



(19)

Евразийское
патентное
ведомство

(11) 015339

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента: **2011.06.30**
(21) Номер заявки: **200870188**
(22) Дата подачи: **2007.01.23**

- (51) Int. Cl. **C07K 14/71** (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGF2 ПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

- (31) 06 001 457.8
(32) 2006.01.24
(33) EP
(43) 2009.02.27
(86) PCT/EP2007/000538
(87) WO 2007/085412 2007.08.02
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ТЕКНОДЖЕН С.П.А. (IT)

- (72) Изобретатель:
**Преста Марко, Камоцци Маура, Рузнати
Марко, Коломбо Маурицио, Мастроянни
Доменико (IT)**

- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) RUSNATI MARCO ET AL.: "Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis". BLOOD. 1 JUL 2004, vol. 104, no. 1, 1 July 2004 (2004-07-01), pages 92-99, XP002408920 ISSN: 0006-4971 the whole document

PRESTA MARCO ET AL.: "Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis". CYTOKINE & GROWTH FACTOR REVIEWS APR 2005, vol. 16, no. 2, April 2005 (2005-04), pages 159-178,

XP002439183 ISSN: 1359-6101 table 1
PEROLLET C. ET AL.: "Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization". BLOOD 1 MAY 1998, vol. 91, no. 9, 1 May 1998 (1998-05-01), pages 3289-3299, XP002439184 ISSN: 0006-4971, page 3295, right-hand column, paragraph 3 - page 3297, right-hand column, paragraph 2

CAMOZZI MAURA ET AL.: "Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo". ARTERIOSCLEROSIS, THROMBOSIS, AND VASCULAR BIOLOGY. SEP 2005, vol. 25, no. 9, September 2005 (2005-09), pages 1837-1842, XP002408921 ISSN: 1524-4636, page 1840, right-hand column, paragraph 2 - page 1841, right-hand column, paragraph 2

WO-A-0238169

CAMOZZI MAURA ET AL.: "Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3". THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 11 AUG 2006, vol. 281, no. 32, 11 August 2006 (2006-08-11), pages 22605-22613, XP002408922 ISSN: 0021-9258

B1**015339**

- (57) В настоящей заявке описаны связывающие FGF2 пептиды, которые были сконструированы, начиная с N-концевого участка PTX3, в частности включающие участок PTX3(82-110). Синтетические пептиды, родственные этой последовательности, способны связывать FGF2 и ингибировать его проангиогенную активность *in vitro* и *in vivo* при отсутствии ожидаемого влияния на врожденный иммунитет.

015339**B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к пептидам, связывающим фактор роста фибробластов-2 (FGF2), которые способны связывать FGF2 и ингибировать его проангиогенную активность *in vitro* и *in vivo* в отсутствие ожидаемого влияния на врожденный иммунитет.

Уровень техники

Пентраксины представляют собой суперсемейство белков, характеризующихся пентамерной структурой¹. Классические короткие пентраксины, С-реактивный белок (CRP) и компонент сывороточного амилоида P (SAP) представляют собой белки острой фазы у человека и мыши соответственно, продуцируемые в печени в ответ на медиаторы воспаления^{2,3}. Пентраксины связывают различные лиганды и вовлечены во врожденную устойчивость к микробам и в удаление продуктов распада клеток и компонентов внеклеточного матрикса^{1,4-6}.

Длинные пентраксины характеризуются неродственным N-концевым доменом, связанным с пентраксинподобным С-концевым доменом⁷. Являющийся прототипом длинный пентраксин PTX3^{8,9} представляет собой гликозилированный белок 45 кДа, собранный преимущественно в виде мультимеров из 10-20 мультимеров¹⁰. PTX3 продуцируется местно и высвобождается клетками различных типов, в частности мононуклеарными фагоцитами, дендритными клетками и эндотелиальными клетками, в ответ на первичные воспалительные сигналы¹¹. В исследованиях на мышах ptx3^{-/-} было показано, что эта молекула *in vivo* выполняет сложные неизбыточные функции, простирающиеся от сборки богатого гиалуроновой кислотой внеклеточного матрикса до способности к оплодотворению у женщин и до врожденного иммунитета против различных микроорганизмов^{12,13}. По меньшей мере, частично это связано со способностью PTX3 связывать с высокой аффинностью компонент комплемента C1q, белок внеклеточного матрикса TSG6 и выбранные микроорганизмы, запуская активацию комплемента и способствуя распознаванию патогена макрофагами и дендритными клетками^{1,14}. Таким образом, PTX3 представляет собой растворимый рецептор распознавания структур, обладающий уникальными неизбыточными функциями в различных патофизиологических условиях^{1,14}.

Фактор роста фибробластов-2 (FGF2) представляет собой связывающий гепарин фактор роста, который индуцирует пролиферацию клеток, хемотаксис и продукцию протеаз в культивируемых эндотелиальных клетках посредством высокоаффинного взаимодействия с рецепторами тирозинкиназ (FGFR)¹⁵. FGF2 индуцирует ангиогенез *in vivo* и регулирует образование новых сосудов в процессе заживления ран, воспаления, атеросклероза и роста опухоли¹⁶. Ряд молекул блокирует FGF2 во внеклеточном пространстве, тем самым предотвращая его взаимодействие с FGFR эндотелиальных клеток и ингибируя его ангиогенную активность (обзор в¹⁶). Многие из этих ингибиторов продуцируются/высвобождаются местно и/или системно, образуя тем самым основу для сложной регуляции процесса ангиогенеза.

Длинный PTX3 связывает FGF2 с высокой аффинностью и специфичностью. Соответственно, длинный PTX3 ингибирует зависимую от FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*¹⁷. Кроме того, полноразмерный PTX3 ингибирует зависимую от FGF2 активацию гладкомышечных клеток и утолщение интимы после повреждения артерий¹⁸. Таким образом, PTX3 теоретически может вносить вклад в регуляцию активности FGF2 в различных патологических условиях, характеризующихся совместной экспрессией двух белков, в том числе при воспалении, заживлении ран, атеросклерозе и неоплазии. Однако учитывая практическую невозможность использовать такую большую молекулу и другие виды активности белка, не описано ни одного варианта терапевтического применения белка. Фактически, PTX3 связывает C1q посредством С-концевого домена пентраксина¹⁰.

До настоящего времени N-концевому участку PTX3 не были приписаны никакие биологические функции. Исходя из этого, авторами изобретения была исследована способность N-концевого участка PTX3 взаимодействовать с FGF2.

Описание изобретения

Было обнаружено, что трансдуцированные ретровирусом клетки эндотелия, сверхэкспрессирующие PTX3N-концевой фрагмент (1-178), обладают сниженной митогенной активностью в ответ на FGF2. Очищенный рекомбинантный PTX3 (1-178) связывает FGF2 и предотвращает взаимодействие PTX3/FGF2. Кроме того, моноклональное антитело mAb-MNB4, распознающее эпипотоп PTX3(87-99), предотвращает взаимодействие FGF2/PTX3 и устраняет активность PTX3 как антагониста FGF2. Неожиданно авторами изобретения было обнаружено, что очень короткие пептиды сохраняют такую активность и являются эффективными в качестве терапевтических лекарственных средств. Соответственно, синтетические пептиды PTX3(82-110), PTX3(97-110), PTX3(97-107) и PTX3(100-104) связывают FGF2 и ингибируют взаимодействие FGF2 с полноразмерным длинным PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore, зависимую от FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток и ангиогенез *in vivo*. Таким образом, данные позволяют идентифицировать очень короткий, связывающий FGF2 домен в N-концевом удлиняющем участке PTX3, охватывающем область PTX3(97-110). Синтетические пептиды, родственные этой последовательности, способны связывать FGF2 и ингибировать его проангиогенную активность *in vitro* и *in vivo* в отсутствие ожидаемого влияния на врожденный иммунитет.

Таким образом, главной целью настоящего изобретения является связывающий FGF2 пептид формулы I

R₁-Ala-X₁-Pro-X₂-Ala-R₂

(I)

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg и Lys;

X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Cys и Thr;

R₁ отсутствует или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3;

R₂ отсутствует или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, при следующих условиях:

когда R₁ отсутствует, R₂ также отсутствует; когда R₁ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, R₂ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

когда R₁ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, R₂ представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4;

функциональное производное, предшественник или фармацевтически приемлемая соль пептида.

Предпочтительно X₁ представляет собой Arg. Более предпочтительно X₂ представляет собой Cys. Еще более предпочтительно пептид состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 10.

Еще одной целью изобретения является конъюгированный химерный пептид, содержащий пептид формулы I или его функциональные производные.

Как правило, термин "пептид" используют в отношении полипептидной цепи, содержащей от 4 до 100 или более последовательных аминокислот, обычно от 5 до 20 последовательных аминокислот.

Термин "функциональный" обозначает пептид, обладающий связывающими FGF2 свойствами, способный значительно снижать биологическую активность FGF2. Биологическая активность FGF2 включает митогенный и ангиогенный эффекты. В частности, пептиды согласно изобретению способны ингибировать индуцируемую FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток или гладкомышечных клеток.

"Предшественники" представляют собой соединения, которые могут быть преобразованы в соединения согласно настоящему изобретению посредством метаболической и ферментативной обработки до или после введения в клетки или организма.

В рамках настоящей заявки термин "соли" относится к солям, получаемым по карбоксильным группам, и к получаемым при добавлении кислот солям по аминогруппам пептидов, полипептидов или их аналогов согласно настоящему изобретению. Соли по карбоксильной группе можно получать известными в данной области способами, и они включают неорганические соли, например соли натрия, кальция, аммония, железа или цинка и т.п., а также соли с органическими основаниями, такие как соли, получаемые, например, с аминами, например триэтаноламином, аргинином или лизином, пиперидином, прокаином и т.п. Получаемые при добавлении кислот соли включают, например, соли с неорганическими кислотами, такими как, например, соляная кислота или серная кислота, и соли с органическими кислотами, такими как, например, уксусная кислота или щавелевая кислота. Любая из таких солей должна обладать практически такой же активностью, как пептиды и полипептиды согласно изобретению или их аналоги.

В рамках настоящей заявки термин "производные" относится к производным, которые могут быть получены известными способами из функциональных групп, присутствующих на боковых цепях молекул аминокислот или на N-/или C-концевых группах. Например, такие производные включают сложные эфиры или алифатические амиды карбоксильных групп, а также N-ацильные производные свободных аминогрупп или O-ацильные производные свободных гидроксильных групп, и их получают с использованием ацильных групп, таких как, например, алканоильные или ароильные группы. Также настоящее изобретение включает пептидомиметики уже описанных пептидов, в которых природа пептидов была химически модифицирована на уровне боковых цепей аминокислот, хиральности аминокислот и/или пептидного каркаса. Эти изменения предназначены для получения связывающих FGF2 средств со сходными (если не улучшенными) терапевтическими, диагностическими и/или фармакокинетическими свойствами.

Например, если пептид подвержен расщеплению пептидазами после введения субъекту, то замена конкретной восприимчивой к воздействию пептидной связи на нерасщепляемый пептидный миметик может обеспечить более стабильный пептид и, соответственно, более функциональный в качестве терапевтического средства. Сходным образом, замена остатка L-аминокислоты является общепринятым способом, чтобы сделать пептид менее чувствительным к протеолизу и, в итоге, более сходным с органическими соединениями, отличными от пептидов. Также эффективными являются аминоконцевые блокирующие группы, такие как трет-бутилоксикарбонильная, ацетильная, сукцинильная, метоксисукцинильная, суберильная, адипильная, азелаильная, дансильная, бензилоксикарбонильная, флуоренилметоксикарбонильная, метоксиазелаильная, метоксиадипильная, метоксисуберильная и 2,4-динитрофенильная группы. В данной области известно множество других модификаций, обеспечивающих повышенную эффективность, пролонгированную активность, легкость очистки и/или увеличенное время полужизни.

Свойства пептидов согласно изобретению можно поддерживать или даже усиливать в мутантных пептидах. Мутантные пептиды содержат аминокислотные последовательности, в которых были осущест-

влены консервативные замены одного или нескольких аминокислотных остатков при условии, что они обладают той же характеризующей настояще изобретение биологической активностью на эквивалентном или даже более высоком уровнях, как определено известными в данной области способами или описано в представленных ниже примерах.

