



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA TUTELA DELLA PROPRIETA' INDUSTRIALE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

UIBM

DOMANDA NUMERO	102000900887247
Data Deposito	08/11/2000
Data Pubblicazione	08/05/2002

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K		

Titolo

USO DELLA PENTRAXINA LUNGA PTX3 PER LA PREPARAZIONE DI UN MEDICAMENTO PER IL TRATTAMENTO DI PATOLOGIE ASSOCIATE AD UNA ALTERATA ATTIVAZIONE DEL FATTORE DI CRESCITA FGF-2.

La presente invenzione riguarda l'uso della pentraxina lunga PTX3 (PTX3) o di un suo derivato funzionale per la preparazione di un medicamento che inibisce l'attività biologica del fattore di crescita FGF-2, detto medicamento essendo utile per la prevenzione e cura di

5 patologie causate da una alterata attivazione di detto fattore di crescita FGF-2.

Sfondo dell'invenzione

Nell'ambito delle patologie causate da un'alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2, vi è incluso un rilevante gruppo

10 causato da una alterata angiogenesi.

Il primo composto ad attività antiangiogenica venne scoperto nelle cartilagini da Henry Brem e Judath Folkman nel 1975 (J. Exp. Med. 1975 Feb. 1;141(2):427-39). Questa scoperta fece ipotizzare agli autori la possibilità di poter intervenire nel controllo di processi

15 patologici, quali lo sviluppo di un tumore e la sua metastatizzazione, l'infiammazione di articolazioni in forma acuta e cronica e la retinopatia diabetica, mediante inibitori selettivi della neovascolarizzazione patologica.

L'angiogenesi nell'adulto è normalmente quiescente, tuttavia

20 essa rappresenta una funzione normale, ad esempio nella guarigione delle ferite, o nella ricostruzione dell'endometrio durante il ciclo riproduttivo femminile.

La risposta angiogenica è fisiologicamente stimolata quando le funzioni vascolari risultano ridotte e la perfusione dei tessuti è

25 inadeguata.

Più in generale, si può affermare che l'angiogenesi, in condizioni fisiologiche, rappresenta un feedback positivo in risposta ad una insufficiente perfusione, o ad un ridotto apporto di ossigeno e nutrienti, come ad esempio nel caso dell'occlusione di una arteria, in situazioni di accrescimento della massa tissutale (ad esempio la neovascolarizzazione che accompagna la formazione di un tessuto muscolare); e nel caso di aumentato carico di lavoro in associazione con una aumentata richiesta di ossigeno e di nutrienti.

È ben noto che la crescita di un tumore primario è favorita da una buona vascolarizzazione del tessuto tumorale. Un adeguato apporto di ossigeno e di sostanze nutritive favorisce una veloce crescita del tumore stesso. È stato dimostrato che l'entità della neoangiogenesi costituisce un fattore molto sfavorevole nella prognosi di neoplasie (van Hinsbergh VW, et al.; Ann. Oncol., 10 Suppl., 4:60-3, 1999; Buolamwini J.K; Curr., Opin., Chem., Biol., 3(4):500-9, 1999 Aug.).

È altresì noto in campo neoplastico che una tappa fondamentale nella biologia della cellula tumorale è l'acquisizione della capacità di dare metastasi.

Le cellule tumorali che metastatizzano hanno la capacità di perdere aderenza alle strutture circostanti, di invadere i vasi ematici e linfatici e colonizzare altri tessuti a distanza dove continuano a riprodursi.

La metastatizzazione rappresenta un evento critico anche nella storia clinica della malattia, essendo la principale causa della morte

per cancro. Essa è strettamente associata e favorita dalla presenza, nella sede del tumore o nelle zone adiacenti, di tessuto vascolare.

Infatti, la migrazione della cellula neoplastica attraverso le strutture circostanti consente alle cellule di raggiungere i vasi ematici intratumorali, sia preesistenti, sia formatisi per neoangiogenesi, e di guadagnare il circolo ematico (Ray J.M., Stetler-Stevenson WG; Eur. Respir. J., 7(11):2062-72, 1994; Stetler-Stevenson WG, et al.; FASEB J., 7(15):1434-41, 1993 Dec.). Nel distretto vascolare tumorale la presenza di comunicazioni tra vasi linfatici ed ematici consente alle cellule neoplastiche di muoversi in entrambi i torrenti vascolari.

Recenti studi hanno evidenziato una relazione diretta tra l'angiogenesi e la patologia artritica (Koch AE; Arthritis and Rheumatism 41:951-962, 1998). In particolare, è stato dimostrato che la neo-vascularizzazione delle cartilagini articolari ha un ruolo cruciale nella formazione del *pannus* e nella progressione dell'artrite.

Una cartilagine normale non ha vasi sanguigni, mentre il fluido sinoviale di pazienti artritici contiene un fattore stimolatore dell'angiogenesi prodotto da cellule endoteliali (ESAF).

La presenza di questo fattore è associata con la vascularizzazione e la degradazione della cartilagine.

Ulteriori patologie sono legate ad una alterata angiogenesi.

È stato riscontrato che la retinopatia diabetica [Histol Histopathol 1999 Oct; 14(4):1287-94], la psoriasi [Br J. Dermatol 1999 Dec; 141(6):1054-60], la infiammazione cronica e la

arteriosclerosi [Planta Med 1998 Dec; 64(8):686-95] hanno come causa favorente la neovascolarizzazione dei tessuti affetti.

Il fattore di crescita FGF-2 è un polipeptide cationico di 18 kDa in grado di indurre angiogenesi *in vivo* e di stimolare proliferazione, chemiotassi e produzione di proteasi in cellule endoteliali in coltura (Basilico e Moscatelli, 1992, Adv. Cancer Res. 59:115-65). Per determinare questi effetti l'FGF-2 interagisce con due diverse classi di recettori presenti sulla superficie delle cellule endoteliali: i recettori ad alta affinità dotati di attività tirosino-chinasica (FGFRs) e i recettori a bassa affinità rappresentati dai proteoglicani eparan solfati (HSPGs) (Johnson e Williams, 1993, Adv. Cancer Res. 60:1-41; Moscatelli, 1987, J. Cell. Physiol. 131:123-30).

L'FGF-2 è coinvolto sia in processi fisiologici come ad esempio il riparo delle ferite, che in processi patologici.

