-Fab-fragmens-szérum termeléséhez antigénként alkalmazzuk. Az angiosztatin-antitest Fab-fragmense elleni antiszérum infúzióval történő beadása megakadályozza, hogy az angiosztatin az angiosztatin-antitestekhez kötődjön. Az angiosztatin anti-angiosztatin-antitest Fab-fragmenséhez történő kötődésének blokkolásával semlegesítjük az endogén anti-angiosztatin-antitesteket. E kezelés tiszta hatása az, hogy fokozzuk a keringésben található angiosztatin célsejteket elérő képességét, ami csökkenti a metasztázisok szétterjedését.

A találmány tárgyába tartozónak tekintünk minden olyan angiosztatin-származékot, amely endoteliális gátló aktivitást mutat. Ennek megfelelően, a találmány tárgyát

képezi a teljes angiosztatin-protein, az angiosztatin-protein származékai, valamint biológiailag aktív fragmensei. Ezek közé tartoznak az angiosztatin-aktivitást mutató proteinek, amelyek aminosav-szekvenciájukban szubsztitúciókat, vagy az aminosavakhoz kapcsolódva cukrokat vagy egyéb molekulákat tartalmaznak. Szintén a találmány tárgyát képezik az angiosztatint és az angiosztatin-receptort kódoló gének, valamint az ilyen gének által expresszált proteinek.

Az angiosztatin-aktivitást mutató proteinek és protein-fragmensek izolált és lényegében tisztított proteinekként, illetve protein-fragmensekként - a szakemberek számára ismert eljárások alkalmazásával előállított - gyógyszerészeti szempontból elfogadható készítményekben alkalmazhatók. Az ilyen készítmények standard módon adhatók be. A készítmények általában topikálisan, transzdermálisan, intraperitoneálisan, intrakraniálisan, intracerebroventrikulárisan, intracerebrálisan, intravaginálisan, méhen keresztül, orálisan, rektálisan vagy parenterálisan (pl. intravénásan, intraspinálisan, szubkután vagy intramuszkulárisan) alkalmazhatók. Az angiosztatin ezenkívül biológiailag lebontható polimerekbe is foglalható, amelyek a vegyület tartós kibocsátását teszik lehetővé. A polimerek annak a helynek a közelébe ültethetők be, ahol a gyógyszer jelenlétére szükség van (pl. tumor közelébe), illetve beültethetők úgy is, hogy az angiosztatin lassú, szisztémás kibocsátását biztosítsák. Az angiosztatin nagy

koncentrációjának megfelelő helyre (kanülön keresztül, például közvetlenül a metasztázisba vagy a tumort ellátó erekbe) történő bevitele érdekében ozmotikus minipumpák is alkalmazhatók. A biológiailag lebontható polimerek és alkalmazásuk részletes leírását ld. Brem és mtsai.: J. Neurosurg. 74, 441 (1991) (melyet teljes terjedelmébe a kitanítás részének kell tekinteni).

A találmány szerinti angiosztatin adagolása a kezelni kívánt betegségtől vagy állapottól és más klinikai tényezőktől függ, például a páciens testtömegétől és kondíciójától, valamint a vegyület beadásának módjától. Emberek és állatok kezeléséhez hozzávetőleg 0,5 mg/kg és 500 mg/kg angiosztatin adható be. Az angiosztatin - kezelt állatban vagy emberben érvényes - felezési idejétől függően napi több alkalomtól heti egy alkalomig terjedő gyakorisággal adhatjuk be. Tudni kell, hogy a találmány szerinti megoldás humán és állatgyógyászatban egyaránt alkalmazható. A találmány szerinti eljárások egyszeri vagy többszöri beadásokat foglalhatnak magukban, melyek egyidejűleg vagy hosszabb időközönként végezhetők.

Az angiosztatin-készítmények közé tartoznak az orális, rektális, nazális, topikális (bukkális és szublingvális), intrauterin, vaginális vagy parenterális (pl. szubkután, intraperitoneális, intramuszkuláris, intravénás, intradermális, intrakraniális, intratracheális és epidurális), valamint a szembe (sugártestbe vagy szemcsarnokba) történő beadáshoz alkalmas készítmények. Az angiosztatin-készítményeket előnyösen egységdózis alakban

alkalmazzuk, melyek hagyományos gyógyszerészeti eljárásokkal állíthatók elő. Az ilyen eljárások során az aktív alkotórészt először érintkezésbe hozzuk a gyógyszerészeti hordozókkal vagy kötőanyagokkal. Általában a készítményeket úgy állítjuk elő, hogy az aktív alkotórészt egyenletesen és alaposan összekeverjük a folyékony hordozóval vagy a finom porrá aprított szilárd hordozóval (vagy mindkettővel), majd, ha szükséges, a terméket megfelelő alakúvá formázzuk.

A parenterális beadáshoz alkalmas készítmények közé tartoznak a vizes és nem vizes alapú, steril injektálható oldatok, melyek tartalmazhatnak antioxidánsokat, puffereket, bakteriosztatikumokat, valamint olyan oldott anyagokat, amelyek a készítményt a kezelni kívánt páciens vérével izotóniássá teszik. Az ilyen készítmények közé tartoznak még a vizes vagy nem vizes alapú steril szuszpenziók, melyek szuszpendálószerkeket és sűrítőanyagokat tartalmazhatnak. Az ilyen készítmények egy vagy több dózist tartalmazó tartályokba, például lezárt ampullákba és fiolákba tölthetők, és fagyasztva szárított (liofilizált) állapotban tárolhatók, melyekhez közvetlenül a felhasználás előtt steril folyékony hordozót, például injekcióhoz alkalmas vizet kell adni. Steril porokból, granulátumokból és tablettákból azonnali felhasználáshoz való injekciós oldatok és szuszpenziók állíthatók elő.

Az előnyös egységdózis készítmények a beadni kívánt hatóanyag egy napra való dózisát vagy egységét, napi részdózisát vagy megfelelő részét tartalmazzák. Tudni kell,

hogy a találmány szerinti készítmények - a fentebb említett összetevőkön kívül - tartalmazhatnak egyéb, az adott készítmény típusát illetően hagyományos anyagokat is. Az angiosztatin-proteinekkal (vagy biológiai aktivitást mutató peptid-fragmenseivel), adott esetben, citotoxikus ágensek kombinálhatók, ami kettős gyógyhatást eredményez.

A találmány szerinti, angiogenezist gátló peptidek standard mikrokémiai eljárással szintetizálhatók, és tisztaságuk HPLC-vel és tömegspektroszkópiával ellenőrizhető. A peptidszintézis, a HPLC-tisztítás és a tömegspektroszkópia eljárásai a szakemberek számára általánosan ismertek. Az angiosztatin-peptidek és az angiosztatin-receptorok rekombináns *E. coli* vagy élesztő expressziós rendszerekben is előállíthatók, és oszlopkromatográfiával tisztíthatók.

Különböző területeken történő alkalmazás céljából a teljes angiosztatin-molekula különböző peptid-fragmensei szintetizálhatók; például - nem kizárólagosan - specifikus antiszérum kifejlesztéséhez alkalmas antigének; az angiosztatin-kötőhelyeknél aktív agonisták és antagonisták; és az angiosztatint megkötő sejteket elpusztító citotoxikus ágensekhez kapcsolt (vagy azokkal kombinálva alkalmazott) peptidek. A ilyen peptideket alkotó aminosav-szekvenciákat a molekula külső régióiban (melyek az antiszérum-kötődés szempontjából elérhetőek) elfoglalt pozíciójuk alapján választjuk ki. A molekula N- és C-terminálisait, illetve középső régióját a szintetizálni kívánt fragmensek külön-külön reprezentálják.

Ezeket a peptid-szekvenciákat aminosav-szekvencia adatbázisok (GenBank, Brookhaven Protein, SWISS-PROT, PIR) alkalmazásával ismert szekvenciákkal hasonlítjuk össze, hogy meghatározzuk a lehetséges szekvencia-homológiákat. Ez az információ lehetővé teszi, hogy kihagyjuk azokat a szekvenciákat, amelyek más molekulákkal nagyfokú szekvencia-homológiát mutatnak, ezáltal növeljük a nagy specifitású antiszérumok, angiosztatin-agonisták és antagonisták kialakításának lehetőségét.

Az angiosztatin és az angiosztatin-peptidek - standard eljárások alkalmazásával - más molekulákhoz kapcsolhatók. Az angiosztatin N- és C-terminális-szekvenciája egyaránt tartalmaz tirozint és lizint, melyek izotópokkal vagy más anyagokkal, különféle technikákkal jelölhetők, például hagyományos eljárással végzett radioaktív izotópos jelöléssel (tirozin: klór-amin-T, jodogén, laktoperoxidáz; lizin: Bolton-Hunter-reagens). Ezek a jelölési technikák a szakemberek számára jól ismertek. Más lehetőség szerint, a tirozint vagy lizint nem tartalmazó fragmensekhez - a peptid reaktív amino- és hidroxilcsoportjai jelölésének elősegítése érdekében - tirozint vagy lizint adhatunk. A kapcsoláshoz alkalmazott technikát az aminosavakon rendelkezésre álló funkciócsoportok (pl. többek között, amino-, szulfhidril-, karboxil-, amid-, fenil- vagy imidazolcsoport) alapján választjuk ki. A kapcsolási reakciók megvalósításához, többek között, glutáraldehidet, diazotált benzidint, karbodiimidet és p-benzo-kinont alkalmazhatunk.

Az angiosztatin-peptidek különböző alkalmazások céljából izotópokhoz, enzimekhez, hordozó proteinekhez, citotoxikus ágensekhez, fluoreszcens molekulákhoz, kemilumineszcens, biolumineszcens és más vegyületekhez kapcsolhatók. A kapcsolási reakció hatékonyságát az adott reakcióra specifikus eljárásokkal határozzuk meg. Például, egy angiosztatin-peptid ^{125}I -izotóppal történő radioaktív jelölését klór-amin-T és nagy specifikus aktivitású Na^{125}I alkalmazásával valósítjuk meg. A reakciót nátrium-metabiszulfit hozzáadásával állítjuk le, és az elegyet eldobható oszlopokon sótalanítjuk. A jelölt peptidet eluáljuk az oszlopról, és a frakciókat összegyűjtjük. Mindegyik frakcióból alikvotokat veszünk ki, és radioaktivitásukat gammaszámlálóban mérjük. Ezzel a módszerrel a reakcióba nem lépett Na^{125}I elválasztható a jelölt angiosztatin-peptidtől. A legnagyobb specifikus radioaktivitást mutató peptid-frakciókat további felhasználásig (pl. az angiosztatin-antiszérumhoz való kötődési képesség vizsgálatáig) tároljuk.

A peptid konjugációjának másik alkalmazási területe a poliklonális antiszérum előállítás. Például, lizint tartalmazó angiosztatin-peptideket - glutáraldehid alkalmazásával - tisztított szarvasmarha szérumalbuminhoz kapcsolunk. A reakció hatékonyságát a radioaktívan jelölt peptid beépülésének mérésével határozzuk meg. A reakcióba nem lépett glutáraldehidet és peptidet dialízissel különítjük el. A konjugátumot későbbi felhasználásig tároljuk.

Az angiosztatin, angiosztatin-analógok, angiosztatin-peptidfragmensek és angiosztatin-receptor ellen antiszérumot állíthatunk elő. A peptid szintézise és tisztítása után, a szakemberek által jól ismert eljárásokkal, monoklonális és poliklonális antiszérumot állíthatunk elő. A poliklonális antiszérum például nyulakban, juhokban, kecskében vagy más állatokban állítható elő. A hordozómolekulához (például szarvasmarha szérumalbuminhoz) konjugált angiosztatin-peptideket vagy magát az angiosztatint adjuvánseleggyel keverjük össze, emulgeáljuk, majd szubkután, több helyre beadjuk az állatok hátába, nyakába, horpaszába, és néha, mancsába. Szabályos időközönként, pl. minden második vagy negyedik héten, emlékeztetőoltásokat adunk. Minden egyes injekció után 7-10 nappal - például a marginális fülvénából - vénapunkcióval vért veszünk. A vérmintákat 4 °C-on egy óra hosszat hagyjuk megalvadni, majd 4 °C-on kb. 30 percig, hozzávetőleg 2400 x g-vel centrifugáljuk. A szérumot eltávolítjuk, alikvotokra osztjuk, és a közvetlen felhasználásig 4 °C-on, illetve későbbi felhasználásig -20 °C-tól -90 °C-ig terjedő hőmérsékleten tároljuk.

Az antitest-titer meghatározása érdekében, poliklonális antiszérum esetében a szérummintákat, monoklonális antiszérum esetében pedig a tápközegmintákat vizsgáljuk. Az antitest-titer többféleképpen is meghatározható, például "dot-blot"-analízissel vagy denzitás-analízissel, továbbá radioaktívan jelölt peptid-antitest-komplexek - protein-A, másodlagos antiszérum,

hideg etanol vagy faszén-dextrán alkalmazásával végzett - kicsapásával, majd az aktivitás gammaszámlálóban végzett mérésével. A legnagyobb titert mutató antiszérumot kereskedelmi forgalomban beszerezhető affinitási oszlopokon is tisztítjuk. Ennek során az angiosztatin-peptideket az affinitási oszlopban lévő gélhez kapcsoljuk, majd az antiszérum-mintákat átfolyatjuk az oszlopon, és az anti-angiosztatin-antitestek a gélhez kötődve az oszlopban maradnak. Ezeket az antitesteket elúcióval eltávolítjuk, összegyűjtjük, és meghatározzuk mennyiségüket és specifitásukat.

A legnagyobb antitest-titert mutató angiosztatin-antiszérumot az alábbiak megállapítása céljából teszteljük:

- az antigén legnagyobb specifikus kötődéséhez és legkisebb nem specifikus kötődéséhez tartozó optimális antiszérum-hígítás;
- az angiosztatin-peptid növekvő mennyiségéhez való kötődési képesség (standard kiszorításos görbén; "standard displacement curve");
- lehetséges keresztreaktivitás rokon peptidekkel és proteinekkel (beleértve a plazminogént), valamint rokon fajok angiosztatinjával;
- angiosztatin-peptidek kimutatásának képessége plazmakivonatban, vizeletben, szövetekben és sejttenyészeti tápközegben.

Az angiosztatin és az angiosztatin-receptor mérésére alkalmas reagenskészletek szintén a találmány tárgyát képezik. A legnagyobb titert és specifitást mutató, illetve plazmakivonatban, vizeletben, szövetekben és sejttenyészeti tápközegben angiosztatin-peptidek kimutatására alkalmas

antiszérumokat tovább vizsgáltuk, hogy olyan reagenskészleteket hozzunk létre, amelyek lehetővé teszik az angiosztatin gyors, megbízható, érzékeny és specifikus mérését és lokalizálását. E reagenskészletek közé tartoznak - többek között - a kompetitív és nem kompetitív vizsgálatokban, radioimmun-vizsgálatokban, biolumineszcens és kemilumineszcens vizsgálatokban, fluorometriás vizsgálatokban, "sandwich"-vizsgálatokban, immunradiometrai vizsgálatokban, "dot-blot"-analízisekben és enzimkött vizsgálatokban (beleértve az ELISA-analízist), mikrotiter-tálcás vizsgálatokban, a vizelet vagy vér gyors ellenőrzésére alkalmas, antitestbevonatú lemezcsík vagy pálca alkalmazásával végzett vizsgálatokban és immuncitokémiai vizsgálatokban alkalmazható reagens-készletek. Valamennyi reagenskészlet esetében meg van állapítva a tartomány, az érzékenység, a pontosság, a megbízhatóság, a specifitás és a reprodukálhatóság. A vizsgálaton belüli és a vizsgálatok közötti variáció a standard kiszorítási vagy aktivitási görbén 20, 50 és 80 százalékpontnál van megállapítva.

A kutatásban és a gyógyászatban általánosan alkalmazott egyik vizsgálati készlet a radioimmunológiai vizsgálati (RIA; "radioimmunoassay") reagenskészlet. Az angiosztatin-RIA reagenskészletet az alábbiakban ismertetjük. Az angiosztatin vagy egy angiosztatin-peptid sikeres radioaktív jódozása és tisztítása után - megfelelő pufferrendszerben viszonylag állandó szintű radioaktivitást (pl. 10000 cpm) tartalmazó kémcsőhöz - a legmagasabb titert

mutató antiszérumot adjuk. A többi kémcső puffert vagy immunizálás előtti szérumot tartalmaz (a nem specifikus kötődés meghatározásához). 4 °C-on 24 órás inkubálás után a kémcsövekbe protein-A-t adunk, a kémcsöveket vortexezzük, majd szobahőmérsékleten 90 percig inkubáljuk, és - a jelölt antigénhez kötődött antitest komplexeinek leüleptítése érdekében - 4 °C-on, körülbelül 2000-2500 x g-vel centrifugáljuk. A felülúszót leszívással eltávolítjuk, és az üledék radioaktivitását gammaszámlálóban mérjük. Azt az antiszérum hígítást, amely a nem specifikus kötődés kivonása után a jelölt peptid hozzávetőleg 10-40 %-át köti meg, tovább karakterizáljuk.

Ezután az angiosztatin-peptid - antiszérum kialakításához alkalmazott (körülbelül 0,1 pg-tól 10 ng-ig terjedő) - hígítási tartományát úgy értékeljük, hogy a radioaktívan jelölt peptidet és az antiszérumot tartalmazó kémcsőhöz ismert mennyiségű peptidet adunk. Újabb (pl. 24 vagy 48 órás) inkubálás után protein-A-t adunk az elegyhez, a kémcsöveket centrifugáljuk, a felülúszót eltávolítjuk, majd meghatározzuk az üledék radioaktivitását. A radioaktívan jelölt angiosztatin-peptid kötődésének a jelöletlen angiosztatin-peptid (standard) által történő kiszorítása adja a standard görbét. Az angiosztatin-antiszérum specifikitásának karakterizálása érdekében különböző koncentrációkban egyéb angiosztatin-peptidfragmenseket, plazminogént, más fajokból származó angiosztatint és homológ peptideket adunk a vizsgálati kémcsövekhez.

Az angiosztatin kivonásához korábban sikeresen alkalmazott kivonási technikák alkalmazásával a különböző szövetekből - például, többek között, primer és szekunder tumorok, Lewis-féle karcinóma, angiosztatintermelő sejtek tenyészetek, méhlepény, méh és más szövetek, pl. agy, máj és bél - kivonatokat készítünk. A szövetkivonatok liofilizálása vagy "Speed Vac" kezelése után vizsgálati puffert adunk hozzájuk, és különböző alikvotokat RIA-csővekbe helyezünk. Az ismert angiosztatintermelő sejtek kivonatai adják a kiszorítási görbéket, melyek párhuzamosak a standard görbével, míg az angiosztatint nem termelő szövetek kivonatai a radioaktívan jelölt angiosztatint nem szorítják ki az angiosztatin-antiszérumból. Ezenkívül, a vizsgálati csővekbe - növekvő mennyiségben - Lewis-féle tüdőrákban szenvedő állatok vizeletének, vérplazmájának és agy-gerincvelői folyadékának kivonatait adjuk. A párhuzamos kiszorítási görbék azt jelzik, hogy az angiosztatin-vizsgálat alkalmas a szövetekben és testfolyadékokban lévő angiosztatin mérésére.

Az angiosztatint tartalmazó szövetkivonatokat reverz fázisú HPLC-vel karakterizálhatjuk tovább. Az eluátum-frakciókat összegyűjtjük, "Speed Vac" alkalmazásával szárítjuk, RIA-pufferben regeneráljuk, és az angiosztatin-RIA vizsgálatban analizáljuk. A maximális angiosztatin-immunreaktivitás az angiosztatin elúciójának megfelelő frakciókban figyelhető meg.

A vizsgálati reagenskészlet használati útmutatást, antiszérumot, angiosztatint vagy angiosztatin-peptidet, és

esetleg radioaktívan jelölt angiosztatint és/vagy a kötött angiosztatin/angiosztatin-antitest-komplex kicsapásához alkalmas reagenseket tartalmaz. A készlet az angiosztatin - daganatos vagy daganat nélküli állatokból és emberekből származó testfolyadékokban és szövetkivonatokban történő - mérésére alkalmas.

Az angiosztatin szövetekben és sejtekben történő lokalizálásához egy másik reagenskészletet alkalmazunk. Ez az immunhisztokémiai angiosztatin-reagenskészlet használati útmutatást, angiosztatin-antiszérumot, és esetleg blokkoló szérumot és fluoreszcens molekulához (pl. fluoreszcein-izotiocianáthoz) vagy más, a primer antiszérum láthatóvá tételére alkalmas reagenshez kapcsolt másodlagos antiszérumot tartalmaz. Az immunhisztokémiai eljárások a szakemberek számára jól ismertek. Az immunhisztokémiai angiosztatin-reagenskészlet lehetővé teszi az angiosztatin szövemetszetekben és tenyészetben lévő sejtekben történő - fénymikroszkópos vagy elektronmikroszkópos - lokalizálását, és kutatási és gyógyászati célokra egyaránt alkalmazható. Például, a tumorokból biopsziával vagy más módon mintát veszünk, mikrotom alkalmazásával szövetmetszeteket készítünk, és vizsgáljuk az angiosztatin-termelőzés helyszíneit. Az így kapott információk diagnosztikai - és esetleg gyógykezelési - szempontból hasznosak a rák detektálásában és kezelésében. Az angiosztatin-bioszintézis lokalizálásának egy másik módszere szerint az angiosztatin-mRNS próbáihoz radioaktív izotóppal jelölt nukleinsavakat hibridizálunk *in situ*. Az angiosztatin-receptor

lokalizálása, láthatóvá tétele és mennyiségi meghatározása immunhisztokémiai eljárásokkal hasonló módon végezhető.

A találmány szerinti megoldást a továbbiakban az alábbi példák leírásával mutatjuk be, mely példákkal semmiképpen nem szándékozunk korlátozni a találmány tárgyát. Ezzel szemben, tudni kell, hogy a különböző egyéb megvalósítási módokhoz, módosításokhoz és ezek megfelelőihez - melyek lehetősége a leírás elolvasása után a szakemberekben felmerülhet, anélkül, hogy eltérnének a találmány és az igénypontok tárgyától - segédeszközökre lehet szükség.

1. példa

Olyan állati tumorrendszer kiválasztása, amelyben a metasztázis növekedését a primer tumor gátolja, a primer tumor eltávolítása pedig felgyorsítja

Számos olyan egértumor átvizsgálása után, melyek képesek saját metasztázisaik gátlására, a Lewis-féle tüdőrákot választottunk ki, ahol a tüdő-metasztázist a primer tumor gátolja leghatásosabban. Hat hetes szingénikus hím C57BI6/J egerek hátába szubkután 1×10^6 tumorsejtet injektáltunk. A látható tumorok a 3-4. napon jelentek meg. Amikor a tumorok hozzávetőleg 1500 mm^3 térfogatot értek el, az egereket véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az első csoportban a primer tumort teljesen eltávolítottuk, míg a második csoportban - egy áloperációt követően - érintetlenül hagytuk. Bár az 500 mm^3 -tól 3000 mm^3 -ig terjedő tumorok gátolták a metasztázisokat, az 1500 mm^3 -es

méret volt a legnagyobb, amelyet még biztonságosan, nagy túlélési aránnyal el lehetett távolítani, és nem jelentek meg helyi kiújulások.

