



**Hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával előidézett betegségek kezelésére**

**K I V O N A T**

A találmány tárgya hosszú pentraxin PTX3 vagy funkciós származéka alkalmazása gyógyszer előállítására, amely FGF-2 növekedési faktor biológiai hatását gátolja, és az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával előidézett betegségek megelőzésére és kezelésére használható.

*Jellemsz. a lve φ*  
*Bertus*



**Hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával előidézett betegségek kezelésére**

A találmány tárgya hosszú pentraxin PTX3 vagy reakcióképes származékai alkalmazása gyógyszer előállítására, amellyel az FGF-2 növekedési faktor biológiai hatása gátolható, és amely gyógyszer olyan betegségek kezelésére vagy megelőzésére alkalmas, amelyeket az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválása idéz elő.

Az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával előidézett betegségek közé tartoznak a megváltozott angiogenezissel és a fibroblasztok vagy a simaizomsejtek nem szabályzott burjánzásával előidézett betegségek.

Az első antiangiogén hatású vegyületet a porcban Henry Brem és Judath Folkman fedezték fel 1975-ben (J. Exp. Med. 1975. február 1.; 141(2):427-39). A szerzők azt gondolták, hogy ez a felfedezés patológiai folyamatok szabályozására, pl. tumornövekedés, áttét, az ízületek krónikus és akut gyulladása, diabéteszes retinopátia szabályozására használható, a patológiai neoangiogenezis szelektív inhibitorainak felhasználásával.

Az angiogenezis a felnőttben rendszerint nyugalmas, de normális működést képvisel, pl. sebgyógyulás vagy a nőknél a reproduktív ciklus alatt a méhbelhám újraképződése.

Az angiogén reakció fiziológiailag stimulálódik, ha csökkennek az érműködések és nem megfelelő a szövet perfúzió.

Még általánosabban azt lehet mondani, hogy fiziológiai körülmények között az angiogenezis pozitív visszajelzés a nem



megfelelő perfúzióra adott reakcióban, vagy a csökkent oxigén-ellátás és tápanyagellátás reakciójában, mint ahogy az előfordul pl. érelzáródás esetében, vagy szövet tömegnövekedési helyzetben, pl. az izomszövet képződését kísérő neovaszkularizációban; és megnövekedett oxigén- és tápanyag-igénnyel járó megnövekedett munkaterhelés esetében.

Jól ismert, hogy a primer tumor növekedését kedvezően befolyásolja a tumorszövet jó vaszkularizációja, azaz érképződése. Megfelelő oxigén- és tápanyagellátás segíti magának a tumornak a gyors növekedését.

Kimutatták, hogy az angiogenezis mértéke rendkívül negatív tényező lehet a neoplazmák prognózisában (van Hinsbergh VW, Collen A, Koolwijk P; Ann. Oncol., 10 Suppl., 4:60-3, 1999; Buolamwini JK; Curr., Opin., Chem., Biol., 3(4):500-9, 1999. aug.).

Az is ismert, hogy a tumor területén a tumorsejt biológiájának alapvető foka az áttét-képződés képességének megszerzése.

Az áttétben résztvevő tumorsejtek képesek elveszíteni a körülöttük levő szerkezetekhez való tapadást, behatolnak a vér- és nyirokerekbe, és a többi szövetet kolonizálják olyan távolságban, ahol folytatni képesek önmaguk reprodukálását.

Az áttét-képződés a betegség klinikai történetének is kritikus eseménye, mert ez a fő halálok a rák következtében. Szorosan összefügg az érszövet jelenlétével a tumor helyén vagy szomszédos területeken, és elősegíti az áttétet.

A tumorsejtek mozgása a környező szerkezetekbe lehetővé teszi, hogy ezek a sejtek elérjék a tumoron belüli véredényeket,



függetlenül attól, hogy már korábban léteztek vagy neo-angiogenézissel képződnek, és így elérik a véráramot (Ray JM., Stetler-Stevenson WG; Eur. Respir. J., 7(11):2062-72, 1994; Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE Jr.; FASEB J.; 7(15):1434-41, 1993. dec.).

A nyirok- és véredények közötti kommunikáció jelenléte a tumor érterületén lehetővé teszi a neoplasztikus sejtek számára, hogy mindkét érrendszerben mozogjanak.

Nemrégiben végzett vizsgálatok kimutattak egy közvetlen összefüggést az angiogenezis és az arthritisztes betegség között (Koch AE; Arthritis and Rheumatism 41:951-962, 1998). Különösen kimutatták, hogy az ízületi porc neovaszkularizációja döntő szerepet játszik a pannus (értartalmú kötőszövet ráterjedése a szaruhártyára) képződésben és az ízületi gyulladás előrehaladásában. Egy normális porc nem rendelkezik véredényekkel, míg az arthritisztes páciensek ízületi nedve angiogenézist stimúláló faktort tartalmaz, amelyet az endoteliális sejtek termelnek (EASF).

Ennek a faktornak a jelenléte összefügg a porc vaszkularizációjával és lebomlásával.

Más betegségek is kapcsolatosak az abnormális angiogenézissel.

Azt találták, hogy diabéteszes retinopátia (Histol Histopathol. 1999 október; 14(4):1287-94), pikkelysömör (Br J. Dermatol. 1999 dec., 141(6):1054-60), krónikus gyulladás és érrelmeszesedés (Planta Med 1998 dec; 64(8):686-95), és az érintett szövetek neovaszkularizációja egy elősegítı tényezı.



Az FGF-2 növekedési faktor egy 18kDA kationos polipeptid, amely alkalmas mind az in vivo neoangiogenézis kiváltására, mind pedig tenyészetben, endoteliális sejtekben levő sejtek burjánzásának, kemotaxisának és proteáz termelésének kiváltására (Basilico és Moscatelli, 1992, Adv. Cancer Res. 59:115-65).

Az FGF-2 szerepe a tumor angiogenézisben már ismert (Pathol. Biol., Párizs, 1999. április; 47(4):364-7).

A J. Pathol. 1999. szept.; 189(1):72-8 irodalomban beszámolnak arról, hogy az FGF-2 fokozottan expresszálódik mezoteliómában szenvedő páciensek esetében, és ez a nagyobb agresszivitással és az ilyen tumorbetegség által sújtott páciensek nagyobb mortalitásával kapcsolatos.

Az Oncogene 1999. november 18-i számában (18(48):6719-24) beszámolnak arról, hogy az FGF-2 metasztázis-képző tulajdonságot ad a patkány hólyagkarcinóma sejteknek.

Az Int. J. Cancer, 1999. május 5; 81(3):451-8 beszámol arról, hogy az FGF-2 erős mitogén hatással rendelkezik, és szerepet játszik a humán tumorok kifejlődésében és a rosszindulatú voltának fokozásában.

A tumorbetegségek gyógyítására az antiangiogén terápia a következő előnyökkel jár a standard, tradicionális kemoterápiával szemben (Cancer Research 1998, 58, 1408-16):

1. nagyobb specifikusság: a célja a tumor neovaszkularizációs folyamat;

2. nagyobb biodisponibilitás: célja az endoteliális sejtek, könnyen elérhető a tradicionális kemoterápiás megközelítéssel



kapcsolatos problémák nélkül, amelyek közvetlenül hatnak a tumorsejtekre;

3. kisebb kémiai rezisztencia: ez lehet a legfontosabb előnye a terápiának; valójában az endoteliális sejtek a tumorsejtekhez képest genetikailag stabilak, és a gyógyszerrezisztencia jelensége valószínűtlen;

4. kevesebb áttét: a neovaszkularizáció gátlása korlátozza a test más részében a tumorsejtek szaporodását a véráramon keresztül;

5. kedvezően hat a sejthalálra: a tumorban az érhálózat gátlása csökkenti a tumorsejtek számára az oxigén és tápanyag hozzáférhetőséget, ily módon fokozódik a sejthalál;

6. szisztémikus toxicitás csökkenése: az antiangiogén terápiában nem figyelhetők meg a tradicionális kemoterápiában jelenlevő toxikus hatás, pl. gerincvelő elállítás, gyomor-bélrendszeri hatások és múló kopaszság.