Nei processi di crescita delle cellule muscolari lisce il basic fibroblast growth factor (FGF-2) svolge un ruolo importante, infatti, esso induce la proliferazione delle cellule muscolari lisce, responsabili dell'iperplasia della parete muscolare del vaso danneggiato (Hanna et al., 1997, J. Vasc. Surg. 25:320-5).

È noto il ruolo dell'FGF-2 nella angiogenesi tumorale (Pathol Biol (Paris) 1999 Apr; 47(4):364-7).

In J. Pathol 1999 Sept; 189(1):72-8 viene riportato che una alta espressione di FGF-2, in pazienti affetti da mesotelioma, è correlata ad una maggiore aggressività e una maggiore mortalità nei pazienti affetti da tale patologia tumorale.

In Oncogene 1999 Nov 18;18(48):6719-24 viene riportato che l'FGF-2 conferisce proprietà metastatiche a cellule di carcinoma della vescica di ratto.

Int J. Cancer 1999 May 5;81(3):451-8 riporta che l'FGF-2 ha una potente attività mitogenica e angiogenica, ed è implicato nello sviluppo di tumori umani e nell'aumento della loro malignità.

Per quanto riguarda la cura di patologie di tipo tumorale, la terapia antiangiogenica presenta i seguenti vantaggi rispetto alla chemioterapia standard tradizionale (Cancer Research 1998, 58, 1408-16):

- 1) maggiore specificità: ha come bersaglio il processo di neovascolarizzazione del tumore;
- 2) maggiore biodisponibilità: ha come bersaglio le cellule endoteliali, facilmente raggiungibili senza i problemi della chemioterapia tradizionale che agisce direttamente sulle cellule tumorali;
- 3) minore chemioresistenza: questo è forse il più importante vantaggio di questa terapia; infatti, essendo le cellule endoteliali, a differenza di quelle tumorali, geneticamente stabili, difficilmente si registrano fenomeni di resistenza al farmaco;
- 4) minore metastatizzazione: il blocco della neovascolarizzazione limita la propagazione delle cellule tumorali in altre parti del corpo mediante il torrente circolatorio;
- 5) favorisce l'apoptosi: il blocco della rete vascolare nel tumore fa diminuire l'apporto di ossigeno e di sostanze nutrienti alle cellule tumorali, in queste condizioni si favorisce l'apoptosi;

6) riduzione della tossicità sistemica: effetti tossici, quali mielosoppressione, effetti gastrointestinali e temporanea perdita dei capelli, quasi sempre presenti con la chemioterapia tradizionale, non si osservano con una terapia antiangiogenica:

5 Inoltre, numerosi studi hanno dimostrato che la neoangiogenesi patologica gioca un importante ruolo nella arteriosclerosi, nella patogenesi dell'ipertensione e nella restenosi dopo angioplastica o "coronary stenting" [Ann Torac Surg 1995 Apr;59(4):948-54; J. Vasc Surg 1997 Feb;25(2):320-5].

10 Il controllo della neovascolarizzazione rappresenta quindi uno degli elementi fondamentali per il controllo e la cura di patologie associate ad una alterata angiogenesi.

15 L'avere a disposizione nuovi presidi terapeutici capaci di inibire in modo specifico l'attività biologica dell'FGF-2 è un obiettivo di primaria importanza per la prevenzione e cura di patologie causate da una alterata attivazione di questo fattore di crescita. Tali patologie includono la patologia artritica, i tumori, la retinopatia diabetica, la psoriasi, l'infiammazione cronica, l'arteriosclerosi, la cicatrizzazione associata ad eccessiva risposta fibroblastica e la
20 restenosi dopo angioplastica.

25 La PTX3 è una proteina che viene espressa in vari tipi cellulari (Bottazzi et Al., J., Biol Chem 1997; 272: 32817-32823) particolarmente in fagociti mononucleari e cellule endoteliali, dopo esposizione alle citochine infiammatorie Interleuchina 1beta (IL-1beta) e Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-alfa).

Fino ad oggi non è stata ancora compresa la funzione biologica della PTX3.

Questa proteina è costituita da due domini strutturali, uno N-terminale non correlato ad alcuna molecola nota, e uno C-terminale simile alle pentraxine corte quali la proteina C-reattiva (CRP). E' stata riscontrata una elevata somiglianza tra la PTX3 umana (hPTX3) e le PTX3 animali.

Il gene della PTX3 è localizzato nel cromosoma 3 del topo, in una regione analoga alla regione 3q umana (q24-28), in accordo con la documentata localizzazione della hPTX3 nella regione 3q 25. Inoltre, la PTX3 di topo (mPTX3) (Introna M., et al.: Blood 87 (1996) 1862-1872) è molto simile alla hPTX3 in base alla organizzazione, localizzazione e sequenza (Breviario F., Et al. J. Biol. chem. 267:22190, 1992).

In particolare, il grado di identità fra le sequenze è dell'82% tra il gene umano e quello di topo, e raggiunge il 92% se vengono considerate le sostituzioni conservative.

L'alto grado di somiglianza fra la sequenza della hPTX3 e quella della mPTX3 è un segno dell'alto grado di conservazione della pentraxina durante l'evoluzione (Pepys MB, Baltz ML: Adv. Immunol: 34:141, 1983).

Per una rassegna sulle pentraxine, si veda H. Gewurz et al, Current Opinion in Immunology, 1995, 7:54-64.

La domanda di brevetto internazionale WO99/32516, depositata a nome della richiedente, descrive l'uso della pentraxina

lunga PTX3 per la terapia di patologie di tipo infettivo, infiammatorio o tumorale. L'attività antitumorale esercitata dalla PTX 3, descritta in WO99/32516, è mediata dal reclutamento leucocitario, cioè su base immunologica.

5 In WO99/32516 non viene descritto o suggerito l'uso della PTX3 come agente utile per il trattamento di patologie associate ad una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2.

Il brevetto US 5767252 descrive un fattore di crescita delle cellule neuronali appartenente alla famiglia delle pentraxine (si veda
10 anche la letteratura ivi citata). Questo brevetto si riferisce al settore della neurobiologia.