21 nap után valamennyi egeret leöltük és felboncoltuk. Azokban az egerekben, amelyekben a primer tumort sértetlenül hagytuk, +2-es látható metasztázisok voltak, míg azokban az egerekben, melyekből a tumort eltávolítottuk, ötven +5-ös metasztázist találtunk ($p < 0,0001$). Ezeket az adatokat megerősítette a tüdő tömege is, amely - amint azt korábban kimutattuk - szorosan összefügg a tumorterheléssel. Azoknak az egereknek a tüdejének nedves tömege, amelyekből a tumort eltávolítottuk, 400 %-os növekedést mutatott a sértetlen tumorú egerek tüdejéhez képest ($p < 0,0001$). Ez a kísérleti modell reprodukálható adatokat ad, és maga a kísérlet is reprodukálható. Ezt a tumort "LLC-Low" (Lewis-féle tüdőrák - kevésbé metasztázisos) jelöléssel azonosítjuk. SCID egerekben - amelyek a B- és T-limfociták tekintetében hiányosak - a tumor majdnem ugyanilyen módon gátolja a metasztázisokat.

2. példa

A Lewis-féle tüdőrák tumor olyan változatának izolálása, amely nagymértékben metasztázisos, függetlenül attól, hogy a primer tumor el van-e távolítva vagy sem

Az egyik egércsoportban az 1. példában leírt "LLC-Low" sejtvonalból spontán a Lewis-féle tüdőrák nagymértékben metasztázisos változata jött létre, melyet az 1. példában

leírtak szerint izoláltunk, és ismételten átültettünk. Ez a tumor ("LLC-High") harmincnál több látható tüdő metasztázist képez, függetlenül attól, hogy a primer tumor jelen van-e.

3. példa

A metasztázisok mérete és a bennük lévő tumorsejtek proliferációjának sebessége; a metasztázisokat gátló primer tumor hatása ("LLC-Low")

Valamennyi kísérletben C57BI6/J egereket alkalmaztunk. Az egereket szubkután "LLC-Low" sejtekkel oltottuk be, és 14 nap múlva az egerek feléből eltávolítottuk a primer tumorokat. A tumor eltávolítása után 5, 10 és 15 nappal az egereket leöltük, és a tüdő metasztázisokból szövettani metszeteket készítettünk. A sértetlen primer tumort hordozó egerek tüdejükben mikrometasztázisokat tartalmaztak, melyekben nem képződtek új erek. E metasztázisok átmérője legfeljebb 12-15 sejtréteg volt, s a tumor eltávolítása után 15 nappal sem mutattak jelentős méretnövekedést. Ezzel ellentétben, azok az állatok, amelyekből a primer tumort eltávolítottuk, már az operáció után öt nappal is nagy méretű, erekkel átszőtt metasztázisokat tartalmaztak. Ezek a metasztázisok a tumor eltávolítása utáni 15. napra további négyszeres térfogat-növekedést mutattak (a tüdő tömege és szövettana alapján). A kísérlet befejezése előtt azoknak az egereknek közel 50 %-a, melyekből eltávolítottuk a primer tumort, tüdő metasztázis miatt elpusztult. A

sértetlen primer tumorú egerek közül mindegyik életben maradt a kísérlet végéig.

A metasztázisokon belüli tumorsejtek replikációs sebességét a BrdU-val (bróm-dezoxi-uridin) (melyet előzetesen az egerekbe injektáltunk) megfestett sejtmagok számlálásával határoztuk meg. A sértetlen primer tumort hordozó állatok kisméretű, erek nélküli metasztázisaiban és primer tumor eltávolításán átesett állatok nagy, erekkel átszőtt metasztázisaiban a BrdU-t felvevő tumorsejtek százalékos aránya hasonló volt (3. ábra). Ez a megfigyelés arra utal, hogy a primer tumor jelenléte nem fejt ki közvetlen hatást a metasztázison belüli tumorsejtek replikációs sebességére.

A 3/A ábrán a tüdőben (primer tumor jelenlétében, illetve hiányában) lévő tumorsejtek BrdU-jelölési indexét mutatjuk be. Az immunhisztokémiai festést megelőzően a metszeteket - a permeabilitás növelése érdekében - 0,2 M sósavval 10 percig kezeltük, majd 37 °C-on 15 percig - 2 mM CaCl_2 -ot tartalmazó 0,2 M Tris-HCl pufferben - 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ koncentrációjú proteináz-K-val (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Németország) emésztettük. A jelölési indexet - 250 "power"-nél - a pozitív sejtmagvak százalékos arányának kiszámításával határoztuk meg. A 3/B ábrán a sértetlen primer tumort hordozó, illetve a primer tumor eltávolításán átesett egerekben - 5, 10 és 15 nappal a műtét után - a teljes tüdőtömeg összehasonlítását mutatjuk be. Az állatokat intraperitoneális BrdU injekció (0,75 mg/egér) beadása után 6 órával öltük le.

4. példa

Az angiogenezis gátlása tüdő metasztázisokban, sértetlen primer tumor jelenlétében

A tüdő metasztázisokban az érképződés mértékének mérése érdekében a szöveteket "von Willebrand"-faktor (endotélium-specifikus marker; Dako Inc., Carpinteria, CA) elleni antitestekkel festettük meg. A sértetlen tumort hordozó állatokban a metasztázisok a már létező tüdőerek körül egy vékony (8-12 sejtréteg vastagságú) "mandzsettát" alkotnak. A "von Willebrand"-faktorra - a vérerek endotélsejtjeit leszámítva - nem volt pozitív sejt (vagy csak kevés). Ezzel szemben, a primer tumor eltávolítása után az állatokban a tüdő metasztázisok nem csak nagyobbak voltak, de ráadásul - a "von Willebrand"-faktoral erőteljesen festődő - endotélsejteket tartalmazó kapilláris-kezdemenyek hatoltak beléjük.

A tüdő metasztázisokban az endotélsejtek jelenlétének immunhisztokémiai analízise során megállapítottuk, hogy a beoltás után 19 nappal a sértetlen primer tüdőtumorban - a tüdőben már meglévő hajszálér körül - tumorsejtekből álló "mandzsetta" alakult ki. A metasztázis csak 8-12 sejtréteg vastagságú volt. A hajszálér körül érképződésre nem volt bizonyíték, és nem találtunk új hajszálereket sem. Ez tipikusan az erek nélküli, érképződés előtti metasztázis maximális mérete.

A primer tumor eltávolítása után öt nappal (a primer tumor beoltása után 19 nappal) gyűjtött szövet

immunhisztokémiai analízise során azt találtuk, hogy a metasztázis egy, a tüdőben már meglévő eret vett körül. Ezzel ellentétben, abban a mintában, amelyből a tumort nem távolítottuk el, a tumorban új erek alakultak ki. Következésképpen, a sértetlen primer tumor gátolja a metasztázisokban az új hajszálerek kialakulását, de a metasztázison belüli tumorsejtek proliferációját nem befolyásolja.

5. példa

A primer tumor gátolja egy második - egér szaruhártyába ültetett - tumor angiogenezisét, miáltal a második tumor növekedése gátlás alá kerül

Egerek szaruhártyájába - a 0. napon - egy $0,25-0,5 \text{ mm}^2$ térfogatú Lewis-féle tüdőtumort ("LLC-Low") ültettünk [Muthukkaruppan, Vr. és mtsai.: Science 205, 1416 (1979)]. A szaruhártyába történő beültetés előtt 4-7 nappal; a szaruhártyába történő beültetés napján; vagy a szaruhártyába történő beültetés után 4-7 nappal - az egerek hátába szubkután 1×10^6 "LLC-Low" sejtet injektálva - primer tumort alakítottunk ki. A kontroll egerek szubkután oltást nem kaptak, csak a szaruhártyájukba ültettük be a tumort. További kontroll egerek esetében - a szaruhártyába történő beültetésen kívül -, hátukba, négy nappal a beültetés előtt "LLC-High" tumorsejteket oltottunk. Az egerek szaruhártyáiban a szaruhártyatumor növekedését, és az új hajszálerek - szaruhártya szélétől kiinduló -

növekedését fényréses lámpával felszerelt sztereomikroszkóp alkalmazásával, okulár mikrométerrel naponta mértük.

A primer szubkután tumort nem hordozó, kontroll egerek esetében a szaruhártyák többségében (nyolcból hat) - a beültetés után 6-7 nappal - megindult az érképződés, és a 10. napig folytatódott. A 10. napra az erekkel átszőtt szaruhártyatumorok nagysága elérte a szem teljes térfogatának kb. 1/4 részét. A primer szubkután "LLC-Low" tumor jelenlétében a szaruhártyába beültetett tumorban nem képződtek erek, ha a primer tumor legalább a beültetés előtt négy nappal már a helyén volt (1. táblázat). Az új erek képződésének hiányában a szaruhártyatumorok a szaruhártyán belül, vékony, fehér, erek nélküli korongok formájában lassan növekednek.

Ha azonban a primer tumort a szaruhártyába történő tumorbeültetés utáni 4. napig nem injektáltuk be, a szaruhártyákban új erek alakultak ki, és a tumorok három eset közül háromban hasonló sebességgel növekedtek, mint a tumort nem hordozó kontroll egerekben. A primer szubkután "LLC-High" tumor jelenlétében a szaruhártyák többségében (háromból kettőben) - a szaruhártyába történő tumorbeültetés utáni 7. napon - megindult az érképződés, ami a 10. napig folytatódott. A 10. napon az erekkel átszőtt szaruhártyatumorok nagysága elérte a szem teljes térfogatának kb. 1/4 részét.

1. táblázat

A szaruhártyatumor-angiogenezis gátlása primer szubkután
tumorral [valamennyi primer tumor "LLC-Low" volt, kivéve a
*-gal jelöltet (amely "LLC-High" volt)]

A szembe történő beültetés napja	0	0	0	0	0	0	0
A primer tumor beültetésének napja	-7	-4	-4*	0	-	+4	+7
A 10. napon új szaruhártya-erekkel rendelkező egerek száma	2/10	0/9	2/3	2/3	6/8	3/3	2/3

Azt várnánk, hogy abban az esetben, amikor a primer "LLC-Low" szubkután tumort a szembe történő tumorbeültetés előtt hét nappal ültettük be (a táblázatban -7), 10 szaruhártya közül egyben sem alakulnának ki erek. A tumorok közül azonban kettő (2/10) elhalt, mivel túl nagyok voltak ($> 3 \text{ cm}^3$).

6. példa

A sértetlen primer tumor gátolja a bázikus fibroblaszt
növekedési faktor (bFGF) másodlagos, szubkután
beültetésével indukált angiogenezist

Bár az 5. és 6. példában leírt kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a primer tumor gátolja egy másodlagos tumorban az angiogenezist, ezek a vizsgálatok nem adnak választ arra, hogy a primer tumor (a) közvetlenül gátolja-e az endoteliális proliferációt (vagy angiogenezist); vagy

(b) közvetett módon, a metasztázisos tumorsejtek érképző aktivitásának leszabályozásával. Ennek megválaszolása érdekében bázikus fibroblaszt növekedési faktort (bFGF) [Passaniti, A. és mtsai.: Lab. Invest. 67, 519 (1992)] tartalmazó "matrigel" beültetésével szubkután angiogenezist indukáltunk.

Heparin jelenlétében 25 ng/ml vagy 50 ng/ml bFGF-et tartalmazó "matrigel"-t (alapmembrán-proteinek kivonata) szubkután egészséges és tumoros ("LLC-Low") egerek hasi részére injektáltunk. Az egereket négy nappal később leöltük, és a gélben - az érképződés mennyiségi meghatározása érdekében - megmértük a hemoglobin koncentrációját. Korábban kimutattuk, hogy a "matrigel"-be behatoló új erek száma egyenesen arányos a hemoglobin-koncentrációval [Folkman, J.: "Angiogenesis and its inhibitors", "Important Advances in Oncology 1985", szerk.: V.T. DeVita, S. Hellman és S. Rosenberg; J.B. Lippincott, Philadelphia (1985)]. Szövetteni vizsgálathoz is készítettünk géleket. Az

A kísérlet során megfigyelt, majdnem teljes angiogenezis-gátlás arra utal, hogy a Lewis-féle primer tüdőtumor közvetlenül képes gátolni a bFGF-indukálta angiogenezist.

7. példa

Egy tumort hordozó állat szérumának - primer tumor
eltávolításán átesett - állatba történő átvitele gátolja a
metasztázisokat

Az egerekbe - a fentebb leírt módon - Lewis-féle tüdőrák sejteket ültettünk. 15 nap elteltével, amikor a tumorok hozzávetőleg 1500 mm^3 térfogatúak voltak, az egereket véletlenszerűen négy csoportba osztottuk. Három csoportban a primer tumort műtétiileg teljesen eltávolítottuk, míg az egyik csoportban a tumorokat - áloperációt követően - helyükön hagytuk. A három műtéti csoportban lévő egereknek ezután naponta, intraperitoneális injekcióval sóoldatot; egészséges, tumort nem hordozó egerekből származó szérumot; illetve 1500 mm^3 térfogatú Lewis-féle tüdőtumorsejteket hordozó egerekből származó szérumot adtunk. A sértetlenül hagyott tumorokat hordozó egereknek intraperitoneálisan sóoldatot adtunk. Valamennyi egér kezelését 21 napig végeztük, ezután az állatokat elaltattuk, és megszámoltuk tüdő metastázisaikat (2. táblázat).

2. táblázat

Primer tumor eltávolítva				Ép primer tumor
Kezelés (i.p. injekciók)	Sóoldat	Egészséges egérből származó	Tumoros egérből szérum	Sóoldat
Tüdő metasztázisok száma	55 ± 5	50 ± 4	7 ± 2	3 ± 1

Ezeket az eredményeket a tüdők tömegével igazoltuk. A két csoport közötti különbségre $p < 0,0001$ [(55 és 50) vs. (7 és 3)]. A tumoros állatok vizeletéből származó angiosztatin alkalmazásával hasonló eredményeket kaptunk.

8. példa

Szarvasmarha hajszálér-endotélsejt (BCE) vizsgálat

A BCE sejteket kizárólag a 9. és 14. passzálás között használtuk. A 0. napon a BCE-sejteket 12500 sejt/üreg mennyiségben - előzetesen 37 °C-on, 10 % CO₂-tartalmú atmoszférában zselatinnal (PBS-ben 1,5 % zselatin) kezelt - 24 üregű tálcákra helyeztük. A sejteket hematocitométer alkalmazásával számoltuk. A sejteket 10 % (56 °C-on 20 percig hővel inaktivált) borjúsérumot (BCS) és 1 % "glutamin-pen-strep"-et (GPS) tartalmazó 500 µl DMEM-ben szélesztettük.

A BCE sejtek proliferációját a következők szerint váltottuk ki. A tápközeget eltávolítottuk, és 5 % BCS-t és 1 % GPS-t tartalmazó 250 µl DMEM-mel helyettesítettük, majd

az üregekhez hozzáadtuk a tesztelni kívánt mintát (a mennyiség a mintától függően változó). A tálcákat kb. 10 percre 37 °C hőmérsékletű és 10 % CO₂-ot tartalmazó inkubátorba helyeztük. Ezután minden egyes üreghez 5 % BCS-t és 1 % GPS-t tartalmazó 250 µl DMEM-et adtunk (2 ng/ml bFGF-fel együtt). A tápközeg így 5 % BCS-t és 1 % GPS-t, valamint 1 ng/ml bFGF-et tartalmazó 500 µl DMEM lett. A tálcát 72 órára a 37 °C hőmérsékletű és 10 % CO₂-ot tartalmazó inkubátorba helyeztük.

A 4. napon eltávolítottuk a tápközeget, és valamennyi üreget 2-3 percig tripszinnel (0,5 ml tripszin/EDTA) kezeltük. A szuszpendált sejteket 9,5 ml "Hemetall"-lal együtt szcintillációs fiolákba tettük, és Coulter-számlálóval megszámloltuk. Az aktivitás egy egysége az angiosztatint tartalmazó szérum azon mennyisége, amely képes a hajszálér-endotélsejtek proliferációját 50 %-ban gátolni (ha az endotélsejteket 1 ng/ml koncentrációjú bFGF jelenlétében 72 óra hosszat inkubáltuk).

9. példa

A kevésbé metasztázisos Lewis-féle tüdőtumort ("LLC-Low") hordozó egerekből származó szérum *in vitro* gátolja a hajszálér-endotélsejtek proliferációját

A szarvasmarha hajszálér-endotélsejteket 72 órás proliferációs vizsgálatban 1 ng/ml koncentrációjú bázikus fibroblaszt növekedési faktorral (bFGF) serkentettük. A tumort hordozó egerek - tenyészetekhez hozzáadott - széruma dóziszfüggő és reverzibilis módon gátolta az endotélsejtek proliferációját. Az egészséges egerek széruma nem mutatott

gátló aktivitást (ld. 5. ábra). Az endotélsejtek proliferációját (a kontrollokhoz képest) hasonló módon gátolta a tumort hordozó nu/nu és SCID egerekből származó szérum. A primer tumor eltávolítása után az angiosztatin-aktivitás 3-5 nap alatt eltűnt a szérumból.

A tumort hordozó egerek széruma gátolta a szarvasmarha aorta-endotélsejteket és a spontán egér érendotéldaganatból származó endotélsejteket is [Obeso, és mtsai.: Lab. Invest. 63(2) 259 (1990)], de nem gátolta a Lewis-féle tüdőtumor sejteket, a 3T3-fibroblasztokat, az aorta símaizomsejtjeit, a vidramenyét (*Mustela vison*) tüdő epitélsejteket és a W138 humán magzati tüdő-fibroblasztokat.

10. példa

A - metasztázisokat nem gátló - Lewis-féle tüdőtumort ("LLC-High") hordozó egerekből származó szérum nem gátolja in vitro a hajszálér-endotélsejtek proliferációját

Az "LLC-High" primer tumorokat hordozó egerek széruma (a kontrollhoz képest) nem gátolta jelentősen a bFGF-fel stimulált szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek proliferációját. Amikor ezt a szérumot heparin-"Sepharose" kromatográfiával és gélfiltrációval tisztítottuk, angiosztatin-aktivitást egyik frakcióban sem találtunk.

11. példa

A kevésbé metasztázisos Lewis-féle tüdőtumorsejteket hordozó egerek hasvize szintén angiosztatin-szérumot termel

Az egereknek intraperitoneális injekcióval "LLC-Low" vagy "LLC-High" tumorsejteket (10^6) adtunk be, majd egy héttel később a 10-20 egér mindegyikéből 1-2 ml véres hasvizet vettünk le. A hasvízben bélfodri tumorkezdeményeket találtunk. Az egereket ezután elaltattuk, és szívpunkcióval szérumot vettünk. Kontrollként egészséges, tumort nem hordozó egerekből vettünk szérumot. A szérumot és a hasvizet - a sejtek eltávolítása érdekében - lecentrifugáltuk, és a felülúszót 1 ng/ml bFGF-fel stimulált szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek (ld. 9. példa) alkalmazásával vizsgáltuk. 72 óra elteltével mind a kétféle tumort hordozó egerekből származó hasvíz jelentős mértékben serkentette a hajszálér-endotélsejtek proliferációját (a kontrollnál 100 %-kal magasabb szintű proliferáció). Ezzel szemben, az "LLC-Low" tumort hordozó egerek széruma gátolta az endotélsejtek proliferációját (a kontroll 79 %-a). Az "LLC-High" tumort hordozó egerek széruma serkentette a proliferációt (a kontrollnál 200 %-kal magasabb szintű proliferáció).

Ezek az adatok azt mutatják, hogy a kevésbé metasztázisos ("LLC-Low") vonalból származó hasvíz sokkal több endoteliális növekedést serkentő anyagot tartalmaz, mint angiosztatint. Ez az állapot hasonló a szilárd primer tumor esetében tapasztalhatóhoz. Az angiosztatin-aktivitás a szérumban jelenik meg. Ez hasonló a szilárd primer tumor esetében megfigyelhetőhöz ("LLC-Low"). A nagymértékben metasztázisos tumort ("LLC-High") hordozó egerek hasvize

szintén döntően endotélsejt-stimulátort tartalmaz, de az ilyen egerek szérumban angiosztatin nem mutatható ki.

12. példa

Az angiosztatin - oszlopkromatográfiával végzett - frakcionálása szérumból, és a növekedést gátló frakciók vizsgálata SDS-PAGE analízissel

Az angiosztatin(ok) tisztítása érdekében tumort hordozó egerekből szérumot gyűjtöttünk. A fentebb leírt *in vitro* inhibitor-aktivitási vizsgálattal elemzett inhibitor-aktivitást - heparin-"Sepharose", Biogel AO.5mm, és (több ciklusban) C4-reverz fázisú HPLC alkalmazásával - egymást követően kromatografáltuk. Az endoteliális inhibitor-aktivitást tartalmazó HPLC-frakció SDS-PAGE analízise egy különálló sávot eredményezett, amelynek látszólagos redukált molekulatömege 38 kD, specifikus aktivitása pedig hozzávetőleg 2×10^7 volt (ami kb. egymilliószeres tisztításnak felel meg; ld. 3. táblázat). A tisztítás különböző stádiumaiban az elegyített frakciókat - specifikus antitestekkel - ismert endoteliális inhibitorok jelenlétére teszteltük. A részlegesen tisztított és a tisztított frakciókban trombocita-faktor-4-et, trombospondint vagy transzformáló növekedési faktor- β -át nem találtunk.

3. táblázat

	Specifikus aktivitás (egység*/mg)	Tisztítás (x-szeres)
Szérum	1,69	1
Heparin-"Sephrose"	14,92	8,8
Bio-gel AO.5m	69,96	41,4
HPLC/C4	2×10^7	$1,2 \times 10^6$

* Az aktivitás egy egysége az angiosztatint tartalmazó szérum azon mennyisége, amely képes a hajszálér-endotélsejtek proliferációját 50 %-ban gátolni, miután az endotélsejteket 1 ng/ml koncentrációjú bFGF jelenlétében 72 óra hosszat inkubáltuk.

13. példa

Angiosztatin oszlopkromatográfiás frakcionálása vizeletből;
a növekedést gátló frakciók vizsgálata SDS-PAGE analízissel

Az endotélsejt-inhibitor(ok) szérumból történő tisztítását megnehezíti, hogy az egyes egerekből kis térfogatú szérum nyerhető, és a szérumban nagy mennyiségű protein van jelen.