Az ilyen hatások meghatározására az FGF-2 két különböző, célsejtek felületén jelenlevő receptorcsoporttal reagál: a nagy affinitású receptorokkal, amelyek tirozin kináz hatásúak (FGFR-ek), és az alacsony affinitású receptorokkal, azaz a proteoglikán eparán-szulfáttal (HSOG-k) (Johnson és Williams, 1993, *Adv. Cancer Res.* 60:1-41; Moscatelli, 1987, *J. Cell. Physiol.* 131:123-30).

Az FGF-2 hatásos mitogén mediális simaizomsejtekre, és szükséges a ballon katéterezés utáni burjánzásokhoz (*J. Biol. Chem.* 2000. április 14; 275 (15): 11270-7).

Ezért az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával előidézett betegségekhez tartozik az artériák izomfalának



hiperpláziája, amely érplasztikai vagy koszorúér stent utáni resztenózis során fordul elő (J. Vasc. Surg. 1997. február; 25(2):320-5).

Az FGF-2-től függő neovaszkularizáció szabályozása a megváltozott angiogenezissel kapcsolatos betegségek szabályozásának és gyógyításának egyik alapvető eleme, valamint az FGF-2-től függő fibroblaszt szabályzatlan burjánzás szabályozása vagy az SMC-k szabályzatlan burjánzásának szabályozása döntő a túlzott fibroblaszt reakcióval és az angioplasztika utáni resztenózissal kapcsolatos hegesedés kezeléséhez.

Az új gyógyszer hozzáférhetősége, amely speciálisan gátolja az FGF-2 biológiai hatását, elsődleges fontosságú cél ennek a növekedési faktornak a megváltozott aktiválásával kiváltott betegség kezelésére és megelőzésére. Ilyen betegségek az arthritisz, tumor, tumor áttét, diabéteszes retinopátia, pikkelysömör, krónikus gyulladás, érlemezés, hegesedés, amely a túlzott fibroblaszt reakcióval és az angioplasztika utáni resztenózissal kapcsolatos.

A PTX3-at különböző sejttípusok formájában fejezzük ki (Bottazzi és tsai, J. Biol. Chem. 1997, 272: 32817-32823), különösen mononukleáris fagocitákban és endoteliális sejtekben, gyulladásos citokinek hatásának kitéve, ilyenek az interleukin  $1\beta$  (IL- $1\beta$ ) és a tumor nekrosis faktor alfa (TNF- $\alpha$ ).

Mind a mai napig a PTX3 biológiai működését nem értették meg teljesen.

A PTX3 két szerkezeti doménből, egy ismert molekulával nem kapcsolatos N-terminális doménből és egy C-terminális doménből áll, amely hasonló olyan rövid pentraxinokhoz, mint a



C-reakcióképes protein (CRP) (Breviario F. és tsai, J. Biol. Chem. 267:22190, 1992).

Nagyfokú hasonlatosságot találtunk a humán PTX3 (hPTX3) és az állati PTX3-ak között. Különösen az egér PTX3 (mPTX3) nagyon hasonlatos a hPTX3-hoz DNS szekvencia, génszerveződés és elhelyezkedés szempontjából. A humán és egér PTX3 gén közötti azonossági fok 82 %-os, és konzervatív helyettesítéseket figyelembe véve eléri a 90 %-ot (Introna M. és tsai: Blood 87 (1996) 1862-1872). Az egér PTX3 gén az egér 3-as kromoszómáján helyezkedik el a humán 3q régióhoz hasonló régióban (q24-28), a hPTX3 dokumentált elhelyezkedésével megegyezően, a 3q 25 régióban (Introna M. és tsai: Blood 87 (1996) 1862-1872).

A hPTX3 és mPTX3 szekvenciák közötti nagyfokú hasonlóság az evolúció folyamán a pentraxinok nagyfokú megőrzésének jele (Pepys M.B., Baltz M.L.: Adv. Immunol. 34:141, 1983).

A pentraxinok áttekintése megtalálható a H. Gewurz és tsai, Current Opinion in Immunology, 1995, 7:54-64 irodalomban.

A WO 99/32516 sz. nemzetközi szabadalmi bejelentésben a bejelentő leírja a hosszú pentraxin PTX3 alkalmazását fertőző betegségek, gyulladásos vagy tumorbetegségek kezelésére. A PTX3 WO 99/32516 sz. iratban leírt tumorelles hatását a fehérvérsejt megerősödés közvetíti, azaz immunológiai alapon. A WO 99/32516 sz. irat nem írja le vagy javasolja a PTX3 alkalmazását FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával kapcsolatos betegségek kezelésére szolgáló szerként.



Az 5767252 sz. USA szabadalmi leírás leírja a neuronális növekedési faktort, amely a pentraxin családkhoz tartozik. Ez a szabadalom a neurobiológiai szektorra vonatkozik.

Azt találtuk, hogy a hosszú pentraxin PTX3 nagy affinitással és specifikussággal képes megkötni az FGF-2-t. A PTX3 és FGF-2 kapcsolódása ( $K_d = 8-16$  nM) megelőzi utóbbi kötődését nagy affinitású tirozin-kináz receptoraihoz, valamint a kötődést kis affinitású receptorok helyén, amelyeket az eparán-szulfát proteoglikánok testesítenek meg a sejt felületén. A kötődés gátlása az FGF-2 biológiai reakció gátlását okozza.

Az FGF-2 és PTX3 közötti kölcsönhatás függ a növekedési faktor helyes szerkezeti képletétől, nem csak bázikus természetétől, minthogy a PTX3 nem köti meg a citokrom C-t (azaz egy proteint, amely ugyanolyan molekulatömegű, mint az FGF-2, azaz 18 kDa, és izoelektromos pontja pH 9,6).

Ezenkívül a C-reakcióképes protein a PTX3-mal homológ és nem köti meg az FGF-2-t.

A találmány célja tehát hosszú pentraxin PTX3 vagy származékai vagy doménje alkalmazása olyan betegségek megelőzésére vagy gyógyítására szolgáló gyógyszer előállítására, amelyek gátolják az FGF-2 növekedési faktor biológiai hatását.

A találmány további célja a hosszú pentraxin PTX3 vagy származékai vagy doménje alkalmazása gyógyszer előállítására, amellyel az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválásával létrejött betegségek kezelhetők vagy előzhetők meg.

A találmány további tárgya a hosszú pentraxin PTX3 vagy származéka vagy doménje alkalmazása gyógyszer előállítására, amellyel a megváltozott angiogenezis gyógyítható vagy meg-



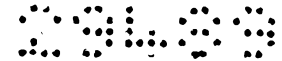
előzhető, ahol a megváltozott angiogenezist az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválása idézi elő, ilyen betegség pl. az ízületi gyulladás, tumor áttét, diabéteszes retinopátia, pikelysömör, krónikus gyulladás, érlemeszesedés vagy tumor, ahol a tumor pl. szarkóma, karcinóma, karcinoid, csonttumor vagy neuroendokrin tumor lehet.

A találmány további célja hosszú pentraxin PTX3 vagy származékai vagy doménje alkalmazása gyógyszer előállítására olyan betegségek kezelésére, amelyek nem szabályzott, FGF-2-függő fibroblaszt burjánzással vagy simaizomsejt burjánzással kapcsolatosak, pl. a túlzott fibroblaszt (kötőszöveti sejt) reakcióhoz kapcsolódó hegesedés és az angioplasztika utáni resztenózis.