Riassunto dell'invenzione

E' stato ora sorprendentemente trovato che la pentraxina lunga PTX3 è in grado di legare l'FGF-2 con elevata affinità e specificità. Il
15 legame della PTX3 all'FGF-2 ($K_d = 8-16$ nM) impedisce il legame di quest'ultimo ai suoi recettori tirosino-chinasici ad alta affinità, ed ai siti di legame a bassa affinità, rappresentati dagli eparan-solfati proteoglicani presenti sulla superficie delle cellule. L'inibizione del legame determina una inibizione dell'attività biologica della FGF-2.

20 L'interazione FGF-2/PTX3 dipende da una corretta struttura conformazionale del fattore di crescita e non semplicemente dalla sua natura basica, poiché la PTX3 non lega il citocromo C (una proteina che condivide con l'FGF-2 peso molecolare (18 kDa) e punto isoelettrico (pH 9,6)).

Inoltre, la proteina C-reattiva, omologa alla PTX3, non lega l'FGF-2.

È pertanto oggetto della presente invenzione l'uso della pentraxina lunga PTX3 o di un derivato della PTX3 o dei suoi domini, per la preparazione di un medicamento per la prevenzione e cura di patologie causate da una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2.

Descrizione dettagliata dell'invenzione

Per «pentraxina lunga PTX3» si intende una qualsiasi pentraxina lunga PTX3, indipendentemente cioè dalla sua origine naturale (umana o animale) oppure sintetica.

Per derivato si intende qualsiasi analogo funzionale della pentraxina lunga PTX3 come definita sopra che rechi almeno una mutazione, conservando la capacità funzionale di inibizione selettiva dell'FGF-2.

Come pentraxina lunga PTX3, è preferita quella umana, la cui sequenza è descritta in WO99/32516.

Le patologie legate ad una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2 come precedentemente citato sono: la patologia artritica, i tumori, la retinopatia diabetica, la psoriasi, l'infiammazione cronica, l'arteriosclerosi, la cicatrizzazione associata ad eccessiva risposta fibroblastica, e la restenosi dopo angioplastica.

È ulteriore oggetto della presente invenzione l'uso del cDNA full length di PTX3 umana clonato in un idoneo vettore di espressione plasmidico o virale, in protocolli di terapia genica per la prevenzione

e cura di patologie causate da una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2.

Il composto secondo l'invenzione si presta ad essere utilizzato per inibire l'attività dell'FGF2 in cellule endoteliali non solo quando
5 viene somministrato come proteina ricombinante, ma anche quando esso viene espresso endogenamente in seguito a trasferimento genico del suo cDNA.

È noto che i protocolli terapeutici per la cura di patologie di tipo tumorale prevedono l'uso della associazione di più
10 chemioterapici o di chemioterapici in associazione con farmaci antiangiogenici, in modo da ridurre gli effetti collaterali a parità di efficacia terapeutica. La pentraxina lunga PTX3, in accordo con la presente invenzione, si pone come efficace presidio terapeutico da utilizzare in associazione con farmaci antitumorali per la cura di tali
15 patologie.

Il meccanismo di azione dei più comuni antitumorali noti è completamente diverso dal meccanismo d'azione del composto secondo l'invenzione, infatti, essi agiscono prevalentemente come composti citotossici nei riguardi delle cellule tumorali.

20 Il composto secondo l'invenzione agendo con un meccanismo d'azione diverso, esercita un effetto curativo proprio (effetto coadiuvante) che si somma a quello degli antitumorali a cui viene associato.

È pertanto ulteriore oggetto della presente invenzione la
25 associazione tra la pentraxina lunga PTX3 e uno o più composti ad

attività antitumorale scelti nel gruppo consistente di: inibitori delle topoisomerasi, agenti alchilanti, anti tubulinici, antimetaboliti, intercalanti, o altri composti ad attività antitumorale utilizzati in terapia, per il trattamento di tali patologie, caratterizzata dal fatto
5 che la PTX3 è presente come coadiuvante del composto ad attività antitumorale.

Per quanto riguarda gli aspetti attinenti la applicabilità industriale, la associazione tra PTX3 e composto antitumorale sarà sotto forma di composizione farmaceutica o kit. La composizione
10 farmaceutica potrà comprendere la associazione secondo la presente invenzione in una unica forma e/o unità di dosaggio, ovvero in forme di dosaggio separate. In quest'ultimo caso, la associazione secondo la presente invenzione potrà convenientemente essere formulata sotto forma di kit, ossia in contenitori separati comprendenti la
15 PTX3, eventualmente in miscela con almeno un eccipiente o veicolo farmaceuticamente accettabile, e il composto antitumorale, rispettivamente, quest'ultimo a sua volta opportunamente formulato agli scopi di somministrazione in un soggetto bisognoso del trattamento antitumorale.

20 La associazione secondo la presente invenzione potrà anche essere sotto forma di un articolo di fabbricazione, ad esempio una composizione farmaceutica o un kit come descritto sopra, comprendente elementi di istruzioni per l'uso della associazione, quali foglietti illustrativi o altri mezzi di informazione per l'attuazione
25 della presente invenzione. Ad esempio, saranno presentate

informazioni per l'uso coordinato della associazione, dove per uso coordinato dei composti anzidetti si intende indifferentemente sia la co-somministrazione, cioè la somministrazione sostanzialmente simultanea o sequenziale della PTX3 e di almeno un antitumorale, 5 che la somministrazione di una composizione comprendente in associazione e in miscela i predetti principi attivi, oltre ad eventuali eccipienti.

Le istruzioni per l'uso coordinato riguarderanno la posologia e lo schema di somministrazione, relativamente alla distribuzione dei 10 dosaggi nel tempo e le loro entità. La presente invenzione rimane comunque sufficientemente descritta nella misura in cui il dosaggio e la posologia saranno determinati dal medico curante in funzione del tipo di patologia da trattare e le condizioni del paziente.

Esempi di composizioni farmaceutiche sono riportati in WO 15 99/32516 e riferimenti ivi citati.

Vengono di seguito riportati alcuni dati sperimentali che illustrano ulteriormente l'invenzione.

ESEMPIO 1

Capacità di PTX3 di legare FGF-2 in soluzione

20 Questo esperimento è stato effettuato per verificare e valutare la capacità della PTX3 di legare l'FGF-2. La PTX3 venne prodotta con il metodo descritto da Bottazzi et al., 1997, J. Biol. Chem. 272:32817-32823. L'FGF-2 umano ricombinante venne prodotto con il metodo descritto da Isacchi A. et al. su Proc. Natl. Acad. Sci. 25 U.S.A. (1991), 88, 2628-32. L'FGF-2 venne marcato, quando

necessario, con ^{125}I utilizzando il metodo descritto da Isacchi et al., sopra citato.