A tumort hordozó egerek vizeletét analizálva azt találtuk, hogy olyan endotélsejt-proliferációt gátló inhibitort tartalmaz, amely a nem tumoros egerek és az "LLC-High" tumorokat hordozó egerek vizeletéből hiányzik. Az endotélsejt-inhibitor aktivitás tisztítását a szérum tisztításához az előző példában leírt módon végeztük (7. ábra).

A 7. ábrán a tumoros egerekből származó részlegesen tisztított szérum, illetve vizelet C4 reverz fázisú kromatográfiájának eredményeit mutatjuk be. Valamennyi frakciót a 9. példában leírtak szerint, bFGF-fel serkentett szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek alkalmazásával végzett 72 órás proliferációs vizsgálatban analizáltuk. Mindkét esetben, a 30-35 % acetonitrilnél eluált 23. frakcióban figyeltünk meg egy jól elhatárolható gátlási csúcsot. A tumort hordozó állatok szérumának C4 reverz fázisú kromatográfiájának harmadik ciklusából származó gátló frakció SDS-poliakril-amid-gélelektroforézise kb. 38 kD-nál egyetlen sávot eredményezett.

14. példa

A keringésben található angiosztatin karakterizálása

Az endoteliális gátlást a 9. példában leírtak szerint vizsgáltuk. Az angiosztatint "Synchropak HPLC C4" oszlopon (Synchrom, Inc., Lafayette, IN) izoláltuk. Az inhibitor 30-35 % acetonitril-gradiensnél eluálódott. Redukáló feltételek (5 térfogat% β -merkaptotanol) mellett végzett SDS-PAGE analízis során az aktivitást mutató proteinsáv 38 kD-nál jelent meg. Nem redukáló feltételek mellett az aktivitást mutató protein 28 kD-nál jelent meg. Az aktivitást azonos helyen mutattuk ki, függetlenül attól, hogy a mintát vizeletből vagy szérumból izoláltuk. Aktivitást egyetlen más sáv esetében sem detektáltunk.

A sávok aktivitása melegítés (100 °C-on 10 perc) vagy tripszines kezelés hatására megszűnt. Az aktivitást mutató

sávot víz és kloroform 1:1 arányú elegyével extrahálva az aktivitás kizárólag a vizes fázisban jelent meg.

15. példa

A humán plazminogénből származó inhibitor fragmensek
tisztítása

A plazminogén I. lizinkötő-helyét a Sigma Chemical Company-től kaptuk. A készítmény - elasztázos emésztésen átesett - tisztított humán plazminogénből áll. Az így kapott I. lizinkötő-helyet olyan peptidek csoportja alkotja, amelyek a plazmin A-láncának legalább az első három triplahurok-struktúráját (1., 2. és 3. "kringle") - összekapcsolódva - tartalmazzák [Sottrup-Jensen, L. és mtsai.: "Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, 3. kötet, 191. old, szerk.: Davidson, J.F. és mtsai., Raven Press, New York (1978); és Wiman, B. és mtsai.: Biochemica et Biophysica Acta 579, 142 (1979)]. A plazminogén I. lizinkötő-helyét (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) vízben újrassuszpendáltuk, és - előzetesen 0,1 % TFA-t tartalmazó, HPLC-tisztaságú vízzel ekvilibrált - C4 reverz fázisú oszlopra vittük. Az oszlopot víz/0,1 % TFA → acetonitril/0,1 % TFA gradienssel eluáltuk, és a frakciókat polipropilén csövekbe gyűjtöttük. Mindegyik frakció egy-egy alikvotját "speed vac" alkalmazásával bepároltuk, vízben újrassuszpendáltuk, és szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek alkalmazásával proliferációs vizsgálatban analizáltuk. Ezt az eljárást az inhibitor frakciók esetében kétszer megismételtük, melyek során az elúciót az előbbivel azonos gradienssel végeztük. A C4

oszlop utolsó eluálásakor az inhibitor-aktivitás 30-35 % aceetonitril-koncentrációnál eluálódott. Az inhibitor frakció SDS-PAGE analízise három elkülönült sávot eredményezett, melyek látszólagos redukált molekulatömege 40 kD, 42,5 kD és 45 kD volt. A nem redukáló körülmények között végzett SDS-PAGE analízis három - 30 kD, 32,5 kD, illetve 35 kD molekulatömegnek megfelelő - sávot eredményezett.

16. példa

Az inhibitor-aktivitás kivonása SDS-PAGE gélről

A humán plazminogén tisztításakor kapott, tisztított inhibitor frakciókat - nem denaturáló feltételek mellett - SDS-PAGE analízissel választottuk szét. A gél azon területeit, amelyek a szomszédos (azonos mintát tartalmazó, ezüsttel festett) oszlopban ("lane") lévő sávoknak ("band") felelnek meg, kivágtuk, és 1 ml foszfát-pufferelt sóoldatot tartalmazó poliprolipén csövekben, 4 °C-on 12 óra hosszat inkubáltuk. A felülúszót eltávolítottuk, és kétszer hat óra hosszat sóoldattal szemben (MWCO = 6-8000), majd kétszer hat óra hosszat desztillált vízzel szemben dializáltuk. A dializátumot vákuumos centrifugálással bepároltuk. A visszamaradt anyagot sóoldatban újraszuszpendáltuk, és - 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktorról serkentett - szarvasmarha hajszálér-endotélsejtek alkalmazásával végzett 72 órás vizsgálatban teszteltük. Mind a három sávból kivont protein gátolta a hajszálér-endotélsejtek proliferációját.

17. példa

Plazminogén-fragmenssel végzett kezelési vizsgálatok

Egerekbe Lewis-féle tüdőtumороkat ültettünk be, és a tumороkat - 1500-2000 mm³ térfogat elérésekör - műtétiileg eltávolítottuk. Az operáció napján az egereket véletlenszerűen hat - egyenként hat egérből álló - csoportra osztottuk. Az egereket naponta, intraperitoneális injekcióval a humán plazminogén három tisztított, inhibitor-fragmensét, teljes humán plazminogént, tumort hordozó állatokból származó vizeletet, egészséges egerekből származó vizeletet, illetve sóoldatot adtunk be. A tumort hordozó állatok egyik csoportján csak álműtetet végeztünk, és sóoldattal oltottuk. Közvetlenül a primer tumor eltávolítása után a egerek intraperitoneális injekcióval - feltöltő dózisként - az inhibitor plazminogén-fragmensek 24 µg-ját (1,2 mg/kg/nap/egér) adjuk be. Ezt követően, a kísérlet ideje alatt az egereknek intraperitoneális injekcióval naponta 12 µg inhibitor-fragmenst (0,6 mg/kg/nap/egér) adunk be. A kontroll egereknek a tumor eltávolítása után azonos dózisban teljes plazminogén molekulát adunk be. A vizelettel végzett kezelésnél az egészséges vagy tumoros egerek vizeletét leszűrjük, dializáljuk, liofilizáljuk, majd steril vízben újrasszuspendáljuk, miáltal 250-szeres koncentrációt érünk el. Az egereknek a primer tumor eltávolításának napján, feltöltő dózisként, két intraperitoneális injekcióban a - tumoros vagy egészséges egerekből származó - dializált vizeletkoncentrátum 0,8 ml-ét adjuk be. Ezután ezeknek az egereknek - a kísérlet ideje alatt - intraperitoneális injekcióval naponta 0,4 ml dializált és koncentrált

vizeletet adunk be. A kezeléseket 13 napig végezzük, majd az egereket leöljük és felboncoljuk.

A kísérlet eredményeit a 8. és 9. ábrán mutatjuk be. A 8. ábrán a felületi tüdőmetasztázisok - 13 napos kezelés utáni - száma látható. A felületi tüdőmetasztázisok száma az egerek tüdején boncoláskor látható metasztázisok számának felel meg. A metasztázisok számolásához sztereomikroszkópot alkalmaztunk. A 8. ábrán a felületi tüdőmetasztázisok átlagos számát, valamint a középérték szórását mutatjuk be. Amint látható, a sértetlen primer tumort hordozó egerek csoportjában nem voltak jelen metasztázisok. Azokban az egerekben, melyekből a primer tumort eltávolítottuk - és később sóoldattal kezeltünk -, sok metasztázis alakult ki. A humán plazminogén-fragmenssel kezelt egerek nem mutattak metasztázisokat, míg a teljes plazminogénnel kezelt egerekben sok metasztázis alakult ki, ami azt jelzi, hogy a teljes plazminogén-molekula nem hordoz endoteliális inhibitor-aktivitást. A tumoros egerek dializált és koncentrált vizeletével kezelt egerekben nem találtunk metasztázisokat. Ezzel szemben, az egészséges egerek koncentrált vizeletével kezelt egerekben sok metasztázis képződött. A tüdő tömegének mérésével hasonló eredményeket kaptunk (ld. 9. ábra).

18. példa

Az egér és humán angiosztatin aminosav-szekvenciája

Az egérvizeletből izolált angiosztatin, illetve a humán plazminogén I. lizinkötő-hely fragmenséből izolált

angiosztatin aminosav-szekvenciáját "Applied Biosystem Model 477A" típusú proteinszekvenáló berendezés alkalmazásával határoztuk meg. A fenil-tio-hidantoin aminosav-frakciókat "on-line" "ABI-Model 120A HPLC" alkalmazásával azonosítottuk. Az egér és humán angiosztatin N-terminális szekvenciájából és tripszines emésztményeikből meghatározott aminosav-szekvencia azt mutatja, hogy az angiosztatin szekvenciája hasonló az egér plazminogén 98. aminosavával kezdődő szekvenciához. Ilyenformán, az angiosztatin aminosav-szekvenciája olyan proteint alkot, amelynek molekulatömege - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézis alapján - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD között van, és amelynek aminosav-szekvenciája lényegében hasonló a teljes egér plazminogén-molekula 98. aminosavával kezdődő egér plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciájával. Az egér angiosztatin (2. azonosítószámú szekvencia) aminosav-szekvenciájának elejét az 1. ábrán mutatjuk be. Az aminosav-szekvencia hosszúsága az 1. ábrán bemutatottnál valamivel hosszabb vagy rövidebb is lehet.

A humán plazminogén I. lizinkötő-hely aktív frakciójának (ld. 15. példa) N-terminális aminosav-analízise és tripszines emésztése azt mutatja, hogy a frakció szekvenciája hozzávetőleg a humán plazminogén 97. vagy 99. aminosavával kezdődik, és hogy a humán angiosztatin homológ az egér angiosztatinnal. A 98. aminosavval kezdődő humán angiosztatin aminosav-szekvenciájának elejét a 2. ábrán mutatjuk be (3. azonosítószámú szekvencia). A 2. ábrán az egér és humán

angiosztatin aminosav-szekvenciát más fajokból (sertésből, szarvasmarhából, rhesus-majomból) származó plazminogének megfelelő, belső aminosav-szekvenciájával hasonlítjuk össze, s ennek eredményeként megállapítható, hogy ezekben a fajokban is megtalálható az angiosztatin.

19. példa

A humán angiosztatin expresszálása *E. coli*-ban

Az eukarióta gének *E. coli*-ban megvalósuló, fokozott transzlációs hatékonyságát biztosító *trc* promóter által irányított, magas szintű transzkripció elérése érdekében a pTrcHisA-vektort (Invitrogen) (10. ábra) alkalmaztuk. Az angiosztatint - a fémaffinitási gyanták alkalmazásával végzett egylépéses tisztítás érdekében - N-terminális nikkelkötő polihisztidin farokhoz fúzionálva expresszáltuk. A fúziós peptidben az enterokinázos hasítási felismerési hely lehetővé teszi az N-terminális hisztidin fúziós peptid tisztított rekombináns proteinről történő leválasztását. A rekombináns humán angiosztatin-proteinről megállapítottuk, hogy kötődik a lizinhez; keresztreaktivitást mutat az 1., 2. és 3. "kringle"-régióra specifikus monoklonális antitestekkel; és gátolja az endotélsejtek bFGF-fel serkentett *in vitro* proliferációját.

Az inszert előállítás érdekében a humán angiosztatint kódoló génfragmenst emberi máj mRNS-ből reverz transzkripcióval átírtuk, és - specifikus láncindítók (primerek) alkalmazásával - polimeráz láncreakcióval (PCR) amplifikáltuk. A 1131 bázispárból álló termék a humán

plazminogén 93-470. aminosavait kódolja. Az amplifikált fragmenst a pTrcHisA-vektor XhoI/KpnI helyére klónoztuk, és a kapott konstrukciót *E. coli* XL-1B sejtekbe (Stratagene) transzformáltuk. Az *E. coli* XL-1B sejtekbe egy kontroll - csak a pTrcHisA-plazmidvektort tartalmazó - klónt is transzformáltunk (ezt a klónt vektor-kontroll klónnak nevezzük). Mindkét klónt azonos módon, az alábbiak szerint tisztítottuk.

Az expressziót mutató telepeket a következők szerint szelektáltuk. Az angiosztatint kódoló génnel transzformált *E. coli* telepeit IPTG-vel impregnált és LB agarlemezre fektetett nitrocellulóz filtereken növesztettük. Az expresszió IPTG-vel történő indukcióját követően a telepeket a filtereken lizáltuk. A nitrocellulózon lévő telepeket blokkoltuk, leöblítettük, és próbaként két - az angiosztatin specifikus konformációit felismerő - monoklonális antitest [Dcd és Vap; S.G. McCance és F.J. Castellino (University of Notre Dame) adománya] alkalmazásával teszteltük. A monoklonális antitestek által felismert, nagymértékű expressziót mutató telepeket választottuk ki.

A maximális expresszió optimális idejének azonosítása érdekében a sejteket az IPTG-indukció előtt és után különböző időpontokban begyűjtöttük, és ismételt fagyasztás/felolvasztás ciklusokkal kezeltük, majd SDS-PAGE analízist, "immunoblot" analízist és próbaként Dcd és Vap monoklonális antitestekkel tesztelést végeztünk.



A vizsgált klónok közül a pTrcHisA/HASH4 klónt választottuk ki. Az IPTG-indukciót négy óra hosszat végeztük, amely után a sejttöledéket összegyűjtöttük, 50 mM Tris (pH = 8,0), 2 mM EDTA, 5 % glicerín és 200 mg/ml lizozim elegyében újraszuszpendáltuk, és 4 °C-on 30 percig kevertük. A kapott sűrű szuszpenziót percenként 14000-es fordulatszámmal 25 percig centrifugáltuk, majd az üledéket 50 mM Tris (pH = 8,0), 2 mM EDTA, 5 % glicerín és 0,1 % DOC elegyében újraszuszpendáltuk. Az így kapott szuszpenziót 4 °C-on egy óra hosszat kevertük, majd percenként 14000-es fordulatszámmal 25 percig centrifugáltuk. A felülúszó frakció expresszált angiosztatint tartalmaz. Az *E. coli* által expresszált humán angiosztatin a natív angiosztatin fizikai tulajdonságaival rendelkezik, vagyis képes megkötni a lizint. Következésképpen, az *E. coli* által expresszált angiosztatint egy lépésben, lizin-"Sepharose" oszlopon (Pharmacia vagy Sigma) tisztítottuk. Az angiosztatint 0,2 M ϵ -amino-n-kapronsavval (pH = 7,5) eluáltuk az oszlopról.

E kísérletek után a pTrcHisA/HASH4 klón 10 literes fermentációs adagjait állítottuk elő. Az így felnagyított indukcióval kapott sejteket leülepítettük és 50 mM Tris-pufferben (pH = 7,5) újraszuszpendáltuk, a sejteket 10000 psi ($6,88 \times 10^5$ kPa) nyomáson háromszori ismétléssel feltártuk (az egyes feltárások között a szuszpenziót 10 °C-ra hűtöttük). A kapott lizátumot 4 °C-on 30 percig, percenként 10000-es fordulatszámmal végzett centrifugálással letisztítottuk, és az expresszált

angiosztatint lizin-"Sepharose" oszlopon izoláltuk (11. ábra).

Az *E. coli* által expresszált, tisztított angiosztatint vízzel szemben alaposan dializáltuk, majd liofilizáltuk. Az expresszált humán angiosztatint tápközegben (DMEM, 5 % BCS, 1 % gentamicin/penicillin/sztreptomycin) - 3 µg/ml becsült koncentrációra - újraszuszpendáltuk, és (a 8. példában leírt) *in vitro* szarvasmarha hajszálér-endotélsejt (BCE) analízisben használtuk fel. A csak vektort tartalmazó kontroll klónt a pTrcHisA/HAsH4 klónnal azonos módon kezeltük. A klónt IPTG-vel indukáltuk, a bakteriális lizátumot lizin-"Sepharose" oszlophoz kötöttük, 0,2 M amino-kapronsavval eluáltuk, alaposan dializáltuk, majd liofilizáltuk. Ezt a kontroll készítményt szintén az említett tápközegben, 3 µg/ml becsült koncentrációban újraszuszpendáltuk. A rekombináns angiosztatin mintákat és a kontroll mintákat különböző indukciós és fermentációs adagokból, illetve külön tisztítási műveletek eredményeként kaptuk, s valamennyi mintát az EntreMed-ben (Maryland) kóddal láttuk el. A kódolt mintákkal a BCE vizsgálatot a bostoni gyermekkórházban ("Children's Hospital", Boston) vakpróbaszerűen végeztük.

A rekombináns humán angiosztatin BCE vizsgálatainak eredménye azt mutatta, hogy az *E. coli*-ban expresszált humán angiosztatin gátolta a BCE-sejtek - 1 ng/ml koncentrációjú bFGF-fel indukált - proliferációját (12. ábra). A rekombináns angiosztatin tápközegben készített törzsoldatát (kb. 3 µg/ml) 1:5, 1:10 és 1:20 hígításban

alkalmaztuk. A százalékos gátlást a következő képlet alapján számítottuk:

$$1 - \frac{\text{sejtek száma angiosztatinnal} - \text{sejtek száma a 0. napon}}{\text{sejtek száma csak bFGF-fel} - \text{sejtek száma a 0. napon}}$$

A BCE vizsgálatban a rekombináns humán angiosztatin által kiváltott százalékos gátlás - azonos koncentrációk esetén - hasonló vagy nagyobb volt, mint a plazminogénből származó angiosztatin által kiváltott százalékos gátlás. A BCE vizsgálat egy ismétlésében - ahol a rekombináns angiosztatin törzsoldat 1:5 arányú hígítását alkalmaztuk - a rekombináns angiosztatin hasonló százalékos gátlást biztosított, mint a plazminogénből származó angiosztatin. A 13. ábrán azt a meglepő eredményt mutatjuk be, miszerint a rekombináns humán angiosztatin-protein tenyészetben a BCE sejtek proliferációját 60 % feletti, illetve 75 %-os arányban gátolja.

20. példa

Az angiosztatin - az apoptózis sebességének fokozásával - fenntartja a mikrometasztázisok nyugvó állapotát

Miután a C57BL6/J egerekbe szubkután oltással Lewis-féle tüdőrák-sejteket (10^6) ültettünk be, hozzávetőleg $1,5 \text{ cm}^3$ térfogatú primer tumorok alakultak ki. Az állatokból műtéti úton eltávolítottuk a primer tumort, vagy - álműtétet végezve - a tumort sértetlenül hagytuk. A műtét utáni 5., 10., illetve 15. napon az egereket leöltük, s tüdejüket szövettani vizsgálathoz készítettük elő. Azokban

az állatokban, melyekből a primer tumort eltávolítottuk, a mikrometasztázisok - az álműtéten átesett (kontroll) egerek tüdejéhez képest - jelentős proliferációt mutattak (14. ábra). Ezek a változások a tüdő tömegének nagymértékű növekedésével jártak.

A bróm-dezoxi-uridin (BrdU) felvétele alapján mért tumorsejt-proliferáció analízise azt mutatta, hogy a sértetlen primer tumort hordozó, illetve a tumor eltávolításán átesett egerek között (az 5., 9. és 13. napon) e tekintetben nincs különbség, ami azt jelzi, hogy a tumor tömegének növekedése nem magyarázható a fokozott proliferációval (ld. 15. ábra). Ilyenformán, ezekben az állatokban a sejtpusztulást is megvizsgáltuk. Az apoptózist (a sejtpusztulás folyamata, amely a génexpresszió változásaitól függ, és a fejlődés során, valamint a gyors proliferációt mutató szövetekben - mint pl. a vékonybélben - lévő bizonyos sejtek eliminálásáért felelős) fragmentált DNS immunhisztokémiai jelölésével vizsgáltuk, melynek során a terminális dezoxinukleotidil-transzferáz (TdT) technikát alkalmaztuk. Az apoptózis indexet minden egyes leöléskor meghatároztuk. A primer tumorok eltávolítása valamennyi vizsgált esetben az apoptózis index statisztikailag szignifikáns (kb. 3-4-szeres) növekedését eredményezte (15. ábra).

A primer tumor eltávolításán átesett egerek - exogén angiogenezis-szuppresszorral végzett - kezelésével további bizonyítékokat kaptunk. Ez az anyag - TNP-1470 (O-klór-acetil-karbamoil-fumagillol; korábban AGM-1470) - a

fumagillin analógja, melyről leírták, hogy angiogenezist gátló hatása van. A TNP-1470 (kétnaponként 30 mg/kg dózisú) szubkután injektálásával olyan eredményeket kaptunk, amelyek feltűnően hasonlítottak a sértetlen tumort hordozó egerekkel kapcsolatban fentebb leírt eredményekhez. A TNP-1470-nel kezelt állatok - a sóoldattal injektált kontrollhoz képest - kisebb tüdőtümeget, azonos proliferációs indexet és nagyobb apoptózis indexet mutattak (16. ábra).

A kapott adatok azt jelzik, hogy a metasztázisok nyugvó állapotban maradnak, ha a tumorsejt-proliferációt azonos sebességű sejtpusztulás tartja egyensúlyban. A primer tumor eltávolítása a metasztázisok növekedésének gyors fokozódását eredményezi, valószínűleg - a metasztázisok növekedését a tumorsejtek növelt szintű apoptózisával szabályozó - angiogenezis-inhibitorok (angiosztatint) eltávolításának következtében. Ezek a hatások hasonlóak a primer tumorok eltávolítását és egy exogén angiogenezis-inhibitor beadását követően megfigyelt hatásokhoz. Összefoglalva; ezek az adatok arra utalnak, hogy a primer tumor angiosztatint szabadít fel, amely fenntartja a mikrometasztázisok nyugalmi állapotát.

21. példa

Primer tumorok *in vivo* kezelése angiosztatinnal

Az angiosztatint humán plazminogénből, a 15. példában leírt, korlátozott elasztázos emésztéssel tisztítottuk. Az angiosztatint - hat hetes hím C57BI6/J egereknek történő

beadás céljából - foszfát-pufferelt sóoldatban újraszuszpendáltuk. A egerekbe szubkután 1×10^6 Lewis-féle tüdőrák-sejtet vagy T241 fibroszarkóma-sejtet ültettünk be. Az angiosztatinos kezelést négy nap elteltével kezdtük meg, amikor a tumorok $80-160 \text{ mm}^3$ nagyságot értek el. Az angiosztatint egy 40 mg/kg dózisú vagy két 80 mg/kg dózisú - intraperitoneális vagy szubkután - injekcióval adtuk be. Az állatokat a kezelést követően különböző időpontokban öltük le.