Согласно настоящему изобретению предпочтительные изменения в мутантных пептидах общеизвестны как "консервативные" или "безопасные" замены. Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены на аминокислоты с химическими свойствами, в достаточной степени сходными для сохранения структуры и биологической функции молекулы. В литературе представлены многочисленные модели, с использованием которых можно проводить выбор консервативных аминокислотных замен на основе статистических и физико-химических исследований последовательности и/или структуры природного белка.

Мутантные пептиды можно получать посредством общепринятого способа сайт-направленного мутагенеза кодирующей ДНК, посредством комбинаторных способов на уровне кодирующей последовательности ДНК (такими как перестановка ДНК, фаговый дисплей/отбор) или аминокислот, посредством исследований на основе компьютерного конструирования или любым другим известным, эффективным для этого способом, обеспечивающим конечный набор практически аналогичных мутированных пептидов, которые специалист в данной области может обычным способом получать и тестировать, используя указания, имеющиеся в предшествующем уровне техники и в примерах настоящей патентной заявки.

Другой целью изобретения является слитый химерный пептид, содержащий пептид формулы (I) или его функциональные производные. Связывающие FGF2 пептиды, являясь слитыми и/или химерными пептидами, содержат аминокислотную последовательность пептида формулы (I) или любое из их мутантов/производных, как описано выше, и аминокислотную последовательность, относящуюся к отличной от PTX3 последовательности белка, обеспечивая дополнительные свойства без значительного нарушения FGF2-связывающей активности.

Дополнительные последовательности белков, которые можно включать в слитые и/или химерные белки, могут быть выбраны из мембранных последовательностей, внеклеточных участков мембранных белков, константных областей иммуноглобулинов, доменов мультимеризации, внеклеточных белков, белков, содержащих сигнальные пептиды, белков, содержащих сигнальные последовательности для выведения.

Дополнительные свойства, проявляемые слитыми и/или химерными полипептидами или пептидами, заключаются в способности к более легкой очистке, более продолжительном времени полужизни в жидкостях организма или во внеклеточной локализации. Это последнее свойство обладает особой важностью для определения конкретной группы слитых или химерных белков, включенных в представление выше определение, поскольку оно позволяет помещать пептиды согласно изобретению в пространство, в котором не только облегчены выделение и очистка этих пептидов, но и в котором происходит природное взаимодействие PTX3 и FGF2.

Выбор одной или нескольких последовательностей, подлежащих слиянию со связывающими FGF2 пептидами, зависит от конкретного варианта использования пептида.

В качестве общего способа слитые белки можно получать, конструируя кодирующие их участки нуклеиновых кислот с использованием общепринятых способов генной инженерии и клонируя в реплицируемые векторы вирусного или плазмидного происхождения, которые используют для модификации прокариотической или эукариотической клетки-хозяина с применением эписомальных или не/гомологично встраиваемых векторов, а также с применением способов на основе трансформации, инфекции или трансфекции. Эти векторы должны обеспечивать экспрессию слитого белка,ключающего связывающее FGF2 средство, в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине под контролем их собственных регуляторных последовательностей для инициации/терминации транскрипции, которые выбраны таким образом, чтобы быть конститутивно активными или индуцибельными в указанной клетке. Затем можно выделять линию клеток для получения стабильной клеточной линии. В частности, если клетки, модифицированные для экспрессии связывающих FGF2 средств согласно изобретению, используют или вводят непосредственным образом, то, предпочтительно, клетки представляют собой клетки человека, обычно экспрессирующие PTX3. Если дополнительная белковая последовательность, как в случае последовательности внеклеточных белков, белков, содержащих сигнальную последовательность для выведения, или белков, содержащих сигнальный пептид, обеспечивает секрецию связывающего FGF2 домена во внеклеточное пространство, то средство может быть более легко выделено и очищено из культивируемых клеток с учетом последующей обработки, или, альтернативно, клетки могут быть использованы или введены непосредственным образом.

Если дополнительный белок, как в случае последовательности мембранных белков, обеспечивает иммобилизацию связывающего FGF2 средства на поверхности клетки, то средство может быть менее легко выделено и очищено из культивируемых клеток с учетом последующей обработки, однако клетки могут быть использованы или введены непосредственным образом, обеспечивая средство в форме, соответствующей форме природного PTX3, возможно, улучшая его свойства.

Связывающие FGF2 пептиды согласно изобретению могут быть также идентифицированы спосо-

бами компьютерного конструирования лекарственных средств, в которых используют структуру и/или последовательность пептидов согласно изобретению или соответствующих мутантов, как описано выше. Пептиды согласно изобретению можно с более высокой эффективностью использовать для исследования взаимодействия РТХ3 и FGF2, используя способы компьютерного моделирования. Такой анализ с использованием компьютера можно применять для получения улучшенных пептидных или непептидных миметических лекарственных средств в виде синтетических органических молекул или пептидов (например, длиной 4-20 аминокислот). После отбора таких соединений и обнаружения, что они способны связывать FGF2, можно затем оценивать их использование с применением клеточных или животных моделей.

Полипептиды согласно изобретению могут находиться в виде активных коньюгатов или комплекса с гетерологичной молекулой, которую можно выбирать из цитотоксических средств, меток (например, биотина, флуоресцентных меток), лекарственных средств или других терапевтических средств, связанных ковалентно или несвязанных, непосредственно или посредством использования связывающих средств или линкеров. Эффективные коньюгаты или комплексы можно получать с использованием известных в данной области молекул и способов (радиоактивных или флуоресцентных меток, биотина, цитотоксических средств, лекарственных средств или других терапевтических средств). Цитотоксические средства включают химиотерапевтические средства, токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибного, растительного или животного происхождения или его фрагменты) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконьюгат). Ферментативно активные токсины и их фрагменты, которые можно использовать, включают цепь дифтерийного токсина А, несвязывающие активные фрагменты дифтерийного токсина, цепь экзотоксина А (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь рицина А, цепь абрина А, цепь модецина А, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантана, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaria officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин и трихотецины. Для получения радиоконьюгированных белков доступно множество радиоактивных изотопов. Примеры включают ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y и ^{186}Re .

Кроме того, эффективные коньюгаты или комплексы можно получать для улучшения средств в аспекте эффективности доставки лекарственного средства. С этой целью пептиды согласно изобретению могут находиться в виде активных коньюгатов или комплекса с такими молекулами, как полиэтиленгликоль и другие природные или синтетические полимеры (Harris J.M. and Chess R.B., Nat Rev Drug Discov. (2003), 2(3):214-21; Greenwald R.B. et al., Adv Drug Deliv Rev. (2003), 55(2):217-50; Pillai O. and Panchagunla R., Curr Opin Chem Biol. (2001), 5(4):447-51). В этом отношении настоящее изобретение включает химически модифицированные пептиды, как описано в настоящей заявке, в которых пептид связан с полимером. Как правило, полимер является водорастворимым, вследствие чего коньюгат не осаждается в водной среде, такой как физиологическая среда. Используемые для лечения коньюгаты могут содержать фармацевтически приемлемые водорастворимые полимерные молекулы. Приемлемые водорастворимые полимеры включают полиэтиленгликоль (PEG), монометокси-PEG, моно($\text{C}_1\text{-C}_{10}$)аллокси-PEG, арилокси-PEG, поли(N-винилпирролидон)-PEG, трезилмонометокси-PEG, PEG-пропиональдегид, бис-сукцинидиликарбонат-PEG, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные многоатомные спирты (например, глицерин), поливиниловый спирт, декстран, целлюлозу или другие полимеры на основе углеводов. Приемлемые PEG могут иметь молекулярную массу от приблизительно 600 до приблизительно 60000, в том числе, например, 5000, 12000, 20000 и 25000. Также коньюгат может содержать смесь таких водорастворимых полимеров.

Примеры коньюгатов включают пептиды согласно изобретению и группу полиалкилоксида, присоединенную к N-концевому участку указанной молекулы полипептида. Одним из приемлемых полиалкилоксидов является PEG. В качестве иллюстрации, пептиды согласно настоящему изобретению можно модифицировать с использованием PEG, применяя способ, известный как "пегилирование". Пегилирование можно проводить с использованием любой из известных в данной области реакций пегилирования. Например, пегилирование можно осуществлять реакцией ацилирования или реакцией алкилирования с использованием реакционноспособной молекулы полиэтиленгликоля. В альтернативном способе коньюгаты получают конденсацией активированного PEG, при которой концевую гидрокси- или аминогруппу в PEG заменяют активированным линкером.

Другой целью изобретения являются нуклеиновые кислоты, которые кодируют связывающие FGF2 пептиды согласно изобретению, нуклеиновые кислоты, которые гибридизуются с указанными выше нуклеиновыми кислотами, нуклеиновые кислоты, которые имеют вырожденные последовательности.

Также изобретение относится к векторам экспрессии вирусного или плазмидного происхождения, обеспечивающим экспрессию нуклеиновой кислоты согласно изобретению, к прокариотическим или эукариотическим клеткам-хозяевам, трансформированным такими векторами, и к получаемым из них стабильным линиям клеток, экспрессирующими связывающее FGF2 средство, которое может секретироваться или экспрессироваться на поверхности мембран. Примерами являются В-клетки человека.

Связывающие FGF2 пептиды согласно изобретению можно получать способом, в котором описанные выше клетки-хозяева культивируют в соответствующих культуральных средах и получают связы-

вающее FGF2 средство.

Последовательность ДНК, кодирующую пептиды согласно изобретению, можно вставлять и лигировать в приемлемый вектор. После получения вектор экспрессии вводят в приемлемую клетку-хозяина, которая затем экспрессирует пептид.

Экспрессию любого из рекомбинантных пептидов согласно изобретению, как описано в настоящей заявке, можно осуществлять в эукариотических клетках (например, клетках дрожжей, насекомых или млекопитающих) или прокариотических клетках с использованием соответствующих векторов экспрессии. Можно использовать любой известный в данной области способ.

Для того чтобы быть способным экспрессировать желаемый белок, вектор экспрессии должен также содержать специфические нуклеотидные последовательности, которые включают информацию для регуляции транскрипции и трансляции, связанные с ДНК, кодирующей желаемый белок, таким образом, чтобы обеспечивать экспрессию гена и продукцию белка. Прежде всего, для того чтобы ген транскрибировался, ему должен предшествовать распознаваемый РНК-полимеразой промотор, с которым полимераза связывается и запускает тем самым процесс транскрипции.

Существует множество таких используемых промоторов, которые действуют с различной эффективностью (сильные и слабые промоторы).

В случае эукариотических организмов-хозяев, в зависимости от природы организма-хозяина, можно использовать различные регулирующие транскрипцию и трансляцию последовательности. Они могут быть получены из вирусных источников, таких как адено-вирус, вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус обезьяны или т.п., где регуляторные сигнальные последовательности связаны с конкретным геном, экспрессирующимся на высоком уровне. Примеры представляют собой промотор ТК вируса герпеса, ранний промотор SV40, дрожжевой промотор гена ga14 и т.д. Можно выбирать такие регуляторные сигнальные последовательности для инициации транскрипции, которые обеспечивают репрессию и активацию таким образом, чтобы можно было регулировать экспрессию генов.

Молекулу ДНК, содержащую нуклеотидную последовательность, которая кодирует белок согласно изобретению, вставляют в вектор(ы), имеющий регуляторные сигнальные последовательности для транскрипции и трансляции, который способен встраивать желаемые последовательности генов в клетку-хозяина.

Клетки, которые были стабильно трансформированы введенной ДНК, можно отбирать посредством дополнительного введения одного или нескольких маркеров, обеспечивающих селекцию клеток-хозяев, которые содержат вектор экспрессии. Кроме того, маркер может обеспечивать фотографию для ауксотрофного организма-хозяина, устойчивость к биоцидам, например антибиотикам или тяжелым металлам, таким как медь, или т.п. Селектируемый ген-маркер можно непосредственно связывать с надлежащими экспрессии последовательностями ДНК для генов или вводить в ту же самую клетку посредством совместной трансфекции.