Procedura sperimentale:

100 μl di PBS contenenti 1 μg di FGF-2 (oppure 100 μl di PBS
5 contenenti 1 μg di PTX3) vennero caricati su una colonna per
cromatografia ad esclusione di peso molecolare (Superose 12,
Pharmacia) che consente di separare le proteine in base al loro peso
molecolare. La colonna venne eluita con PBS ad una velocità di
flusso di 1 ml/minuto, vennero raccolte frazioni da 1 ml che furono
10 analizzate mediante analisi dot blot, con anticorpi specifici per le
due proteine. Per valutare la capacità di PTX3 di legare FGF-2, le
due proteine (5 μg ed 1 μg , rispettivamente) vennero miscelate in 100
 μl di PBS ed incubate a 4° C per 10 minuti prima di essere caricate
in colonna. L'eluizione venne effettuata come descritto
15 precedentemente e le frazioni raccolte vennero analizzate mediante
dot-blot con anticorpi specifici anti-FGF-2. I risultati ottenuti,
riportati in Figura 1, mostrano che l'FGF-2 (18.000 D) venne
trattenuto in colonna con un tempo di ritenzione pari ad un volume
di circa 22 ml. Nelle stesse condizioni sperimentali PTX3 (450.000 D)
20 venne trattenuto in colonna con un tempo di ritenzione pari ad un
volume di circa 7 ml. Quando in colonna venne caricata la miscela
FGF-2 + PTX3, la quale era stata preincubata a 4°C per 10 minuti, si
osservò un anticipo nell'uscita dell'FGF-2, la quale venne eluita
insieme alla PTX3, con un tempo di ritenzione pari a quello della
25 PTX3 da sola. Ulteriori analisi sugli eluati, in frazioni corrispondenti

a volumi di ritenzione maggiori, non rilevarono la presenza dell'FGF-2.

ESEMPIO 2

Capacità della PTX3 biotinilata di legare FGF-2 immobilizzato alla
5 plastica

100 µl di NaHCO₃ pH 9,6 contenenti 0,5 µg di FGF-2 oppure 0,5 µg di C1q (frazione del complemento C1q), vennero incubati per 18 ore a 4 °C in piastre di plastica da 96 pozzetti. Al termine dell'incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con PBS e quindi
10 incubati ulteriormente per 2 ore a temperatura ambiente con 200 µl di PBS contenente 1 mg/ml di BSA. Al termine di questa seconda incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con PBS. I pozzetti così preparati vennero quindi incubati per 2 ore a temperatura ambiente con 30 ng/ml di ¹²⁵I-FGF-2 e dosi crescenti di PTX3 biotinilata in
15 100 µl di PBS. Alternativamente, i pozzetti vennero adsorbiti con dosi crescenti di FGF-2 o di C1q ed incubati con PTX3 biotinilata alla dose fissa di 100 ng/pozzetto in 100 µl di PBS. Al termine di questa ulteriore incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con PBS e quindi la quantità di PTX3 biotinilata legata ai pozzetti nelle
20 diverse condizioni sperimentali venne valutata mediante aggiunta di streptavidina perossidata (diluizione 1:2000 in 100 µl di PBS/pozzetto) e la rilevazione venne effettuata mediante kit ABTS microwell peroxidase substrate system (2-C) (Kirkegaard & Perry Laboratories) e la lettura venne effettuata mediante Titertek a 405
25 nm. I risultati ottenuti riportati in Figura 2 mostrano che l'FGF-2

immobilizzato alla plastica è in grado di legare la PTX3 biotinilata in modo simile al ligando "fisiologico" della PTX3, il C1q (Bottazzi et al., 1997 J. Biol. Chem. 272:32817-32823).

ESEMPIO 3

5 Caratterizzazione dell'interazione PTX3/FGF-2

100 µl di NaHCO₃ pH 9,6 contenenti PTX3 o proteina C reattiva (200 nM) oppure contenenti 2 µg/ml di albumina serica bovina, fibronectina, gelatina, o laminina, usate come controlli negativi, vennero incubati per 18 ore a 4 °C in piastre di plastica da 96
10 pozzetti. Al termine dell'incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con PBS e quindi incubati ulteriormente per 2 ore a temperatura ambiente con 200 µl di PBS contenente 1 mg/ml di BSA. Al termine di questa seconda incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con
15 PBS. I pozzetti così preparati vennero quindi incubati per 2 ore a temperatura ambiente con 30 ng/ml di ¹²⁵I-FGF-2. Al termine di questa ulteriore incubazione i pozzetti vennero lavati 3 volte con PBS. Lo ¹²⁵I-FGF-2 legato ai pozzetti venne recuperato mediante due lavaggi con 200 µl di SDS 2% in acqua e misurato mediante contatore-γ. I risultati ottenuti riportati in Figura 3 mostrano che
20 l'FGF-2 lega la PTX3 immobilizzata alla plastica, tale legame è specifico in quanto l'FGF-2 non interagisce con altre proteine differenti e lega in modo limitato PCR.

ESEMPIO 4**Capacità dello ^{125}I -FGF-2 di legare PTX3 immobilizzata alla plastica in presenza di un eccesso di FGF-2 non marcato**

In una seconda serie di esperimenti lo ^{125}I -FGF-2 venne testato per valutare la sua capacità di legare PTX3 immobilizzata alla plastica in presenza di un eccesso di FGF-2 non marcato nativo o denaturato al calore (entrambi a 100 nM), in presenza di un'identica concentrazione di citocromo C oppure in presenza di un eccesso di PTX3 solubile (300 nM). L'esperimento venne quindi effettuato con le modalità descritte precedentemente. I risultati ottenuti riportati in Figura 4 mostrano che l'FGF-2 non marcato e PTX3 solubile inibiscono l'interazione tra ^{125}I -FGF-2 e PTX3 immobilizzata alla plastica. Il fatto che l'FGF-2 denaturato al calore e il citocromo C (che condivide con FGF-2 peso molecolare e punto isoelettrico) non siano in grado di legare PTX3 indicano inoltre che una corretta struttura tridimensionale del fattore di crescita piuttosto che la sua natura basica sono coinvolte nella sua capacità di legare PTX3 .