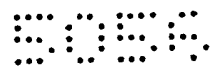
A napi 40 mg/kg dózisban intraperitoneálisan (i.p.) beadott angiosztatin a T241 primer tumorok rendkívül nagymértékű gátlását eredményezte (ld. 17. ábra). Ez a gátló hatás már két napon belül szemmel látható volt, és a vizsgálat ideje során nagyságrendekkel fokozódott. A 18. napon az angiosztatinnal kezelt egerekben lévő tumorok mérete a sóoldattal kezelt kontroll egerekben lévő tumorok térfogatának hozzávetőleg 38 %-a volt. Ez a különbség statisztikailag szignifikáns ($p < 0,001$; Student-féle t-teszt).

Az naponta kétszer 40 mg/kg dózissal (összesen 80 mg/kg/nap) intraperitoneálisan vagy szubkután beadott angiosztatin jelentős mértékben csökkentette az LLC-LM primer tumorok növekedési sebességét (18. ábra). A gátló hatás a 4. napon már szemmel látható volt, és a továbbiakban nagyságrendileg fokozódott. A kísérlet utolsó (19.) napján az angiosztatinnal kezelt egerek átlagos tumortérfogata a sóoldattal injektált kontroll egerek

tumortérfogatának csak 20 %-a volt, ami statisztikailag szignifikáns különbség ($p < 0,001$, Student-féle t-teszt).

Egy másik kísérletsorozatban - beültetett T241 fibroszarkóma-sejteket, Lewis-féle tüdőrák (LM) sejteket vagy retikulumszarkóma-sejteket hordozó - egereknek 12 óránként 50 mg/kg dózisban adtunk be angiosztatint. Az angiosztatinnal kezelt egerekben a tumorok mérete - függetlenül attól, hogy milyen tumort hordoztak - jelentős mértékben csökkent. A 19. ábrán látható, hogy a T241 fibroszarkómát hordozó, angiosztatinnal kezelt egerekben az átlagos tumortérfogat - a 24. napon - a nem kezelt (kontroll) egerekben megfigyelhető tumortérfogat csupán 15 %-a volt. A 20. ábrán az látható, hogy a Lewis-féle tüdőrák (LM) sejteket hordozó, angiosztatinnal kezelt egerekben az átlagos tumortérfogat - a 24. napon - a nem kezelt (kontroll) egerekben megfigyelhető tumortérfogat csupán 13 %-a volt. A 21. ábrán bemutatjuk, hogy a retikulumszarkóma-sejteket hordozó, angiosztatinnal kezelt egerekben az átlagos tumortérfogat - a 24. napon - a nem kezelt (kontroll) egerekben megfigyelhető tumortérfogat csupán 19 %-a volt. A feltüntetett adatok mindegyik időpontban négy egér eredményeinek átlagát reprezentálják.

A kapott eredmények azt bizonyítják, hogy az angiosztatin a három különböző primer tumor rendkívül hatásos *in vivo* inhibitora.



Humán sejt-eredetű primer tumorok angiosztatinnal végzett
in vivo kezelése egerekben

Ebben a példában az angiosztatin két humán tumorsejt-vonalra (PC-3 humán prosztatarák és MDA-MB humán emlőrák) gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Immunhiányos SCID egerekbe humán tumorsejteket ültettünk, és az egereket - lényegében a 21. példában leírtak szerint - 12 óránként 50 mg/kg dózisban angiosztatinnal kezeltük. A kapott eredmények azt mutatják, hogy a találmány szerinti angiosztatin-protein hatásosan gátolja a humán tumorsejtek növekedését. A 22. ábrán látható, hogy a PC-3 humán prosztatarák-sejteket hordozó, angiosztatinnal kezelt egerekben a 24. napon az átlagos tumortérfogat a kezelés nélküli (kontroll) egerekben megfigyelhető tumortérfogat csupán 2 %-a volt. A 23. ábrán látható, hogy az MDA-MB humán emlőrák-sejteket hordozó, angiosztatinnal kezelt egerekben a 24. napon az átlagos tumortérfogat a kezelés nélküli (kontroll) egerekben megfigyelhető tumortérfogat csupán 8 %-a volt.

23. példa

Génterápia - az angiosztatin-gén transzfekciójának
tumortérfogatra gyakorolt hatása

Az "American Type Culture Collection"-től (ATTC) kapott egér plazminogén-cDNS-ből származó - az egér plazminogén 1-460. aminosavát kódoló - 1380 bázispár hosszúságú angiosztatin-DNS-t polimeráz-láncreakcióval állítottuk elő, majd expressziós vektorba inszertáltuk. Az

expressziós vektort T241 fibroszarkóma-sejtekbe transzfektáltuk, és a transzfektált sejteket egerekbe ültettük. A kontroll egerekbe nem transzfektált T241 sejteket vagy csak vektorral transzfektált (azaz angiosztatint nem expresszáló) T241 sejteket ültettünk be. A kísérletben három angiosztatin-expresszáló, transzfektált sejtklón alkalmaztunk. Az idő függvényében meghatároztuk a tumortérfogatot. Az eredmények azt mutatják, hogy az angiosztatin-expresszáló sejtklónokat tartalmazó egerekben az átlagos tumortérfogat (a nem transzfektált, illetve az angiosztatint nem expresszáló kontroll sejteket hordozó egerekben megfigyelt tumortérfogathoz képest) meglepő módon és rendkívüli mértékben csökkent.

Az egér angiosztatin-proteint kódoló egér DNS-szekvencia az egér plazminogén-cDNS-ből származik. Az egér angiosztatin magában foglalja az egér plazminogén 1-4. "kringle"-régióit. A klón kialakításának sémáját a 24. ábrán mutatjuk be.

Az egér angiosztatin-protein klónokat - a LIPOFECTINTM transzfekciós rendszer (Life Technologies, Gaithersburg, MD) alkalmazásával - T241 fibroszarkóma-sejtekbe transzfektáltuk. A LIPOFECTINTM reagens az N-[1(2,3-dioleil-oxi)-propil]-n,n,n-trimetil-ammónium-klorid (DOTMA) elnevezésű kationos lipid és a diolekoil-foszfotidil-etanol-amin (DOPE) - membránon átszűrt vízben készített - 1:1 tömegarányú elegyből álló liposzómakészítmény.

A sejtek átmeneti transzfektálását a következők szerint végeztük.

1) A T241 sejteket 60 cm²-es szövettenyésztő csészékben növesztjük (a beoltáshoz 2 ml, szérummal kiegészített megfelelő növesztő tápközegekben 1-2x10⁵ sejtet használunk).

2) A sejteket CO₂-ot tartalmazó inkubátorban, 37 °C-on 40-70 %-os konfluens állapot eléréséig inkubáljuk (ez rendszerint 18-24 órát vesz igénybe, de a sejttípustól függően változhat). A T241 tumorsejtek 70 %-os konfluens állapotúak voltak.

3) 12 x 75 mm-es steril csövekben az alábbi két oldatot készítjük:

"A" oldat: minden egyes transzfekcióhoz 5 µg DNS-t 100 µl szérummentes "OPTI-MEM I Reduced Serum Medium" tápközegekben (Life Technologies) hígítunk (szövettenyésztési tisztaságú ioncserélt víz szintén alkalmazható);

"B" oldat: minden egyes transzfekcióhoz 30 µg LIPOFECTIN-t 100 µl "OPTI-MEM" tápközegekben hígítunk.

4) Az "A" és "B" oldatot összeöntjük, óvatosan összekeverjük, és szobahőmérsékleten 10-15 percig inkubáljuk.

5) A sejteket szérummentes tápközegekkel kétszer mossuk.

6) Minden transzfekciónál az egyes - LIPOFECTINTM-reagens/DNS-komplexet tartalmazó - csövekbe 0,8 ml szérummentes tápközeget teszünk, óvatosan összekeverjük, és a komplexet a sejtekre rétegezzük.

7) A sejteket CO₂-ot tartalmazó inkubátorban, 37 °C-on 12 órán át inkubáljuk.

8) A DNS-tartalmú tápközeget szérumot tartalmazó, 1 mg/ml koncentrációjú szelekciós tápközeggel helyettesítjük, és a sejteket CO₂-ot tartalmazó inkubátorban, 37 °C-on 48-72 órán át inkubáljuk.

9) A transzfekció után 48-72 órával a sejtkivonatokat génaktivitásra teszteljük.

A transzfektált sejteket - angiosztatin-specifikus antitestek alkalmazásával - az angiosztatin-protein expressziójára tesztelhetjük. Más módon, körülbelül 10-14 nap elteltével a CMV-angiosztatinnal transzfektált T241 sejtekben G418-rezisztens telepek jelentek meg. A csak vektorral transzfektált sejtek esetében számos klónt figyeltünk meg, a nem transzfektált sejtek esetében azonban egyet sem. A G418-rezisztens klónokat - immunfluoreszcens eljárással - angiosztatin-expresszióra szelektáltuk.

Érdekes, hogy az angiosztatinnal transzfektált T241 sejtek és Lewis-féle tüdőrák-sejtek *in vitro* proliferációja nem került gátlás alá (ld. 25. és 26. ábra).

A 27. ábrán a transzfekciós kísérlet eredményeit mutatjuk be. Mind a három angiosztatin-expresszázó, transzfektált T241 klón olyan átlagos tumortérfogatot eredményezett az egerekben, amely lényegesen kisebb volt, mint a kontroll egerekben megfigyelhető tumortérfogat. Az átlagos tumortérfogat - a kontroll tumortérfogathoz viszonyítva - a 37. klónt hordozó egerekben 13 %, a 31. klónt hordozó egerekben 21 %, a 25. klón hordozókban pedig 34 % volt. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciák sejtekbe

transzfektálhatók; a transzfektált DNS-szekvenciák a - beültetett sejtek révén - képesek angiosztatin-proteint expresszálni; és az expresszált angiosztatin *in vivo* csökkenti a tumornövekedést.

24. példa

Az angiosztatin-expresszió *in vivo* helyszínének lokalizálása

Az angiosztatin-expresszió *in vivo* helyszínének lokalizálása érdekében különböző sejttypusokból, Lewis-féle tüdőrák-sejtekből (egér) T241 fibroszarkóma-sejtekből (egér) és Burkitt-limfóma-sejtekből (ember) - melyek friss tumorokból vagy több passzálás utáni sejttenyészetből származtak - teljes RNS-t vizsgálatunk, hogy meghatározzuk az angiosztatin-transzkriptumok jelenlétét. A minták "northern"-analízisével megállapítottuk, hogy - az egészséges egér májából származó RNS kivételével, amely az egér plazminogénnek megfelelő, hozzávetőleg 2,4 kb-os szignálszekvenciát tartalmaz - egyik mintában sem található olyan szignálszekvencia, amely hibridizálna a thn-szekvenciával. A humán minták "northern"-analízise azt mutatja, hogy - az egészséges emberi májból származó RNS kivételével, amely a humán plazminogénnek megfelelő, hozzávetőleg 2,4 kb-os szignálszekvenciát tartalmaz - egyik mintában sem található olyan szignálszekvencia, amely hibridizálna a humán angiosztatin-szekvenciával.

Reverz transzkripció polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) kimutattuk, hogy a próbaként egér angiosztatin-

szekvenciákkal tesztelt minták egyikében sem volt megfelelő termék (kivéve az egészséges egér máját). Hasonlóan, reverz transzkripció polimeráz-láncreakcióval (RT-PCR) kimutattuk, hogy a próbaként humán angiosztatin-szekvenciákkal tesztelt minták egyikében sem volt megfelelő termék (kivéve az egészséges emberi máját). Egér esetében a várt méret 1050 bp, ember esetében pedig 1134 bp volt.

Következésképpen, úgy tűnik, hogy az egér angiosztatin-transzkriptumok (feltételezve az egér plazminogén 97-450. aminosavaival való azonosságot) egyik fenti egér-eredetű mintában sem termelődnek, és a humán angiosztatin-transzkriptumokat (feltételezve a humán plazminogén 93-470. aminosavaival való azonosságot) sem termeli a fenti humán minták egyike sem. Az egészséges egér, illetve emberi máj esetében kapott pozitív jelek a plazminogénnel való hibridizáció eredményei.

25. példa

Az angiosztatin expresszálása élesztőben

A humán plazminogén 93-470. aminosavait kódoló génfragmenst a pHIL-SI vektor (Invitrogen) XhoI/EcoRI helyére klónoztuk. Ez a vektor - a PH01 szekréciós szignál segítségével - a *Pichia pastoris*-ban szekretált proteinek expresszióját teszi lehetővé. Hasonlóan, a humán plazminogén 93-470. aminosavait kódoló génfragmenst a pPIC9 vektor (Invitrogen) SnaBI/EcoRI helyére klónoztuk. Ez a vektor - az α -faktor szekréciós szignál segítségével - a *Pichia pastoris*-ban szekretált proteinek expresszióját

teszi lehetővé. Az e rendszerekben expresszált humán angiosztatin-proteinek számos előnnyel bírnak az *E. coli*-ban expresszált proteinekhez képest, például a "protein-processing", a protein harmadlagos szerkezetének kialakulása ("folding") és a poszttranszlációs módosítások (pl. glikolizáció) terén.

A gén *P. pastoris*-ban történő expresszáálásának leírását ld. Sreekrishna, K. és mtsai.: J. Basic Microbiol. 29(4), 265 (1988); és Clare, J.J. és mtsai.: Gene 105, 205 (1991) (mindkét hivatkozást teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni).

26. példa

Az angiosztatin-proteinek expresszáálása transzgénikus állatokban és növényekben

Olyan transzgénikus állatokat (pl. szarvasmarhákat vagy sertéseket) hozunk létre, amelyek expresszálják az angiosztatin géntranszkriptumot. A transzgénikus állatok az angiosztatin-proteint például tejükben expresszálják. Létrehoztunk olyan transzgénikus növényeket is, amelyek expresszálják az angiosztatin géntranszkriptumot.

Az idegen DNS-t expresszáló transzgénikus állatok kialakításának leírását ld. Smith, H.: Semin. Cell. Biol. 5(5), 315 (1994); melyet teljes terjedelmében a kitanítás részének kell tekinteni.

Tudni kell, hogy a fenti példákban csak a találmány előnyös megvalósítási módjait mutattuk be. E megvalósítási

módoknak számos módosítása és változata lehetséges, melyek szintén a találmány tárgyát képezik.

SZEKVENCIALISTA

Szekvenciák száma: 6

TUDNIVALÓK AZ 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 812 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: egér

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 1. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Met	Asp	His	Lys	Glu	Val	Ile	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Lys	Pro	
1				5					10					15		
Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	Asp	Gly	Tyr	Ile	Ser	Thr	Gln	Gly	Ala	Ser	
			20					25					30			
Leu	Phe	Ser	Leu	Thr	Lys	Lys	Gln	Leu	Ala	Ala	Gly	Gly	Val	Ser	Asp	
			35				40					45				
Cys	Leu	Ala	Lys	Cys	Glu	Gly	Glu	Thr	Asp	Phe	Val	Cys	Arg	Ser	Phe	
	50					55				60						
Gln	Tyr	His	Ser	Lys	Glu	Gln	Gln	Cys	Val	Ile	Met	Ala	Glu	Asn	Ser	
65					70					75					80	
Lys	Thr	Ser	Ser	Ile	Ile	Arg	Met	Arg	Asp	Val	Ile	Leu	Phe	Glu	Lys	
				85					90					95		
Arg	Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Tyr	Arg	
			100					105					110			
Gly	Thr	Met	Ser	Arg	Thr	Lys	Ser	Gly	Val	Ala	Cys	Gln	Lys	Trp	Gly	
		115					120					125				
Ala	Thr	Phe	Pro	His	Val	Pro	Asn	Tyr	Ser	Pro	Ser	Thr	His	Pro	Asn	
		130					135					140				
Glu	Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Gln	
145					150					155					160	
Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Asp	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	
				165					170					175		

Asn	Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met	Tyr	Cys	Ser	Gly	Glu	Lys	180	185	190
Tyr	Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Asp	Cys	Gln	Ala	195	200	205
Trp	Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ala	Lys	Phe	210	215	220
Pro	Ser	Lys	Asn	Leu	Lys	Met	Asn	Tyr	Cys	His	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	225	230	235
Pro	Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Thr	Lys	Arg	Trp	Glu	Tyr	245	250	255
Cys	Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Pro	Ser	Pro	Thr		260	265	270
Tyr	Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	275	280	285
Val	Thr	Val	Ser	Gly	Lys	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Glu	Gln	Thr	Pro	290	295	300
His	Arg	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Glu	305	310	315
Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	325	330	335
Thr	Thr	Asp	Ser	Gln	Leu	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Glu	Ile	Pro	Ser	Cys	340	345	350
Glu	Ser	Ser	Ala	Ser	Pro	Asp	Gln	Ser	Asp	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Glu	355	360	365
Glu	Gln	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Glu	Cys	Tyr	Gln	Ser	Asp	Gly	Gln	Ser	370	375	380
Tyr	Arg	Gly	Thr	Ser	Ser	Thr	Thr	Ile	Thr	Gly	Lys	Lys	Cys	Gln	Ser	385	390	395
Trp	Ala	Ala	Met	Phe	Pro	His	Arg	His	Ser	Lys	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	405	410	415
Pro	Asp	Ala	Gly	Leu	Glu	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Asp	420	425	430
Lys	Gly	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Ser	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	435	440	445
Cys	Asn	Leu	Lys	Arg	Cys	Ser	Glu	Thr	Gly	Gly	Ser	Val	Val	Glu	Leu	450	455	460

Pro Thr Val Ser Gln Glu Pro Ser Gly Pro Ser Asp Ser Glu Thr Asp
465 470 475 480

Cys Met Tyr Gly Asn Gly Lys Asp Tyr Arg Gly Lys Thr Ala Val Thr
485 490 495

Ala Ala Gly Thr Pro Cys Gln Gly Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
500 505 510

His Ser Ile Phe Thr Pro Gln Thr Asn Pro Arg Ala Asp Leu Glu Lys
515 520 525

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Asn Gly Pro Trp Cys Tyr
530 535 540

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Pro Leu Cys
545 550 555 560

Ala Ser Ala Ser Ser Phe Glu Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys
565 570 575

Lys Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala Asn Pro His Ser
580 585 590

Trp Pro Trp Gln Ile Ser Leu Arg Thr Arg Phe Thr Gly Gln His Phe
595 600 605

Cys Gly Gly Thr Leu Ile Ala Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His
610 615 620

Cys Leu Glu Lys Ser Ser Arg Pro Glu Phe Tyr Lys Val Ile Leu Gly
625 630 635 640

Ala His Glu Glu Tyr Ile Arg Gly Leu Asp Val Gln Glu Ile Ser Val
645 650 655

Ala Lys Leu Ile Leu Glu Pro Asn Asn Arg Asp Ile Ala Leu Leu Lys
660 665 670

Leu Ser Arg Pro Ala Thr Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu
675 680 685

Pro Ser Pro Asn Tyr Met Val Ala Asp Arg Thr Ile Cys Tyr Ile Thr
690 695 700

Gly Trp Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Arg Leu Lys Glu
705 710 715 720

Ala Gln Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Val Glu Tyr
725 730 735

Leu Asn Asn Arg Val Lys Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly Gln Leu Ala
740 745 750

Gly Gly Val Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys
755 760 765
Phe Glu Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu
770 775 780
Gly Cys Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg
785 790 795 800
Phe Val Asp Trp Ile Glu Arg Glu Met Arg Asn Asn
805 810

TUDNIVALÓK A 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 339 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: egér

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 2. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

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

Ser Lys Asn Leu Lys Met Asn Tyr Cys His Asn Pro Asp Gly Glu Pro
130 135 140

Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Thr Lys Arg Trp Glu Tyr Cys
145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Pro Pro Ser Pro Thr Tyr
165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Arg Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val
180 185 190

Thr Val Ser Gly Lys Thr Cys Gln Arg Trp Ser Glu Gln Thr Pro His
195 200 205

Arg His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Glu Glu
210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Thr Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
225 230 235 240

Thr Asp Ser Gln Leu Arg Trp Glu Tyr Cys Glu Ile Pro Ser Cys Glu
245 250 255

Ser Ser Ala Ser Pro Asp Gln Ser Asp Ser Ser Val Pro Pro Glu Glu
260 265 270

Gln Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr Gln Ser Asp Gly Gln Ser Tyr
275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
290 295 300

Ala Ala Met Phe Pro His Arg His Ser Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
305 310 315 320

Asp Ala Gly Leu Glu Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Lys
325 330 335

Gly Pro Trp

TUDNIVALÓK A 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 339 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: *Homo sapiens*

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 3. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Val	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	Gly	1	5	10	15
Thr	Met	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Gly	Ile	Thr	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Ser	20	25	30	
Thr	Ser	Pro	His	Arg	Pro	Arg	Phe	Ser	Pro	Ala	Thr	His	Pro	Ser	Glu	35	40	45	
Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Pro	Gln	Gly	50	55	60	
Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Lys	Arg	Tyr	Asp	Tyr	Cys	Asp	65	70	75	80
Ile	Leu	Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	Asn	Tyr	85	90	95	
Asp	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Leu	Glu	Cys	Gln	Ala	Trp	100	105	110	
Asp	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Ile	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	115	120	125	
Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Lys	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Arg	Glu	Leu	130	135	140	
Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Leu	Cys	145	150	155	160
Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	165	170	175	
Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Thr	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Asn	Val	Ala	Val	180	185	190	
Thr	Val	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	His	Trp	Ser	Ala	Gln	Thr	Pro	His	195	200	205	
Thr	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Asp	Glu	210	215	220	
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Lys	Arg	Ala	Pro	Trp	Cys	His	Thr	225	230	235	240
Thr	Asn	Ser	Gln	Val	Arg	Trp	Glu	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	Asp	245	250	255	
Ser	Ser	Pro	Val	Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Ala	Pro	Thr	Ala	Pro	Pro	Glu	260	265	270	
Leu	Thr	Pro	Val	Val	Gln	Asp	Cys	Tyr	His	Gly	Asp	Gly	Gln	Ser	Tyr	275	280	285	

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335
 Gly Pro Trp

TUDNIVALÓK A 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 339 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: rhesus-majom

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 4. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

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

Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Pro
 130 135 140

Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys
 145 150 155 160

Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr Tyr
 165 170 175

Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asp Val Ala Val
 180 185 190

Thr Val Ser Gly His Thr Cys His Gly Trp Ser Ala Gln Thr Pro His
 195 200 205

Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu
 210 215 220

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Glu Lys Ala Pro Trp Cys Tyr Thr
 225 230 235 240

Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys Glu
 245 250 255

Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Pro Leu Asp Pro Thr Ala Pro Pro Glu
 260 265 270

