

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

| | | |
|--|---|---------------------------------------|
| (22) Data de pedido: 2007.01.23 | (73) Titular(es): SIGMA-TAU INDUSTRIE FARMACEUTICHE RIUNITE S.P.A. VIALE SHAKESPEARE 47 00144 ROMA | IT |
| (30) Prioridade(s): 2006.01.24 EP 06001457 | | |
| (43) Data de publicação do pedido: 2008.10.01 | (72) Inventor(es): MARCO PRESTA MAURA CAMOZZI MARCO RUSNATI MAURIZIO COLOMBO DOMENICO MASTROIANNI | IT IT IT IT IT |
| (45) Data e BPI da concessão: 2016.05.11 130/2016 | (74) Mandatário: MANUEL BASTOS MONIZ PEREIRA RUA DOS BACALHOEIROS, 4 1100-070 LISBOA | PT |

(54) Epígrafe: **PEPTÍDEOS DE LIGAÇÃO DE FGF-2 E USOS DOS MESMOS**

(57) Resumo:

PEPTÍDEOS DE LIGAÇÃO DE FGF2 SÃO AQUI DESCRITOS, OS QUAIS FORAM PROJETADOS PARTINDO DA REGIÃO DE N-TERMINAL DE PTX3, EM PARTICULAR ABRANGENDO A REGIÃO DE PTX3(82-110). PEPTÍDEOS SINTÉTICOS RELACIONADOS A ESTA SEQUÊNCIA SÃO CAPAZES DE LIGAR FGF2 E INIBIR SUA ATIVIDADE PRÓANGIOGÉNICA IN VITRO E IN VIVO SEM IMPACTO ANTECIPADO EM IMUNIDADE INATA.

RESUMO

PEPTÍDEOS DE LIGAÇÃO DE FGF-2 E USOS DOS MESMOS

Peptídeos de ligação de FGF2 são aqui descritos, os quais foram projetados partindo da região de N-terminal de PTX3, em particular abrangendo a região de PTX3(82-110). Peptídeos sintéticos relacionados a esta sequência são capazes de ligar FGF2 e inibir sua atividade pró-angiogénica in vitro e in vivo sem impacto antecipado em imunidade inata.

DESCRIÇÃO

PEPTÍDEOS DE LIGAÇÃO DE FGF-2 E USOS DOS MESMOS

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se a peptídeos de ligação de Fator-2 de Desenvolvimento de Fibroblasto (FGF2), capazes de ligar FGF2 e inibir sua atividade pró-angiogénica *in vitro* e *in vivo* sem impacto antecipado em imunidade inata.

ANTECEDENTES DAS INVENÇÕES

Pentraxinas são uma superfamília de proteínas caracterizadas por uma estrutura pentamérica¹. As pentraxinas curtas clássicas proteína reativa a C (CRP) e componente P amiloide de soro (SAP) são proteínas de fase aguda em homem e camundongo, respetivamente, produzidas no fígado em resposta a mediadores inflamatórios^{2,3}. Pentraxinas ligam vários ligantes e estão envolvidas na resistência inata a micróbios e recuperação de detritos celulares e componentes de matriz extracelular^{1,4,6}.

Pentraxinas longas são caracterizadas por um domínio de terminal N não relacionado acoplado a um domínio de terminal C do tipo pentraxina⁷. A pentraxina longa prototípica PTX3^{8,9} é uma proteína glicosilada de 45 kD predominantemente agrupada em multímeros de 10 a 20 mero¹⁰. PTX3 é localmente produzida e liberada por diferentes tipos de célula, em particular por fagócitos mononucleares, células dendríticas e células endoteliais, em resposta a sinais inflamatórios primários¹¹. Estudos em *ptx3*⁻¹-de camundongos mostraram que esta molécula desempenha funções não redundantes complexas *in vivo*, variando da montagem de uma matriz extracelular rica em

ácido hialurônico, a fertilidade feminina e a imunidade inata contra diversos microorganismos^{12,13}. Isto está relacionado, pelo menos em parte, à capacidade de PTX3 para ligar-se com alta afinidade ao componente de complemento C1q, à proteína de matriz extracelular TSG6 e micro-organismos selecionados, ativando ativação de complemento e facilitando reconhecimento de patógeno por macrófagos e células dendríticas^{1,14}. Desta forma, PTX3 é um recetor de reconhecimento de padrão solúvel com funções não redundantes únicas em várias condições patofisiológicas^{1,14}.

Fator-2 de desenvolvimento de fibroblasto (FGF2) é um fator de desenvolvimento de ligação de heparina que induz proliferação celular, quimiotaxia, e produção de protease em células endoteliais cultivadas através de interação com recetores de tirosina cinase de alta afinidade (FGFRs)¹⁵. FGF2 induz angiogênese *in vivo* e modula neovascularização durante cicatrização de ferimento, inflamação, aterosclerose, e desenvolvimento de tumor¹⁶. Diversas moléculas sequestram FGF2 no ambiente extracelular, desta forma prevenindo sua interação com FGFRs de célula endotelial e inibindo sua atividade angiogénica (revisto em¹⁶). Muitos dos mesmos inibidores são produzidos/liberados localmente e/ou sistemicamente, desta forma sustentando a modulação complexa do processo de angiogênese.

PTX3 longa liga FGF2 com alta afinidade e especificidade. Consequentemente, PTX3 longa inibe proliferação de célula endotelial dependente de FGF2 *in vitro* e angiogênese *in vivo*¹⁷. Também, PTX3 inteira inibe ativação celular de músculo liso dependente de FGF2 e espessamento de íntima depois de lesão arterial¹⁸. Desta forma, PTX3 pode

potencialmente contribuir para a modulação de atividade de FGF2 em diferentes cenários patológicos caracterizada pela co-expressão das duas proteínas, incluindo inflamação, cicatrização de ferimento, aterosclerose, e neoplasia. No entanto nenhum uso terapêutico da proteína é descrito devido à impraticabilidade da utilização de tal molécula grande e a outras atividades da proteína. De fato, PTX3 liga Clq por meio do domínio de pentraxina C¹⁰-terminal.