A találmány szerinti vegyület alkalmas FGF-2 hatás gátlására célsejtekben, nemcsak akkor, ha rekombináns proteinként adagoljuk, hanem akkor is, ha endogén adagoljuk cDNS-ének gén transzferje következményeképpen.

Ezért a találmány további tárgya humán PTX3 vagy származéka vagy doménje teljes hosszúságú cDNS-ének alkalmazása plazmid vagy vírus expressziós vektorok előállítására, amelyek a cDNS-ből állnak, olyan betegségek génterápiájára, amelyeket az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválása idéz elő, és ahol a betegség pl. tumor, tumor áttét, túlzott kötőszöveti sejt reakcióval kapcsolatos hegesedés, vagy érplasztika utáni resztenózis.

A hosszú pentraxin PTX3 bármilyen hosszú pentraxin PTX3, függetlenül természetes (állati vagy emberi) vagy mesterséges eredetétől.



A származékok magukba foglalják a hosszú pentraxin PTX3 bármilyen funkciós analógját, amely legalább egy mutációt hordoz, és amely fenntartja azt a funkciós képességét, hogy szelektíven gátolja az FGF-2-t.

Előnyös hosszú pentraxin PTX3 a humán PTX3, amely szekvencia megtalálható a WO 99/32516 sz. nemzetközi közvételteli iratban.

Az itt leírt hosszú pentraxin PTX3-at alkalmazhatjuk kombinációban is egy vagy több rákellenes gyógyszerrel tumorbetegség kezelésére, amelyben a megnövekedett FGF-2 expresszió a tumorbetegség nagyobb agresszivitását vagy nagyobb áttétképző képességét idézi elő.

Valójában jól ismert, hogy annak érdekében, hogy a nem kívánatos mellékhatásokat elkerüljük, és megőrizzük a terápiás hatékonyságot, a legtöbb onkológiai páciens nem csak egy rákellenes gyógyszerrel kezelünk, hanem több rákellenes gyógyszer kombinációjával vagy egy rákellenes gyógyszerkombinációt más antiangiogén vegyülettel együtt alkalmazunk.

A szokásosabb rákellenes gyógyszerek hatásmechanizmusa teljesen más, mint a találmány szerinti vegyület mechanizmusa, valójában a szokásos rákellenes gyógyszerek citotoxikusak a tumorsejtekkel szemben.

A találmány szerinti vegyület, amely más hatásmechanizmussal hat, gyógyhatást fejt ki (adjuváns hatást) az egyidejűleg alkalmazott tumorelles gyógyszer hatásán túlmenően.

Ezért a találmány további tárgya hosszú pentraxin PTX3 kombinációja egy vagy több ismert rákellenes gyógyszerrel.



A találmány további tárgya gyógyszerkészítmény, amely hosszú pentraxin PTX3-at tartalmaz egy vagy több ismert rákellenes gyógyszerrel kombinálva, ilyenek pl. az alkilező szerek, topoizomeráz inhibitorok, antitubulin szerek, beágyazó szerek, antimetabolitok, természetes termékek, pl. vinka alkaloidák, epipodofillotoxinok, antibiotikumok, enzimek, taxánok és citodifferenciáló vegyületek, és egy vagy több oldószer vagy segédanyag, amelyek gyógyászatilag elfogadhatóak.

A találmány további tárgya a hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása egy vagy több ismert tumorellenes vegyülettel kombinálva gyógyszer előállítására tumor kezelésére, amelyben az FGF-2 megnövekedett expressziója nagyobb tumor agresszivitást idéz elő.

A találmány további tárgya a hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása egy vagy több ismert tumorellenes vegyülettel kombinálva gyógyszer előállítására, a tumor áttét bekövetkezésének megelőzésére, ahol az FGF-2 megnövekedett expressziója nagyobb áttét-képző képességet idéz elő.

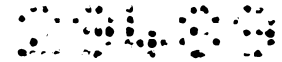
A találmány tárgya továbbá a hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása rákellenes gyógyszerrel kombinálva gyógyszer előállítására tumor kezelésére, oly módon, hogy a hosszú pentraxin PTX3 a rákellenes vegyület segédanyagaként van jelen.

A találmány további részleteit a következő példákkal illusztráljuk.

#### **1. példa**

##### PTX3 képessége FGF megkötésére oldatban

Ezt a kísérletet azért végezzük, hogy kiértékeljük a PTX3 kötődését FGF-2-höz. A PTX3-at az alábbi irodalom szerint ál-



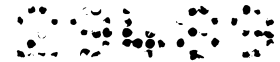
lítjuk elő: Bottazzi és tsai, 1997, J. Biol. Chem. 272:32817-32823. Humán rekombináns FGF-2-t az alábbi irodalom szerint állítjuk elő: Isacchi A. és tsai, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1991), 88:2628-32. Szükség esetén az FGF-2-t <sup>125</sup>Jóddal jelezzük Isacchi és tsai alább leírt módszere szerint.

Kísérleti eljárás:

1 µg FGF-2-t vagy 1 µg PTX3-at tartalmazó 100 µl PBS-t kromatografálunk egy méretkizárásos gyors protein folyadék-kromatográfiás Superose 12 oszlopon (Pharmacia): ez az oszlop képes a molekulatömeg alapján elválasztani a proteineket. Az oszlopot 1 ml/perc áramlási sebességgel PBS-sel eluáljuk, és 1 ml-es frakciókat gyűjtünk és dot blot módszerrel analizáljuk két proteinre, speciális antitestekkel. A PTX3 FGF-2-höz való kötődésének kiértékelésére az 5 g-os és 1 µg-os két proteint összekeverjük 100 µl PBS-ben, és 4 °C-on 10 percig inkubáljuk, mielőtt az oszlopra feltöltjük. A frakciókat összegyűjtjük és dot-blot módszerrel analizáljuk anti FGF-2 specifikus antitestekkel. Az eredményeket az 1. ábra mutatja. Az 1. ábra szerint az FGF-2 18.000 D-nél eluál az oszlopról, kb. 22 ml retenciós térfogattal. Ugyanilyen körülmények között a PTX3 450.000 D-nél eluál üres oszloptérfogattal (7 ml). Amikor az FGF-2-t 10 percig 4 °C-on PTX3-mal előinkubáljuk, akkor az oszlopra visszük és megfigyeljük a kromatográfiás viselkedésben bekövetkező változást: a kísérleti körülmények között az FGF-2 az oszlopról ugyanolyan retenciós térfogattal eluál, mint a PTX3 önmagában.

## **2. példa**

Biotinilezett PTX3 képessége műanyag, rögzített FGF-2 megkötésére

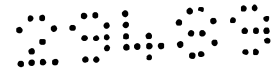


500 ng FGF-2-t vagy a kiegészítő C1q komponenst tartalmazó, 9,6 pH-jú 100 µl nátrium-hidrogén-karbonátot 18 óra hosszat 4 °C-on 96-üregű műanyag lemezekben inkubálunk. Az inkubáció végén az üregeket PBS-sel háromszor mossuk, majd 2 órát szobahőmérsékleten inkubáljuk 200 µl PBS-sel, amely 1 mg/ml marhaszérum albumint (BSA) tartalmaz. Az inkubálás végén az üregeket újra mossuk háromszor PBS-sel, és 30 ng/ml <sup>125</sup>I-FGF-2-vel inkubáljuk növekvő mennyiségű biotinilezett PTX3 jelenlétében, 100 µl PBS-ben szobahőmérsékleten 2 órán keresztül. Egy másik változat szerint az üregeket növekvő adagú FGF2-vel vagy C1q-val adszorbeáljuk és 100 ng/ml biotinilezett PTX3-mal 100 µl PBS-ben inkubáljuk. Az inkubáció után az üregeket háromszor mossuk PBS-sel, és 1 órát szobahőmérsékleten inkubáljuk 100 µl sztreptavidin HRP konjugátummal (1/2000). A reakciót kromogén mikrohullámú peroxidáz szubsztrát ABTS rendszer hozzáadásával hívjuk elő (Kirkegaard & Perry Laboratories). A lemezeket automata ELISA leolvasóval 405 nm-nél olvassuk. A 2. ábrán közölt eredmények azt mutatják, hogy a műanyag üregekben rögzített FGF-2 képes megkötni a biotinilezett PTX3-at hasonlóan a fiziológiás PTX3 ligandum C1q-hoz (Bottazzi B. és tsai, 1997, J. Biol. Chem. 272:32817-32823).