Leu Thr Pro Val Val Gln Glu Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr
 275 280 285

Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300

Ser Ser Met Thr Pro His Trp His Glu Lys Thr Pro Glu Asn Phe Pro
 305 310 315 320

Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335

Gly Pro Trp

TUDNIVALÓK AZ 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 339 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: sertés

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 5. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

Ile	Tyr	Leu	Ser	Glu	Cys	Lys	Thr	Gly	Asn	Gly	Lys	Asn	Tyr	Arg	Gly	1	5	10	15
Thr	Thr	Ser	Lys	Thr	Lys	Ser	Gly	Val	Ile	Cys	Gln	Lys	Trp	Ser	Val	20	25	30	
Ser	Ser	Pro	His	Ile	Pro	Lys	Tyr	Ser	Pro	Glu	Lys	Phe	Pro	Leu	Ala	35	40	45	
Gly	Leu	Glu	Glu	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Asn	Asp	Glu	Lys	Gly	50	55	60	
Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	Thr	Asp	Pro	Glu	Thr	Arg	Phe	Asp	Tyr	Cys	Asp	65	70	75	80
Ile	Pro	Glu	Cys	Glu	Asp	Glu	Cys	Met	His	Cys	Ser	Gly	Glu	His	Tyr	85	90	95	
Glu	Gly	Lys	Ile	Ser	Lys	Thr	Met	Ser	Gly	Ile	Glu	Cys	Gln	Ser	Trp	100	105	110	
Gly	Ser	Gln	Ser	Pro	His	Ala	His	Gly	Tyr	Leu	Pro	Ser	Lys	Phe	Pro	115	120	125	
Asn	Lys	Asn	Leu	Lys	Met	Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Pro	130	135	140	
Arg	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr	Thr	Asp	Pro	Asn	Lys	Arg	Trp	Glu	Phe	Cys	145	150	155	160
Asp	Ile	Pro	Arg	Cys	Thr	Thr	Pro	Pro	Pro	Thr	Ser	Gly	Pro	Thr	Tyr	165	170	175	
Gln	Cys	Leu	Lys	Gly	Arg	Gly	Glu	Asn	Tyr	Arg	Gly	Thr	Val	Ser	Val	180	185	190	
Thr	Ala	Ser	Gly	His	Thr	Cys	Gln	Arg	Trp	Ser	Ala	Gln	Ser	Pro	His	195	200	205	
Lys	His	Asn	Arg	Thr	Pro	Glu	Asn	Phe	Pro	Cys	Lys	Asn	Leu	Glu	Glu	210	215	220	
Asn	Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Asp	Gly	Glu	Thr	Ala	Pro	Trp	Cys	Tyr	Thr	225	230	235	240
Thr	Asp	Ser	Glu	Val	Arg	Trp	Asp	Tyr	Cys	Lys	Ile	Pro	Ser	Cys	Gly	245	250	255	
Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Thr	Glu	His	Leu	Asp	Ala	Pro	Val	Pro	Pro	Glu	260	265	270	

Gln Thr Pro Val Ala Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Glu Ser Tyr
 275 280 285
 Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Ile Thr Gly Arg Lys Cys Gln Ser Trp
 290 295 300
 Val Ser Met Thr Pro His Arg His Glu Lys Thr Pro Gly Asn Phe Pro
 305 310 315 320
 Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys
 325 330 335
 Ser Pro Trp

TUDNIVALÓK A 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIÁHOZ:

(i) SZEKVENCIAJELLEMZŐK

(A) HOSSZÚSÁG: 339 aminosav

(B) TÍPUS: aminosav

(C) SZÁL:

(D) ALAK: lineáris

(ii) MOLEKULA TÍPUSA: protein

(iii) HIPOTETIKUS: nem

(vi) EREDETI FORRÁS:

(A) ORGANIZMUS: szarvasmarha

(xi) SZEKVENCIA LEÍRÁS: 6. AZONOSÍTÓSZÁMÚ SZEKVENCIA:

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

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Angiosztatin.

2. Az 1. igénypont szerinti angiosztatin, amely - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézises meghatározás szerint - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD közötti molekulatömegű proteint tartalmaz, melynek aminosav-szekvenciája lényegében hasonló az - egér plazminogén-molekula hozzávetőleg 98. aminosavával kezdődő - egér plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciájához.

3. A 2. igénypont szerinti angiosztatin, amely humán plazminogénből, egér plazminogénből, szarvasmarha plazminogénből, rhesus-majom plazminogénből vagy sertés plazminogénből származó plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciáját tartalmazza.

4. A 3. igénypont szerinti angiosztatin, amely a 2., 3., 4., 5. vagy 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciát tartalmazza.

5. Az 1. igénypont szerinti angiosztatin, amely angiogenezist gátolni képes proteint tartalmaz.

6. A 3. igénypont szerinti angiosztatin, amely endoteliális gátló aktivitást mutató plazminogén-fragmenst tartalmaz.

7. Az 1. igénypont szerinti angiosztatin, amely angiogenezissel kapcsolatos betegség gátlására képes proteint tartalmaz.

8. A 7. igénypont szerinti angiosztatin, amely angiogenezissel kapcsolatos betegség gátlására képes proteinként rák gátlására képes proteint tartalmaz.

9. Az 1. igénypont szerinti angiosztatin, amely - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézises meghatározás szerint - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD közötti molekulatömegű proteint tartalmaz, mely protein képes megkötni a lizint, és képes az angiogenezis gátlására.

10. Az 1. igénypont szerinti angiosztatin, amely angiosztatin - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézises meghatározás szerint - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD közötti molekulatömegű proteint tartalmaz, mely protein képes megkötni a lizint, és képes az angiogenezis gátlására.

11. Eljárás egy angiogenezis közvetítette betegség diagnosztizálására vagy prognosztizálására, azzal jellemezve, hogy meghatározzuk egy - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézis szerint - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD közötti molekulatömegű protein koncentrációját, mely protein aminosav-szekvenciája lényegében hasonló az - egér plazminogén-molekula hozzávetőleg 98. aminosavával kezdődő - egér plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciájához.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy rák diagnosztizálása vagy prognosztizálása céljából végezzük.

13. Készítmény, amely angiosztatint kódoló izolált DNS-szekvenciát tartalmaz.

14. A 13. igénypont szerinti készítmény, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a 2. azonosítószámú

szekvenciához lényegében hasonló aminosav-szekvenciát kódol, mely aminosav-szekvencia egértumor modellben angiogenezist gátló aktivitást mutat.

15. A 13. igénypont szerinti készítmény, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a 2., 3., 4., 5. vagy 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciát kódolja.

16. A 13. igénypont szerinti készítmény, amely tartalmaz egy - az angiosztatint kódoló DNS-szekvenciával kapcsolatban álló - vektort is, mely vektor, ha jelen vagy egy sejtben, képes az angiosztatin expresszáására.

17. Készítmény, amely egy vektort hordozó sejtet tartalmaz, mely vektor angiosztatint kódol DNS-szekvenciát tartalmaz, és, ha jelen van a sejtben, képes az angiosztatin expresszáására.

18. A 17. igénypont szerinti készítmény, amely olyan DNS-szekvenciát tartalmaz, amely a 2., 3., 4., 5. vagy 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciát kódolja.

19. Eljárás egy vektort tartalmazó sejtnek emberbe vagy állatba való beültetésére, azzal jellemezve, hogy olyan vektort alkalmazunk, amely angiosztatint kódoló DNS-szekvenciát tartalmaz, és - ha jelen van a sejtben - képes az angiosztatint expresszálni.

20. A 19. igénypont szerinti eljárás, azzal jellemezve, hogy olyan DNS-szekvenciát alkalmazunk, amely a 2., 3., 4., 5. vagy 6. azonosítószámú aminosav-szekvenciát kódolja.

21. Készítmény, amely angiosztatint és gyógyászati szempontból elfogadható kötőanyagot tartalmaz.

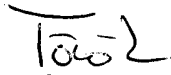
22. A 21. igénypont szerinti készítmény, amely tartós kibocsátást biztosító anyagot is tartalmaz.

23. A 21. igénypont szerinti készítmény, amely angiosztatiként olyan proteint tartalmaz, melynek molekulatömege - redukáló poliakril-amid-gélelektroforézis szerint - hozzávetőleg 38 kD és 45 kD közötti, és aminosav-szekvenciája lényegében hasonló az - egér plazminogén-molekula hozzávetőleg 98. aminosavával kezdődő - egér plazminogén-fragmens aminosav-szekvenciájához.

24. Készítmény, amely angiosztatinhoz specifikusan kötődő antitestet tartalmaz, mely antitest nem kötődik a plazminogénhez.

A meghatalmazott:

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.
29.


Török Ferenc

szabadalmi ügyvivő

114 oldal
26 oldal oldal
140 oldal Bevez

Az egér plazminogén aminosav-szekvenciája:

met asp his lys glu val ile leu leu phe leu leu leu leu lys
 pro gly gln gly asp ser leu asp gly tyr ile ser thr gln gly
 ala ser leu phe ser leu thr lys lys gln leu ala ala gly gly
 val ser asp cys leu ala lys cys glu gly glu thr asp phe val
 cys arg ser phe gln tyr his ser lys glu gln gln cys val ile
 met ala glu asn ser lys thr ser ser ile ile arg met arg asp
 val ile leu phe glu lys arg val tyr leu ser glu cys lys thr
 gly ile gly asn gly tyr arg gly thr met ser arg thr lys ser
 gly val ala cys gln lys trp gly ala thr phe pro his val pro
 asn tyr ser pro ser thr his pro asn glu gly leu glu glu asn
 tyr cys arg asn pro asp asn asp glu gln gly pro trp cys tyr
 thr thr asp pro asp lys arg tyr asp tyr cys asn ile pro glu
 cys glu glu glu cys met tyr cys ser gly glu lys tyr glu gly
 lys ile ser lys thr met ser gly leu asp cys gln ala trp asp
 ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
 ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu
 pro arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu
 tyr cys asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro ser
 pro thr tyr gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly
 thr val ser val thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser
 glu gln thr pro his arg his asn arg thr pro glu asn phe pro
 cys lys asn leu glu glu asn tyr cys arg asn pro asp gly glu
 thr ala pro trp cys tyr thr thr asp ser gln leu arg trp glu
 tyr cys glu ile pro ser cys glu ser ser ala ser pro asp gln
 ser asp ser ser val pro pro glu glu gln thr pro val val gln
 glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr arg gly thr ser ser
 thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp ala ala met phe
 pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro asp ala gly
 leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys gly pro
 trp cys tyr thr thr asp pro ser val arg trp glu tyr cys asn
 leu lys arg cys ser glu thr gly gly ser val val glu leu pro
 thr val ser gln glu pro ser gly pro ser asp ser glu thr asp
 cys met tyr gly asn gly lys asp tyr arg gly lys thr ala val
 thr ala ala gly thr pro cys gln gly trp ala ala gln glu pro
 his arg his ser ile phe thr pro gln thr asn pro arg ala asp
 leu glu lys asn tyr cys arg asn pro asp gly asp val asn gly
 pro trp cys tyr thr thr asn pro arg lys leu tyr asp tyr cys
 asp ile pro leu cys ala ser ala ser ser phe glu cys gly lys
 pro gln val glu pro lys lys cys pro gly arg val val gly gly
 cys val ala asn pro his ser trp pro trp gln ile ser leu arg
 thr arg phe thr gly gln his phe cys gly gly thr leu ile ala
 pro glu trp val leu thr ala ala his cys leu glu lys ser ser
 arg pro glu phe tyr lys val ile leu gly ala his glu glu tyr
 ile arg gly leu asp val gln glu ile ser val ala lys leu ile
 leu glu pro asn asn arg asp ile ala leu leu lys leu ser arg
 pro ala thr ile thr asp lys val ile pro ala cys leu pro ser
 pro asn tyr met val ala asp arg thr ile cys tyr ile thr gly
 trp gly glu thr gln gly thr phe gly ala gly arg leu lys glu
 ala gln leu pro val ile glu asn lys val cys asn arg val glu
 tyr leu asn asn arg val lys ser thr glu leu cys ala gly gln
 leu ala gly gly val asp ser cys gln gly asp ser gly gly pro
 leu val cys phe glu lys asp lys tyr ile leu gln gly val thr
 ser trp gly leu gly cys ala arg pro asn lys pro gly val tyr
 val arg val ser arg phe val asp trp ile glu arg glu met arg
 asn asn

Egér

Humán

Rhesus-majom

Sertés

Szarvasmarha

plazminogén-fragmensek szekvenciái

val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	ile	gly	asn	gly	tyr	arg	gly
val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
val	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
ile	tyr	leu	ser	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	lys	asn	tyr	arg	gly
ile	tyr	leu	leu	glu	cys	lys	thr	gly	asn	gly	gln	thr	tyr	arg	gly
thr	met	ser	arg	thr	lys	ser	gly	val	ala	cys	gln	lys	trp	gly	ala
thr	met	ser	lys	thr	lys	asn	gly	ile	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ser
thr	met	ser	lys	thr	arg	thr	gly	ile	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ser
thr	thr	ser	lys	thr	lys	ser	gly	val	ile	cys	gln	lys	trp	ser	val
thr	thr	ala	glu	thr	lys	ser	gly	val	thr	cys	gln	lys	trp	ser	ala
thr	phe	pro	his	val	pro	asn	tyr	ser	pro	ser	thr	his	pro	asn	glu
thr	ser	pro	his	arg	pro	arg	phe	ser	pro	ala	thr	his	pro	ser	glu
thr	ser	pro	his	arg	pro	thr	phe	ser	pro	ala	thr	his	pro	ser	glu
ser	ser	pro	his	ile	pro	lys	tyr	ser	pro	glu	lys	phe	pro	leu	ala
thr	ser	pro	his	val	pro	lys	phe	ser	pro	glu	lys	phe	pro	leu	ala
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	pro	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	gly	gln	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	lys	gly
gly	leu	glu	glu	asn	tyr	cys	arg	asn	pro	asp	asn	asp	glu	asn	gly
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	asp	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asn
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	glu	arg	phe	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	glu	thr	arg	phe	asp	tyr	cys	asp
pro	trp	cys	tyr	thr	thr	asp	pro	asp	lys	arg	tyr	asp	tyr	cys	asp
ile	pro	glu	cys	glu	glu	glu	cys	met	tyr	cys	ser	gly	glu	lys	tyr
ile	leu	glu	cys	glu	glu	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	glu	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	his	tyr
ile	pro	glu	cys	glu	asp	lys	cys	met	his	cys	ser	gly	glu	asn	tyr
glu	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	asp	cys	gln	ala	trp
asp	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	glu	cys	gln	ala	trp
asp	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	leu	glu	cys	gln	ala	trp
glu	gly	lys	ile	ser	lys	thr	met	ser	gly	ile	glu	cys	gln	ser	trp
glu	gly	lys	ile	ala	lys	thr	met	ser	gly	arg	asp	cys	gln	ala	trp

2. ábra

```

asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ala lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro
gly ser gln ser pro his ala his gly tyr leu pro ser lys phe pro
asp ser gln ser pro his ala his gly tyr ile pro ser lys phe pro

ser lys asn leu lys met asn tyr cys his asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp arg glu leu
asn lys asn leu lys lys asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro
asn lys asn leu lys met asn tyr cys arg asn pro asp gly glu pro

arg pro trp cys phe thr thr asp pro thr lys arg trp glu tyr cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu leu cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro asn lys arg trp glu phe cys
arg pro trp cys phe thr thr asp pro gln lys arg trp glu phe cys

asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro pro pro ser pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro thr ser gly pro thr tyr
asp ile pro arg cys thr thr pro pro pro ser ser gly pro lys tyr

gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asn val ala val
gln cys leu lys gly thr gly glu asn tyr arg gly asp val ala val
gln cys leu lys gly arg gly glu asn tyr arg gly thr val ser val
gln cys leu lys gly thr gly lys asn tyr gly gly thr val ala val

thr val ser gly lys thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his
thr val ser gly his thr cys gln his trp ser ala gln thr pro his
thr val ser gly his thr cys his gly trp ser ala gln thr pro his
thr ala ser gly his thr cys gln arg trp ser ala gln ser pro his
thr glu ser gly his thr cys gln arg trp ser glu gln thr pro his

arg his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
thr his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu asp glu
lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu
lys his asn arg thr pro glu asn phe pro cys lys asn leu glu glu

asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly lys arg ala pro trp cys his thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu thr ala pro trp cys tyr thr
asn tyr cys arg asn pro asp gly glu lys ala pro trp cys tyr thr

```

2. ábra folytatása

thr asp ser gln leu arg trp glu tyr cys glu ile pro ser cys glu
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys asp
 thr asn ser gln val arg trp glu tyr cys lys ile pro ser cys glu
 thr asp ser glu val arg trp asp tyr cys lys ile pro ser cys gly
 thr asn ser glu val arg trp glu tyr cys thr ile pro ser cys glu

ser ser ala ser pro asp gln ser asp ser ser val pro pro glu glu
 ser ser pro val ser thr glu gln leu ala pro thr ala pro pro glu
 ser ser pro val ser thr glu pro leu asp pro thr ala pro pro glu
 ser ser thr thr ser thr glu his leu asp ala pro val pro pro glu
 ser ser pro leu ser thr glu arg met asp val pro val pro pro glu

gln thr pro val val gln glu cys tyr gln ser asp gly gln ser tyr
 leu thr pro val val gln asp cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
 leu thr pro val val gln glu cys tyr his gly asp gly gln ser tyr
 gln thr pro val ala gln asp cys tyr arg gly asn gly glu ser tyr
 gln thr pro val pro gln asp cys tyr his gly asn gly gln ser tyr

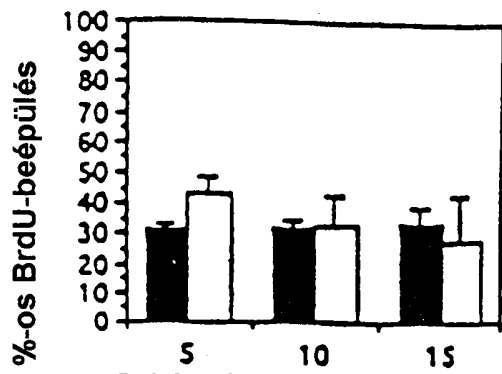
arg gly thr ser ser thr thr ile thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly lys lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp
 arg gly thr ser ser thr thr thr thr gly arg lys cys gln ser trp

ala ala met phe pro his arg his ser lys thr pro glu asn phe pro
 ser ser met thr pro his arg his gln lys thr pro glu asn tyr pro
 ser ser met thr pro his trp his glu lys thr pro glu asn phe pro
 val ser met thr pro his arg his glu lys thr pro gly asn phe pro
 ser ser met thr pro his arg his leu lys thr pro glu asn tyr pro

asp ala gly leu glu met asn tyr cys arg asn pro asp gly asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys
 asn ala gly leu thr met asn tyr cys arg asn pro asp ala asp lys

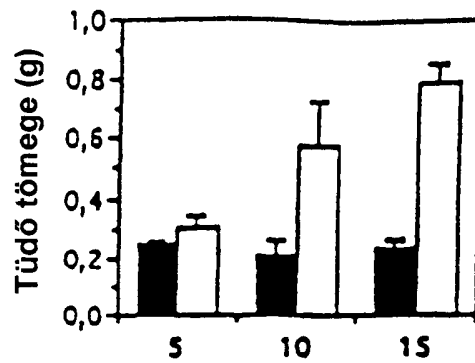
gly pro trp
 gly pro trp
 gly pro trp
 ser pro trp
 ser pro trp