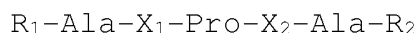
No momento, nenhuma função biológica foi atribuída ao terminal de N de PTX3. Nesta base, os autores investigaram a capacidade N-terminal de PTX3 para interagir com FGF2.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

Foi constatado que células endoteliais transduzidas retrovirais superexpressando o fragmento N-terminal de PTX3(1-178) mostram atividade mitogênica reduzida em resposta a FGF2. PTX3(1-178) recombinante purificada liga FGF2 e previne interação de PTX3/FGF2. Também, o anticorpo monoclonal mAb-MNB4, que reconhece o epitopo de PTX3(87-99), previne interação de FGF2/PTX3 e abole a atividade de antagonista de FGF2 de PTX3. Surpreendentemente os autores constataram que muitos peptídeos curtos retêm tal atividade e são úteis como fármacos terapêuticos. Consistentemente, peptídeos sintéticos PTX3(82-110), PTX3(97-110), PTX3(97-107) e PTX3 (100-104) ligam FGF2 e inibem a interação de FGF2 com PTX3 longa inteira imobilizada a um "sensorchip" de BIAcore, proliferação de célula endotelial dependente de FGF2 e angiogênese *in vivo*. Desta forma, os dados permitem identificar um domínio de ligação de FGF2 muito curto na extensão N-terminal de abrangência de PTX3 à região de PTX3(97-110). Peptídeos sintéticos relacionados a esta sequência são

capazes de ligar FGF2 e inibir sua atividade pró-angiogénica *in vitro* e *in vivo* sem impacto antecipado em imunidade inata.

O objetivo principal da presente invenção é por esse motivo um peptídeo de ligação de FGF2 de fórmula I:



em que:

X₁ é um aminoácido selecionado entre Arg e Lys;

X₂ é um aminoácido selecionado entre Cys e Thr;

R₁ está ou ausente ou consiste na sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID N^o: 1 e SEQ ID N^o: 3;

R₂ está ou ausente ou consiste na sequência de aminoácido selecionada de SEQ ID N^s: 2 e SEQ ID N^o: 4, com as seguintes condições:

quando R₁ está ausente, também R₂ está ausente; quando R₁ é a sequência de aminoácido de SEQ ID N^o: 1, R₂ é a sequência de aminoácido de SEQ ID N^s: 2; quando R₁ é a sequência de aminoácido de SEQ ID N^o: 3, R₂ é uma sequência de aminoácido selecionada entre SEQ ID N^s: 2 e SEQ ID N^o: 4; um derivado funcional, um precursor ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

De preferência, X₁ é Arg. Mais preferivelmente X₂ é Cys. Ainda mais preferivelmente o peptídeo consiste na sequência de aminoácido selecionado entre SEQ ID N^o: 5, SEQ ID N^o: 6, SEQ ID N^o: 7 e SEQ ID N^o: 10.

O termo "peptídeo" é ordinariamente aplicado a uma cadeia po-lipeptídica contendo de 4 a 100 ou aminoácidos mais contíguos, geralmente de 5 a 20 aminoácidos contíguos. O termo "funcional" define um peptídeo mostrando propriedades de ligação de FGF2 sendo capaz de diminuir grandemente a atividade biológica de FGF2. A atividade biológica de FGF2 inclui efeitos mitogênicos e

angiogênicos. Em particular, os peptídeos da invenção são capazes de inibir a proliferação induzida por FGF2 de células endoteliais ou células de músculo liso.

Os "precursores" são compostos os quais podem ser convertidos nos compostos da presente invenção através de processamento metabólico e enzimático antes ou depois da administração às células ou ao corpo.

O termo "sais" aqui refere-se tanto a sais de grupos de carboxila quanto a sais de adição de ácido de grupos de amino dos peptídeos, polipeptídeos, ou análogos dos mesmos, da presente invenção. Sais de um grupo de carboxila podem ser formados através de métodos conhecidos na técnica e incluem sais inorgânicos, por exemplo, sais de sódio, cálcio, amônio, férricos ou zinco, e outros mais, e sais com bases orgânicas como aquelas formadas, por exemplo, com aminas, tais como trietanolamina, arginina ou lisina, piperidina, procaína e outros mais. Sais de adição de ácido incluem, por exemplo, sais com ácidos minerais tais como, por exemplo, ácido clorídrico ou ácido sulfúrico, e sais com ácidos orgânicos tais como, por exemplo, ácido acético ou ácido oxálico. Quaisquer de tais sais devem possuir atividade substancialmente similar aos peptídeos e polipeptídeos da invenção ou seus análogos.

O termo "derivados" tal como aqui usado refere-se a derivados os quais podem ser preparados dos grupos funcionais presentes nas cadeias laterais das porções de aminoácido ou nos grupos N/ou C-terminal de acordo com métodos conhecidos. Tais derivados incluem por exemplo ésteres ou amidas alifáticas dos grupos de carboxila e derivados de N-acila de grupos de amino livres ou derivados de O-acila de grupos de hidroxila livres e são

formados com grupos de acila como por exemplo grupos de alcanóila ou aroíla. A presente invenção inclui também peptidomiméticos dos peptídeos já descritos, nos quais a natureza de peptídeos foi quimicamente modificada no nível de cadeias laterais de aminoácido, quiralidade de aminoácido, e/ou cadeia principal de peptídeo. Estas alterações pretendem fornecer agentes de ligação de FGF2 possuindo propriedades terapêuticas, de diagnóstico e/ou farmacocinéticas similares (se não melhoradas).

Por exemplo, quando o peptídeo é propenso à clivagem por peptidases seguinte a injeção no indivíduo, substituição de uma ligação de peptídeo particularmente sensível com um mimético de peptídeo não clivável pode fornecer um peptídeo mais estável e desta forma mais funcional como um terapêutico. Similarmente, a substituição de um resíduo de L-aminoácido é um modo padrão de render o peptídeo menos sensível à proteólise, e finalmente mais similar a compostos orgânicos diferentes de peptídeos. Também úteis são grupos de bloqueio de terminal de amino tais como t-butiloxicarbonila, acetila, succinila, metoxissuccinila, suberila, adipila, azelaíla, dansila, benziloxicarbonila, fluo-renilmetoxicarbonila, metoxiazelaíla, metoxiadipila, metoxissuberila, e 2,4,-dinitrofenila. Muitas outras modificações fornecendo eficácia aumentada, atividade prolongada, facilidade de purificação, e/ou meia vida aumentada são conhecidas na técnica.

As propriedades dos peptídeos da invenção podem ser mantidas, ou ainda potencializadas, em peptídeos mutantes. Peptídeos mutantes incluem sequências de aminoácido em que um ou mais resíduos de aminoácido foram conservadoramente substituídos, com a condição de que eles exibam a mesma atividade biológica caracterizando a presente invenção em

níveis equivalentes ou até mais elevados, tal como determinado por métodos conhecidos na técnica ou descritos nos Exemplos abaixo.