Дополнительные элементы векторов также могут быть эффективными для достижения оптимального получения белков согласно изобретению, в частности для отбора конкретной клетки, содержащей плазмидный или вирусный вектор: легкость, с которой содержащие вектор клетки-реципиенты могут быть распознаны и отделены от клеток-реципиентов, не содержащих вектор; количество копий вектора, которое желаемо в конкретном организме-хозяине; а также желательна ли способность вектора к "членочным перемещениям" между клетками-хозяевами различных видов.

После того как для экспрессии конструкции(ий) ДНК были получены содержащий конструкцию(ии) вектор(ы) или последовательность ДНК, их можно вводить в соответствующую клетку-хозяин любым из множества приемлемых способов: трансформацией, трансфекцией, конъюгацией, слиянием протопластов, электропорацией, осаждением посредством фосфата кальция, прямой микроинъекцией и т.д.

Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими. Предпочтительными являются эукариотические организмы-хозяева, например клетки млекопитающих, такие как клетки человека, обезьяны, мыши и клетки яичника китайского хомячка (СНО), поскольку они обеспечивают посттрансляционные модификации белковых молекул, в том числе надлежащую укладку или гликозилирование надлежащих участков. Клетки дрожжей также могут осуществлять посттрансляционные модификации пептидов, в том числе гликозилирование. Существует множество способов рекомбинантной ДНК, в которых используют последовательности сильных промоторов и большое число копий плазмид, которые можно применять для получения желаемых белков в дрожжах. Дрожжи распознают лидерные последовательности в продуктах клонированных генов млекопитающих и секрецируют пептиды, содержащие лидерные последовательности (т.е. препептиды).

После введения вектора(ов) клетки-хозяева выращивают в селективной среде, посредством которой проводят селекцию на предмет роста клеток, содержащих вектор. Экспрессия последовательности(ей) клонированного гена приводит к получению желаемых белков.

Во многих обзورах и книгах представлены указания относительно того, как клонировать и получать рекомбинантные белки с использованием векторов и прокариотических или эукариотических клеток-хозяев, например в некоторых документах из серий "A Practical Approach", опубликованных Oxford University Press ("DNA Cloning 2: Expression Systems", 1995; "DNA Cloning 4: Mammalian Systems", 1996;

"Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Примеры способов химического синтеза, которые более всего показаны для получения связывающего FGF2 средства согласно изобретению, когда оно находится в виде пептида или пептидных миметиков, представляют собой твердофазный синтез и жидкофазный синтез. Например, в случае твердофазного синтеза аминокислоту, соответствующую C-концевому участку подлежащего синтезу пептида, связывают с носителем, который не растворим в органических растворителях, и посредством поочередного повтора реакций удлиняют таким образом пептид, где в ходе одной реакции аминокислоты вместе с их аминогруппами и функциональными группами боковых цепей, защищенные соответствующими защитными группами, конденсируют одну за другой в порядке от C-концевого участка к N-концевому участку, а в ходе другой реакции высвобождают связанные со смолой аминокислоты или защитную группу на аминогруппах пептидов.

В основном, способы твердофазного синтеза в зависимости от используемого типа защитной группы подразделяют на способ tBoc и способ Fmoc. Как правило, используемые защитные группы включают tBoc (трет-бутилоксикарбонил), Cl-Z (2-хлорбензилоксикарбонил), Br-Z (2-бромбензилоксикарбонил), Bzl (бензил), Fmoc (9-флуоренилметоксикарбонил), Mbh (4,4'-диметоксидибензогидрил), Mtr (4-метокси-2,3,6-триметилензолсульфонил), Trt (тритил), Tos (тозил), Z (бензилоксикарбонил) и Cl₂-Bzl (2,6-дихлорбензил) для аминогрупп; NO₂ (нитрогруппу) и Pmc (2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил) для гуанидиногрупп и tBu (трет-бутил) для гидроксильных групп). После синтеза желаемого пептида его подвергают реакции снятия защиты и отделяют от твердого носителя. Такую реакцию отделения пептида можно проводить с использованием фторводородной кислоты или трифторметансульфоновой кислоты в случае способа Boc и с использованием TFA в случае способа Fmoc.

В конечном итоге связывающие FGF2 средства, полученные способами рекомбинантной ДНК или химического синтеза, подвергают одной или нескольким стадиям очистки. Очистку можно проводить любым из известных для этой цели способов, т.е. любым общепринятым способом, в том числе экстракцией, осаждением, хроматографией, электрофорезом или т.п. Например, можно использовать ВЭЖХ (высокоэффективную жидкостную хроматографию). Элюцию можно проводить с использованием растворителя на основе вода-ацетонитрил, обычно применяемого для очистки белков. Изобретение относится к очищенным препаратам связывающих FGF2 средств согласно изобретению. В рамках настоящей заявки очищенные препараты относятся к препаратам, которые содержат по меньшей мере 1%, предпочтительно по меньшей мере 5% сухой массы соединений согласно изобретению.

Описанные выше соединения согласно изобретению (белки, пептиды, органические соединения) можно использовать в качестве лекарственного средства, предпочтительно в качестве средства против заболевания, обусловленного измененным ангиогенезом. Более предпочтительно измененный ангиогенез вызван измененной активацией фактора роста FGF2. Еще более предпочтительно заболевание выбирают из группы, состоящей из артрита, метастазирования опухоли, диабетической ретинопатии, псориаза, хронического воспаления, артериосклероза или опухоли. Предпочтительно опухоль выбирают из группы саркомы, карциномы, карциноидной опухоли, опухоли костной ткани или нейроэндокринной опухоли.

Описанные выше соединения согласно изобретению (белки, пептиды, органические соединения) можно использовать в качестве средств против заболеваний, связанных с неконтролируемой, зависимой от FGF2 пролиферацией фибробластов или гладкомышечных клеток, рубцевания, связанного с чрезмерной реакцией фибробластов, и рестеноза после ангиопластики.

Действительно, связывающие FGF2 пептиды согласно изобретению, связываясь с FGF2, действуют как ингибитор FGF2. В самом деле, пептиды способны ингибировать индуцируемую FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток или гладкомышечных клеток. Поэтому терапевтический потенциал такой молекулы заключается в профилактике и/или лечении заболеваний, при которых ингибирование FGF2 является благоприятным. Этот последний эффект также можно использовать для уменьшения популяции клеток, экспрессирующих FGF2.

Связывающие FGF2 пептиды согласно изобретению можно использовать в качестве активных ингредиентов в фармацевтических композициях для профилактики и/или лечения заболеваний, обусловленных измененным ангиогенезом, где измененный ангиогенез вызван измененной активацией FGF2. Примером указанных заболеваний является: артрит, метастазирование опухоли, диабетическая ретинопатия, псориаз, хроническое воспаление, артериосклероз или опухоль, где опухоль, например, представляет собой саркому, карциному, карциноидную опухоль, опухоль костной ткани или нейроэндокринную опухоль.

Связывающие FGF2 средства согласно изобретению можно также использовать в качестве активных ингредиентов в фармацевтических композициях для профилактики и/или лечения заболеваний, связанных с неконтролируемой, зависимой от FGF2 пролиферацией фибробластов или гладкомышечных клеток, например, рубцеванием, связанным с чрезмерной реакцией фибробластов, и рестеноза после ангиопластики.

Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей терапевтически эффективное количество пептида формулы I или его функциональных производных, а также приемлемые разбавители и/или наполнители, и/или вспомогательные фармацевтические средства для про-

филактики и/или лечения указанных выше заболеваний. Эти фармацевтические композиции можно составлять в сочетании с фармацевтически приемлемыми носителями, наполнителями, стабилизаторами или разбавителями. В зависимости от свойств средства фармацевтическая композиция может быть эффективна при заболеваниях, связанных с Т-клетками CD4+, например при аутоиммунных заболеваниях, воспалениях или инфекциях.

Фармацевтические композиции, которые содержат связывающие FGF2 пептиды согласно настоящему изобретению, включают все композиции, где указанное соединение содержится в терапевтически эффективном количестве, т.е. количестве, эффективном для достижения желаемого медицинского эффекта у животного, которому проводят лечение. Фармацевтические композиции могут содержать эффективные фармацевтически приемлемые носители, биологически совместимые инертные вещества, приемлемые для введения животному (например, физиологический раствор), а также при соответствующих условиях композиции содержат вспомогательные средства (такие как наполнители, стабилизаторы или разбавители), способствующие преобразованию активных соединений в препараты, которые можно использовать в фармацевтических целях.

Фармацевтические композиции можно составлять любым приемлемым образом, удовлетворяющим требованиям конкретного способа введения. В литературе описано использование биоматериалов и других полимеров для доставки лекарственного средства, а также различные способы и модели для подтверждения правильного выбора конкретного способа введения. Также эффективны модификации соединений согласно изобретению для улучшения проникновения через гематоэнцефалический барьер.

Любой приемлемый способ введения может быть использован и определен специалистами в данной области. Например, введение можно осуществлять различными парентеральными способами, такими как подкожное, внутривенное, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, интраназальное, трансдермальное, пероральное или буккальное введение. Парентеральное введение можно осуществлять болюсной инъекцией или постепенной перфузией в течение определенного времени. Препараты для парентерального введения включают стерильные водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии, которые могут содержать известные в данной области вспомогательные средства или наполнители и могут быть получены общепринятыми способами. Кроме того, можно вводить суспензию активных соединений в виде соответствующих масляных суспензий для инъекций. Приемлемые липофильные растворители или носители включают жирные масла, например кунжутное масло, или синтетические сложные эфиры жирных кислот, например этилолеат или триглицериды.

Водные суспензии для инъекции, которые могут содержать вещества, повышающие вязкость суспензии, включают, например, карбоксиметилцеллюлозу натрия, сорбит и/или декстран. Необходимо, суспензия может также содержать стабилизаторы. Фармацевтические композиции включают растворы, приемлемые для введения инъекцией, и содержат от приблизительно 0,01 до 99%, предпочтительно от приблизительно 20 до 75% активного соединения вместе с наполнителем. Композиции, которые можно вводить ректально, включают суппозитории.

Понятно, что вводимая доза зависит от возраста, пола, состояния здоровья и массы реципиента, вида сопутствующего лечения, при наличии такого, частоты проведения лечения и природы желаемого эффекта. Дозу подбирают для конкретного субъекта, как понимает и определяет специалист в данной области. Суммарную дозу, необходимую для каждого лечения, можно вводить в виде многократных доз или в виде разовой дозы. Фармацевтическую композицию согласно настоящему изобретению можно вводить отдельно или в сочетании с другими терапевтическими средствами, направленными против заболевания или направленными против других симптомов заболевания. Как правило, суточная доза активного ингредиента составляет от 0,01 до 100 мг на 1 кг массы организма.

Соединения согласно настоящему изобретению можно вводить пациенту внутривенно в фармацевтически приемлемом носителе, таком как физиологический раствор. Можно использовать общепринятые способы внутриклеточной доставки пептидов, например доставку посредством липосом. Такие способы хорошо известны специалистам в данной области. Препараты согласно этому изобретению эффективны для парентерального введения, такого как внутривенное, подкожное, внутримышечное и внутрибрюшинное. Как хорошо известно в области медицины, дозы для любого пациента зависят от множества факторов, в том числе размера пациента, площади поверхности тела, возраста, конкретного соединения, подлежащего введению, пола, времени и способа введения, общего состояния здоровья и других параллельно вводимых лекарственных средств.

Все цитируемые в настоящей заявке ссылки включены сюда в качестве ссылки в полном объеме, включая все данные, таблицы, фигуры и текст, представленные в цитируемых ссылках. Кроме того, полное содержание ссылок, которые цитируются в цитируемых в настоящей заявке ссылках, также приведено здесь полностью в качестве ссылки. Ссылки на известные стадии способов, стадии общепринятых способов, известные способы или общепринятые способы никаким образом не являются признанием того, что какой-либо аспект, описание или вариант осуществления настоящего изобретения описан, указан или предложен в соответствующей области. Поняв особенности способов и продуктов, описанных в настоящей заявке, можно легко вывести необходимость и тип дополнительных стадий из обзора предшествующей области, а также из следующих ниже неограничивающих фигур и примеров, в которых

описаны основные детали и некоторые варианты использования изобретения.