### **3. példa**

#### **PTX3 – FGF-2 kölcsönhatások jellemzése**

96-üregű lemezeket bevonunk 4 °C-on PTX3-at vagy C-reakcióképes proteint (200 nmól) tartalmazó 100 µl nátrium-hidrogén-karbonáttal pH 9,6 értéken, vagy 2 µg/ml alábbi proteinekkel, amelyeket negatív kontrollként használunk: marha-



szérum albumin, fibronectin, zselatin vagy laminin. Inkubálás után az üregeket háromszor mossuk PBS-sel, és 2 órát szobahőmérsékleten blokkoljuk 200  $\mu$ l, 1 mg/ml BSA-val PBS-ben. Az inkubálás után az üregeket háromszor mossuk PBS-sel, majd 30 ng  $^{125}$ I-FGF-2 faktorról 2 óra hosszat szobahőmérsékleten inkubáljuk. Az üregeket ezt követően háromszor mossuk PBS-sel, és a megkötött  $^{125}$ I-FGF-2-t úgy nyerjük vissza, hogy minden üreget kétszer mosunk 200  $\mu$ l 2 %-os SDS vizes oldattal. A  $^{125}$ I-FGF-2 szinteket gamma számlálón mérjük. A 3. ábrán bemutatott eredmények mutatják, hogy az FGF-2 megköti a műanyag rögzített PTX3-at, és ez a kötődés specifikus, mert az FGF-2 gyengén reagál CRP-vel és nem reagál egyéb rögzített proteinekkel.

#### 4. példa

##### $^{125}$ I-FGF-2 kötődése műanyag rögzített PTX3-hoz hideg FGF-2 feleslegének jelenlétében

Egy második kísérletsorozatban a  $^{125}$ I-FGF-2 műanyag rögzített PTX3-hoz való kötődését vizsgáljuk természetes és hővel denaturált hideg FGF-2 (100 nmól) feleslegében, hasonló citokrom C koncentrációk vagy 300 nmól oldódó PTX3 feleslegének jelenlétében. A kísérletet a fent leírt módon végezzük. Az eredményeket a 4. ábrán mutatjuk be. A 4. ábra azt illusztrálja, hogy a hideg FGF-2 és az oldódó PTX3 gátolják a  $^{125}$ I-FGF-2 és műanyag rögzített PTX3 közötti kölcsönhatást. A megfigyelés, hogy a hővel inaktivált FGF-2 és a citokrom C, melynek az FGF-2-vel azonos molekulatömege és izoelektromos pontja van, nem képesek megkötni a PTX3-at, arra vall, hogy a növekedési kor-



korrekt alakulása vesz inkább részt abban a kapacitásban, hogy megköti a PTX3-at, mint a bázikus természetű.

### **5. példa**

#### Az FGF-2/PTX3 kölcsönhatás disszociációs állandója (Kd)

Ezzel a kísérlettel az FGF-2/PTX3 kölcsönhatás disszociációs állandóját (Kd) határozzuk meg. Ebből a célból  $^{125}\text{I}$ -FGF-2 növekvő dózisait inkubáljuk műanyag rögzített PTX3-mal, és a kötődési eredményeket Scatchard görbével analizáljuk. Az eredményeket az 5. ábrán mutatjuk be. Ezek azt mutatják, hogy az FGF-2 megköti a PTX3-at egy telíthető módon és emelt affinitással (Kd = 8-16 nmól). Ez az affinitás a PTX3 és fiziológiai C1q liganduma közötti kölcsönhatásra előzetesen kiszámított affinitáshoz hasonlít.

### **6. példa**

#### PTX3 és FGF-2 kötődés hatása az endoteliális sejtekre

Transzformált marha magzati aortás endoteliális GM7373 sejteket  $80.000 \text{ sejt/cm}^2$  mellett 24-üregű edényekbe oltunk, 10 % FCS-t tartalmazó, Eagle-féle minimális esszenciális közegbe (Eagle-féle MEM-be). 24 óra múlva  $37^\circ\text{C}$ -on a tapadó sejteket kétszer mossuk FCS nélkül Eagle-féle MEM-mel, majd inkubáljuk 2 órát  $4^\circ\text{C}$ -on  $^{125}\text{I}$ -FGF-2-vel (10 ng/ml), 0,15 % zselatint és 20 mmól HEPES-t 7,5 pH-n tartalmazó Eagle-féle MEM-ben, adott esetben növekvő koncentrációjú PTX3 jelenlétében. Az inkubálás végén kiértékeljük a  $^{125}\text{I}$ -FGF-2 mennyiségét, amely az alacsony HSPG-khez és a nagy affinitású receptorokhoz (FGFR) kötődik, Moscatelli, 1987, J. Cell. Physiol. 131:123-30 módszere szerint. Röviden a sejteket kétszer öblítjük 20 mmól HEPES pufferban 2 mólos nátrium-kloriddal (pH



7,5), hogy eltávolítsuk az alacsony affinitású kötődési helyekhez kötött  $^{125}\text{I}$ -FGF-2-t, és kétszer öblítjük 2 mólos nátrium-kloriddal 20 mmól nátrium-acetátban (pH 4,0), hogy eltávolítsuk a nagy affinitású kötődési helyekhez kötődött  $^{125}\text{I}$ -FGF-2-t. A nem specifikus kötődést nem jelzett FGF-2 százszoros moláris feleslegének jelenlétében mérjük, és az összes értékből kivonjuk. A 6. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a PTX3 dóziszfüggő módon képes gátolni az FGF-2 nagy és alacsony affinitású receptorokhoz való kötődését endoteliális sejteken.

### **7. példa**

#### PTX3 hatása endoteliális sejteken FGF-2-vel kiváltott mitogén hatásra

A GM 7373 sejteket beoltjuk 75.000 sejt/cm<sup>2</sup> mellett 48-üregű lemezekben levő Eagle-féle MEM-be, amely 10 % FCS-t tartalmaz. 24 óra múlva 37 °C-on a tapadó sejteket kétszer mossuk FCS nélkül Eagle-féle MEM-mel, majd 24 órát 37 °C-on inkubáljuk 0,4 % FCS-t tartalmazó Eagle-féle MEM-ben, adott esetben FGF-2 (10 ng/ml) jelenlétében és növekvő koncentrációjú PTX3 mellett. Az inkubálás végén a sejteket tripszinezünk és megszámláljuk. Egy másik kísérletsorozatban GM 7373 sejteket a fent leírt módon kezelünk különböző mitogén ingerek jelenlétében: 10 % FCS; 5 µg/ml diacil-glicerin (DAG); 10 ng/ml forbolészter (TPA), 30 ng/ml epidermális növekedési faktor (EGF) vagy 30 ng/ml vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF). Az eredmények azt mutatják, hogy a 7. ábrán látható, hogy a PTX3 gátolja a mitogén hatást, amelyet FGF-2 vált ki endoteliális sejteken dóziszfüggő módon, és az ID50 30 nmól-nak



felel meg. Ez az érték hasonló az FGF-2 – PTC3 kölcsönhatásra számított Kd-hez. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az FGF-2 biológiai hatásának gátlása PTX3-mal az extracelluláris helyek szekvesztrálásának tulajdonítható. A PTX3 FGF-2-re mutatott gátló hatása speciális, mert nem mutatható ki, ha a sejtburjánzás előidézésére más mitogéneket használunk.