De acordo com a presente invenção, mudanças preferidas nos peptídeos mutantes são comumente conhecidos como substituições "conservadoras" ou "seguras". Substituições de aminoácido conservadoras são aquelas com aminoácidos possuindo propriedades químicas suficientemente similares, a fim de preservar a estrutura e a função biológica da molécula. A literatura fornece muitos modelos nos quais a seleção de substituições de aminoácidos conservadoras pode ser desempenhada com base nos estudos estatísticos e físico-químicos na sequência e/ou na estrutura de proteína natural.

Peptídeos mutantes podem resultar de técnica de mutagénesis direcionada a sítio convencional do ADN de codificação, de tecnologias combinatoriais no nível de sequência de ADN de codificação (tal como *rear-ranjo* de ADN, exibição/seleção de *fago*) ou de aminoácidos, de estudos de projeto auxiliado por computador, ou qualquer outra técnica conhecida adequada dos mesmos, os quais fornecem um grupo finito de peptídeos mutados substancialmente correspondentes os quais podem ser rotineiramente obtidos e testados por aquele versado na técnica usando os ensinamentos apresentados na técnica anterior e nos Exemplos do pedido de patente presente.

Os peptídeos de ligação de FGF2 sendo peptídeos de fusão e/ou quiméricos compreendem a sequência de aminoácido do peptídeo de fórmula (I) ou quaisquer de seus mutantes/derivados tal como definido acima, e uma sequência de aminoácido pertencente a uma sequência de

proteína diferente de PTX3, fornecendo propriedades adicionais sem atividade de ligação de FGF2 consideravelmente prejudicial.

Sequências de proteína adicionais as quais podem ser compreendidas em proteínas de fusão e/ou quiméricas podem ser escolhidas entre sequências ligadas a membrana, regiões extracelulares de proteínas ligadas à membrana, regiões constantes de imunoglobulina, domínios de multimerização, proteínas extracelulares, proteínas contendo peptídeo de sinal, proteínas contendo sinal de exportação.

As propriedades adicionais exibidas pelos polipeptídeos ou peptídeos de fusão e/ou quiméricos são uma capacidade de purificação mais fácil, uma meia vida de duração mais longa em fluidos corporais, ou localização extracelular. Este segundo aspeto é de importância particular para definição de um grupo específico de proteínas de fusão ou quiméricas incluídas na definição acima uma vez que ele permita os peptídeos da invenção serem localizados no espaço onde não apenas o isolamento e purificação dos mesmos peptídeos são facilitados, mas também onde PTX3 e FGF2 naturalmente interagem.

A escolha de uma ou mais das sequências a serem fundidas ao peptídeo de ligação de FGF2 depende de uso específico do referido peptídeo.

Como um procedimento geral, proteínas de fusão podem ser produzidas através de geração de segmentos de ácido nucleico codificando-os, usando técnicas de engenharia genética comuns, e clonagem em vetor replicável de origem viral ou de plasmídeo os quais são usados para modificar

uma célula hospedeira Procariótica ou Eucariótica, usando vetores episômicos ou não homologamente integrados, assim como tecnologias com base em transformação, infecção, ou transfecção. Estes vetores devem permitir a expressão da proteína de fusão incluindo o agente de ligação de FGF2 na célula hospedeira procariótica ou eucariótica sob o controle de suas próprias sequências reguladoras de iniciação/terminação transcricional, as quais são escolhidas serem constitutivamente ativas ou induzíveis em referida célula. Uma linhagem celular pode ser em seguida isolada para fornecer uma linhagem celular estável. Em particular, sempre que células modificadas para expressar os agentes de ligação de FGF2 da invenção são diretamente utilizadas ou administradas, células preferidas são células humanas, normalmente expressando PTX3. Quando a sequência de proteína adicional, como no caso da sequência de proteínas contendo sinal de exportação ou peptídeo de sinal extracelular, permite o domínio de ligação de FGF2 ser secretado no espaço extracelular, o agente pode ser mais facilmente coletado e purificado de células cultivadas em vista de processamento adicional ou, alternativamente, as células podem ser diretamente usadas ou administradas.

Quando a proteína adicional, como no caso da sequência de proteínas ligadas à membrana, permite a imobilização do agente de ligação de FGF2 na superfície do célula, o agente pode ser menos facilmente coletado e purificado das células cultivadas em vista de processamento adicional mas as células podem ser diretamente usadas ou administradas fornecendo o agente em uma forma correspondente àquela de PTX3 natural, possivelmente melhorando suas propriedades.

Os peptídeos de ligação de FGF2 da invenção podem ser identificados também através de métodos de projeto de fármaco auxiliado por computador os quais fazem uso da estrutura e/ou sequência dos peptídeos da invenção, ou os mutantes ativos correspondentes tal como definido acima. Os peptídeos da invenção podem ser usados para estudar a interação entre PTX3 e FGF2 com maior eficácia usando tecnologias de modelagem computacional. Tal análise assistida por computador pode ser explorada para desenvolver fármacos miméticos de peptídeo ou não peptídeo melhorado na forma de moléculas ou peptídeos orgânicos sintéticos (por exemplo, 4-20 aminoácidos longos). Uma vez que estes compostos foram analisados e constatados serem capazes de ligação de FGF2, o seu uso será então avaliado usando modelos de célula ou animal.

Os polipeptídeos da invenção podem estar na forma de conjugados ou complexos ativos com uma porção heteróloga, os quais podem ser selecionados de agentes citotóxicos, rótulos (por exemplo rótulos de biotina, fluorescentes), fármacos ou outros agentes terapêuticos, covalentemente ligados ou não, ou diretamente ou por meio do uso de agentes de acoplamento ou ligantes. Conjugados ou complexos úteis podem ser gerados usando moléculas e métodos conhecidos na técnica (radioativas ou fluorescentes rótulos, biotina, citotóxicos agentes, fármacos ou outras terapêutico agentes). Agentes citotóxicos incluem agentes quimioterapêuticos, toxina (por exemplo, uma toxina enzimaticamente ativa de origem bacteriana, fúngica, de planta, ou de animal, ou fragmentos dos mesmos), ou um isótopo radioativo (isto é, um radio conjugado). Toxinas enzimaticamente ativas e fragmentos dos mesmos que podem ser usados incluem cadeia de difteria A, fragmentos ativos de não ligação de toxina de difteria,

cadeia de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadeia de ricin A, cadeia de abrina A, cadeia de modicina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, e PAP-S), inibidor de *Momordica charantia*, curcina, crotina, inibidor de *Saponaria officinalis*, gelonina, mitogelina, restrictocina, fenomicina, enomicina, e os tricote-cenos. Umass variedades de radionuclídeos são disponíveis para a produção de proteínas radio conjugadas. Exemplos incluem ^{212}Bi , ^{131}I , ^{131}In , ^{90}Y , e ^{186}Re .