ESEMPIO 5**Costante di dissociazione (K_d) dell'interazione FGF-2/PTX3**

In questo esperimento è stata determinata la costante di dissociazione (K_d) dell'interazione FGF-2/PTX3. A tale scopo dosi crescenti di ^{125}I -FGF-2 vennero incubate con PTX3 immobilizzata alla plastica ed i dati di legame vennero analizzati mediante Scatchard plot. I risultati ottenuti e riportati in Figura 5 mostrano che l'FGF-2 lega PTX3 in modo saturabile e con elevata affinità ($K_d = 8-16$ nM).

Tale affinità è sovrapponibile a quella già calcolata per il legame di PTX3 con il suo ligando fisiologico C1q.

ESEMPIO 6

Effetto di PTX3 sul legame di FGF-2 alle cellule endoteliali.

5 Cellule endoteliali trasformate fetali aortiche bovine GM 7373
vennero seminate alla densità di 80.000/cm² in piastre da 24
pozzetti in terreno MEM Eagle contenente 10% siero fetale bovino
(FCS) e vennero incubate per 24 ore a 37 °C. Al termine
dell'incubazione le cellule adese ai pozzetti vennero lavate due volte
10 con MEM-Eagle senza FCS e quindi incubate per 2 ore a 4 °C in
MEM-Eagle contenente gelatina allo 0,15% e 20 mM HEPES pH 7,5
in presenza di ¹²⁵I-FGF-2 (10 ng/ml). Al termine dell'incubazione la
radioattività associata ai recettori ad alta affinità (FGFR) ed a bassa
affinità (HSPGs) venne valutata come descritto da Moscatelli, 1987
15 J. Cell. Physiol. 131:123-30. Brevemente, la radioattività associata
agli HSPGs venne rimossa mediante due lavaggi del monostrato
cellulare con tampone HEPES 20 mM pH 7,5 contenente NaCl 2M,
mentre la radioattività associata agli FGFRs venne successivamente
recuperata mediante due lavaggi con tampone sodio acetato 20 mM
20 pH 4,5 contenente NaCl 2M. Il legame aspecifico venne determinato
incubando le cellule con ¹²⁵I-FGF-2 come precedentemente descritto
in presenza di un eccesso di 1µg/ml di FGF-2 non marcato. I
risultati ottenuti riportati in Figura 6 mostrano che la PTX3 inibisce
in modo dose-dipendente il legame di FGF-2 ai suoi recettori ad alta
25 ed a bassa affinità presenti sulla superficie delle cellule endoteliali.

ESEMPIO 7Effetto di PTX3 sull'attività mitogenica di FGF-2 in cellule endoteliali

Cellule GM 7373 vennero seminate alla concentrazione di 75.000/cm² in piastre da 48 pozzetti in terreno MEM Eagle contenente 10% siero fetale bovino (FCS) e vennero così incubate per 24 ore a 37 °C. Al termine dell'incubazione le cellule adese ai pozzetti vennero lavate due volte con MEM-Eagle senza FCS e quindi incubate per ulteriori 24 ore a 37 °C in MEM-Eagle contenente 0,4% FCS in assenza o in presenza di FGF-2 (10 ng/ml) e di dosi crescenti di PTX3. Al termine dell'incubazione le cellule vennero staccate con tripsina e contate mediante camera di Burker. In un'altra serie di esperimenti le cellule GM 7373 vennero trattate esattamente come descritto precedentemente con diversi stimoli mitogeni (10% FCS, 5 µg/ml diacil glicerolo (DAG), 10 ng/ml estere del forbolo (TPA), 30 ng/ml epidermal growth factor (EGF) oppure 30 ng/ml vascular endothelial growth factor (VEGF). I risultati ottenuti riportati in Figura 7 mostrano che la PTX3 inibisce l'attività mitogena esercitata da FGF-2 in cellule endoteliali in coltura in modo dose-dipendente con una ID₅₀ uguale a 30 nM. Tale valore è simile alla K_d calcolata per legame FGF-2-PTX3. Ciò suggerisce che il meccanismo tramite cui PTX3 inibisce l'attività biologica di FGF-2 è sequestrandolo in sede extracellulare ed impedendone di conseguenza l'interazione con la cellula bersaglio. L'attività inibitoria di PTX3 è specifica per FGF-2 in quanto non si esercita sulla proliferazione cellulare indotta da altri stimoli mitogeni.

ESEMPIO 8**Effetto di PTX3 sulla proliferazione di cellule endoteliali aortiche murine trasfettate**

In questo esperimento è stato valutato l'effetto di PTX3 sulla proliferazione di cellule endoteliali aortiche murine MAE3F2T stabilmente trasfettate con un plasmide codificante per FGF-2 (Gualandris et al., 1996, Cell Growth Differ. 7:147-60). Tali cellule proliferano in risposta ad un "loop" autocrino di stimolazione imposto dall'FGF-2 prodotto endogenamente (Gualandris et al., 1996, Cell Growth Differ. 7:147-60). Le cellule MAE3F2T vennero seminate alla concentrazione di 10.000/cm² in piastre da 48 pozzetti in terreno Dulbecco contenente 10% FCS ed incubate per 24 ore a 37°C. Al termine dell'incubazione le cellule adese ai pozzetti vennero lavate due volte con Dulbecco senza FCS e quindi incubate per ulteriori 72 ore a 37 °C in Dulbecco contenente 0,4% FCS in assenza od in presenza di PTX3 (70 nM), di anticorpi specifici anti-FGF-2 o di suramina (50 µg/ml). La suramina è un composto noto per la sua capacità di sequestrare FGF-2 in sede extracellulare inibendone le attività biologiche (Rusnati et al., 1996, Mol. Biol. Cell 7:369-381). Al termine dell'incubazione le cellule vennero staccate con tripsina e contate mediante camera di Burker. I risultati ottenuti e riportati in Figura 8 mostrano che la PTX3 è in grado di interrompere il "loop" autocrino di stimolazione indotto da FGF-2 in cellule MAE3F2B, inibendo la loro proliferazione FGF-2 dipendente, in maniera simile a quella esercitata da anticorpi anti-FGF-2 e suramina.