Описание чертежей

Фиг. 1 - ингибирование митогенной активности FGF2 посредством трансдуцированных ретровирусом N_{term}-PTX3. (А) Анализ посредством вестерн-блоттинга для кондиционированной среды из клеток эндотелия аорты мыши (МАЕ), инфицированных EGFP, полноразмерным ретровирусом человека PTX3, ретровирусами sC_{term}-PTX3 или N_{term}-PTX3. Две иммунореактивные полосы, присутствующие на дорожке для sC_{term}-PTX3, соответствуют гликозилированной и негликозилированной формам рекомбинантного белка¹⁰. (В) Инфицированные ретровирусом клетки МАЕ стимулировали с использованием FGF2 (0,55 нМ). Через 48 ч клетки обрабатывали трипсином и подсчитывали. Данные выражают в виде процента пролиферации, наблюдаемой у псевдоинфицированных клеток, обрабатываемых FGF2 (0,8 удвоения клеточной популяции). (С) Клетки GM7373 инкубировали с использованием кондиционированной среды от инфицированных клеток МАЕ и сразу обрабатывали посредством 0,55 нМ FGF2. Через 24 ч клетки обрабатывали трипсином и подсчитывали. Данные выражают в виде процента пролиферации, наблюдаемой у клеток GM7373, инкубуемых в свежей среде вместе с FGF2 (1,0 удвоения клеточной популяции). В В и С данные представляют собой среднее значение ±SD для 3 независимых экспериментов в трех сериях.

Фиг. 2 - ингибирование взаимодействия FGF2/PTX3 посредством рекомбинантного N_{term}-PTX3. (А) Рекомбинантный 6×His-меченный N_{term}-PTX3 и C_{term}-PTX3 экспрессировали и очищали из трансформированных клеток E. coli (во вставке представлено окрашивание серебром геля SDS-PAGE, в который поместили очищенные белки). Затем покрытые посредством FGF2 лунки инкубировали вместе с полноразмерным PTX3, N_{term}-PTX3 или C_{term}-PTX3 (все при концентрации 44 нМ) в течение 30 мин при 37°C. Относительное количество белка, связавшегося с иммобилизованным FGF2, регистрировали иммunoлогическим способом посредством инкубации с поликлональным антителом кролика против PTX3, как описано в "Веществах и способах". (В) Покрытые посредством FGF2 лунки инкубировали вместе с биотинилированным PTX3 (bPTX3, 22 нМ) в отсутствие или при наличии 10-кратного молярного избытка полноразмерного PTX3, N_{term}-PTX3 или C_{term}-PTX3. Затем измеряли количество bPTX3, связавшегося с иммобилизованным FGF2, а данные выражали в виде процента связывания, измеряемого в отсутствие какого-либо конкурентного вещества. Все данные представляют собой среднее значение ±SD для 3 независимых экспериментов в трех сериях.

Фиг. 3 - картирование эпитопа PTX3. (А) Полноразмерный PTX3, N_{term}-PTX3 и C_{term}-PTX3 (200 нг/дорожка) анализировали вестерн-блоттингом с использованием моноклональных антител mAb-MNB4 и mAb-16B5. (В) 128 перекрывающихся пептидов, состоящих из 13 мономеров, покрывающих всю последовательность PTX3 человека, группировали на целлюлозных мембренах посредством спот-синтеза. Затем на мембранны воздействовали антителами mAb-MNB4 (черные столбцы) и mAb-16B5 (серые столбцы) и количественно определяли иммунокомплексы денситометрическим анализом мембранны. Аминокислотная последовательность пептидов PTX3,познаваемая двумя антителами, представлена в виде однобуквенного кода курсивным шрифтом с подчеркиванием.

Фиг. 4 - mAb-MNB4 препятствует взаимодействию FGF2/PTX3. (А) Покрытые посредством FGF2 лунки инкубировали вместе с 22 нМ bPTX3 в отсутствие или в присутствии полноразмерного PTX3, mAb-MNB4 или mAb-16B5 (все в концентрации 220 нМ). Затем измеряли количество bPTX3, связавшегося с иммобилизованным FGF2, а данные выражали в виде процента связывания, измеряемого в отсутствие какого-либо конкурентного вещества. (В) Клетки GM7373 инкубировали вместе с FGF2 (0,55 нМ) вместе с PTX3 (220 нМ) в отсутствие или в присутствии mAb-MNB4 или mAb-16B5 (оба в концентрации 2,2 мкМ). Через 24 ч клетки обрабатывали трипсином и подсчитывали. Данные выражают в виде процента пролиферации, наблюдаемой у клеток GM7373, которые инкубируют только с FGF2. Все данные представляют собой среднее значение ±SD для 3 независимых экспериментов в трех сериях.

Фиг. 5 - ингибирование взаимодействия FGF2/PTX3 синтетическими пептидами PTX3. (А) Схематическое представление N-концевого PTX3 человека и родственных синтетических пептидов PTX3. (В) В лунки, покрытые указанными пептидами PTX3 (200 мкг/лунка), добавляли FGF2 (80 нМ) и оценивали количество связавшегося FGF2. Данные, выраженные в виде процента количества FGF2, связавшегося с покрытыми PTX3 лунками, представляют собой среднее значение ±SD для 3 независимых экспериментов в трех сериях. (С) Верхняя панель: вспрыскивали FGF2 (0,8 мкМ) над покрытыми PTX3 или покрытыми желатином сенсорными чипами BIACore. Нижняя панель: лист сенсограммы, на котором представлено связывание FGF2 (0,1, 0,5, 0,8 и 1,1 мкМ) в возрастающих количествах с иммобилизованным PTX3. Реакцию (в RU, резонансных единицах) регистрировали как функцию времени. (Д) вспрыкивали FGF2 (0,8 мкМ) над покрытым PTX3 сенсорном чипом BIACore в присутствии возрастающих концентраций полноразмерного PTX3 (■) или синтетических пептидов PTX3 (82-110) (●) смешанного PTX3(82-110) (○) или PTX3(57-85) (□). Регистрировали ответную реакцию по окончании вспрыкивания и наносили на график как функцию концентрации антагониста. Для каждого пептида получали сходные результаты в 2-3 независимых экспериментах. (Е) Клетки GM7373 инкубировали вместе с FGF2 (0,55 нМ) в отсутствие или в присутствии PTX3 (220 нМ) или указанных пептидов PTX3 (все в концентрации 66 мкМ). Данные,

выраженные в виде процента пролиферации, наблюдавшейся у клеток GM7373, которые инкубируют только с FGF2, представляют собой среднее значение $\pm SD$ для 3 независимых экспериментов в трех сериях.

Фиг. 6 - пептид PTX3(97-110) как антагонист FGF2. (А) Схематическое представление перекрывающихся пептидов PTX3(82-110). (В) Лунки, покрытые указанными пептидами PTX3 (200 мкг/лунка), инкубировали вместе с FGF2 (80 нМ) и оценивали количество связавшегося FGF2. Данные, выраженные в виде процента количества FGF2, связавшегося с покрытыми PTX3 лунками, представляют собой среднее значение $\pm SD$ для 3 независимых экспериментов в трех сериях. (С) Впрыскивали FGF2 (0,8 мкМ) над покрытым PTX3 сенсорным чипом BIACore в присутствии возрастающих концентраций PTX3(82-110) (●) PTX3(97-110) (○), PTX3 (82-101) (■) или PTX3(82-96) (▲). Регистрировали ответную реакцию по окончании впрыскивания и наносили на график как функцию концентрации антагониста. Для каждого пептида получали сходные результаты в 2-3 независимых экспериментах. (Д) Клетки GM7373 инкубировали вместе с FGF2 (0,55 нМ) в отсутствие или в присутствии указанных пептидов PTX3 (все в концентрации 66 мкМ). Данные, выраженные в виде процента пролиферации, наблюдавшейся у клеток GM7373, которые инкубируют только с FGF2, представляют собой среднее значение $\pm SD$ для 3 независимых экспериментов в трех сериях. (Е) Впрыскивали FGF2 (0,8 мкМ) над покрытым PTX3 сенсорным чипом BIACore в присутствии возрастающих концентраций PTX3(97-110) (●), PTX3(100-110) (●), PTX3 (97-104) (▲) или PTX3 (97-107) (▼), PTX3(104-113) (◆), PTX3(100-113) (▲), PTX3(100-104) (■). Регистрировали ответную реакцию по окончании впрыскивания и наносили на график как функцию концентрации антагониста. Для каждого пептида получали сходные результаты в 2-3 независимых экспериментах.

Фиг. 7 - антиangiогенная активность пептида PTX3(82-110). Фотографировали на 14 сутки хорион-наплантационную мембрану эмбриона цыпленка (CAM), имплантированную на 11 сутки вместе с гранулами альгината, содержащими носитель (а) или 16 пмоль FGF2 в отсутствие (б) или в присутствии (с) 3 нмоль PTX3(82-110). Исходное увеличение, $\times 5$.

Примеры

Пример 1. Вещества и способы.

Химические вещества.

Рекомбинантный FGF2 человека (универсальный идентификатор 09038) и PTX3 (универсальный идентификатор Swiss-Prot P26022) экспрессировали в *E. coli* и клетках яичника китайского хомячка соответственно и очищали, как описано в^{10,19}. Синтетические пептиды PTX3(31-60), PTX3(57-85) и PTX3(107-132) человека получали из Primm (Milan, Italy), все остальные пептиды получали из Tecnogen (Piana di Monteverna, Caserta, Italy) (степень чистоты ВЭЖХ $\geq 95\%$). Аминокислотная последовательность для всех пептидов представлена в табл. 1 в виде однобуквенного кода, а нумерация начинается с метионинового остатка в положении 1 в лидерной последовательности PTX3.

Таблица 1

Синтетические пептиды, покрывающие N-концевой PTX3 человека

Пептид	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
PTX3 (31-60)	DNEIDNGLHPTEDPTPCDCGQEHWDKLF	8
PTX3 (57-85)	DKLFIMLENSQMRERMLLQATDDVLRGEL	9
PTX3 (82-110)	RGEQLQLREELGRLAESLARPCAPGAPAE	10
Смешанный PTX3 (82-110)	EGLRGELRGSREAELLRQAARAPACPLPE	11
PTX3 (107-132)	APAAEARLTSALDELLQATRDAAGRRLA	12
PTX3 (82-96)	RGEQLQLREELGRLA	13
PTX3 (82-101)	RGEQLQLREELGRLAESLAR	14
PTX3 (97-110)	ESLARPCAPGAPAE	5
PTX3 (97-104)	ESLARPCA	15
PTX3 (97-107)	ESLARPCAPGA	6
PTX3 (100-104)	ARPCA	7
PTX3 (100-110)	ARPCAPGAPAE	16
PTX3 (82-99)	RGEQLQLREELGRLAESL	1
PTX3 (105-110)	PGAPAE	2
PTX3 (97-99)	ESL	3
PTX3 (105-107)	PGA	4

Ранее были описаны моноклональные антитела крысы, направленные против очищенного PTX3 человека^{10,20} (MNB1, номер в каталоге ALX-804-463, MNB4, номер в каталоге ALX-804-464, Alexis Biochemicals).

Культуры клеток.

Эндотелиальные клетки аорты бычьего эмбриона GM7373²¹ выращивали на MEM Игла, содержа-

щей 10% эмбриональную телячью сыворотку (FCS). Клетки-упаковщики эмбриональной почки человека (EcoPack2-293) (Clontech, C.A., USA) выращивали на DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, M.D.), содержащей 10% FCS. Эндотелиальные клетки аорты мыши Balb/c 22106 (клетки MAE) получали от R. Auerbach (University of Wisconsin, Madison, W.I.) и выращивали на DMEM с добавкой 10% FCS.

Ретровирусная инфекция.