Conjugados ou complexos úteis podem também ser gerados para melhora dos agentes em termos de eficácia de liberação de fármaco. Para este propósito, os peptídeos da invenção podem estar na forma de conjugados ou complexos ativos com moléculas tais como polietileno glicol e outros polímeros naturais ou sintéticos (Harris JM and Chess RB, *Nat Rev Drug Discov.* (2003), 2(3):214 a 21 ; Greenwald RB e outros, *Adv Drug Deliv Rev.* (2003), 55(2):217 a 50; Pillai O e Panchagnula R, *Curr Opin Chem Biol.* (2001), 5(4):447 a 51). A este respeito, a presente invenção contempla peptídeos quimicamente modificados tal como descrito aqui, em que o peptídeo é ligado com um polímero. Tipicamente, o polímero é solúvel em água de modo que o conjugado não precipite em um ambiente aquoso, tal como um ambiente fisiológico. Os conjugados usados para terapia podem compreender porções de polímeros solúveis em água farmaceuticamente aceitáveis. Polímeros solúveis em água adequados incluem polietileno glicol (PEG), PEG de monometóxi, PEG de mono-(C₁-C₁₀) alcóxi, PEG de ariló-xi, PEG de poli-(N-vinil pirrolidona), PEG de monometóxi de tresila, propio-naldeído de PEG, PEG de carbonato de bis-succinimidila, homopolímeros de propileno glicol, um copolímero de óxido de polipropileno/óxido de etileno,

polióis polioxietilados (por exemplo, glicerol), álcool de polivinila, dextrano, celulose, ou outros polímeros com base em carboidrato. PEG adequado pode possuir um peso molecular de cerca de 600 a cerca de 60.000, incluindo, por exemplo, 5.000, 12.000, 20.000 e 25.000. Um conjugado pode também compreender uma mistura de tais polímeros solúveis em água.

Exemplos de conjugados compreendem os peptídeos da invenção e uma porção de óxido de polialcila ligada ao terminal de N de referida porção de polipeptídeo. PEG é um óxido polialquila adequado. Como uma ilustração, os peptídeos da presente invenção podem ser modificados com PEG, um processo conhecido como "PEGilação". PEGilação pode ser realizada por quaisquer das reações de PEGilação conhecidas na técnica. Por exemplo, PEGilação pode ser desempenhada por uma reação de acilação ou através de uma reação de alquilação com uma molécula de polietileno glicol reativo. Em um método alternativo, conjugados são formados através de condensação de PEG ativado, em que um grupo hidróxi terminal ou amino de PEG foi substituído por um ligante ativado.

Outro objetivo da invenção é representado por um ácido nucleico codificando os peptídeos de ligação de FGF2 da invenção, hibridização de ácidos nucleicos com os ácidos nucleicos acima, ácidos nucleicos possuindo sequências degeneradas. A invenção também inclui vetores de expressão de origem viral ou de plasmídeo que permite a expressão do ácido nucleico da invenção e células hospedeiras procarióticas ou eucarióticas transformadas com tais vetores e linhagens celulares estáveis derivadas disso, expressando o agente de ligação de FGF2, os quais podem

ser secretados ou expressos na superfície de membrana. Exemplos são células B humanas.

Peptídeos de ligação de FGF2 da invenção podem ser produzidos através de método em que as células hospedeiras acima descritas, são cultivadas em um meio de cultura apropriado e o agente de ligação de FGF2 é coletado.

A sequência de ADN codificando para os peptídeos da invenção pode ser inserida e ligada em um vetor adequado. Uma vez formado, o vetor de expressão é introduzido em uma célula hospedeira adequada, a qual então expressa o peptídeo.

Expressão de quaisquer dos peptídeos recombinantes da invenção tal como mencionado aqui pode ser efetuada em células eucarióticas (por exemplo células de leveduras, inseto ou mamífero) ou células procarióticas, usando os vetores de expressão apropriados. Qualquer método conhecido na técnica pode ser empregue.

A fim de ser capaz de expressão da proteína desejada, um vetor de expressão deve também compreender sequências de nucleótido específicas contendo informação reguladora transcricional e translacional ligada ao ADN codificando a proteína desejada de uma tal forma como para permitir expressão de gene e produção da proteína. Primeiro de modo a que o gene seja transcrito, ele deve ser precedido por um promotor reconhecível por ARN polimerase, ao qual a polimerase liga-se e desta forma inicia o processo de transcrição.

Há uma variedade de tais promotores em uso, que trabalham com diferentes eficiências (promotores fortes e fracos).

Para hospedeiras eucarióticas, sequências reguladoras transcricionais e translacionais diferentes podem ser empregadas, dependendo da natureza das hospedeiras. Eles podem ser fontes virais de forma derivada, tais como adenovírus, papiloma vírus bovino, vírus de Símio ou outros mais, onde os sinais reguladores são associados com um gene particular o qual possui um nível alto de expressão. Exemplos são o promotor TK do vírus do Herpes, o promotor inicial SV40, o promotor de gene gal4 de levedura, etc. Sinais reguladores de iniciação transcricional podem ser selecionados os quais permitem repressão e ativação, de modo que expressão dos genes pode ser modulada.

A molécula de ADN compreendendo a sequência de nucleotídeo codificando para a proteína da invenção é inserida em vetor(es), possuindo os sinais reguladores transcricionais e translacionais operavelmente ligados, o qual é capaz de integração das sequências de gene desejadas na célula hospedeira.

As células que foram estavelmente transformadas pelo ADN introduzido podem ser selecionadas também por introdução de um ou mais marcadores permitindo seleção de células hospedeiras contendo o vetor de expressão. O marcador pode também fornecer fototropia a uma hospedeira auxotrófica, resistência a biocida, por exemplo antibióticos, ou metais pesados tais como cobre, ou outros mais. O gene marcador selecionável pode ou ser diretamente ligado às sequências de gene de ADN a serem expressas, ou introduzido na mesma célula através de co-transfecção.