ESEMPIO 9Terapia genica con PTX3

Cellule endoteliali murine overesprimenti FGF2, denominate pZipFGF2 MAE (Cell Growth & Differ 1996; 7: 147-160) vennero
5 tranfettate con metodi noti (Cell Growth & Differ 1996; 7: 147-160)
con il cDNA full length di PTX3 umana clonato nel vettore di
espressione virale commerciale pLXSH (Clontech).

Le cellule vennero testate in vitro per verificare che
l'espressione di PTX3 era in grado di inibire la loro attività
10 proliferativa, la loro capacità di invadere gel tridimensionali di
fibrina e la loro capacità di formare cordoni endoteliali quando
seminate su Matrigel (J. Pathol. 1999, 189, 590-599).

Inoltre, le cellule vennero testate per verificare che
l'espressione di PTX3 era in grado di inibire sia la loro attività
15 angiogenetica quando applicate sulla membrana corioallantoidea di
embrione di pollo (J. Vasc. Res. 1997, 34, 455-463) che la loro
capacità di formare tumori vascolari quando iniettate in topi nudi
(Angiogenesis 1997, 1, 102-116).

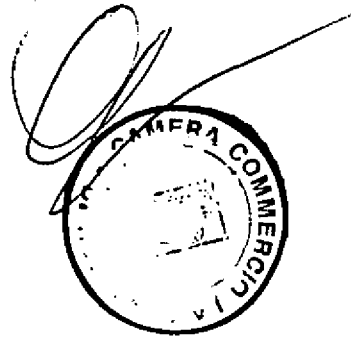
I risultati ottenuti confermano che la PTX3 è capace di inibire
20 l'attività di FGF2 in cellule endoteliali non solo quando viene
somministrata come proteina ricombinante, ma anche quando essa
viene espressa endogenamente in seguito a trasferimento genico del
suo cDNA.

Il composto secondo l'invenzione si presta ad essere utilizzato
25 in protocolli di terapia genica, in vivo, utilizzando metodi noti [In

Vivo. 1998 Jan-Feb;12(1):59-67; In Vivo. 1998 Jan-Feb;12(1):35-41;
In Vivo. 1994 Nov-Dec;8(5):771-80], per il trattamento di patologie
causate da una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2.

-7 NOV. 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke at the end.

RIVENDICAZIONI

1. Uso della pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato per la preparazione di un medicamento per la prevenzione e cura di patologie che rispondono all'inibizione dell'attività biologica del
5 fattore di crescita FGF-2.
2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui dette patologie derivano da una alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2.
3. Uso secondo la rivendicazione 2, in cui detta alterata attivazione del fattore di crescita FGF-2 comporta una alterata angiogenesi.
- 10 4. Uso secondo la rivendicazione 3, in cui la patologia causata da una alterata angiogenesi è scelta nel gruppo consistente di: patologia artritica, tumori, retinopatia diabetica, psoriasi, infiammazione cronica, arteriosclerosi, cicatrizzazione associata ad eccessiva risposta fibroblastica e restenosi dopo
15 angioplastica.
5. Uso secondo la rivendicazione 3, per la prevenzione o cura dei tumori.
6. Uso secondo la rivendicazione 3, per la prevenzione dell'insorgenza di metastasi tumorali.
- 20 7. Uso secondo la rivendicazione 3, per la prevenzione di cicatrizzazione associata ad eccessiva risposta fibroblastica.
8. Uso secondo la rivendicazione 3, per la prevenzione dell'insorgenza della restenosi dopo angioplastica.
9. Uso secondo una delle rivendicazioni precedenti, in cui la
25 pentraxina lunga PTX3 è la PTX3 presente in natura.

10. Uso secondo la rivendicazione 9, in cui la pentraxina lunga PTX3 è la PTX3 umana.
11. Uso secondo la rivendicazione 1-8, in cui la pentraxina lunga PTX3 è la PTX3 di origine sintetica.
- 5 12. Uso del cDNA che codifica per la pentraxina lunga PTX3 o un suo derivato o un suo dominio, per preparare dei vettori di espressione comprendenti tale cDNA da utilizzare in terapia genica, per il trattamento di patologie che rispondono all'inibizione dell'attività biologica del fattore di crescita FGF-2.
- 10 13. Uso secondo la rivendicazione 12, in cui detto cDNA contenente il gene codificante per la PTX3 o un suo derivato è veicolabile mediante vettore plasmidico o vettore virale.
14. Uso secondo la rivendicazione 12 o 13, per la prevenzione o cura dei tumori.
- 15 15. Uso secondo la rivendicazione 12 o 13, per la prevenzione dell'insorgenza di metastasi tumorali.
16. Uso secondo la rivendicazione 12 o 13, per la prevenzione di cicatrizzazione associata ad eccessiva risposta fibroblastica.
17. Uso secondo la rivendicazione 12 o 13, per la prevenzione
20 dell'insorgenza della restenosi dopo angioplastica.
18. Associazione che consiste di pentraxina lunga PTX3 e un composto ad attività antitumorale.
19. Associazione della rivendicazione 18, in cui il composto ad attività antitumorale è scelto nel gruppo consistente di: inibitori

delle topoisomerasi, agenti alchilanti, anti tubulinici, antimetaboliti, o intercalanti.

20. Composizione farmaceutica comprendente l'associazione della rivendicazione 18 o 19.
- 5 21. Uso della associazione della rivendicazione 18 o 19, per la preparazione di un medicamento per il trattamento di patologie di tipo tumorale, caratterizzato dal fatto che la pentraxina lunga PTX3 è presente come coadiuvante del composto ad attività antitumorale.
- 10 22. Associazione della rivendicazione 18 o 19 sotto forma di kit.
23. Kit comprendente una confezione di contenitori formata da un primo contenitore comprendente una quantità terapeuticamente efficace di pentraxina lunga, eventualmente in miscela con almeno un veicolo e/o eccipiente farmaceuticamente accettabile
- 15 e un secondo contenitore comprendente una quantità terapeuticamente efficace di un composto ad attività antitumorale eventualmente in miscela con almeno un veicolo e/o eccipiente farmaceuticamente accettabile.
24. Kit secondo la rivendicazione 23, dove detta pentraxina lunga è
- 20 presente in una quantità tale da svolgere un'azione coadiuvante con l'attività del composto antitumorale.
25. Kit secondo una delle rivendicazioni 23 e/o 24 comprendente informazioni atte all'uso coordinato di detta pentraxina e detto composto ad attività antitumorale.