### **8. példa**

#### PTX3 hatása transzformált marha magzati aortás endoteliális sejtek burjánzására

Ebben a kísérletben azt kutattuk, hogy milyen hatása van a PTX3-nak az egér aorta endoteliális sejtvonal MAE3F2T burjánzására, amelyet stabilan transzfektáltunk FGF-2-t kódoló expressziós vektorral (Gualandris és tsai, 1996, Cell Growth Diff. 7:147-60). Ezek a sejtek képesek burjánzani az endogén FGF-2-vel kiváltott ingerlés autokrin kacsára (Gualandris és tsai, 1996, Cell Growth Diff. 7:147-60). MAE3F2T sejteket 10.000/cm<sup>2</sup> arányban beoltunk 48-üregű lemezekre Dulbecco táptalajban (DMEM), amelyhez 10 % FCS-t adunk. 24 óra múlva 37 °C-on a tapadó sejteket kétszer mossuk DMEM-mel FCS nélkül, és 72 órát 37 °C-on inkubáljuk 0,4 % FCS-t tartalmazó DMEM-ben, adott esetben 70 nmól PTX3, anti FGF-2 specifikus antitestek vagy 50 µg/ml szuramin jelenlétében. A szuraminról ismeretes, hogy extracelluláris FGF-2-t képes szekvesztrálni, és gátolja biológiai hatását (Rusnati és tsai, 1996, Mol. Biol. Cell. 7:369-381). Az inkubálás végén a sejteket tripszinnel kezeljük és Burker kamrában számláljuk. A 8. ábrán bemutatott eredmények azt mutatják, hogy a PTX3 képes blokkolni az FGF-2-vel MAE3F2T sejtekben előidézett autokrin kacs stimulálást,



és gátolja ennek FGF-2-függő burjánzását az anti FGF-2 antitestekkel és szuraminnal kiváltott hatáshoz hasonlóan.

### **9. példa**

#### PTX3 hatása az in vivo FGF-2-vel kiváltott neovaszkularizációra, azaz érképződésre

A PTX3 antiangiogén potenciálját in vivo értékeljük ki csirke embrió korioallantoin membrán kísérletben (CAM). Röviden, egy 3-napos, megtermékenyített tyúktojásban a tojáshéjon ablakot nyitunk. A 8. napon zselatin szivacsokat implantálunk CAM-re, és önmagában 10 µl PBS-sel vagy FGF-2-t tartalmazó PBS-sel (szivacsonként 500 ng) adszorbeáljuk, adott esetben 5 µg/szivacs PTX3 jelenlétében (csoportonként 5-6 embrió). 4 nap múlva a CAM-eket in ovo figyeljük meg Zeiss SR sztereomikroszkóp alatt, és kiértékeljük az angiogén reakciót két kutató által, a tesztelt minták ismerete nélkül, és egy 0-4+-es skálán beosztjuk, ahol a 0 azt jelenti, hogy nincs angiogén reakció, és a 4+ jelentése a legerősebb hatás. A 9. ábrán az eredmények azt mutatják, hogy a PTX3 az FGF-2-vel in vivo kiváltott neovaszkularizációt képes blokkolni.

### **10. példa**

#### PTX3-mal végzett génterápia

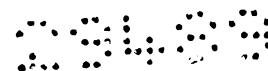
FGF-2-t túlexpresszáló egér endoteliális sejteket, amelyeknek a neve FGF2MAE3F2T (Gualandris és tsai, 1996, Cell Growth Diff. 7:147-60) teljes hosszúságú cDNS humán PTX3-mal transzfektálunk, melynek teljes hosszúságú cDNS-e előzőleg szubklónozva lett kereskedelmi expresszió pLXSH vektorral (Clontech).



A kapott transzfektált sejtvonalakon in vitro tanulmányokat végeztünk, hogy tanulmányozzuk a PTX3 túlexpresszállódásának hatását az FGF2MAE3F2T sejtek FGF-2-függő burjánzására, és a három dimenziós fibrin gélek invazív viselkedését is vizsgáltuk.

Részletekben, különböző PTX3 szinteket, és szülő FGF2MA3F2T sejteket expresszálló több FGF2MAE3F2T klónt (amelyek nem termelnek PTX3-at), beoltunk 10.000/cm<sup>2</sup> mennyiségben 48-üregű lemezekre, 10 % FCS-t tartalmazó Dulbecco táptalajon (DMEM). 24 óra múlva 37 °C-on a tapadó sejteket DMEM-vel FCS nélkül kétszer mossuk, és különböző ideig inkubáljuk 37 °C-on, 0,4 % FCS-t tartalmazó DMEM-ben. Az inkubáció végén a sejteket tripszinnel kezeljük és Burker kamrában számláljuk. Az eredmények a 10. ábrán találhatóak, és azt mutatják, hogy a PTX3 túltermelés gátolja az FGF2MAE3F2T sejtburjánzást, és ennek a gátlásnak a mértéke összefügg a különböző tesztelt klónok által termelt PTX3 mennyiségével.

Hogy kiértékeljük a PTX3-at túltermelő FGF2MAE3F2T klónok invazív viselkedését 3-dimenziós fibrin géleken, sejtaggregátumokat készítünk agarózzal bevont lemezekre a leírt módszerrel (Gualandris és tsai, 1996, Cell Growth Diff. 7:147-60). Ezeket az aggregátumokat fibrinnel bevont, 48-üregű lemezekre oltjuk. Az oltás után azonnal 2,5 mg/ml fibrinogént tartalmazó, kalciummentes közeget és 250 mU/ml trombint adunk minden üreghez, és hagyjuk gélesedni 5 percig 37 °C-on. Ezután hozzáadunk 500 l táptalajt a gél tetejére, és az összes kísérletben a gélhez fibrinolitikus inhibitor trazilolt adagolunk, és 200 KIU/ml mellett a táptalajhoz adjuk az anyag feloldásának



megelőzésére. A radiálisan növe sejtcsírák képződését 2 nappal később komputerezált képanalízissel értékeljük ki.

A 11. ábrán levő eredmények azt mutatják, hogy az FGF2MAE3F2T klónokat túltermelő PTX3 invazív kapacitása lényegesen alacsonyabb, mint a parenterális FGF2MAE3F2T sejté.

A kapott eredmények azt mutatják, hogy a PTX3 az FGF-2 hatást az endoteliális sejtekben gátolja, ha cDNS-ének gén transzferje után endogén termelődik.

Így a találmány szerinti vegyület alkalmazható génterápiás protokolloknál a jól ismert módszerekkel egyezően (In Vivo. 1998. jan-febr.; 12(1):59-67; In Vivo. 1998. jan-febr.; 12(1):35-41; In Vivo. 1994. nov-dec.; 8(5):771-80), olyan betegségek kezelésére, amelyeket az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktivitása idéz elő.



## SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Hosszú pentraxin PTX3 vagy származéka vagy doménje alkalmazása gyógyszer előállítására olyan betegségek kezelésére és megelőzésére, amelyeket az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválása idéz elő, és amely betegség lehet szabályzatlan fibroblaszt burjánzás vagy simaizomsejt burjánzás vagy megváltozott angiogenezis.

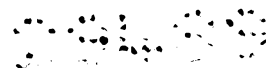
2. Az 1. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fibroblaszt vagy simaizomsejt szabályzatlan burjánzása által előidézett betegség vagy a megváltozott angiogenezis által előidézett betegség lehet túlzott fibroblaszt reakcióhoz kapcsolódó hegesezés, érplasztika utáni resztenózis, artritisz, diabéteszes retinopátia, pikkelysömör és ateroszklerózis.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hosszú pentraxin PTX3 a természetben előforduló PTX3.