Elementos adicionais dos vetores podem também ser úteis para obtenção de uma produção ideal de proteínas da

invenção, em particular para seleção de uma célula particular contendo vetor de plasmídeo ou viral: a facilidade com a qual células recipientes, que contêm o vetor podem ser reconhecidas e selecionadas daquelas células recipientes as quais não contêm o vetor; o número de cópias do vetor que é desejado em uma hospedeira particular; e se é desejável ser capaz de "transportar em viagem de ida e volta" o vetor entre células hospedeiras de diferentes espécies.

Uma vez que o(s) vetor(es) ou sequência de ADN contendo a(s) construção(ões) foi preparado para expressão do ADN, construção(ões) podem ser introduzidas em uma célula hospedeira apropriada por qualquer de uma variedade de métodos adequados: transformação, transfecção, conjugação, fusão de pro-toplasto, eletroporação, precipitação de fosfato de cálcio, microinjeção direta, etc.

Células hospedeiras podem ser ou procarióticas ou eucarióticas. Preferidas são hospedeiras eucarióticas, por exemplo células de mamífero, tais como células de humano, macaco, camundongo, e Ovário de Hamster Chinês (CHO), porque elas fornecem modificações pós-translacionais a moléculas de proteína, incluindo duplicação correta ou glicosilação em sítios corretos. Também células de levedura podem realizar modificações de peptídeo pós-translacional incluindo glicosilação. Diversas estratégias de ADN recombinante existem as quais utilizam sequências de promotor forte e número de cópia alto de plasmídeos que podem ser utilizados para produção das proteínas desejadas em levedura. Levedura reconhece sequências líderes em produtos de gene de mamífero clonado e secreta peptídeos transportando sequências líderes (isto é, pré-peptídeos). Depois da introdução do(s) vetor(es), as células

hospedeiras são desenvolvidas em um meio seletivo, o qual seleciona quanto ao desenvolvimento de células contendo vetor. Expressão da(s) sequência(s) de gene clonado resulta na produção das proteínas desejadas.

Muitas revistas e livros fornecem ensinamentos de como clonar e produzir proteínas recombinantes usando vetores e células hospedeiras Procarióticas ou Eucarióticas, tais como alguns títulos na série "A Practical Approach" publicada por Oxford University Press ("ADN Cloning 2: Expression Systems", 1995; "ADN Cloning 4: Mammalian Systems", 1996; "Protein Expression", 1999; "Protein Purification Techniques", 2001).

Exemplos de tecnologias de síntese química, que são mais indicadas para produção do agente de ligação de FGF2 da invenção quando ele está na forma de peptídeo ou miméticos de peptídeo, são síntese de fase sólida e síntese de fase líquida. Como uma síntese de fase sólida, por exemplo, o aminoácido correspondente ao C-terminal do peptídeo a ser sintetizado é ligado a um suporte o qual é insolúvel em solventes orgânicos, e através de repetição alternada de reações, aquela em que aminoácidos com seus grupos amino e grupos funcionais de cadeia lateral protegidos com grupos protetores apropriados são condensados um por um em ordem do C-terminal ao terminal de N, e aquela onde os aminoácidos ligados à resina ou ao grupo protetor dos grupos amino dos peptídeos são liberados, a cadeia de peptídeo é então estendida desta maneira.

Métodos de síntese de fase sólida são grandemente classificados pelo método de tBoc e o método de Fmoc, dependendo do tipo de grupo protetor usado. Grupos protetores tipicamente usados incluem tBoc (t-

butoxicarbonila), Cl-Z (2-clorobenziloxicarbonilo), Br-Z (2-bromobenziloxicar-bonila), Bzl (benzila), Fmoc (9-fluorenilmetoxicarbonilo), Mbh (4,4'-dimetoxidibenzidrilo), Mtr (4-metóxi-2,3,6-trimetilbenzenossulfonilo), Trt (tritila), Tos(tosila), Z (benziloxicarbonila) e Cl₂-Bzl (2,6-diclorobenzilo) para os grupos amino; NO₂ (nitro) e Pmc (2,2,5,7,8-pentamétilcromano-6-sulfonila) para os grupos guanidino; e tBu (t-butila) para os grupos hidroxilo). Depois de síntese do peptídeo desejado, ele é submetido à reação de desproteção e cortado fora do suporte sólido. Tal reação de corte de peptídeo pode ser conduzida com fluoreto de hidrogênio ou ácido sulfônico tri-fluorometano para o método de Boc, e com TFA para o método de Fmoc.

Os agentes de ligação de FGF2 obtidos através de tecnologias de ADN recombinante ou síntese química são finalmente submetidos a uma ou mais etapas de purificação. Purificação pode ser realizada através de quaisquer um dos métodos conhecidos para este propósito, isto é qualquer procedimento convencional envolvendo extração, precipitação, cromatografia, eletroforese, ou outros mais. Por exemplo, HPLC (Cromatografia Líquida de Alto Desempenho) pode ser usada. A eluição pode ser conduzida usando um solvente com base em água-acetonitrilo comumente empregado para purificação de proteína. A invenção inclui preparações purificadas dos agentes de ligação de FGF2 da invenção. Preparações purificadas, tal como aqui usado, refere-se às preparações as quais são pelo menos 1 %, de preferência pelo menos 5%, em peso seco dos compostos da invenção.

Os compostos da invenção descritos acima (proteínas, peptídeos, compostos orgânicos) podem ser usados como um

medicamento. De preferência como um anti doença conduzida aproximadamente através de uma angiogênese alterada. Mais preferivelmente a angiogênese alterada é provocada por uma ativação alterada do fator de desenvolvimento FGF2. Ainda mais preferivelmente, a doença é selecionada do grupo consistindo em doença artrítica, metástase de tumor, retinopatia diabética, psoríase, inflamação crônica, arteriosclerose ou tumor. De preferência o tumor é selecionado do grupo de: sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor ósseo ou tumor neuroendócrino.

Os compostos da invenção descritos acima (proteínas, peptídeos, compostos orgânicos) podem ser usados como anti doença associada com proliferação dependente de FGF2 não controlada de fibroblastos ou células musculares lisas, cicatrização ligada à resposta fibroblástica excessiva, e restenose depois de angioplástica.

De fato os peptídeos de ligação de FGF2 da invenção, uma vez ligados a FGF2, agem como inibidores de FGF2. Realmente os peptídeos são capazes de inibir a proliferação induzida por FGF2 de células endoteliais ou células de músculo liso. Por esse motivo, o potencial terapêutico de tal molécula é a profilaxia e/ou tratamento de doenças nas quais uma inibição de FGF2 é benéfica. Este segundo efeito pode ser também usado para redução da população de células que expressam FGF2.