-7 NOV. 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

Figura 1

RM2000 A 0005781

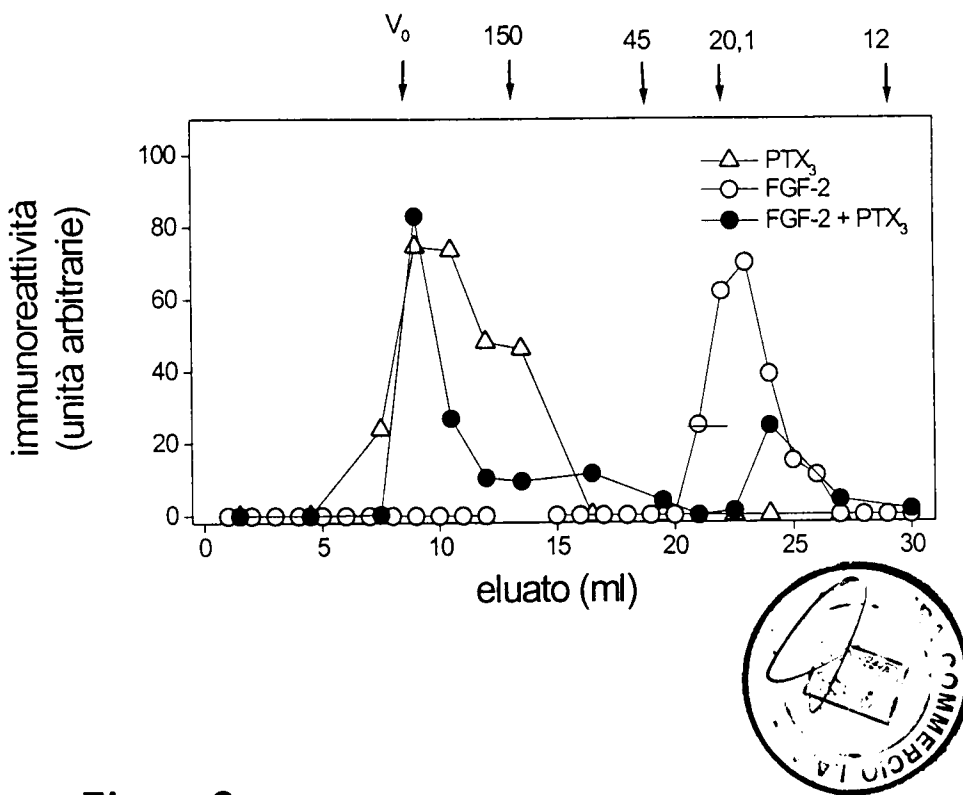
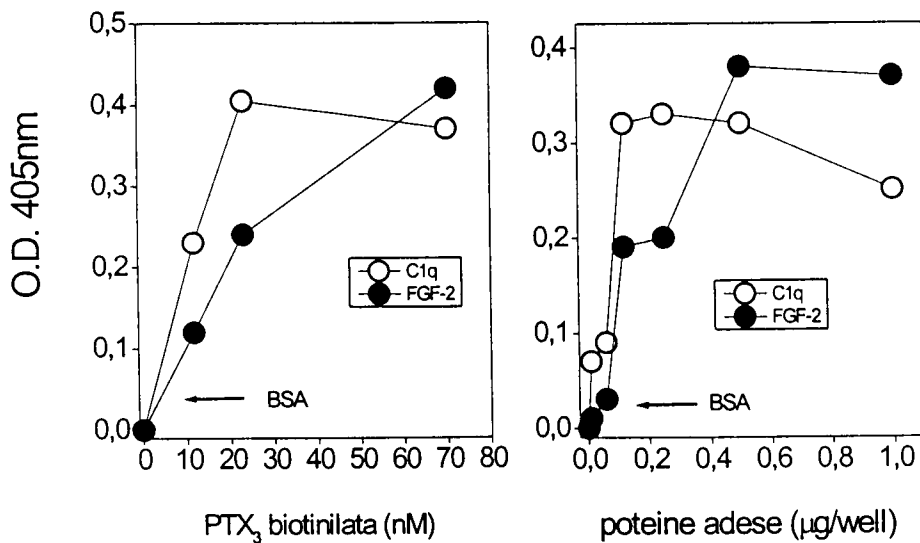


Figura 2

5



7 NOV. 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

[Handwritten signature]

./.

Figura 3

RM2000 A 000578

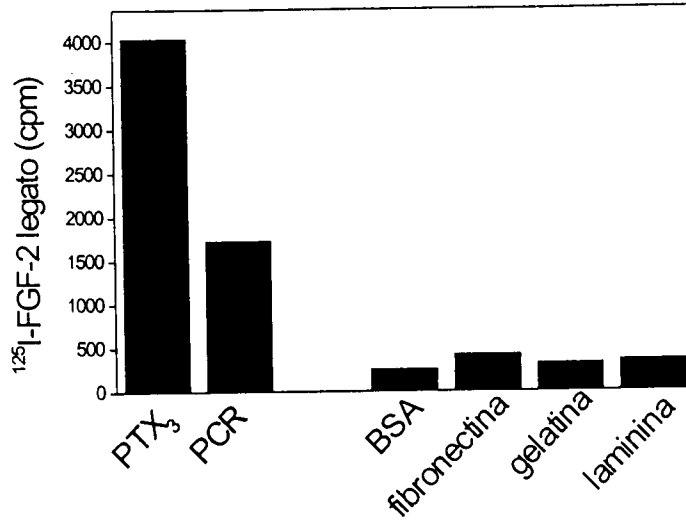
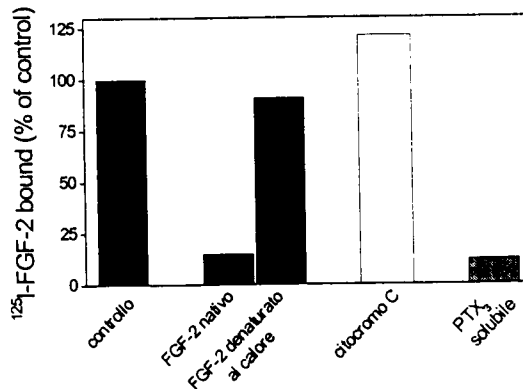


Figura 4



7 NOV 2007

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Marco Ghisla".