кДНК, кодирующие PTX3 человека и улучшенный зеленый флуоресцентный белок (EGFP) получали, как описано в¹⁷. кДНК, кодирующие N-концевой фрагмент PTX3 (1-178) (N_{term}-PTX3) и C-концевой фрагмент PTX3(179-381), слитые с лидерной последовательностью для секреции PTX3 (1-17) (sC_{term}-PTX3), получали из pLX-PTX3¹⁷ с использованием ПЦР общепринятых способов клонирования. Все кДНК клонировали в ретровирусный вектор pBABE, получая таким образом pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3 и pBABE-EGFP, которые использовали для трансфицирования клеток-упаковщиков EcoPack2-293 в присутствии липофектамина¹⁷. Трансдуцированные клетки отбирали в течение 2 недель с использованием пуромицина (1 мкг/мл, Sigma). Для дальнейших экспериментов использовали клоны с титром вирусов, превышающим 10⁶ колониеобразующих ед./мл. Затем достигшие смыкания монослоя культуры клеток MAE инкубировали в течение 24 ч вместе с кондиционированной средой от pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3 или клеток-упаковщиков pBABE-EGFP в присутствии полибрена (8 мкг/мл, Sigma). Популяции инфицированных клеток отбирали в течение 7 суток с использованием пуромицина. При наблюдении инфицированных EGFP клеток посредством эпифлуоресцентной микроскопии (микроскоп Axiovert S100, ×10/0,25; Zeiss, Gottingen, Germany) было выявлено, что эффективность ретровирусной инфекции превышала 80%. Для оценки уровней экспрессии и высвобождения трансгенного белка инфицированными клетками выращивали в течение 2 суток клеточные культуры в не содержащих сыворотку условиях. Затем кондиционированные среды собирали, очищали центрифугированием, 10-кратно концентрировали с использованием фильтров Centricon YM-10 (Millipore) и анализировали аликвоты 100 мкл посредством анализа вестерн-блоттингом.

Анализ пролиферации клеток.

Анализ клеточной пролиферации для эндотелиальных клеток проводили, как описано в²². Вкратце, клетки GM7373 или MAE высевали в 96-луночные планшеты при 75000 клеток/см² или 25000 клеток/см² соответственно. Через 16 ч клетки инкубировали в свежей среде, содержащей 0,4% FCS вместе с FGF2 (0,55 нМ), в отсутствие или в присутствии различных антагонистов. Через 24 или 48 ч соответственно клетки обрабатывали трипсином и подсчитывали в камере Бюркера.

Экспрессия и очистка фрагментов рекомбинантного 6×His-меченного PTX3 из E. Coli.

Амплифицировали кДНК N_{term}-PTX3 и C_{term}-PTX3 из pLX-PTX3 посредством ПЦР с использованием праймеров, содержащих дополнительные нуклеотиды

PTX3-N:

(+) CACCGAGAACTCGGATGATTATGA 8 (SEQ ID NO: 17);

(-) TTAACCTGCCGGCAGCCAGCTCC (SEQ ID NO: 18);

PTX3-C:

(+) CACCTGTGAAACAGCTATTAA (SEQ ID NO: 19);

(-) TTATGAAACATACTGAGCTCC (SEQ ID NO: 20).

Эти кДНК клонировали в вектор pENTR TOPO (набор для клонирования pENTR Directional TOPO, Invitrogen) и проводили секвенирование. Затем с использованием способа Gateway[®] (Invitrogen) кДНК N_{term}-PTX3 и C_{term}-PTX3 из вектора pENTR TOPO клонировали в вектор pDEST17, обеспечивая вставку 6×His-метки в C-концевой участок рекомбинантных белков. Затем клетки E. coli BL21-AI (Invitrogen) трансформировали посредством двух рекомбинантных плазмид и выращивали при 37°C в среде LB, содержащей 100 мкг/мл ампициллина. Экспрессию рекомбинантного белка индуцировали посредством инкубации в течение ночи при 30°C в присутствии 0,2% L-арabinозы. После индукции клетки ресус펜сировали в буфере для связывания (20 мМ фосфата натрия, 0,5M NaCl, 10 мМ имидазола, pH 7,4) и лизировали воздействием ультразвука. Очищенные супернатанты фильтровали через фильтр 0,45 мкм и помещали для очистки в аффинную колонку с иммобилизованным металлом (IMAC) HiTrap, с никелем, объемом 3,0 мл (Amersham Biosciences). Колонку промывали 100 мМ имидазола в буфере для связывания и элюировали связавшиеся белки с использованием 300 мМ имидазола в соответствии с указаниями производителя. Фракции анализировали на предмет наличия рекомбинантного белка посредством иммуноблоттинга, а положительные фракции собирали и обессоливали гельфильтрационной хроматографией (колонка сефадекс G25 PD10, Amersham) в PBS. Степень чистоты рекомбинантных белков превышала 90%, как оценивали посредством SDS-PAGE с последующим окрашиванием геля серебром (см. вставку в фиг. 2A).

Твердофазный анализ связывания.

Микропланшеты для ELISA инкубировали в течение 16 ч при 4°C вместе с 100 мкл/лунка 100 мМ NaHCO₃, pH 9,6 (буфер для нанесения покрытия), содержащим FGF2 (270 нМ). Затем лунки в течение 2 ч при комнатной температуре покрывали 5% сухим молоком в буфере для нанесения покрытия. После этого аликвоты PBS 100 мкл, содержащие полноразмерный PTX3, рекомбинантный N_{term}-PTX3 или C_{term}-

PTX3 (все в концентрации 44 нМ), инкубировали в течение 30 мин при 37°C в лунках, покрытых FGF2. Затем лунки последовательно инкубировали в течение 1 ч при 37°C вместе с поликлональным антителом кролика против PTX3 (разведение 1:2000), распознающим оба фрагмента PTX3 с одинаковой эффективностью в вестерн-блоттинге и ELISA, биотинилированным антителом против кролика (1:2000) и 100 мкл стрептавидин-пероксидазы хрина (1:5000, Amersham) в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого добавляли 100 мкл/лунка хромогенного субстрата в виде 2,29-азин-бис(3- этилбензтиазолинсульфоновой кислоты). Величины поглощения регистрировали при 405 нм на автоматическом считывющем устройстве для ELISA. В некоторых экспериментах аликвоты PBS 100 мкл, содержащие меченный биотином PTX3 (bPTX3) (22 нМ), инкубировали в течение 30 мин при 37°C в покрытых FGF2 лунках в присутствии или отсутствие конкурирующих веществ. Затем лунки промывали и оценивали количество связавшегося bPTX3, как описано в¹⁷. Альтернативно, фиксировали синтетические пептиды PTX3 в лунках микропланшета для ELISA (200 мкг/лунка), как описано выше. После этого добавляли FGF2 (80 нМ) и оценивали количество FGF2, связавшегося с иммобилизованными пептидами, посредством инкубации в течение 1 ч при 37°C вместе с поликлональным антителом кролика против FGF2 (1:7000) с последующей регистрацией иммунокомплекса, как описано выше.

Картирование эпитопа PTX3.

Для выявления аминокислотной последовательности эпитопов, связывающихся с моноклональными антителами против PTX3, группировали 128 пептидов на целлюлозных мембранных с использованием способа SPOT-синтеза²³. Длина пептидов составляла 13 аминокислот при 3-аминокислотном сдвиге рамки считывания. Мембранные блокировали 2% молоком в Tween-TBS (MBS) в течение 16 ч при 4°C. После промывки мембранные инкубировали в течение 90 мин при 37°C вместе с моноклональными антителами mAb MNB4 или mAb 16B5 (оба при разведении 1:1000 в MBS), а затем инкубировали в течение 90 мин при 37°C вместе с коньюгированным со щелочной фосфатазой IgG кролика против крысы (1:30000, Sigma) в MBS. Получали реакцию окрашивания, как описано в²³, и оценивали интенсивность сигнала денситометрическим анализом мембранных.

Анализ связывания BIAcore.

Использовали устройство BIAcore X (BIAcore Inc, Piscataway, NJ). Для измерения изменений показателя преломления, которые обусловлены способностью FGF2 связываться с PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore, использовали поверхностный плазмонный резонанс. С этой целью позволяли PTX3 (2,2 мкМ) взаимодействовать с проточной ячейкой в сенсорном чипе CM4, которая была предварительно активирована посредством 50 мкл смеси 0,2М гидрохлорида N-этил-N'-(3-диметиламино-пропил)карбодиимида и 0,05 М N-гидроксисукциниимида. Эти экспериментальные условия обеспечивали иммобилизацию 5000 резонансных единиц (RU), соответствующих приблизительно 0,1 пмоль PTX3. Сходные результаты получали для иммобилизации желатина, используемого в настоящей заявке в качестве отрицательного контроля, и для вычитания фоновых значений. Затем FGF2 в возрастающих концентрациях в присутствии или отсутствии синтетических пептидов PTX3 в буфере для разведения (PBS вместе с 0,005% поверхностно-активным веществом P20, 5,0 мкг/мл CaCl₂ и MgCl₂) впрыскивали в течение 4 мин над поверхностью PTX3 (для обеспечения их связывания с иммобилизованным PTX3), а после этого промывали до тех пор, пока не наблюдали диссоциации.

Анализ с использованием хорионаллантоинской мембранный эмбриона цыпленка (CAM).

Альгинатные гранулы (5 мкл), содержащие носитель или 16 пмоль FGF2 в присутствии или отсутствии синтетических пептидов PTX3, получали, как описано в²⁴, и помещали на верхнюю поверхность CAM из оплодотворенных яиц цыплят породы белый леггорн после 11 суток инкубации (10 яиц на экспериментальную группу). Через 72 ч подсчитывали количество сходящихся к имплантату кровеносных сосудов посредством двух наблюдений двойным слепым способом с использованием стереомикроскопа (STEMI-SR, $\times 2/0,12$; Zeiss).

Результаты.

N-Концевой участок PTX3 связывает FGF2.

Белок PTX3 характеризуется C-концевым доменом из 203 аминокислот (C_{term}-PTX3), обладающим гомологией с классическими короткими пентраксинами CRP и SAP, и N-концевым удлиняющим участком из 178 аминокислот (N_{term}-PTX3), для которого не показано какой-либо значительной гомологии с каким-либо известным белком⁸. При попытке выявить антиangiогенный, связывающий FGF2 домен(ы) PTX3 оценивали два участка C_{term} или N_{term}-PTX3 на предмет их способности взаимодействовать с FGF2.

В ходе предшествующих наблюдений было показано, что сверхэкспрессия полноразмерного PTX3 приводит к ингибированию зависящей от FGF2 пролиферации клеток эндотелия, что обусловлено связыванием высвобождаемого PTX3 с экзогенным фактором роста и его блокированием во внеклеточной среде¹⁷. Исходя из этого, эндотелиальные клетки аорты мыши (МАЕ) инфицировали ретровирусами, содержащими полноразмерный PTX3 человека, N-концевой удлиняющий участок PTX3 N_{term}-PTX3 или C-концевой участок PTX3, слитые с лидерной последовательностью PTX3 для секреции (sC_{term}-PTX3). Контрольные клетки инфицировали посредством ретровируса, содержащего EGFP. Инфицированные клетки сверхэкспрессировали и высвобождали соответствующие белки в сходных количествах (фиг. 1A), и для них наблюдали сходную скорость роста в основных условиях. Однако сверхэкспрессия N_{term}-PTX3 вы-

звала значительное снижение способности инфицированных клеток к пролиферации в ответ на экзогенный FGF2, что является сходным со сверхэкспрессией полноразмерного PTX3 (фиг. 1В). В отличие от этого, сверхэкспрессия sC_{term}-PTX3 не вызывала ингибирования в сравнении с контрольными клетками, инфицированными посредством EGFP.

Для дополнительной оценки способности N_{term}-PTX3 действовать в качестве антагониста FGF2 оценивали кондиционированные среды от инфицированных клеток MAE на предмет способности воздействовать на зависящую от FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток GM7373 (фиг. 1С). Как и предполагали, инкубация клеток GM7373 вместе с FGF2 в присутствии кондиционированной среды от клеток MAE, инфицированных посредством N_{term}-PTX3 или PTX3, вызывала значительное ингибирование митогенной активности фактора роста, тогда как кондиционированные среды от клеток MAE, инфицированных посредством sC_{term}-PTX3 и EGFP, были неэффективными (фиг. 1С). Ни одна из кондиционированных сред не вызывала значительного ингибирования пролиферации клеток GM7373, запускаемой посредством 10% FCS, что тем самым подтверждает специфичность эффекта.