Os peptídeos de ligação de FGF2 da invenção podem ser usados como ingredientes ativos em composições farmacêuticas para a profilaxia e/ou tratamento de doenças conduzidas aproximadamente através de uma angiogênese alterada, em que a angiogênese alterada é provocada através de uma ativação alterada de FGF2. Exemplos de doenças referidas

são: doença artrítica, metástase de tumor, retinopatia diabética, psoríase, inflamação crônica, arteriosclerose ou tumor, nas quais o tumor é, por exemplo, sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor ósseo ou tumor neuro endócrino.

Os agentes de ligação de FGF2 da invenção podem também ser usados como ingredientes ativos em composições farmacêuticas para a profilaxia e/ou tratamento de doenças associadas com proliferação dependente de FGF2 não controlada de fibroblastos ou células musculares lisas, tal como a cicatrização ligada à resposta fibroblástica excessiva, e à restenose depois de angioplástica.

A presente invenção também fornece composição farmacêutica compreendendo uma quantidade terapêuticamente eficaz do peptídeo de fórmula I ou derivados funcionais dos mesmos e produtos farmacêuticos diluentes e/ou excipientes e/ou adjuvantes adequados para a profilaxia e/ou tratamento das doenças acima mencionadas. Estas composições farmacêuticas podem ser formuladas em combinação com veículos, excipientes, estabilizantes, ou diluentes farmacêuticamente aceitáveis. Dependendo das propriedades do agente, a composição farmacêutica pode ser útil para doenças relacionadas com as células T CD4+ tais como doenças autoimunes, inflamações, ou infecções.

Composições farmacêuticas compreendendo os peptídeos de ligação de FGF2 da presente invenção incluem todas as composições em que o referido composto está contido em quantidade terapêuticamente eficaz, isto é, uma quantidade eficaz para obter o resultado sob o ponto de vista médico desejável no animal tratado. As composições farmacêuticas podem conter veículos aceitáveis farmacêuticos adequados,

veículos biologicamente compatíveis adequados para administração a um animal (por exemplo, solução salina fisiológica) e eventualmente compreendendo auxiliares (tipo excipientes, estabilizantes ou diluentes) os quais facilitam o processamento dos compostos ativos em preparações as quais podem ser usados produtos farmacêuticos.

As composições farmacêuticas podem ser formuladas de qualquer modo aceitável para satisfazer as necessidades do modo de administração. O uso de biomateriais e outros polímeros para liberação de fármaco, igualmente as técnicas e modelos diferentes para validar um modo específico de administração, são descritos na literatura. Modificações dos compostos da invenção para melhorar penetração da barreira sangue-cérebro também seriam úteis.

Qualquer modo de administração aceito pode ser usado e determinado por aqueles versados na técnica. Por exemplo, administração pode ser através de várias vias parenterais tais como vias subcutâneas, intravenosas, intradérmicas, intramusculares, intraperitoneais, intranasais, transdérmicas, orais, ou bucais. Administração parenteral pode ser por injeção de bolo ou por perfusão gradual durante o tempo. Preparações para administração parenteral incluem soluções, suspensões, e emulsões aquosas ou não aquosas estéreis, as quais podem conter agentes ou excipientes auxiliares conhecidos na técnica, e podem ser preparados de acordo com métodos de via. Além disso, suspensão dos compostos ativos como suspensões de injeção oleosas apropriadas pode ser administrada. Solventes ou veículos lipofílicos adequados incluem óleos graxos, por exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres de ácido graxo sintéticos, por exemplo, óleo de gergelim, ou ésteres de

ácido graxo sintéticos, por exemplo, etiloleato ou triglicerídeos.

Suspensões de injeção aquosas que podem conter substâncias aumentando a viscosidade da suspensão incluem, por exemplo, carboximetil celulose de sódio, sorbitol, e/ou dextrano. Opcionalmente, a suspensão pode também conter estabilizantes. Composições farmacêuticas incluem soluções adequadas para administração por injeção, e contêm de cerca de 0,01 a 99 por cento, de preferência de cerca de 20 a 75 por cento de composto ativo junto com o excipiente. Composições as quais podem ser administradas retal-mente incluem supositórios.

É entendido que a dosagem administrada será dependente da idade, sexo, saúde, e peso do recipiente, tipo de tratamento concorrente, se existir, frequência de tratamento, e a natureza do efeito desejado. A dosagem será adaptada ao sujeito individual, como é entendido e determinável por aquele versado na técnica. A dose total requerida para cada tratamento pode ser administrada por doses múltiplas ou em uma dose única. A composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada sozinha ou em conjunção com outros terapêuticos direcionados à condição, ou direcionados a outros sintomas da condição. Geralmente uma dosagem diária de ingrediente ativo é compreendida entre 0,01 a 100 miligramas por quilograma de peso corporal.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados ao paciente intravenosamente em um veículo aceitável farmacêutico tal como solução salina fisiológica.

Métodos padrão para liberação intracelular de peptídeos podem ser usados, por exemplo liberação por meio de lipossomas. Tais métodos são bem-conhecidos àqueles versados na técnica. As formulações desta invenção são úteis para administração parenteral, tal como intravenosa, subcutânea, intramuscular, e intraperitoneal.

Igualmente conhecidas nas técnicas médicas, dosagens para qualquer paciente depende de muitos fatores, incluindo o tamanho do paciente, área de superfície corporal, idade, o composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral, e outros fármacos sendo administrados concorrentemente.

Uma vez entendidos os aspetos dos métodos e produtos descritos no presente pedido, a necessidade e tipo de etapas adicionais podem ser facilmente deduzidos através de revisão de processo de técnica anterior, assim como das seguintes figuras e exemplos não limitantes descrevendo os detalhes básicos e algumas aplicações da invenção.

DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1. Inibição de atividade mitogênica de FGF2 por N_{term}-PTX3 transduzida por retrovírus. (A) Análise de mancha do Oeste do meio condicionado de células endoteliais aórticas de murino (MAE) infectadas com retrovírus de EGFP, PTX3 de tamanho natural humano, sC_{term}-PTX3, ou N_{term}-PTX3. As duas faixas imunorreativas presentes no caminho de sC-term-PTX3 correspondem à forma glicosilada e não-glicosilada da proteína recombinante ¹⁰ (B) Células MAE infetadas por retrovírus foram estimuladas com FGF2 (0,55 nM). Depois de 48 horas, células foram tripsinadas e contadas. Os dados são expressos como

percentagem da proliferação observada em células tratadas por FGF2 infetado por silindra (duplicações de 8 de população celular). (C) Células GM7373 foram incubadas com o meio condicionado de células MAE infetadas e imediatamente tratadas com 0,55 nM de FGF2. Depois de 24 horas, células foram tripsinadas e contadas. Os dados são expressos como percentagem da proliferação observada em células GM7373 incubadas em meio fresco mais FGF2 (duplicações de 1,0 de população celular). Em B e C, os dados são a média \pm SD de 3 ensaios independentes em triplicata.

Figura 2. Inibição de interação de FGF2/PTX3 por N_{term}-PTX3 recombinante. (A) N_{term}-PTX3 e C_{term}-PTX3 rotuladas por 6xHis recombinante foram expressas e purificadas de células de E. coli transformadas (final mostra o manchamento de prata de um gel SDS-PAGE carregado com as proteínas purificadas). Em seguida, cavidades revestidas por FGF2 foram incubadas com PTX3 de tamanho natural, N_{term}-PTX3 ou C_{term}-PTX3 (todas em 44 nM) durante 30 minutos em 37°C. A quantidade relativa de proteína ligada a FGF2 imobilizado foi imunodetectada através de incubação com um anticorpo anti-PTX3 policlonal de coelho tal como descrito em Material e Métodos. (B) Cavidades revestidas por FGF2 foram incubadas com PTX3 biotinilada (bPTX3, 22 nM) na ausência ou na presença de um excesso molar de 10 vezes de PTX3 de tamanho natural, N_{term}-PTX3 ou C_{term}-PTX3. A quantidade de bPTX3 ligada a FGF2 imobilizado foi em seguida medida e os dados foram expressos como percentagem de ligação medida na ausência de qualquer competidor. Todos os dados são a média \pm SD de 3 ensaios independentes em triplicata.

Figura 3. Mapeamento de epitopo de PTX3. (A) PTX3 de tamanho natural, N_{term}-PTX3, e C_{term}-PTX3 (200 ng/caminho) foram analisadas através de western blot usando os anticorpos monoclonais mAb-MNB4 e mAb-16B5. (B) 128 peptídeos de 13-mero de sobreposição abrangendo a sequência de PTX3 humana integral foram dispostos em membranas de celulose pela técnica de síntese SPOT. Em seguida, membranas foram sondadas com anticorpos de mAb-MNB4 (barras pretas) e mAb-16B5 (barras cinzas) e imunocomplexos foram quantificados através de análise densitométrica das membranas. A sequência de aminoácido dos peptídeos de PTX3 reconhecidos pelos dois anticorpos é mostrada em itálico sublinhado no código de letra única.

Figura 4. mAb-MNB4 impede interação de FGF2/PTX3. (A) Cavidades revestidas por FGF2 foram incubadas com 22 nM de bPTX3 na ausência ou na presença de PTX3 de tamanho natural, mAb-MNB4, ou mAb-16B5 (todas em 220 nM). A quantidade de bPTX3 ligada a FGF2 imobilizado foi em seguida medida e os dados foram expressos como percentagem de ligação medida na ausência de qualquer competidor. (B) Células GM7373 foram incubadas com FGF2 (0,55 nM) mais PTX3 (220 nM) na ausência ou na presença de mAb-MNB4 ou mAb-16B5 (ambos em 2,2 µM). Depois de 24 horas, células foram tripsinadas e contadas. Os dados são expressos como percentagem da proliferação observada em células GM7373 incubadas com FGF2 apenas. Todos os dados são a média ± SD de 3 ensaios independentes em triplicata.

Figura 5. Inibição de interação de FGF2/PTX3 por peptídeos sintéticos de PTX3. (A) Representação esquemática N-terminal de PTX3 humana e peptídeos sintéticos relacionados de PTX3. (B) Cavidades revestidas com os peptídeos de PTX3 indicados (200 µg/cavidade) foram

adicionadas com FGF2 (80 nM) e a quantidade de FGF2 ligada foi avaliada. Os dados, expressos como percentagem da quantidade de FGF2 ligada a cavidades revestidas por PTX3, são a média \pm SD de 3 ensaios independentes em triplicata. (C) Painel superior: FGF2 (0,8 μ M) foi injetado sobre "sensorchips" de BIAcore revestidos por PTX3 ou revestidos por gelatina. Painel inferior: revestimento de sensograma mostrando a ligação de quantidades crescentes de FGF2 (0,1, 0,5, 0,8, e 1,1 μ M) para PTX3 imobilizada. A resposta (em RU, Unidades de Ressonância) foi registada como uma função de tempo. D) FGF2 (0,8 μ M) foi injetado sobre um "sensorchip" de BIAcore revestido por PTX3 na presença de concentrações crescentes de PTX3 de tamanho natural (■) ou peptídeos sintéticos PTX3(82-110) (•), PTX3(82-110) misturada (○), ou PTX3(57-85) (□). A resposta foi registada no término de injeção e plotada como uma função da concentração de antagonista. Para cada peptídeo, resultados similares foram obtidos em 2 a 3 ensaios independentes. (E) Células GM7373 foram incubadas com FGF2 (0,55 nM) na ausência ou na presença de PTX3 (220 nM) ou dos peptídeos de PTX3 indicados (todos em 66 μ M). Os dados, expressos como percentagem da proliferação observada em células GM7373 incubadas com FGF2 apenas, são a média \pm SD de 3 ensaios independentes em triplicata.