2. ábra folytatása



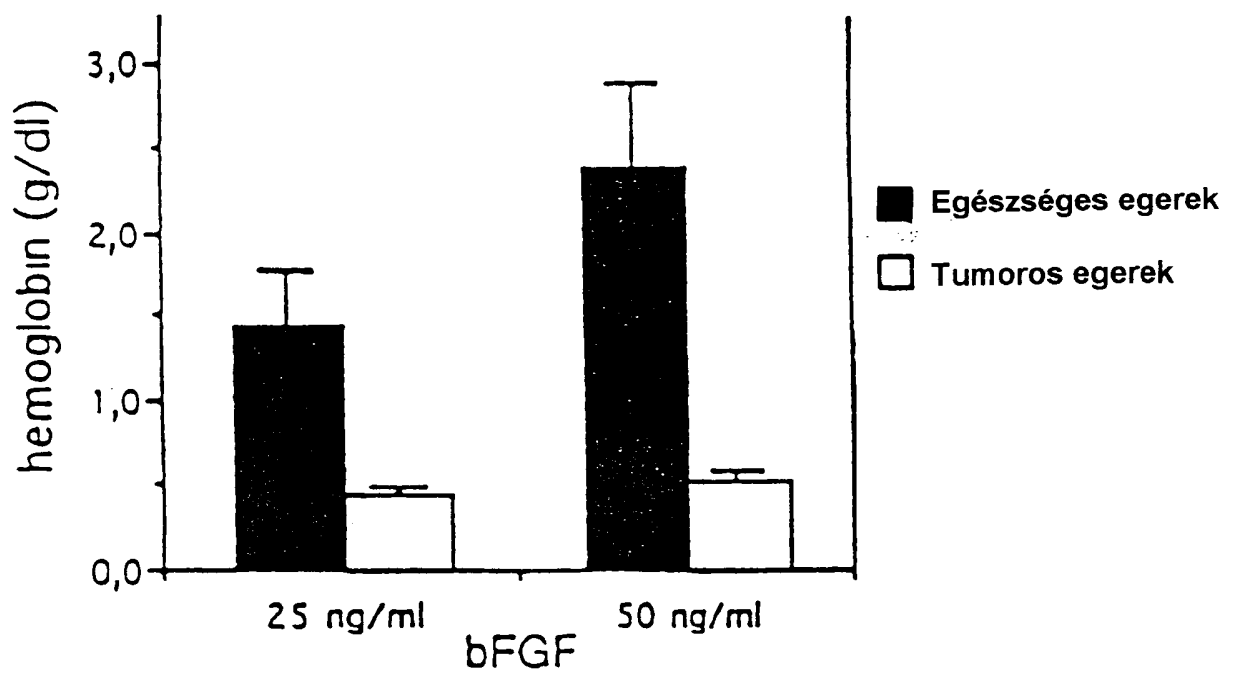
Az operáció után eltelt napok száma

3A ábra

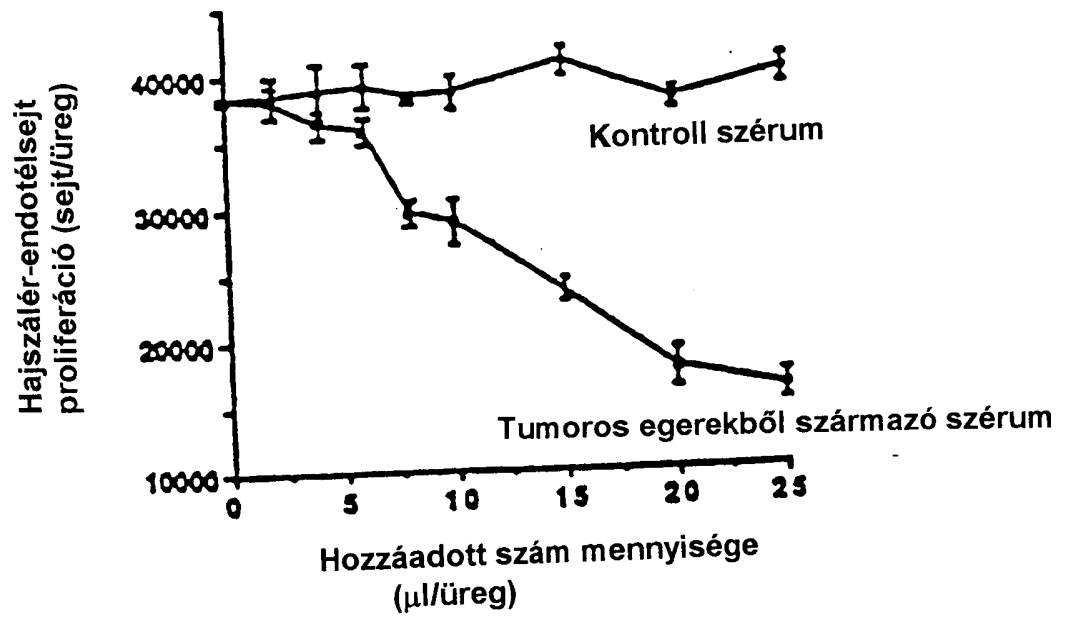


Az operáció után eltelt napok száma

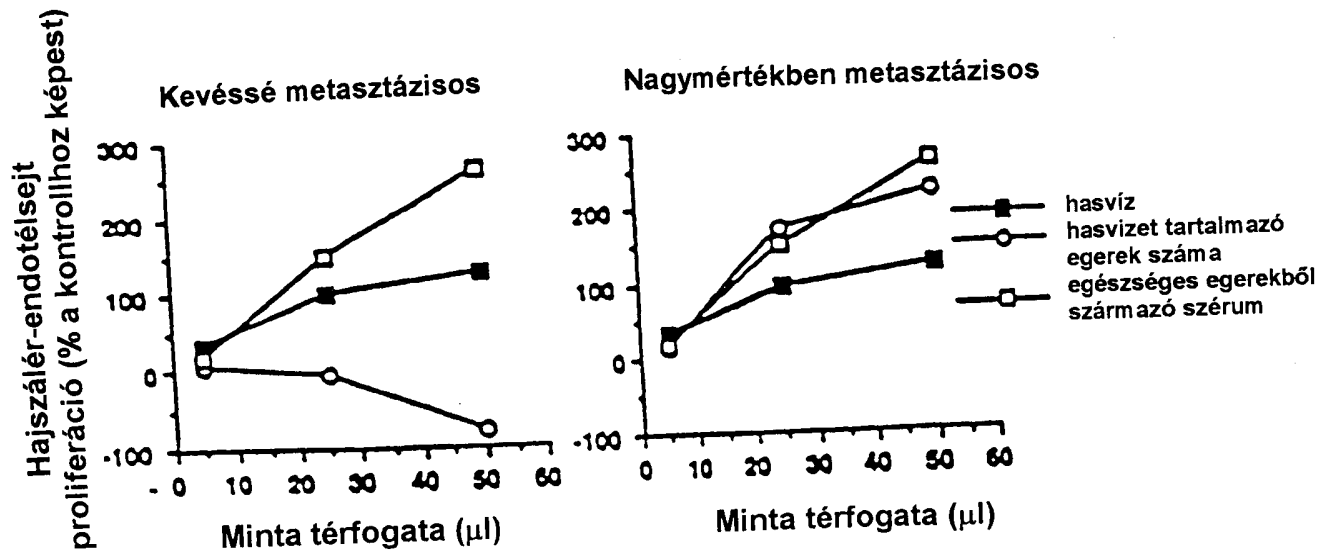
3B ábra



4. ábra

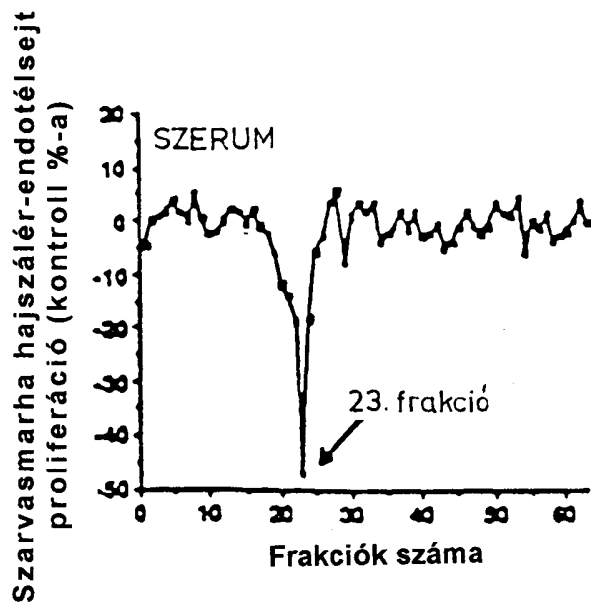


5. ábra

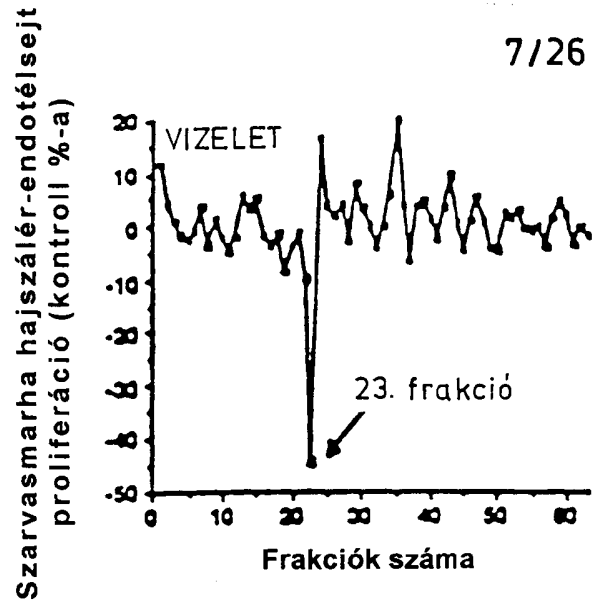


6A ábra

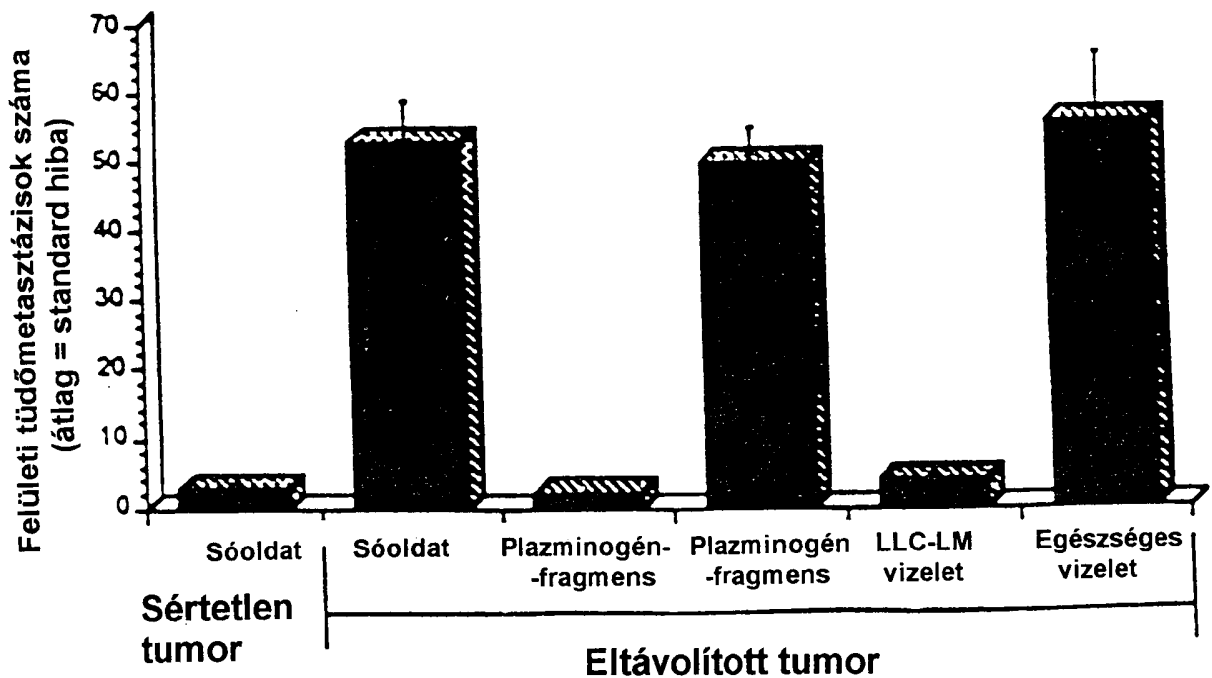
6B ábra



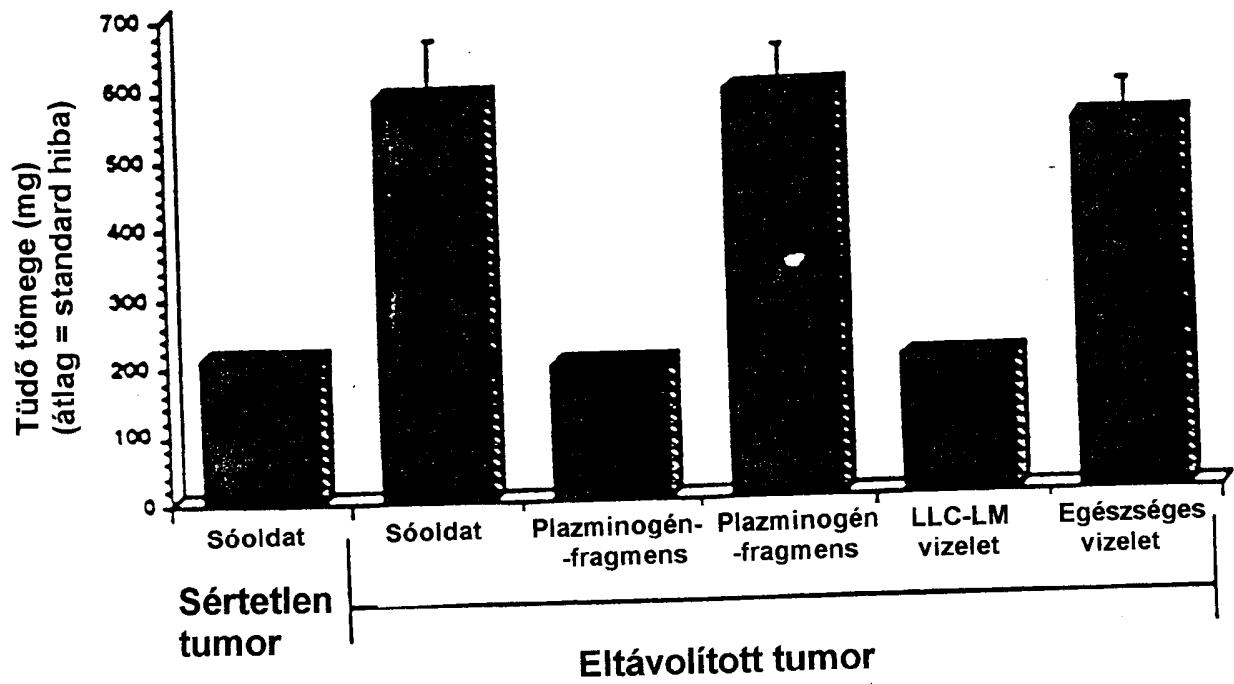
7A ábra



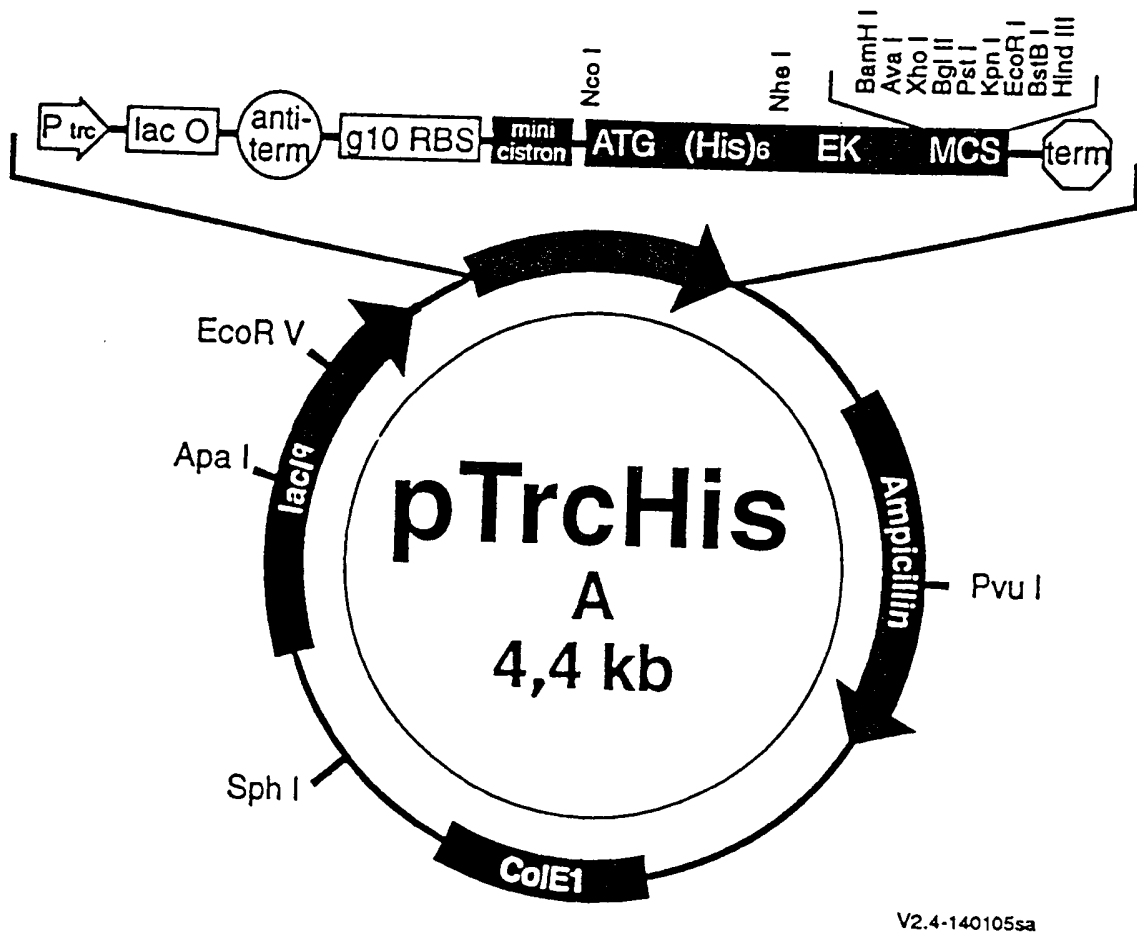
7B ábra



8. ábra

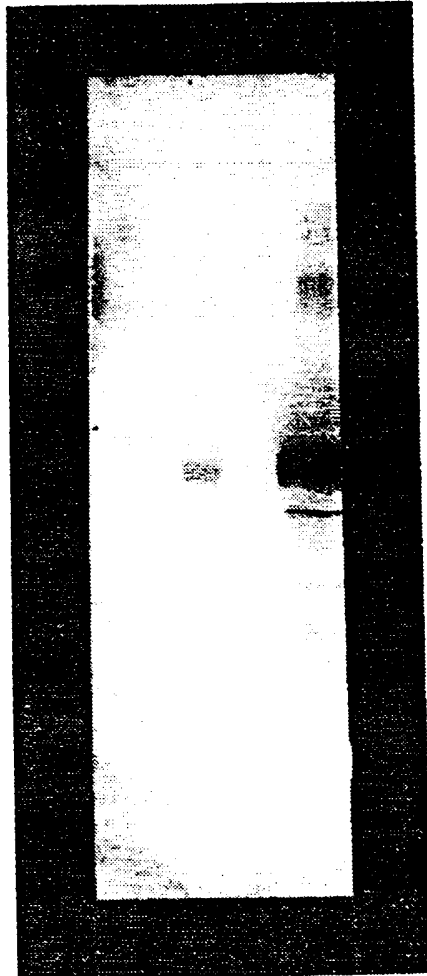


9. ábra

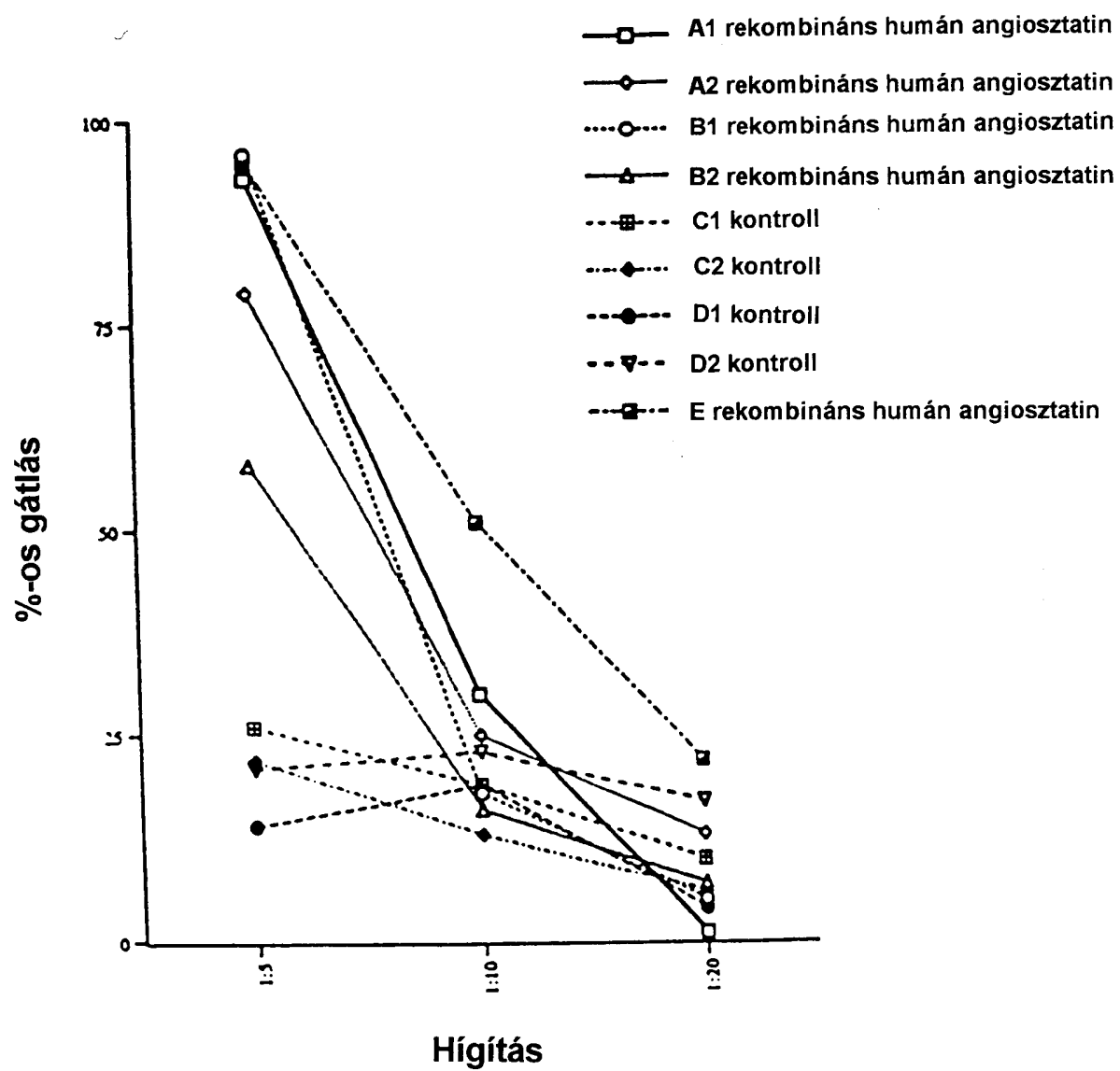