Для подтверждения того, что активность N_{term}-PTX3 как антагониста FGF2 была обусловлена его способностью непосредственно взаимодействовать с фактором роста, N_{term}-PTX3 экспрессировали и очищали из трансформированных клеток *E. coli* в виде рекомбинантного 6×His-меченого белка; в качестве контроля использовали очищенный рекомбинантный 6×His-меченный C_{term}-PTX3 (фиг. 2А, вставка). При оценке взаимодействия FGF2 у полноразмерного PTX3 и фрагмента рекомбинантного N_{term}-PTX3 наблюдали способность связываться с FGF2, иммобилизованным на пластмассе для нетканевых культур. В отличие от этого, для рекомбинантного C_{term}-PTX3 взаимодействия не наблюдали (фиг. 2А). Соответственно, 10-кратный молярный избыток рекомбинантного N_{term}-PTX3 или полноразмерного PTX3, но не C_{term}-PTX3, предотвращал связывание биотинилированного PTX3 (bPTX3) с иммобилизованным FGF2 (фиг. 2В).

Взятые вместе эти результаты означают, что за связывание с FGF2 ответственен N-концевой участок PTX3.

Ингибирование взаимодействия FGF2/PTX3 моноклональным антителом против N_{term}-PTX3.

При скрининге набора моноклональных антител крысы, получаемых против полноразмерного PTX3 человека, были выявлены антитела mAb-MNB4²⁰ (MNB4, номер в каталоге ALX-804-464, Alexis Biochemicals) и mAb-16B5¹⁰ (MNB1, номер в каталоге ALX-804-463, Alexis Biochemicals), которые при вестерн-блоттинге избирательно связывают рекомбинантный N_{term}-PTX3 и C_{term}-PTX3, соответственно (фиг. 3А).

Для картирования эпитопов PTX3, распознаваемых двумя антителами, авторы изобретения использовали преимущество способа SPOT-синтеза²³, посредством которого на целлюлозной мемbrane группировали 128 перекрывающихся, состоящих из 13 мономеров пептидов, охватывающих всю последовательность PTX3 человека. В случае воздействия на мембрану двумя моноклональными антителами при регистрации иммунокомплекса было выявлено, что mAb-MNB4 распознает эпитоп PTX3(87-99), представленный на N-концевом удлиняющем участке PTX3, тогда как mAb-16B5 распознает эпитоп PTX3(306-312), расположенный на C-концевом участке PTX3 (фиг. 3В).

При тестировании способности воздействовать на взаимодействие FGF2/PTX3 mAb-MNB4, но не mAb-16B5, препятствует способности bPTX3 связывать зафиксированный FGF2, что сходно со случаем молярного избытка свободного немеченого PTX3 (фиг. 4А). Соответственно, mAb-MNB4 устраняет способность полноразмерного PTX3 ингибировать митогенную активность, вызываемую FGF2 у эндотелиальных клеток GM7373, тогда как mAb-16B5 является неэффективным (фиг. 4В). Таким образом, mAb-MNB4, распознавающее N-концевой эпитоп PTX3(87-99), нейтрализует взаимодействие FGF2/PTX3.

Синтетические N_{term}-PTX3-родственные пептиды как антагонисты FGF2.

Для дальнейшего определения связывающего FGF2 участка в N-концевом удлиняющем участке PTX3 авторы изобретения оценивали активность синтетического пептида PTX3(82-110) как антагониста FGF2, где пептид содержит эпитоп PTX3(87-99), распознаваемый нейтрализующим mAb-MNB4 (см. выше), вместе с тремя отдельными синтетическими пептидами PTX3(31-60), PTX3(57-85) и PTX3(107-132), частично покрывающими аминокислотную последовательность N_{term}-PTX3 (фиг. 5А).

В первом наборе экспериментов четыре синтетических фрагмента PTX3 оценивали на предмет их способности взаимодействовать с FGF2 в твердофазном анализе связывания. Как представлено на фиг. 5В, свободный FGF2 связывается с PTX3(82-110), иммобилизованным на пластмассе для нетканевых культур, но не с иммобилизованным PTX3(31-60) или PTX3(57-85), проявляя лишь ограниченное взаимодействие с иммобилизованным PTX3(107-132).

Затем использовали поверхностный плазмонный резонанс для оценки способности четырех пептидов воздействовать на взаимодействие FGF2/PTX3. Результаты показывают, что FGF2 (0,8 мкМ) с высокой эффективностью связывается с PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore, (350-400 резонансных единиц, связавшихся по окончании стадии впрыскивания) (фиг. 5С, верхняя панель). Специфичность взаимодействия показывают посредством отсутствия связывания с сенсорным чипом, покрытым желатином. Кроме того, для оценки кинетических параметров взаимодействия FGF2/PTX3 на поверхность PTX3 впрыскивали FGF2 в возрастающих концентрациях (от 0,1 до 1,1 мкМ, фиг. 5С, нижняя

панель). Данные по связыванию показывают, что взаимодействие происходит с кинетической константой диссоциации ($k_{\text{дис}}$), составляющей $6 \times 10^{-5} \text{ с}^{-1}$, и кинетической константой ассоциации (k_{ac}), составляющей $0,2 \times 10^3 \text{ с}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$, тем самым приводя к величине K_d , равной $0,3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Исходя из этого, четыре синтетических пептида PTX3 оценивали на предмет их способности блокировать FGF2 в подвижной фазе, предотвращая тем самым его взаимодействие с сенсорным чипом PTX3. Как представлено на фиг. 5D, PTX3(82-110) ингибитирует связывание FGF2 с поверхностью PTX3 зависящим от дозы образом при эффективности в 30 раз ниже, чем эффективность, наблюдавшаяся для свободного полноразмерного PTX3 (ID_{50} равно 1,0 мкМ и 30 мкМ для свободного PTX3 и пептида PTX3(82-110) соответственно). В отличие от этого, в тех же самых экспериментальных условиях не наблюдали ингибирующего эффекта, вызываемого пептидами PTX3(31-60), PTX3 (57-85) и PTX3(107-132) (фиг. 5D и другие полученные данные). Кроме того, для смешанного синтетического пептида с аминокислотным составом, совпадающим с PTX3(82-110) [sPTX3(82-110), табл. 1], наблюдали ограниченный ингибирующий эффект ($ID_{50} > 3000$ мкМ) (фиг. 5D), что тем самым указывает на важность первичной аминокислотной последовательности в PTX3(82-110) для взаимодействия с FGF2.

Способность пептида PTX3(82-110) связывать FGF2 побудила авторов изобретения оценить его способность действовать в качестве антагониста FGF2. При тестировании на эндотелиальных клетках GM7373 и полноразмерный PTX3, и PTX3(82-110) ингибируют митогенную активность, вызываемую экзогенным FGF2, тогда как смешанный пептид PTX3(82-110), пептиды PTX3(31-60), PTX3(57-85) и PTX3(107-132) были неэффективны (фиг. 5E). Кривые доза-эффект подтверждают, что активность PTX3(82-110) как антагониста FGF2 являлась зависящей от дозы (ID_{50} равно 30 мкМ и 30 нМ для PTX3(82-110) и PTX3 соответственно).

Выявление минимальной линейной связывающей FGF2 последовательности в N-концевом удлиняющем участке PTX3.

Взятые вместе представленные выше данные указывают на то, что линейная последовательность аминокислот 82-110 в N-концевом удлиняющем участке PTX3 играет важную роль во взаимодействии с FGF2. При попытке выявить минимальную линейную связывающую FGF2 последовательность три перекрывающихся синтетических пептида PTX3(82-96), PTX3(82-101) и PTX3(97-110), охватывающих всю последовательность PTX3(82-110) (фиг. 6A и табл. 1), оценивали на предмет способности взаимодействовать с FGF2 в твердофазном анализе связывания. В одних и тех же экспериментальных условиях свободный FGF2 связывается с иммобилизованным PTX3(97-110), а также с родительским PTX3(82-110) и полноразмерным PTX3 при отсутствии взаимодействия с PTX3(82-96) или PTX3(82-101) (фиг. 6B). Соответственно, PTX3(97-110) связывает FGF2 в подвижной фазе, предотвращая тем самым его взаимодействие с PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore (фиг. 6C). Ингибирующая активность PTX3(97-110) была сходной с активностью, наблюдавшейся для родительского пептида PTX3(82-110), тогда как PTX3(82-96) и PTX3(82-101) были неэффективны (фиг. 6C). В соответствии с этими наблюдениями PTX3(97-110), но не PTX3(82-96) или PTX3(82-101), ингибирует митогенную активность, вызываемую FGF2 у эндотелиальных клеток GM7373 (фиг. 6D).

Для дальнейшего исследования минимальной линейной связывающей FGF2 последовательности, охватывающей пептид PTX3(97-110), авторы изобретения анализировали связывание представленных ниже более коротких пептидов с FGF2 посредством измерения их взаимодействия с PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore: PTX3(97-107), PTX3(97-104), PTX3(100-104) и PTX3(100-110) (фиг. 6E). Для пептидов PTX3(97-107) и PTX3(100-104) наблюдали значительное связывание с FGF2. В отличие от этого пептиды PTX3(97-104) и PTX3(100-110) не предотвращали связывание свободного FGF2 с PTX3, иммобилизованным на сенсорном чипе BIAcore (фиг. 6E). Таким образом, по-видимому, PTX3(100-104) представляет собой минимальную линейную связывающую FGF2 последовательность аминокислот в N-концевом удлиняющем участке PTX3. Соответственно, PTX3(100-104) ингибирует индуцируемую FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток.

Синтетические N_{term} -PTX3-родственные пептиды ингибируют ангиогенную активность FGF2.

Для оценки способности N_{term} -PTX3-родственных пептидов воздействовать на индуцируемое FGF2 образование новых сосудов *in vivo* на верхнюю поверхность CAM эмбриона цыпленка в возрасте 11 суток имплантировали желатиновые губки с адсорбированным FGF2 в отдельности или с добавкой пептидов PTX3. Как представлено на фиг. 7, альгинатные гранулы с адсорбированным FGF2 (16 пмоль/эмбрион) вызывают сильную ангиогенную реакцию при сравнении с гранулами, на которых адсорбирован носитель (число макроскопических сосудов, сходящихся по направлению к имплантату, равно 44 ± 7 и 11 ± 5 сосудов/эмбрион для двух экспериментальных групп соответственно). В соответствии с наблюдениями *in vitro* зависящими от FGF2 ангиогенная реакция *in vivo* была значительно снижена (28 ± 5 сосудов/эмбрион, $p < 0,05$ при ANOVA) в результате добавления 3,0 нмоль пептида PTX3(82-110) к имплантатам FGF2 (фиг. 7). Соответственно, 80 нмоль PTX3(97-110) вызывали 50% ингибирование ангиогенной реакции, вызываемой посредством FGF2; в отличие от этого PTX3(82-96) эффекта не оказывал.

Обсуждение.

Авторами изобретения показано, что взаимодействие с FGF2 опосредуется N-концевым удлиняю-

щим участком в PTX3. Кроме того, в экспериментах, проведенных с использованием нейтрализующих моноклональных антител и синтетических, родственных PTX3 пептидов, выявлена линейная последовательность аминокислот PTX3(97-110) как ответственная за это взаимодействие. Эти выводы основаны на следующих экспериментальных данных: i) короткие пентраксины CRP и SAP являются неэффективными связывающими FGF2 веществами¹⁷, несмотря на гомологию их последовательностей с C-концевым участком PTX3⁷; ii) ретровирусная трансдукция N-концевого фрагмента PTX3(1-178) (N_{term} -PTX3), но не sC_{term} -PTX3, ингибирует митогенную активность, вызываемую экзогенным FGF2 у эндотелиальных клеток; iii) рекомбинантный N_{term} -PTX3, но не C_{term} -PTX3, связывается с иммобилизованным FGF2 и ингибирует взаимодействие PTX3/FGF2; iv) моноклональное антитело mAb-MNBA4, посредством которого картировали линейный эпигопотенциал PTX3(87-99), предотвращает взаимодействие FGF2/PTX3 и устраниет активность PTX3 как антагониста FGF2 у эндотелиальных клеток; v) синтетический пептид PTX3(82-110) и более короткие пептиды PTX3(97-110), PTX3(97-107) и PTX3(100-104), но не другие пептиды на основе различных областей N-концевого участка PTX3, предотвращают взаимодействие FGF2/PTX3 посредством связывания FGF2, ингибируя тем самым зависящую от FGF2 пролиферацию эндотелиальных клеток *in vitro* и ангиогенез *in vivo*.