Figura 5

RM 2000 A 000578

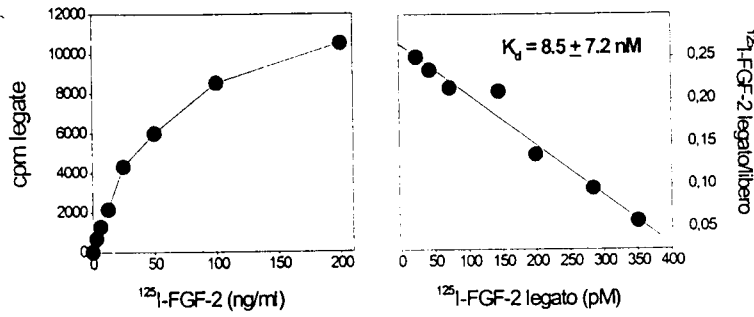
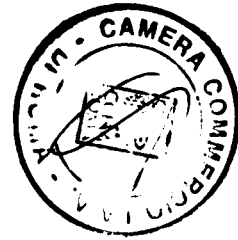
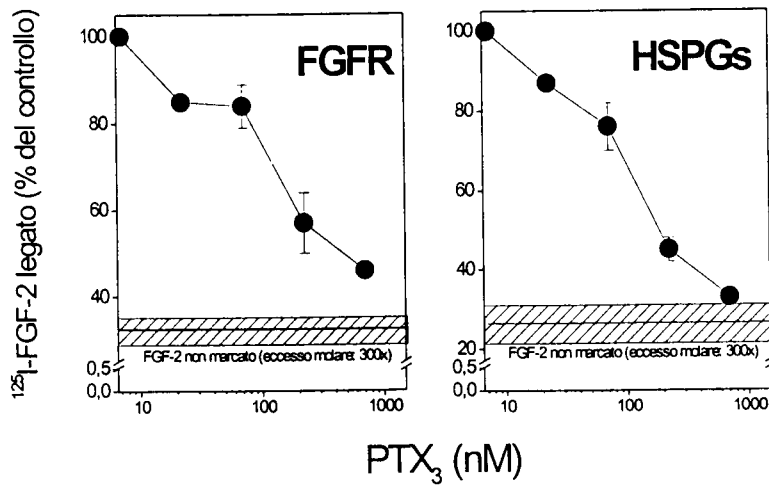


Figura 6



5

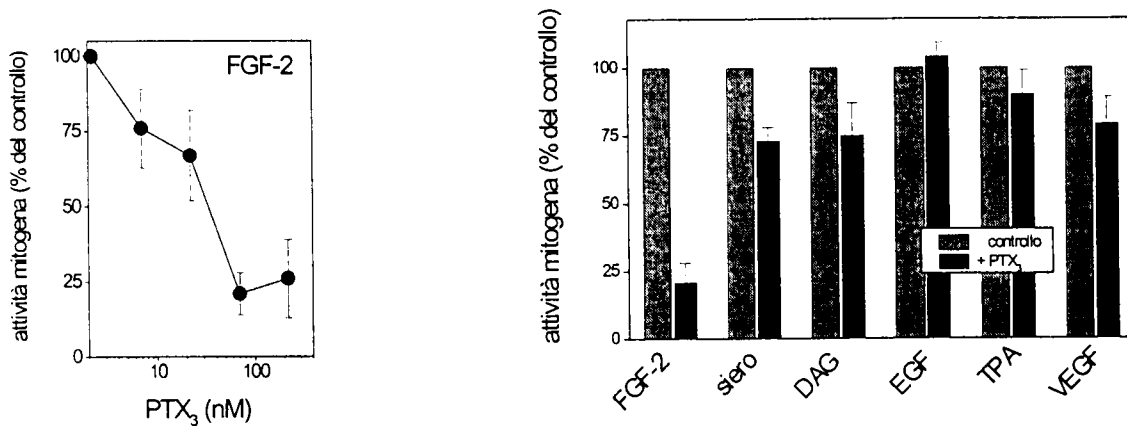


NOV 2000

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA

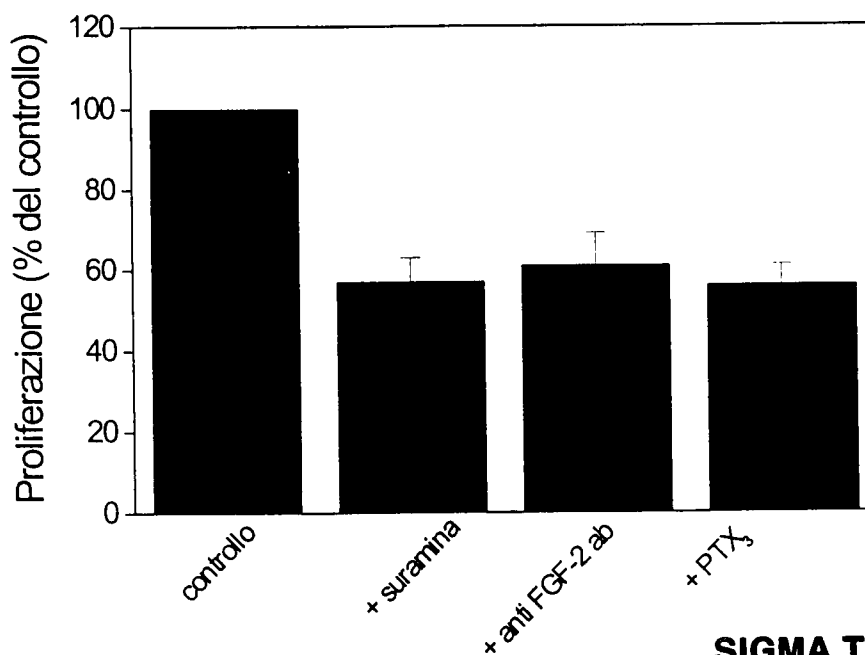
Figura 7

RM2000 A 000578



5

Figura 8



NOV 2300

SIGMA TAU
IND. FARM. RIUNITE S.p.A.
Viale Shakespeare, 47
00144 ROMA