V2.4-140105sa

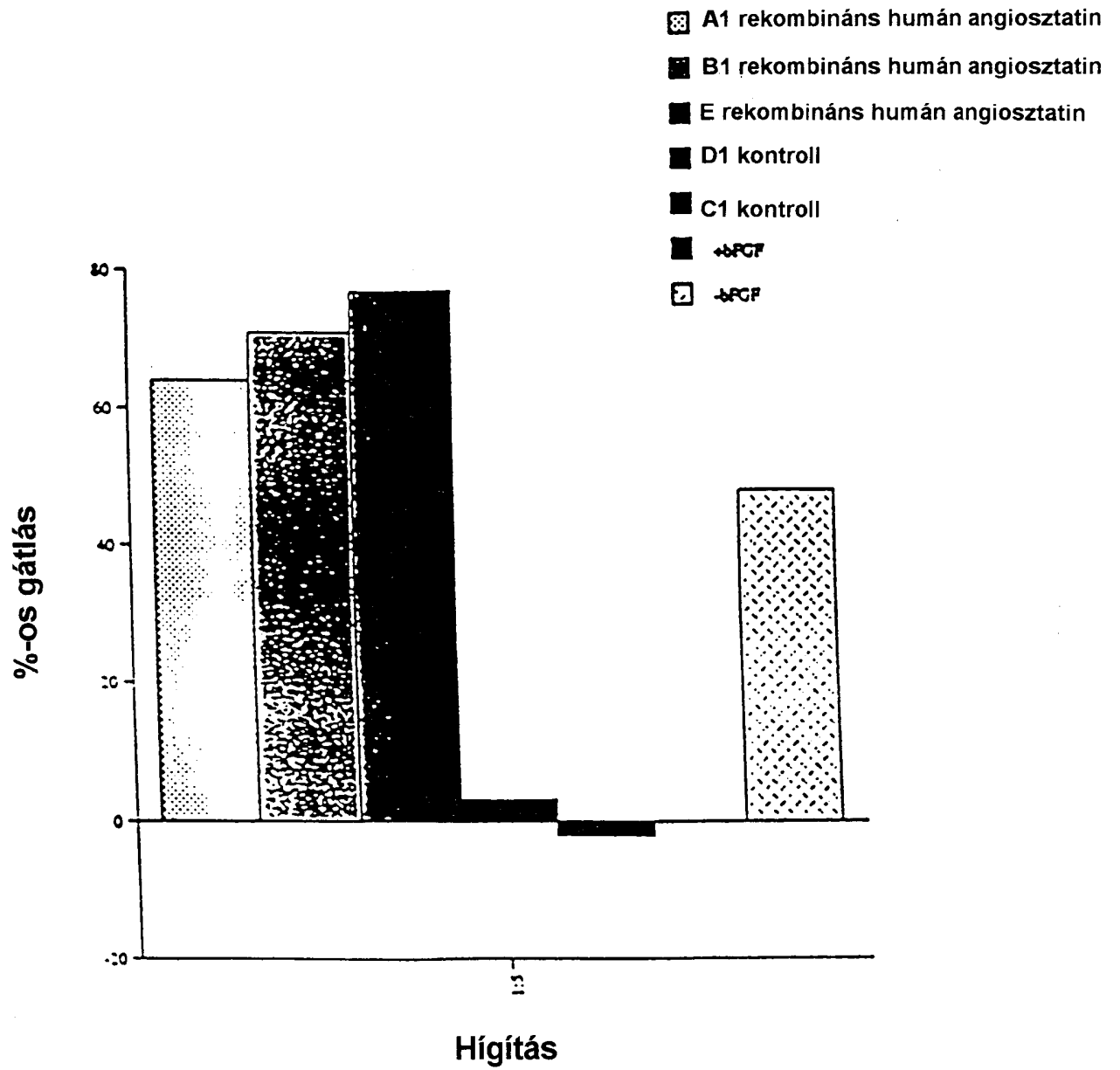
10. ábra



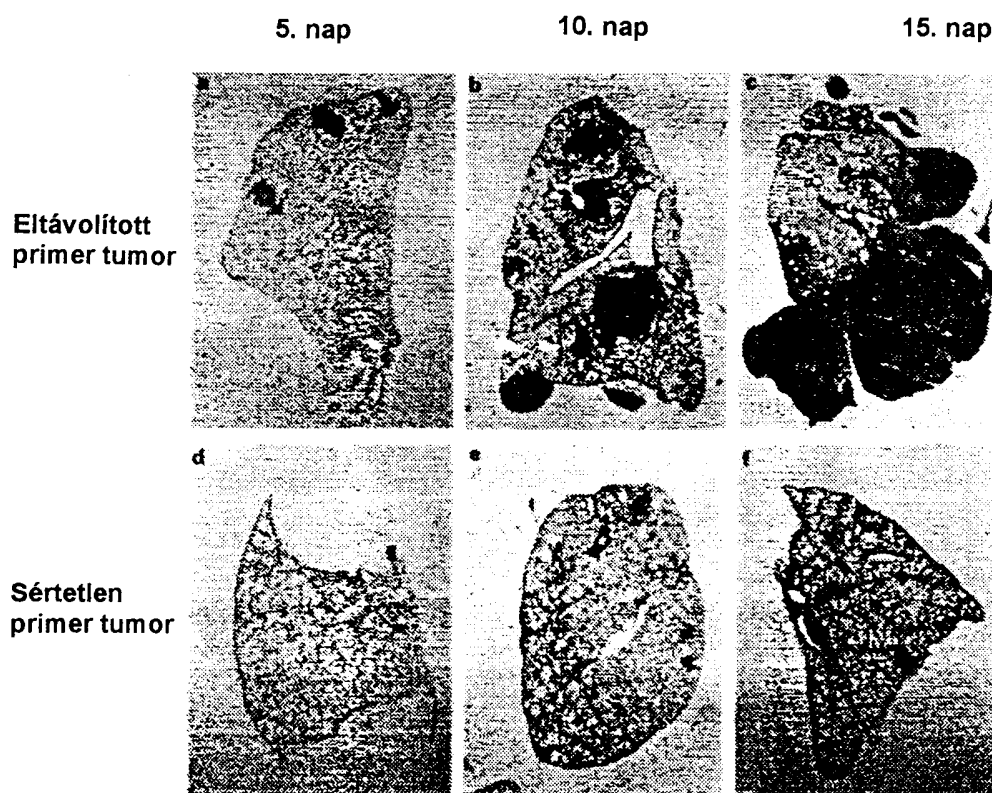
11. ábra



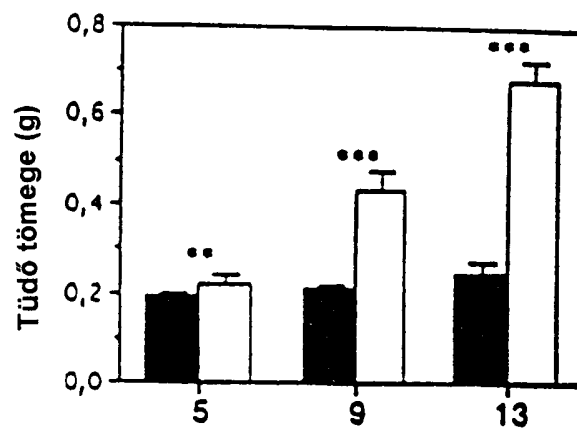
12. ábra



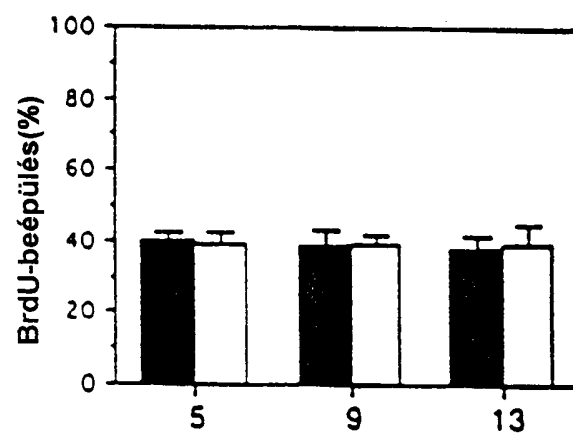
13. ábra



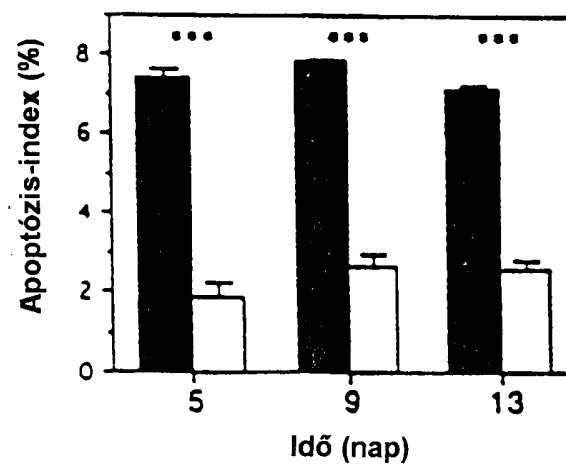
14. ábra



15A ábra

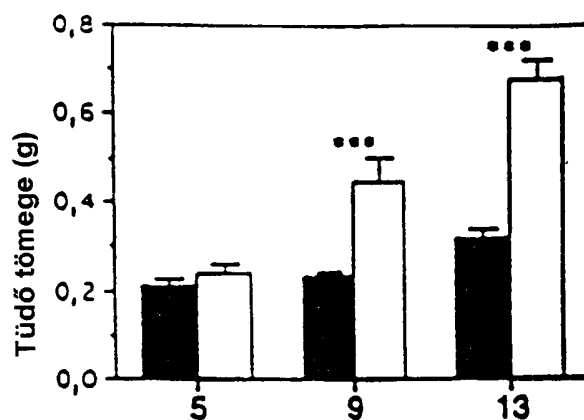


15B ábra

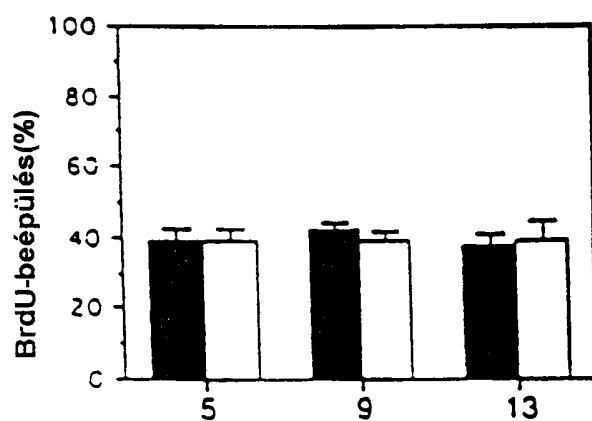


15C ábra

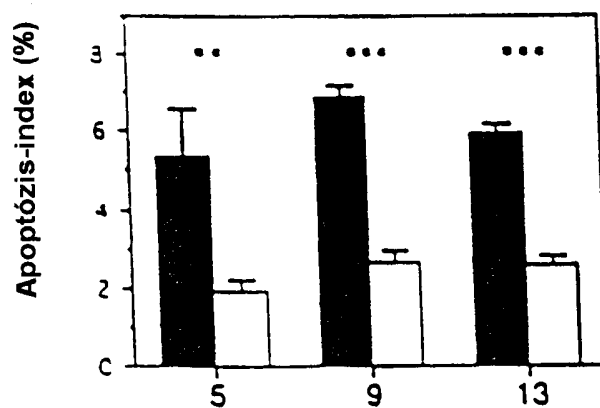
Idő (nap)



16A ábra

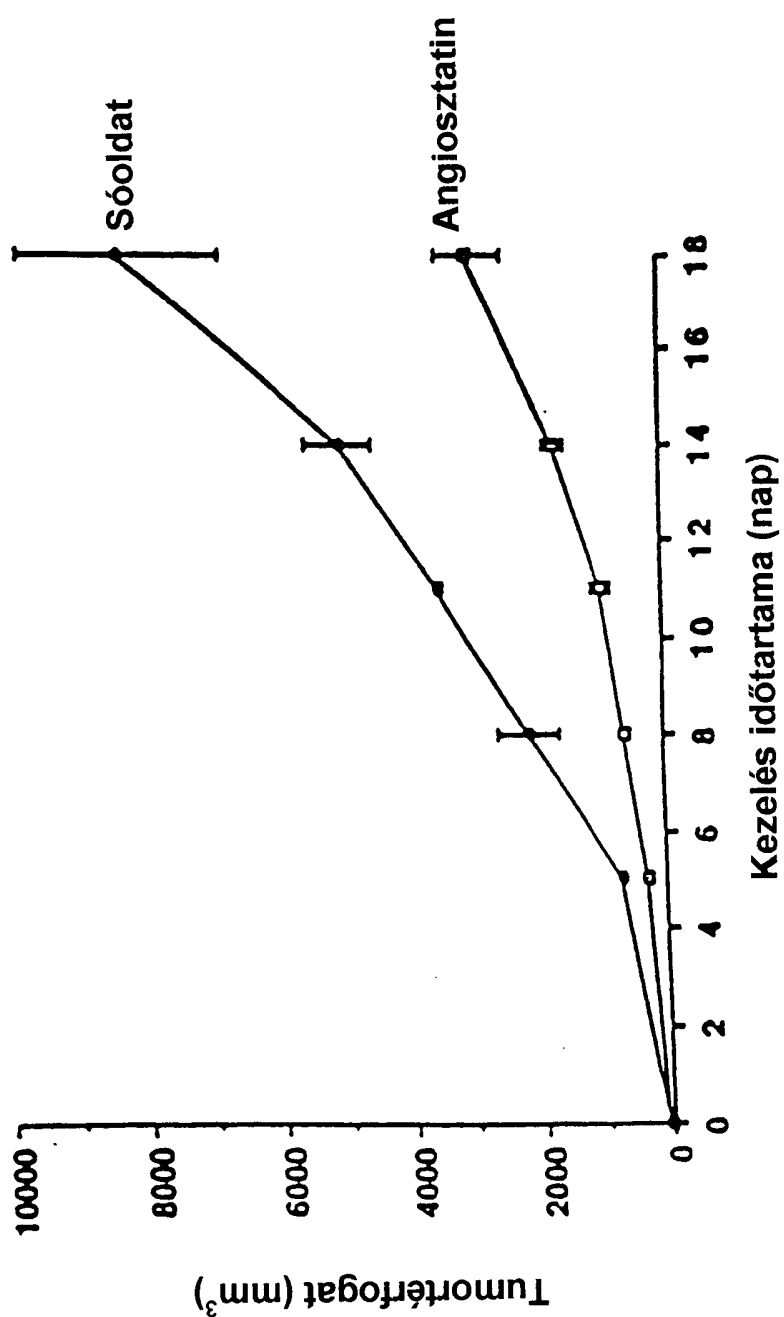


16B ábra

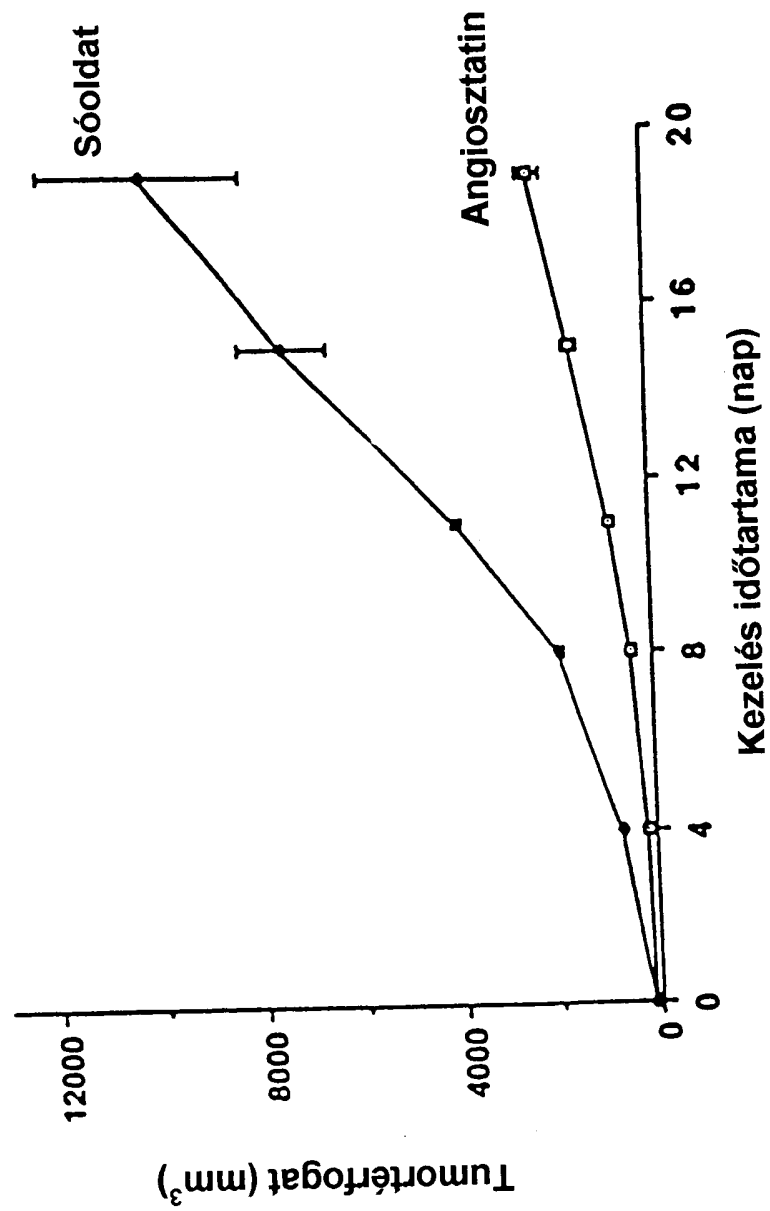


16C ábra

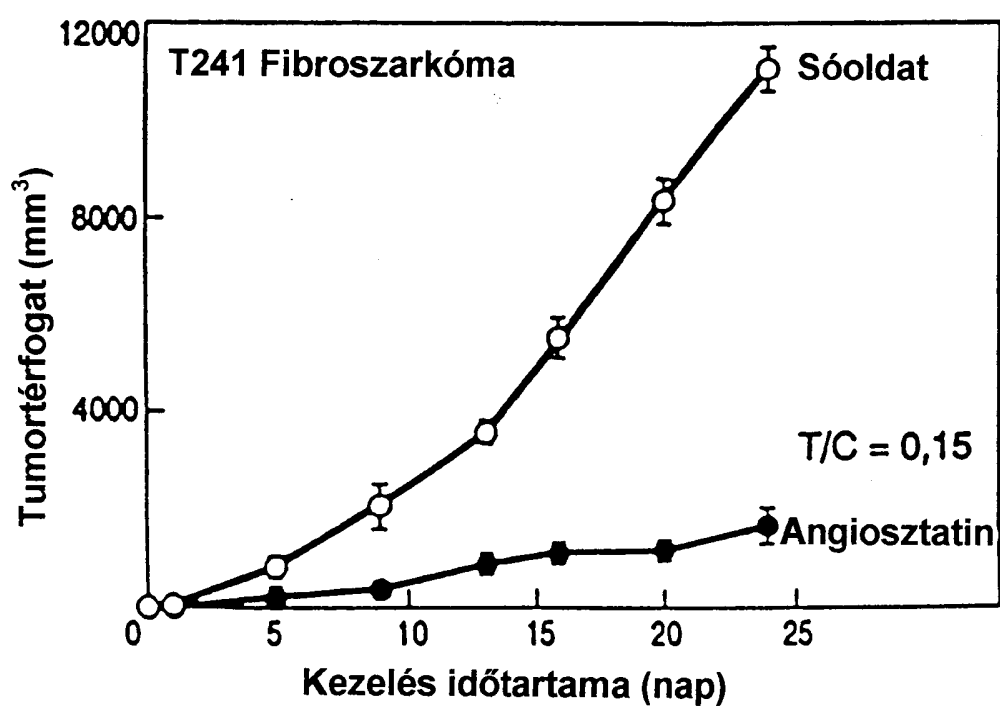
Idő (nap)