PTX3 продуцируется макрофагами²⁷, фибробластами⁹, миобластами²⁸, микроглией²⁹ и эндотелиальными клетками⁸, что указывает на то, что PTX3 может обладать паракринной и аутокринной функциями в отношении эндотелия. Сходным образом, различные стимулирующие сигналы, в том числе медиаторы воспаления IL-1 и оксид азота^{30,31}, индуцируют экспрессию FGF2 в эндотелиальных клетках, вовлеченных в аутокринную петлю стимуляции. Таким образом, эндотелиальные клетки и клетки других типов могут экспрессировать и PTX3, и FGF2. Соответственно, PTX3, продуцируемый воспалительными клетками или самими эндотелиальными клетками, может воздействовать на аутокринное и паракринное действие, оказываемое FGF2 на эндотелий *in vitro* и *in vivo*. Это должно обеспечивать точную регуляцию образования новых сосудов посредством продукции и ингибиторов стимуляторов ангиогенеза.

FGF2 представляет собой плейотропный фактор роста, стимулирующий различные типы клеток эндоцермального и мезодермального происхождения³². Соответственно, роль, которую играет FGF2 при различных патофизиологических состояниях, не ограничена его ангиогенной активностью. Например, FGF2 стимулирует миграцию и пролиферацию фибробластов в ходе заживления ран, а также гладкомышечных клеток в ходе атеросклероза^{33,34} и рестеноза³⁵. Кроме того, он способствует выживанию нейронов и пролиферации глиальных клеток в поврежденной центральной нервной системе³⁶. При всех этих состояниях сопутствующая продукция PTX3^{37,38} регулирует действие, оказываемое FGF2 на такие клетки. Действительно, PTX3 ингибирует зависящую от FGF2 активацию гладкомышечных клеток *in vitro* и утолщение интимы после повреждения артерий *in vivo*¹⁸.

В заключение, авторами изобретения впервые показано, что N-концевой участок PTX3 вовлечен во взаимодействие с FGF2. PTX3 представляет собой полифункциональный растворимый рецептор распознавания структур на пересечении врожденного иммунитета, воспаления, отложения матрикса и способности к оплодотворению у женщин. Он проявляет свою полифункциональную активность посредством взаимодействия с множеством лигандов с различными молекулярными свойствами.

Ссылки

1. Garlanda C., Bottazzi B., Bastone A., Mantovani A. Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility. *Annu Rev Immunol.* 2005; 23:337-366.
2. Steel D.M., Whitehead A.S. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 1994; 15:81-88.
3. Pepys M.B., Baltz M.L. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983; 34:141-212.
4. Du Clos T.W. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *Mol Biol Rep.* 1996; 23:253-260.
5. Gewurz H., Zhang X.H., Lint T.F. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7:54-64.
6. Nauta A.J., Daha M.R., van Kooten C., Roos A. Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins. *Trends Immunol.* 2003; 24:148-154.
7. Goodman A.R., Cardozo T., Abagyan R., Altmeier A., Wisniewski H.G., Vilcek J. Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1996; 7:191-202.
8. Breviario F., d'Aniello E.M., Golay J., Peri G., Bottazzi B., Bairoch A., Saccone S., Marzella R., Predazzi V., Rocchi M., et al. Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:22190-22197.
9. Lee G.W., Lee T.H., Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis factor- and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentraxin family of acute phase proteins. *J. Immunol.* 1993; 150:1804-1812.
10. Bottazzi B., Vuoret-Craviari V., Bastone A., De Gioia L., Matteucci C., Peri G., Spreafico F., Pausa M., D'Ettorre C., Gianazza E., Tagliabue A., Salmona M., Tedesco F., Introna M., Mantovani A. Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:32817-32823.

11. Basile A., Sica A., d'Aniello E., Breviario F., Garrido G., Castellano M., Mantovani A., Introna M. Characterization of the promoter for the human long pentraxin PTX3. Role of NF-kappaB in tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta regulation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272:8172-8178.
12. Salustri A., Garlanda C., Hirsch E., De Acetis M., Maccagno A., Bottazzi B., Doni A., Bastone A., Mantovani G., Beck Peccoz P., Salvatori G., Mahoney D.J., Day A.J., Siracusa G., Romani L., Mantovani A. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in vivo fertilization. *Development*. 2004; 131:1577-1586.
13. Garlanda C., Hirsch E., Bozza S., Salustri A., De Acetis M., Nota R., Maccagno A., Riva F., Bottazzi B., Peri G., Doni A., Vago L., Botto M., De Santis R., Carminati P., Siracusa G., Altruda F., Vecchi A., Romani L., Mantovani A. Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response. *Nature*. 2002; 420:182-186.
14. Mantovani A., Garlanda C., Bottazzi B. Pentraxin 3, a non-redundant soluble pattern recognition receptor involved in innate immunity. *Vaccine*. 2003; 21 Suppl 2:S43-47.
15. Gerwins P., Skoldenberg E., Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 2000; 34:185-194.
16. Presta M., Dell'Era P., Mitola S., Moroni E., Ronca R., Rusnati M. Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005; 16:159-178.
17. Rusnati M., Camozzi M., Moroni E., Bottazzi B., Peri G., Indraccolo S., Amadori A., Mantovani A., Presta M. Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis. *Blood*. 2004; 104:92-99.
18. Camozzi M., Zacchigna S., Rusnati M., Coltrini D., Ramirez-Correa G., Bottazzi B., Mantovani A., Giacca M., Presta M. Pentraxin 3 inhibits fibroblast growth factor 2-dependent activation of smooth muscle cells in vitro and neointima formation in vivo. *Arterioscler Thromb Vase Biol.* 2005; 25:1837-1842.
19. Isacchi A., Statuto M., Chiesa R., Bergonzoni L., Rusnati M., Sarmientos P., Ragnotti G., Presta M. A six-amino acid deletion in basic fibroblast growth factor dissociates its mitogenic activity from its plasminogen activator-inducing capacity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88:2628-2632.
20. Peri G., Introna M., Corradi D., Iacutti G., Signorini S., Avanzini F., Pizzetti F., Maggioni A.P., Moccetti T., Metra M., Cas L.D., Ghezzi P., Sipe J.D., Re G., Olivetti G., Mantovani A., Latini R. PTX3, A prototypical long pentraxin, is an early indicator of acute myocardial infarction in humans. *Circulation*. 2000; 102:636-641.
21. Grinspan J.B., Mueller S.N., Levine E.M. Bovine endothelial cells transformed in vitro by benzo(a)pyrene. *J. Cell. Physiol.* 1983; 114:328-338.
22. Presta M., Maier J.A., Rusnati M., Ragnotti G. Basic fibroblast growth factor: production, mitogenic response, and post-receptor signal transduction in cultured normal and transformed fetal bovine aortic endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 1989; 141:517-526.
23. Frank R., Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. *Methods Mol Biol.* 1996; 66:149-169.
24. Knoll A., Schmidt S., Chapman M., Wiley D., Bulgrin J., Blank J., Kirchner L. A comparison of two controlled-release delivery systems for the delivery of amiloride to control angiogenesis. *Microvasc Res.* 1999; 58:1-9.
25. Emsley J., White H.E., O'Hara B.P., Oliva G., Srinivasan N., Tickle I.J., Blundell T.L., Pepys M.B., Wood S.P. Structure of pentameric human serum amyloid P component. *Nature*. 1994; 367:338-345.
26. Eriksson A.E., Cousens L.S., Weaver L.H., Matthews B.W. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1991; 88:3441-3445.
27. Vouret-Craviari V., Matteucci C., Peri G., Poli G., Introna M., Mantovani A. Expression of a long pentraxin, PTX3, by monocytes exposed to the mycobacterial cell wall component lipoarabinomannan. *Infect Immun.* 1997; 65:1345-1350.
28. Introna M., Alles W., Castellano M., Picardi G., De Gioia L., Bottazzai B., Peri G., Breviario F., Salmona M., De Gregorio L., Dragani T.A., Srinivasan N., Blundell T.L., Hamilton T.A., Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at extrahepatic sites. *Blood*. 1996; 87:1862-1872.
29. Polentarutti N., Bottazzi B., Di Santo E., Blasi E., Agnello D., Ghezzi P., Introna M., Bartfai T., Richards G., Mantovani A. Inducible expression of the long pentraxin PTX3 in the central nervous system. *J. Neuroimmunol.*, 2000; 106:87-94.
30. Samaniego F., Markham P.D., Gendelman R., Gallo R.C., Ensoli B. Inflammatory cytokines induce endothelial cells to produce and release basic fibroblast growth factor and to promote Kaposi's sarcoma-like lesions in nude mice. *J. Immunol.* 1997; 158:1887-1894.
31. Ziche M., Parenti A., Ledda F., Dell'Era P., Granger H.J., Maggi C.A., Presta M. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res.* 1997; 80:845-852.
32. Rifkin D.B., Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J. Cell. Biol.* 1989; 109:1-6.

33. Blotnick S., Peoples G.E., Freeman M.R., Eberlein T.J., Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994; 91:2890-2894.
34. Peoples G.E., Blotnick S., Takahashi K., Freeman M.R., Klagsbrun M., Eberlein T.J. T lymphocytes that infiltrate tumors and atherosclerotic plaques produce heparin- binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor: a potential pathologic role. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995; 92:6547-6551.
35. Reidy M.A., Fingerle J., Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. Circulation. 1992; 86:11143-46.
36. Logan A., Berry M. Transforming growth factor-beta 1 and basic fibroblast growth factor in the injured CNS. Trends Pharmacol Sci. 1993; 14:337-342.
37. Ravizza T., Moneta D., Bottazzi B., Peri G., Garlanda C., Hirsch E., Richards G.J., Mantovani A., Vezzani A. Dynamic induction of the long pentraxin PTX3 in the CNS after limbic seizures: evidence for a protective role in seizure-induced neurodegeneration. Neuroscience. 2001; 105:43-53.
38. Rolph M.S., Zimmer S., Bottazzi B., Garlanda C., Mantovani A., Hansson G.K. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. Arterioscler Thromb Vase Biol. 2002/22:e10-14.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Связывающий FGF2 пептид формулы I



(I)

где X₁ представляет собой аминокислоту, выбранную из Arg и Lys;
 X₂ представляет собой аминокислоту, выбранную из Cys и Thr;
 R₁ отсутствует или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3;

R₂ отсутствует или состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4, при следующих условиях:

когда R₁ отсутствует, R₂ также отсутствует; когда R₁ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, R₂ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

когда R₁ представляет собой аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, R₂ представляет собой аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4;

или фармацевтически приемлемая соль.

2. Пептид по п.1, в котором X₁ представляет собой Arg.

3. Пептид по п.1 или 2, в котором X₂ представляет собой Cys.

4. Пептид по любому из предшествующих пунктов, состоящий из аминокислотной последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 10.

5. Слитый химерный пептид, содержащий пептид по любому из предшествующих пунктов, где слияя аминокислотная последовательность относится к отличной от PTX3 человека последовательности белка, выбранной из группы мембраносвязанных белков, внеклеточных участков мембраносвязанных белков, константных областей иммуноглобулинов, доменов мультимеризации, внеклеточных белков, белков, содержащих сигнальные пептиды, белков, содержащих сигнальные последовательности для выведения.

6. Конъюгированный химерный пептид, содержащий пептид или его функциональные производные по любому из предшествующих пунктов.

7. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая пептид по любому из предшествующих пунктов, или гибридизующаяся с указанной выше нуклеиновой кислотой, или включающая ее вырожденную последовательность.

8. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.7.

9. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п.8.

10. Клетка-хозяин по п.9, где пептид секретируется или экспрессируется на поверхности мембранных клетки.

11. Применение пептида по пп.1-6 в качестве лекарственного средства.

12. Применение по п.11, где лекарственное средство представляет собой средство против заболевания, обусловленного измененным ангиогенезом.

13. Применение по п.12, где измененный ангиогенез обусловлен измененной активацией фактора роста FGF2.

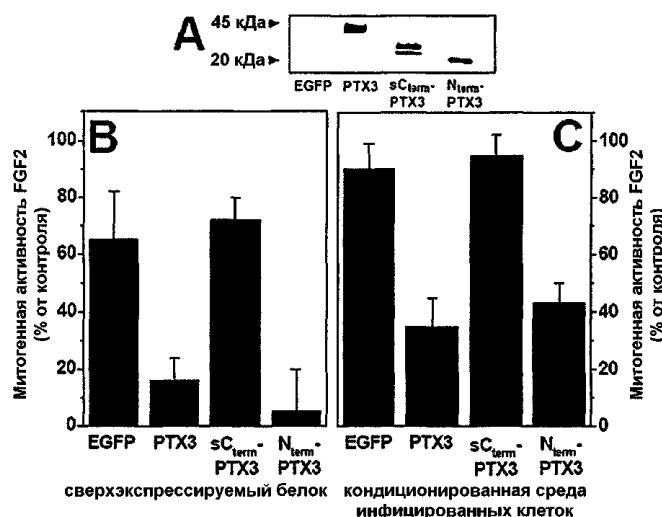
14. Применение по п.12 или 13, где заболевание выбрано из группы, состоящей из артрита, метастазирования опухоли, диабетической ретинопатии, псориаза, хронического воспаления, артериосклероза или опухоли.

15. Применение по п.14, где опухоль выбрана из группы саркомы, карциномы, карциноидной опу-

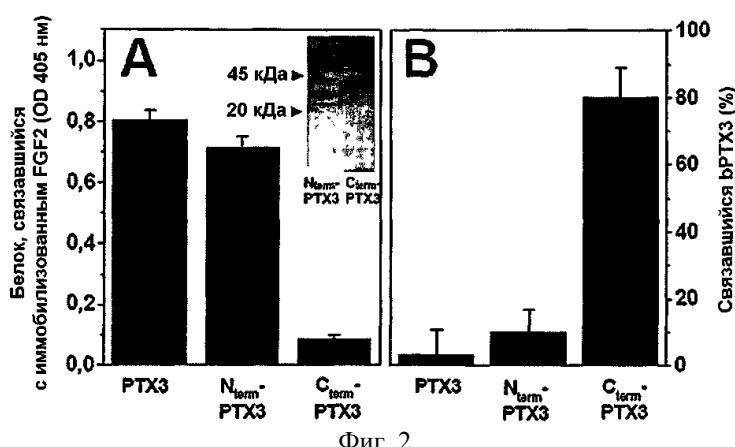
холи, опухоли костной ткани или нейроэндокринной опухоли.

16. Применение по п.11, где лекарственное средство представляет собой средство против заболевания, связанного с неконтролируемой, зависимой от FGF2 пролиферацией фибробластов или гладкомышечных клеток, рубцевания, связанного с чрезмерной реакцией фибробластов, и рестеноза после ангиопластики.

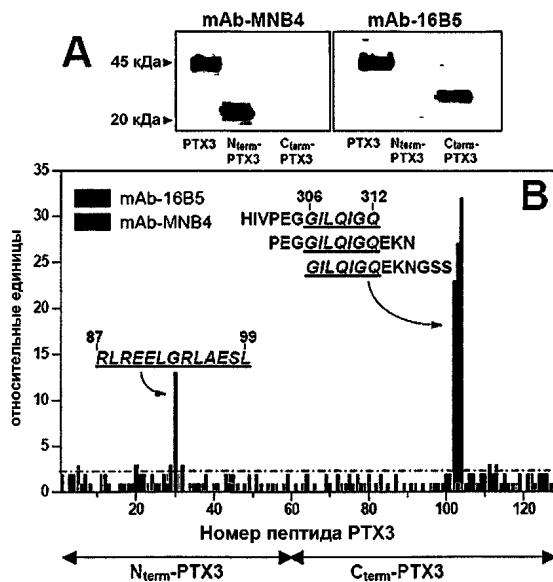
17. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество пептида по любому из пп.1-6, а также приемлемые разбавители, и/или наполнители, и/или адьюванты.



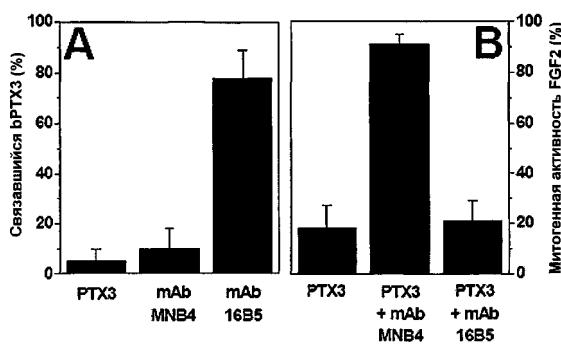
Фиг. 1



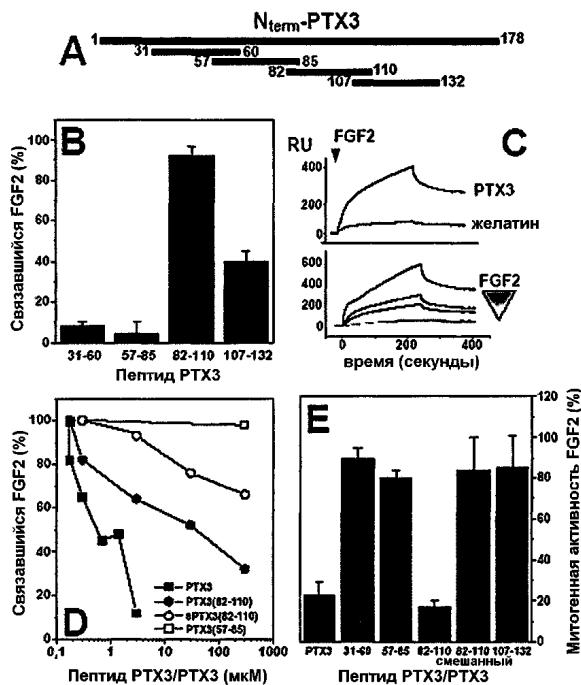
Фиг. 2



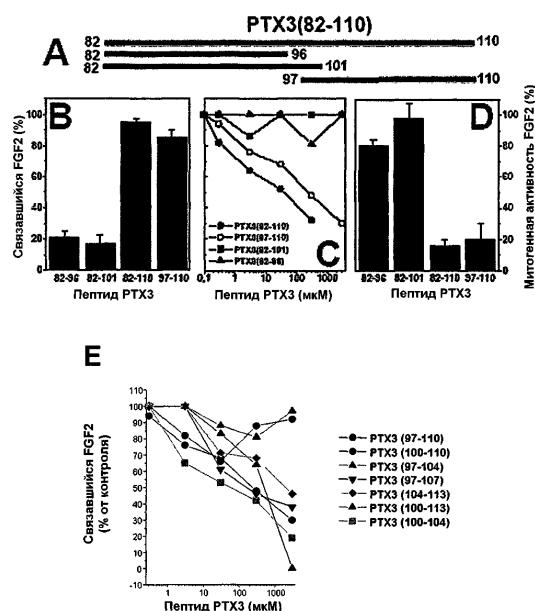
Фиг. 3



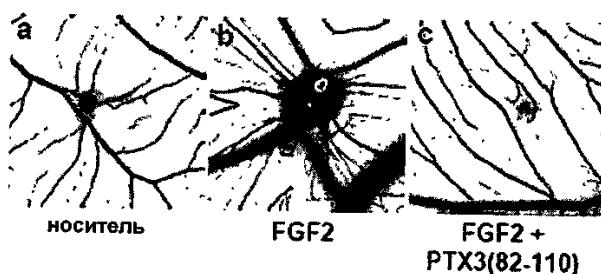
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

Список последовательностей

<110> TECNOGEN S.C.p.a.
PRESTA, Marco
CAMOZZI, Maura
RUSNATI, Marco
COLOMBO, Maurizio
MASTROIANNI, Domenico

<120> СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGF2 ПЕПТИДЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

<130> PCT 96729

<150> EP 06001457.8

<151> 2006-01-24

<160> 20

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 18

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 1

Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala Glu
1 5 10 15

Ser Leu

<210> 2

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 2

Pro Gly Ala Pro Ala Glu
1 5

<210> 3

<211> 3

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 3

Glu Ser Leu
1

<210> 4
 <211> 3
 <212> Белок
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 4

 Pro Gly Ala
 1

<210> 5
 <211> 14
 <212> Белок
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 5

 Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu
 1 5 10

<210> 6
 <211> 11
 <212> Белок
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 6

 Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala
 1 5 10

<210> 7
 <211> 5
 <212> Белок
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Синтетический пептид

 <400> 7

 Ala Arg Pro Cys Ala
 1 5

<210> 8
 <211> 30
 <212> Белок
 <213> Искусственный

 <220>
 <223> Синтетический пептид

<400> 8

Asp	Asn	Glu	Ile	Asp	Asn	Gly	Leu	His	Pro	Thr	Glu	Asp	Pro	Thr	Pro
1					5				10						15
Cys	Asp	Cys	Gly	Gln	Glu	His	Ser	Glu	Trp	Asp	Lys	Leu	Phe		
				20					25						30

<210> 9

<211> 29

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 9

Asp	Lys	Leu	Phe	Ile	Met	Leu	Glu	Asn	Ser	Gln	Met	Arg	Glu	Arg	Met
1					5				10						15
Leu	Leu	Gln	Ala	Thr	Asp	Asp	Val	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu			
				20					25						

<210> 10

<211> 29

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 10

Arg	Gly	Glu	Leu	Gln	Arg	Leu	Arg	Glu	Glu	Leu	Gly	Arg	Leu	Ala	Glu
1				5				10							15
Ser	Leu	Ala	Arg	Pro	Cys	Ala	Pro	Gly	Ala	Pro	Ala	Glu			
				20					25						

<210> 11

<211> 29

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 11

Glu	Gly	Leu	Arg	Gly	Glu	Leu	Arg	Gly	Ser	Arg	Glu	Ala	Glu	Leu	Leu
1				5				10							15
Arg	Gln	Ala	Ala	Arg	Ala	Pro	Ala	Cys	Pro	Leu	Pro	Glu			
				20					25						

<210> 12

<211> 26

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 12

Ala Pro Ala Glu Ala Arg Leu Thr Ser Ala Leu Asp Glu Leu Leu Gln
1 5 10 15

Ala Thr Arg Asp Ala Gly Arg Arg Leu Ala
20 25

<210> 13

<211> 15

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 13

Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala
1 5 10 15

<210> 14

<211> 20

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 14

Arg Gly Glu Leu Gln Arg Leu Arg Glu Glu Leu Gly Arg Leu Ala Glu
1 5 10 15

Ser Leu Ala Arg
20

<210> 15

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>

<223> Синтетический пептид

<400> 15

Glu Ser Leu Ala Arg Pro Cys Ala
1 5

<210> 16

<211> 11

<212> Белок

<213> Искусственный

<220>
<223> Синтетический пептид
<400> 16
Ala Arg Pro Cys Ala Pro Gly Ala Pro Ala Glu
1 5 10

<210> 17
<211> 24
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Праймер
<400> 17

caccggagaac tcggatgatt atga

24

<210> 18
<211> 23
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетический праймер
<400> 18

ttaacctgcc ggcaagccagc tcc

23

<210> 19
<211> 22
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетический праймер
<400> 19

cacctgtgaa acagctattt ta

22

<210> 20
<211> 21
<212> ДНК
<213> Искусственная

<220>
<223> Синтетический праймер
<400> 20

ttatgaaaca tactgagctc c

21