4. A 3. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hosszú pentraxin PTX3 humán PTX3.

5. Az 1-2. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a hosszú pentraxin PTX3 szintetikus eredetű PTX3.

6. cDNS alkalmazása, amely a hosszú pentraxin PTX3-at, származékát vagy doménjét kódolja, cDNS-ből álló expressziós vektorok előállítására betegségek génterápiájára, amelyeket az FGF-2 növekedési faktor megváltozott aktiválása idéz elő, és ahol a betegség a fibroblasztok vagy simaizomsejtek szabályzatlan burjánzása vagy megváltozott angiogenezis.



7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a PTX3-at vagy származékát kódoló gént tartalmazó cDNS-t egy plazmid vagy vírusos vektor hordoz.

8. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fibroblasztok vagy simaizomsejtek nem szabályzott burjánzása által okozott betegség vagy megváltozott angiogenezis által okozott betegség lehet túlzott fibroblaszt reakcióval kapcsolatos hegesedés, angioplasztika utáni resztenózis, artritisz, diabéteszes retinopátia, pikkelysömör vagy ateroszklerózis.

9. Hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása gyógyszer előállítására, amellyel a tumor agresszivitása blokkolható vagy csökkenthető, ahol az agresszivitást az FGF-2 megnövekedett expressziója idézi elő.

10. Hosszú pentraxin PTX3 alkalmazása gyógyszer előállítására tumor áttét bekövetkeztének megelőzésére, ahol az FGF-2 megnövekedett expressziója nagyobb áttét-képző képességet idéz elő.

11. A 9. vagy 10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a tumor lehet szarkóma, karcinóma, karcinoid, csonttumor vagy neuroendokrín tumor.

12. A 9-11. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a hosszú pentraxin PTX3 egy vagy több ismert rákellenes gyógyszerrel van kombinálva, ahol a hosszú pentraxin PTX3 egy rákellenes gyógyszer adjuvánsaként van jelen.

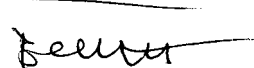
A meghatalmazott:

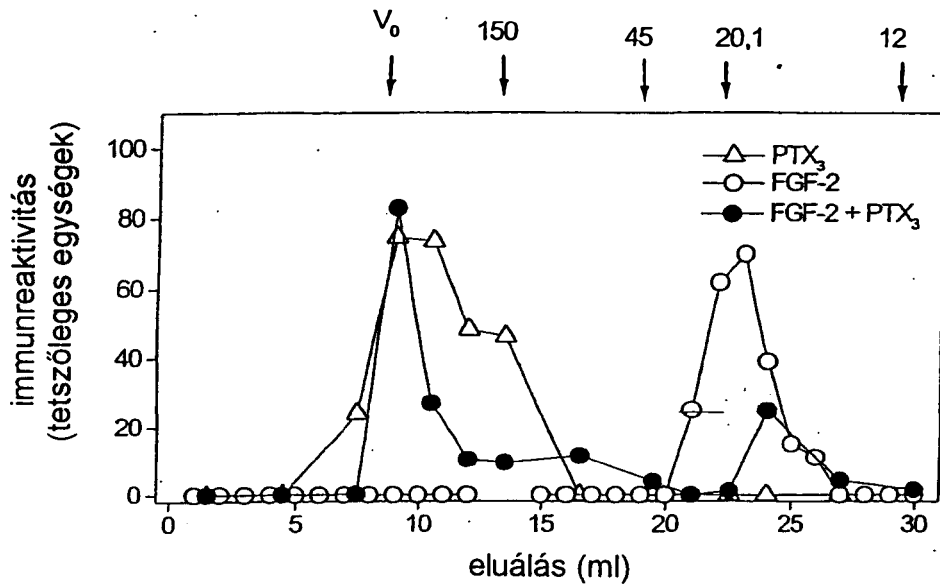
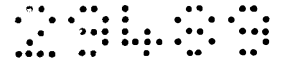
**DANUBIA**