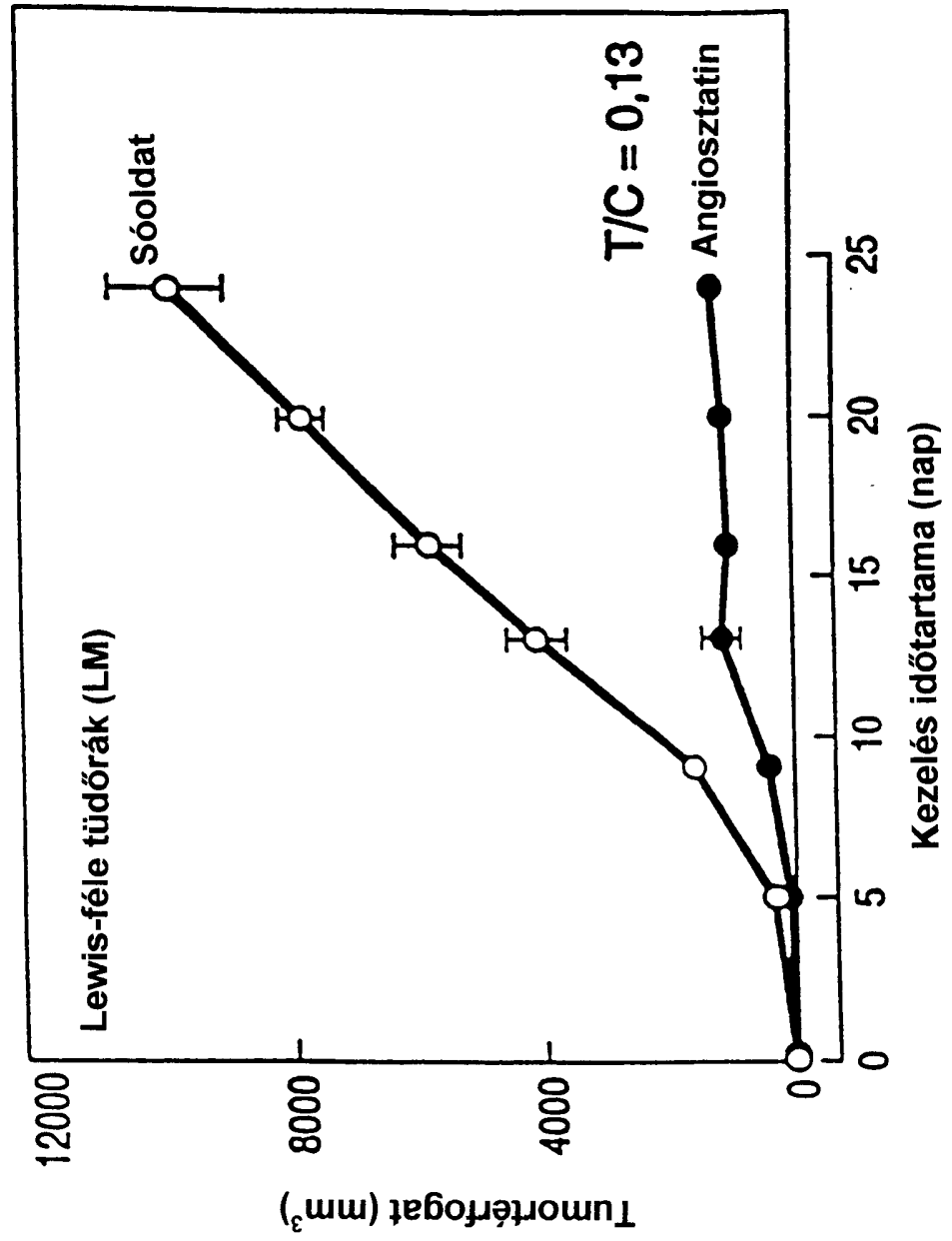
17. ábra



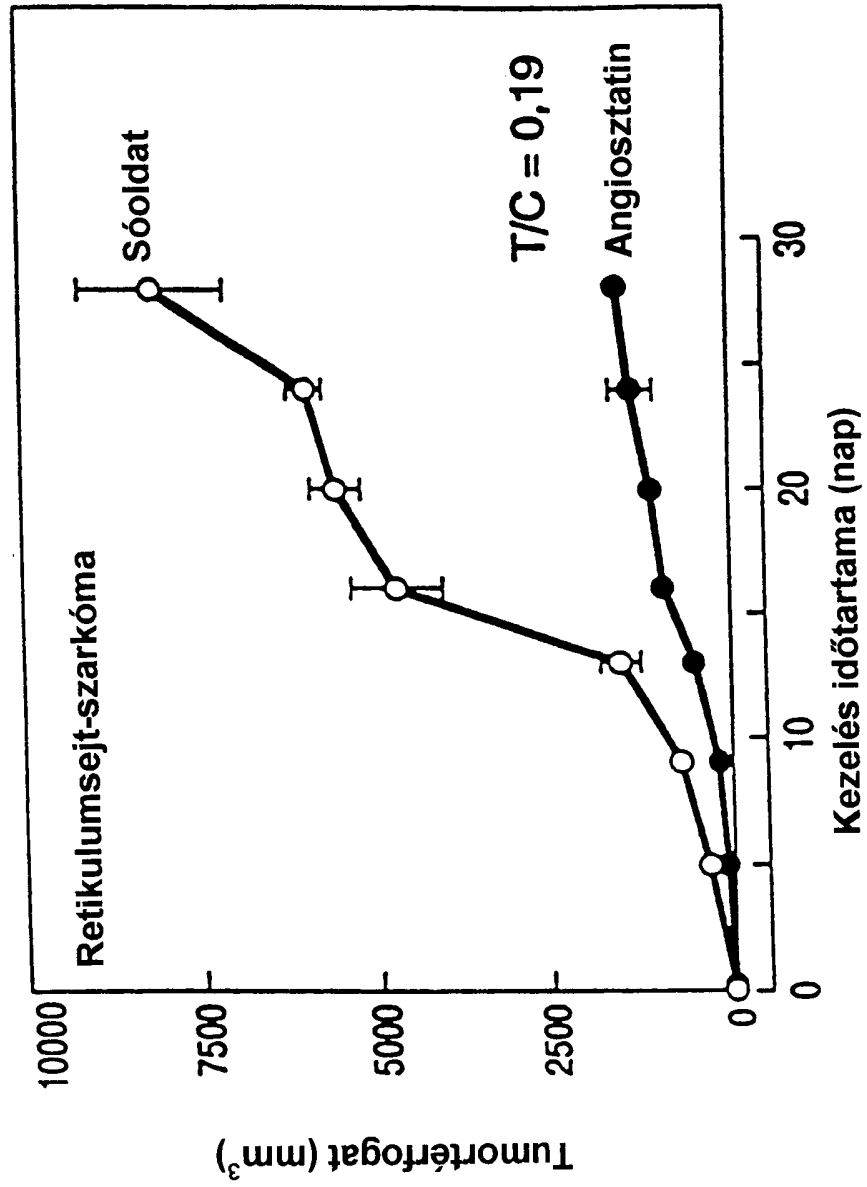
18. ábra



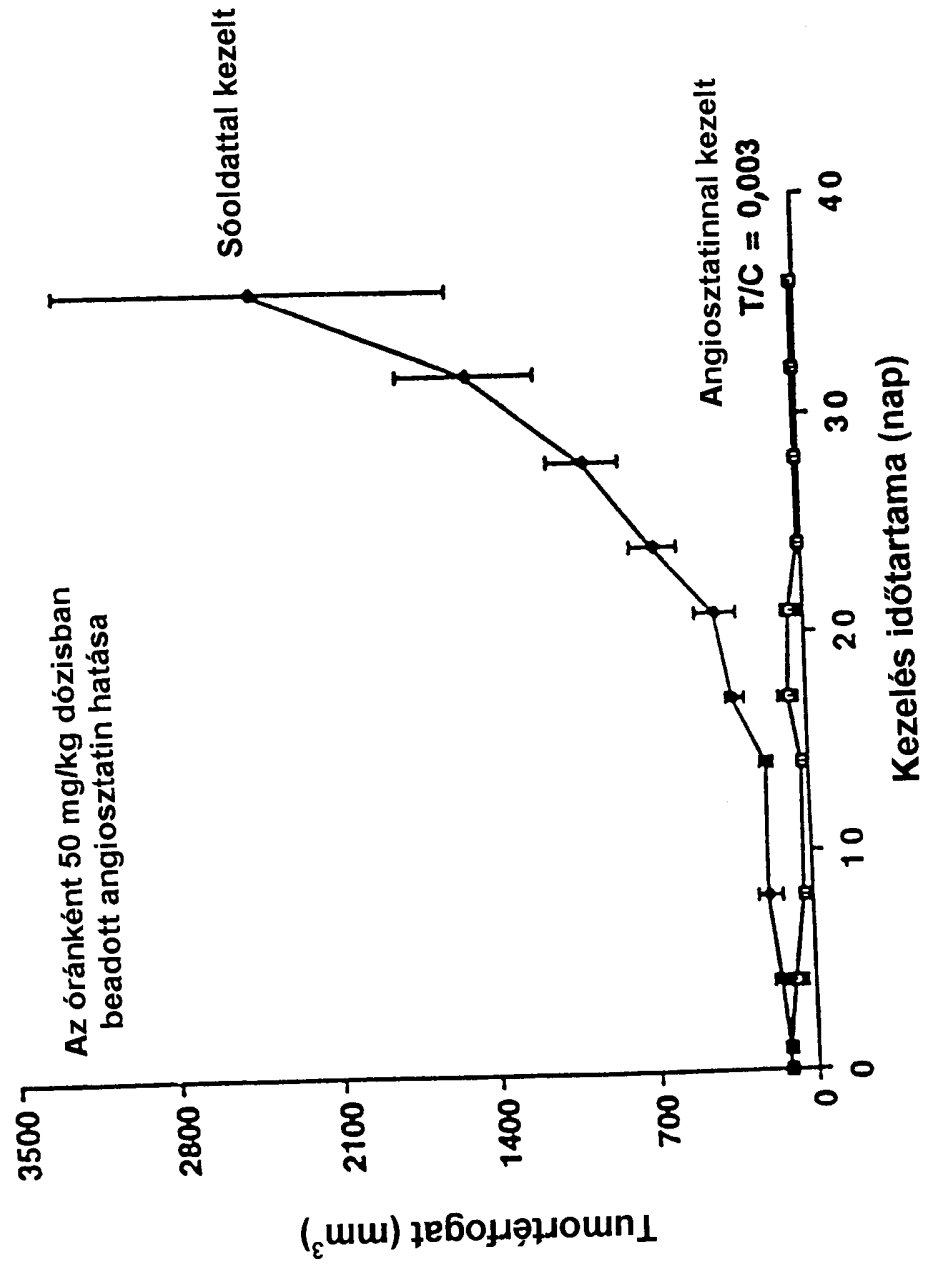
19. ábra



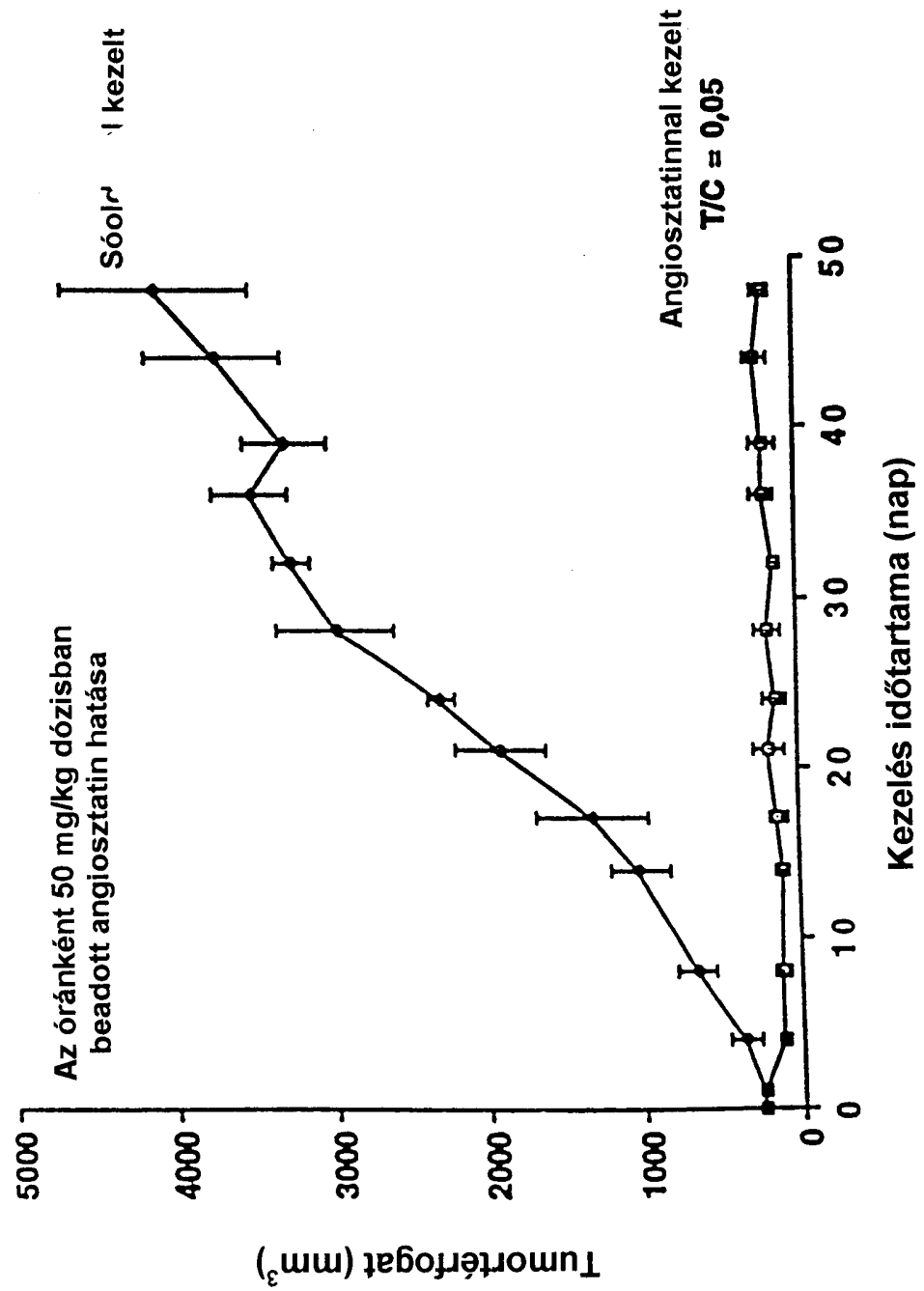
20. ábra



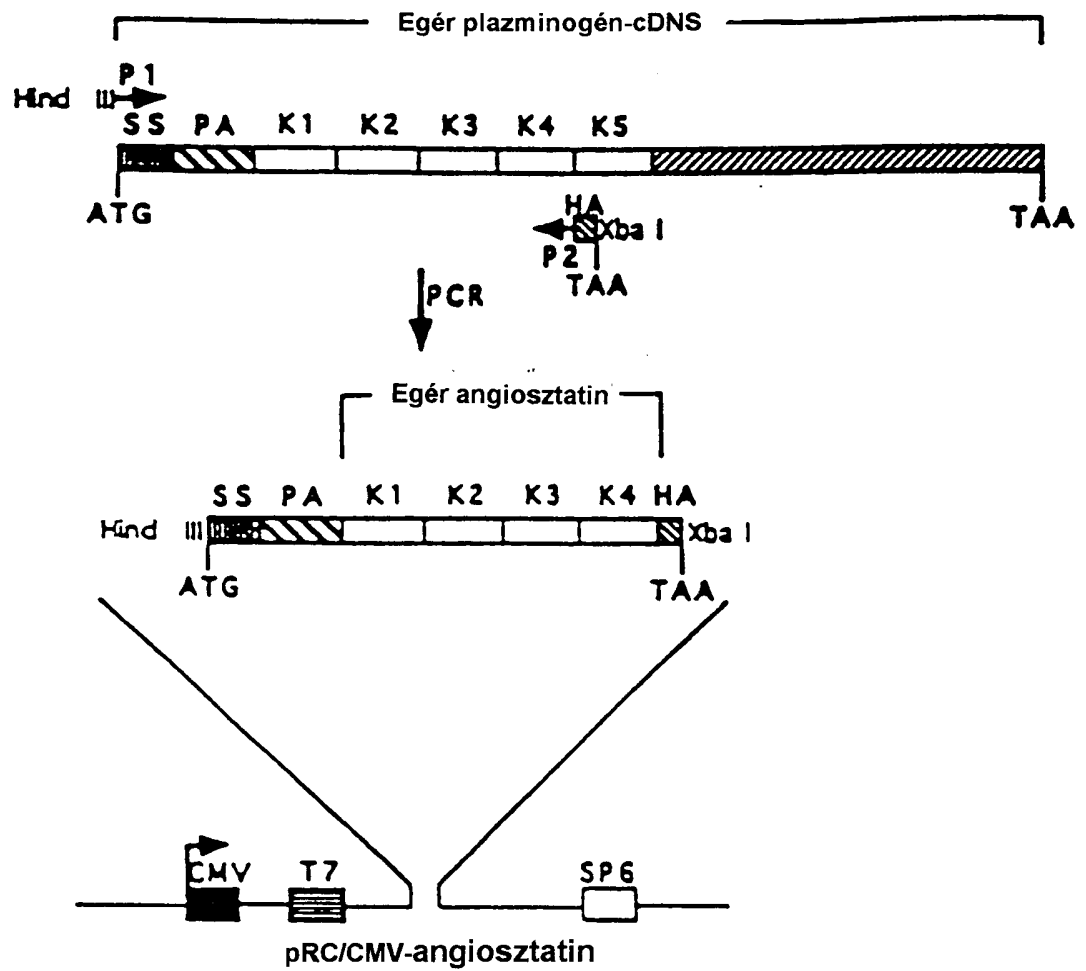
21. ábra



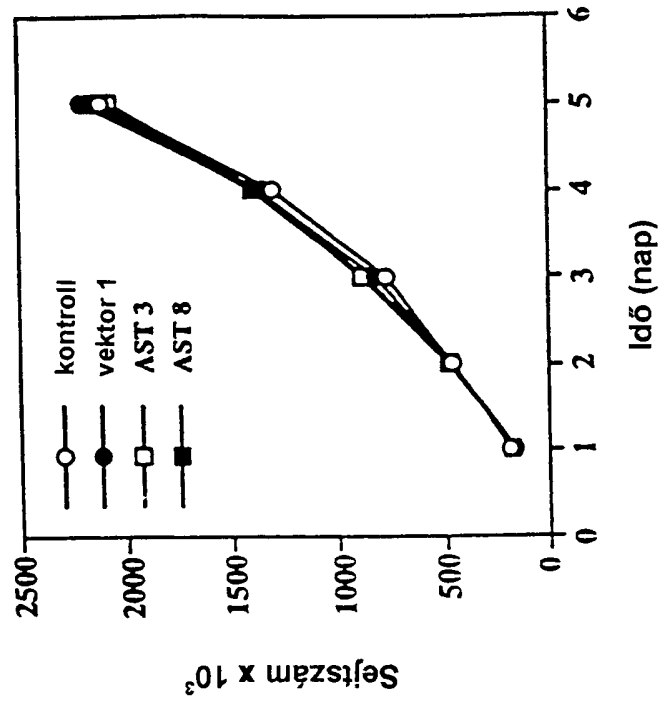
22. ábra



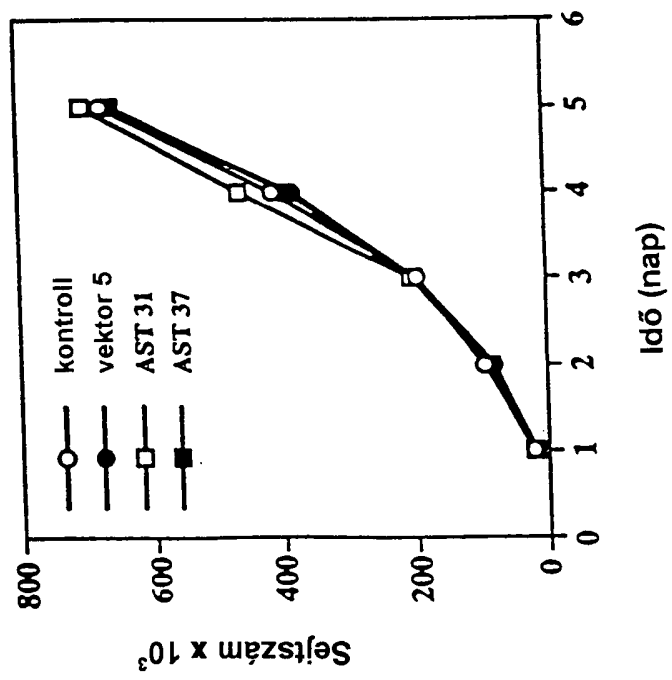
23. ábra



24. ábra

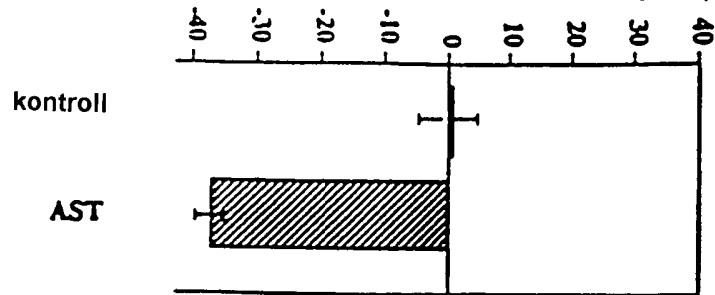


25B ábra



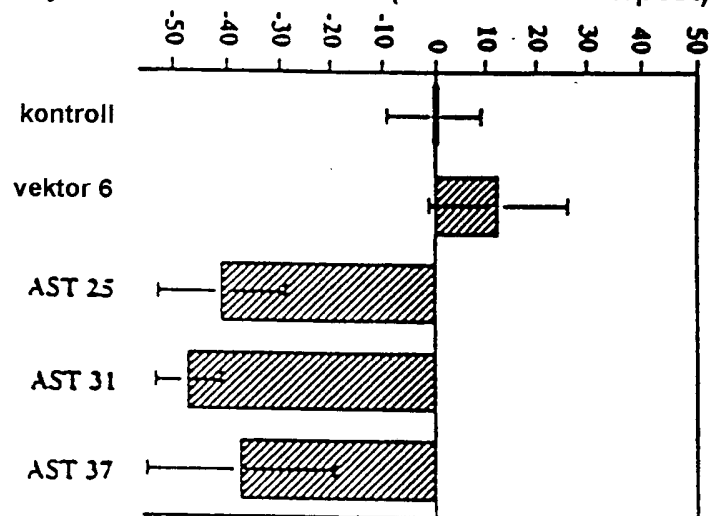
25A ábra

A sejtszám %-os változása (a kontrollhoz képest)



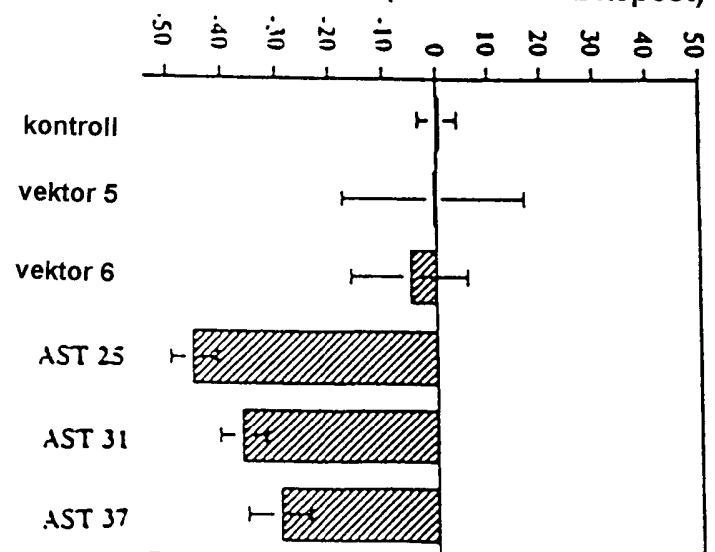
26A ábra

A sejtszám %-os változása (a kontrollhoz képest)

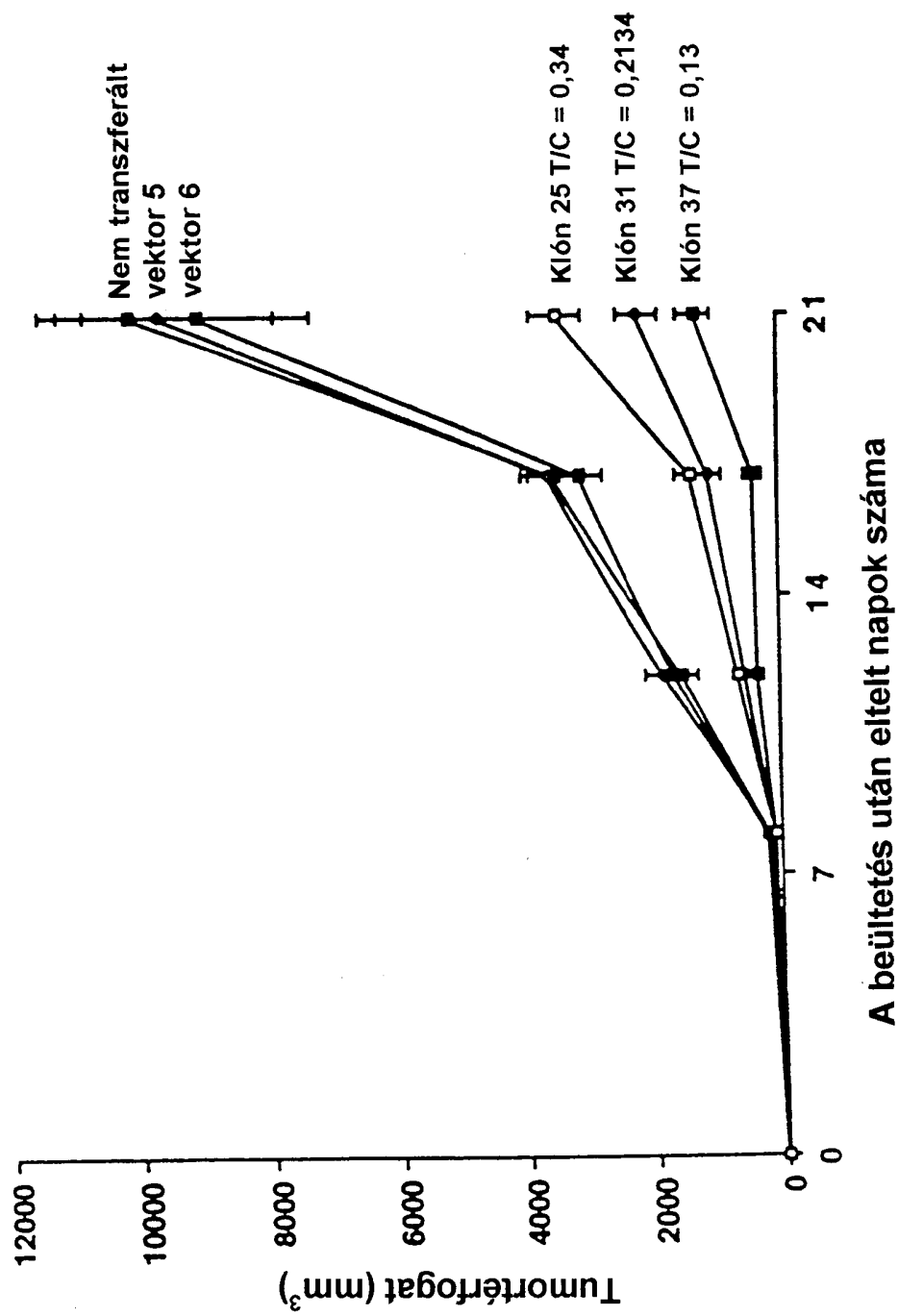


26B ábra

A sejtszám %-os változása (a kontrollhoz képest)



26C ábra



27. ábra