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

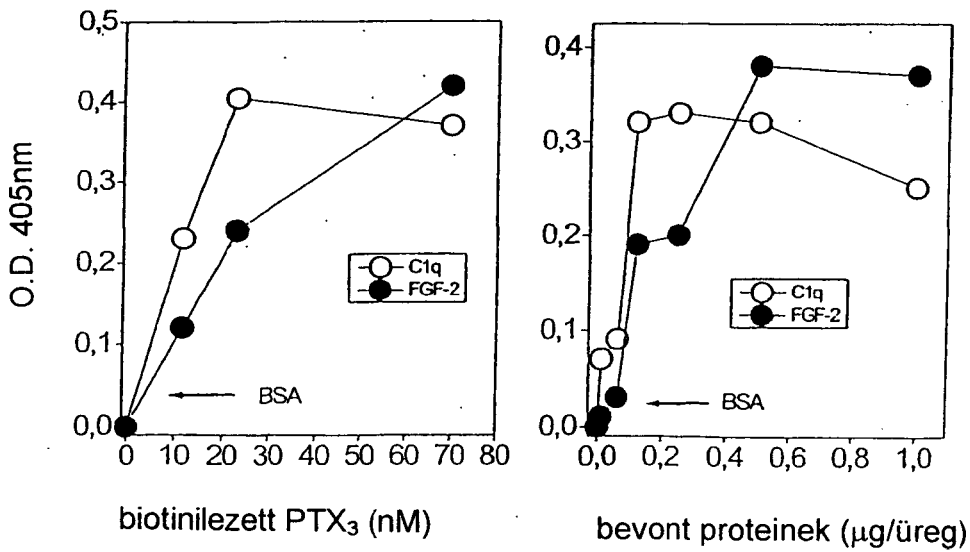
  
Kerény Judit  
szabadalmi ügyvivő

22 oldal  
6 oldal old

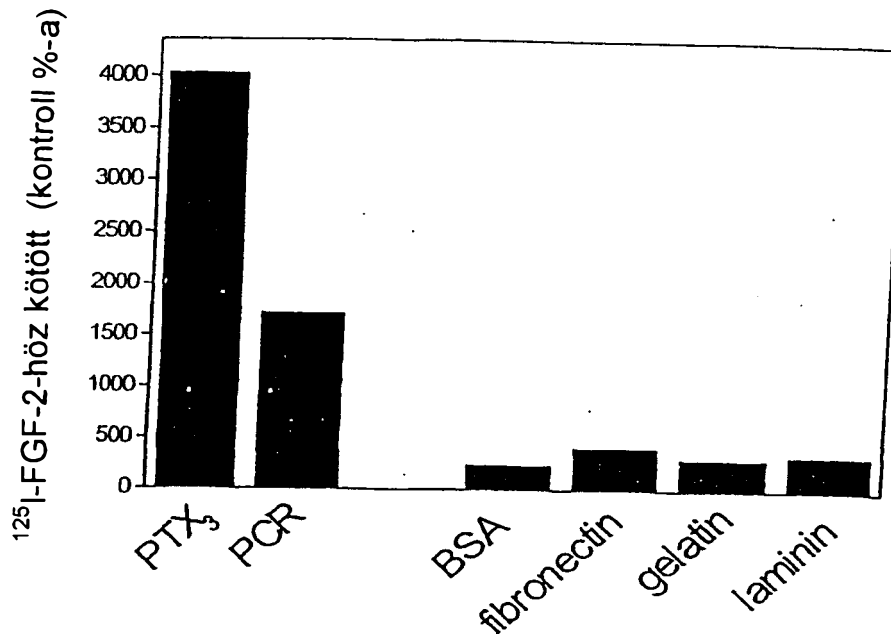
28 oldal 



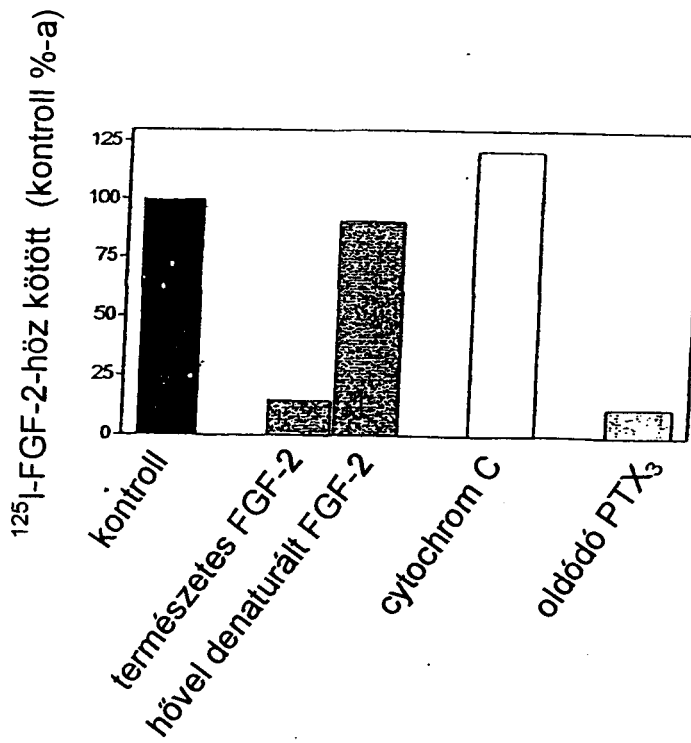
1. ábra



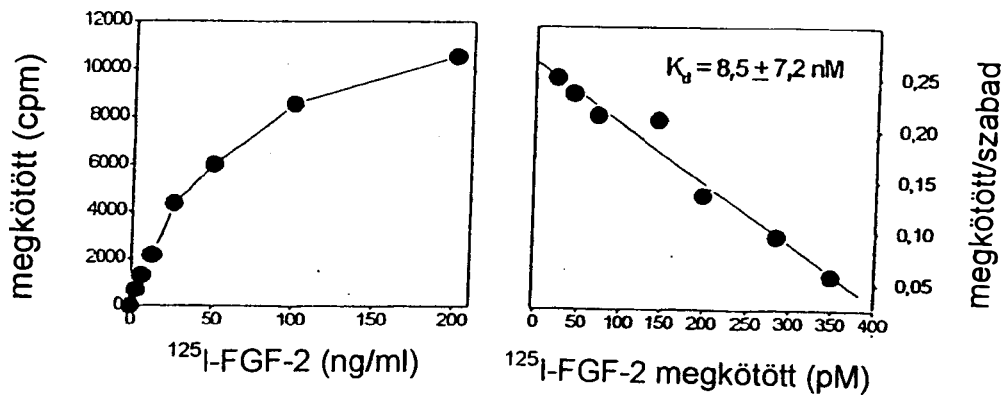
2. ábra



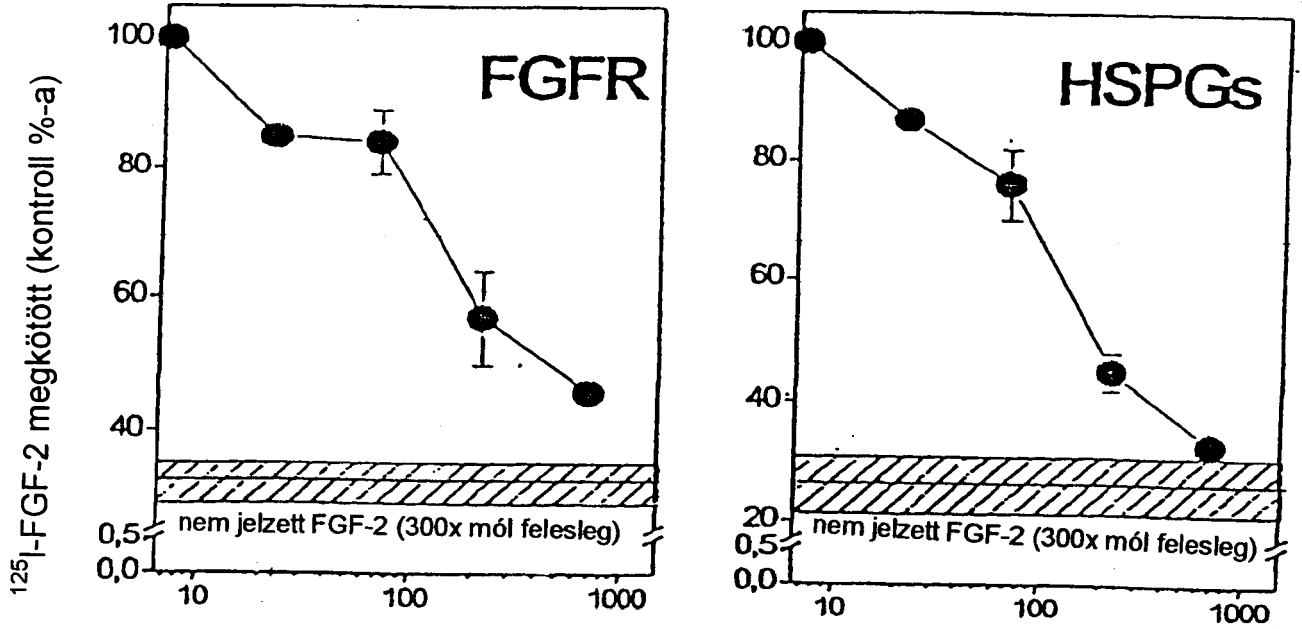
3. ábra



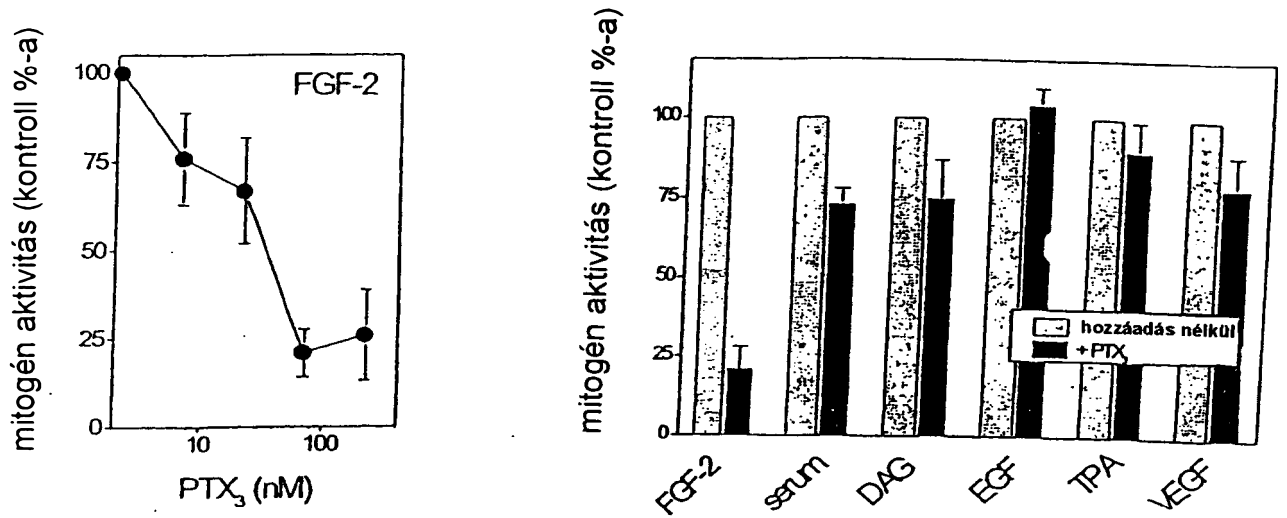
4. ábra



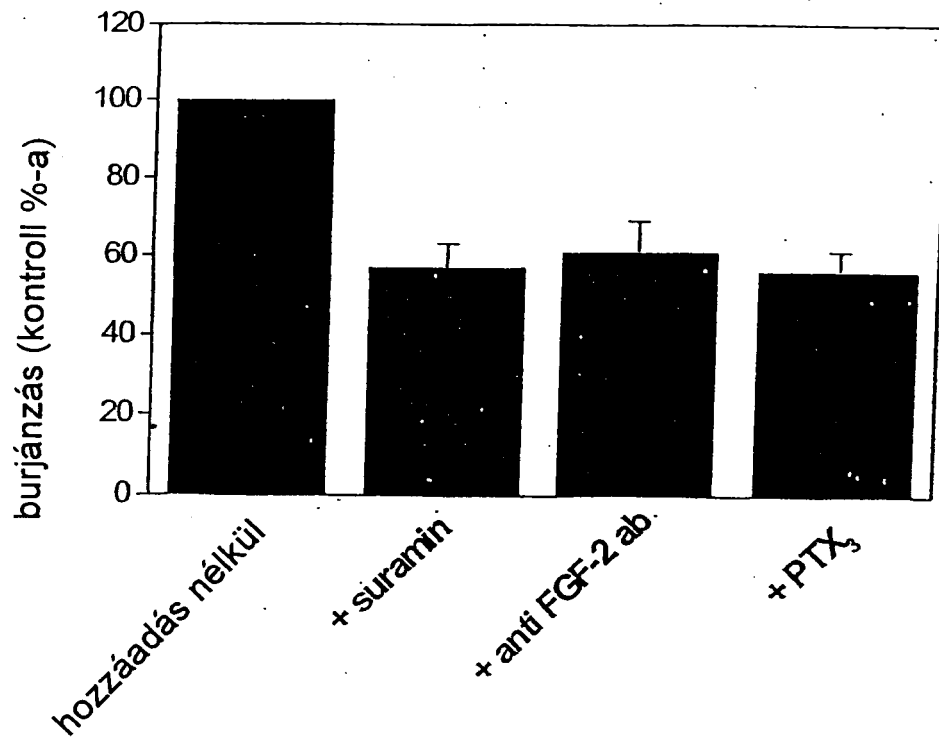
5. ábra



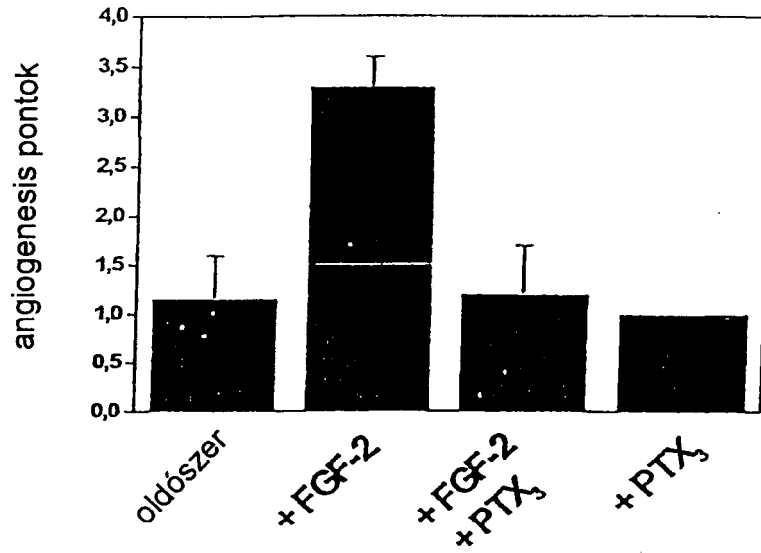
6. ábra



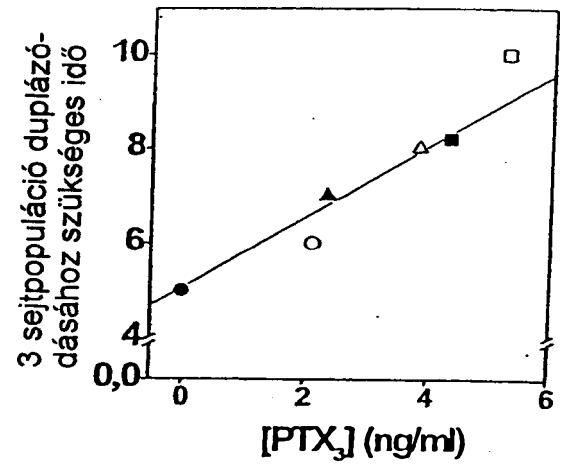
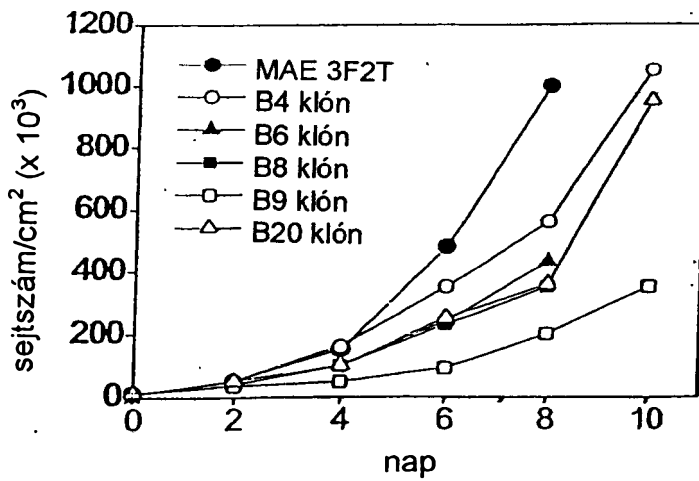
7. ábra



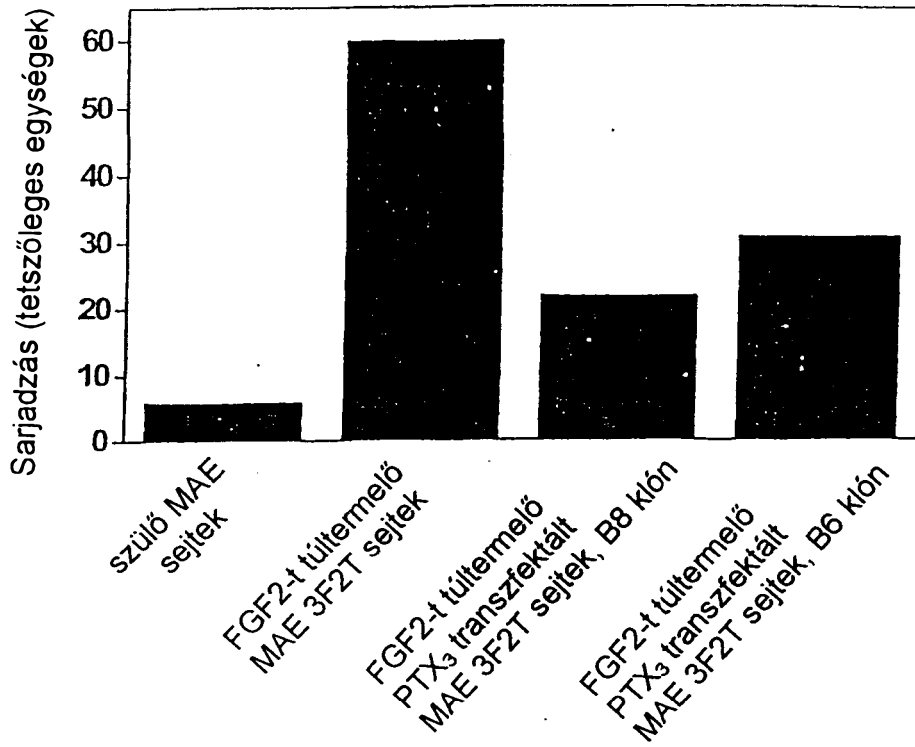
8. ábra



9. ábra



10. ábra



11. ábra