Figura 6. Peptídeo de PTX3(97-110) como um antagonista de FGF2. (A) Representação esquemática de peptídeos de abrangência de PTX3(82-110). (B) Cavidades revestidas com os peptídeos de PTX3 indicados (200 μ g/cavidade) foram incubadas com FGF2 (80 nM) e a quantidade de FGF2 ligado foi avaliada. Os dados, expressos como percentagem da quantidade de FGF2 ligada a cavidades revestidas por PTX3, são a média \pm SD de 3 ensaios independentes em triplicata. (C) FGF2 (0,8 μ M) foi injetado sobre um "sensorchip" de

BIACore revestido por PTX3 na presença de concentrações crescentes de PTX3(82-110) (•), PTX3(97-110) (○), PTX3(82-101) (■), ou PTX3(82-96) (A). A resposta foi registada no término de injeção e plotada como uma função da concentração de antagonista. Para cada peptídeo, resultados similares foram obtidos em 2 a 3 ensaios independentes. (D) Células GM7373 foram incubadas com FGF2 (0,55 nM) na ausência ou na presença dos peptídeos de PTX3 indicados (todos em 66 µM). Os dados, expressos como percentagem da proliferação observada em células GM7373 incubadas com FGF2 apenas, são a média ± SD de 3 ensaios independentes em triplicata. (E) FGF2 (0,8 µM) foi injetado sobre um "sensorchip" de BIACore revestido por PTX3 na presença de concentrações crescentes de PTX3(97-110) (•), PTX3(100-110) (●), PTX3(97-104) (▲), ou PTX3(97-107) (▼), PTX3(104-113) (◆), PTX3(100-113) (▲), PTX3(100-104) (□). A resposta foi registada no término de injeção e plotada como uma função da concentração de antagonista. Para cada peptídeo, resultados similares foram obtidos em 2 a 3 ensaios independentes.

Figura 7. Atividade antiangiogénica de peptídeo de PTX3(82-110). Membrana corioalantóica (CAM) de embrião de galinha implantada no dia 11 com contas de alginato contendo veículo (a) ou 16 pmoles de FGF2 na ausência (b) ou na presença (c) de 3 nmoles de PTX3(82-110) foi fotografada no dia 14. Ampliação original, x 5.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Materiais e Métodos

Químicos

FGF2 recombinante humano (número de acesso 09038) e PTX3 (número de acesso suíço-prot P26022) foram expressos em células de *E. coli* e ovário de hamster Chinês, respectivamente, e purificados tal como descrito^{10,19}. Peptídeos de PTX3(31-60), PTX3(57-85), e PTX3(107-132) humana sintéticos foram fornecidos por Primm (Milão, Itália), todos os outros peptídeos sendo fornecidos por Tecnogen (Piana di Monteverna, Caserta, Itália) (pureza de HPLC > 95%). Para todos os peptídeos, sequência de aminoácido é mostrada na Tabela 1 no código de letra única e estrelas de numeração do resíduo de metionina na posição 1 na sequência líder de PTX3.

Tabela 1. Peptídeos sintéticos abrangendo o terminal de N de PTX3 humana

| Peptídeo | Sequência de Aminoácido | SEQ IDN ^s : |
|---------------|--------------------------------|------------------------|
| PTX3(31-60) | DNEIDNGLHPTEDPTPCDCGQEHSEWDKLF | 8 |
| PTX3(57-85) | DKLFI MLNSQMRERMLLQATDDVLRGEL | 9 |
| PTX3(82-110) | RGELQRLREELGRLAESLARPCAPGAPAE | 10 |
| PTX3(82-110) | EGLRGELRGSREAELLRQAARAPACPLPE | 11 |
| PTX3(107-132) | APAEARLTSALDELLQATRDAGRRLA | 12 |
| PTX3(82-96) | RGELQRLREELGRLA | 13 |
| PTX3(82-101) | RGELQRLREELGRLAESLAR | 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) | RGELQRLREELGRLAESL | 1 |

| | | |
|---------------|--------|----------|
| PTX3(105-110) | PGAPAE | <u>2</u> |
| PTX3(97-99) | ESL | 3 |
| PTX3(105-107) | PGA | 4 |

Anticorpos monoclonais de rato direcionados contra PTX3 humana purificada foram descritos previamente ^{10,20} (número de MNB1 cat. ALX-804-463, Número de MNB4 cat. ALX-804-464, Alexis Biochemicals).

Culturas de célula

Células GM7373 endoteliais aórticas bovinas fetais²¹ foram desenvolvidas em MEM de Águia contendo soro de bezerro fetal (FCS) a 10%. Células embalando rim embriônico humano (EcoPack2-293) (Clontech, CA, USA) foram desenvolvidas em DMEM (Life Technologies, Gaithersburg, MD) contendo FCS a 10%. Células 22106 endoteliais aórticas de murino balb/c (células MAE) foram obtidas de R. Auerbach (University of Wisconsin, Madison, WI) e desenvolvidas em DMEM adicionado com FCS a 10%.

Infecção retroviral

Os cADNs codificando para PTX3 humana e para a proteína fluorescente verde realçada (EGFP) foram obtidos tal como descrito¹⁷. Os cADNs codificando para a PTX3(1-178) de fragmento N-terminal (N_{term}-PTX3) e a PTX3(179-381) de fragmento N-terminal fundidos à sequência líder para secreção de PTX3(1-17) (sC_{term}-PTX3) foram gerados de pLX-PTX3¹⁷ através de técnicas de PCR e clonagem padrão. Todos os cADNs foram clonados no vetor retroviral pBABE desta forma gerando pBABE-PTX3, pBABE-N_{term}-PTX3, pBABE-sC_{term}-PTX3, e pBABE-EGFP que foram usadas para transfectar as

células embalando EcoPack2-293 na presença de Lipofectamina¹⁷. Células transduzidas foram selecionadas com puromici-na (1 µg/rnl, Sigma) durante duas semanas. Clones com um título viral mais elevado do que 10⁶ cfu/mL foram usados para experimentação adicional. Culturas confluentes de células MAE foram em seguida incubadas durante horas com o meio condicionado de células embalando pBABE-PTX3, pBABE-N,emrPTX3, pBABE-sC,_{er}m-PTX3, ou pBABE-EGFP na presença de polibreno (8 µg/ml, Sigma). Populações de célula infectadas foram selecionadas durante 7 dias com puromicina. Observação de células infectadas por EGFP através de microscopia de epifluorescência (microscópio Axiovert S100, x10/0,25; Zeiss, Göttingen, Germany) mostrou que eficiência de infecção retroviral foi mais elevada do que 80%. Para avaliar os níveis de expressão e liberação de proteína de transgene por células infetadas, culturas de célula foram desenvolvidas sob condições livres de soro durante 2 dias. Em seguida, meios condicionados foram coletados, clarificados através de centrifugação, concentrados 10 vezes usando filtros Centricon YM-10 (Millipore), e 100 µl de alíquotas foram sondados através de análise de western blot.

Ensaio de proliferação celular

Ensaio de proliferação celular em células endoteliais foi desempenhado tal como descrito²². Resumidamente, células GM7373 ou MAE foram semeadas em placas de 96 cavidades em 75.000 células/cm² ou 25.000 células/cm², respetivamente. Depois de 16 h, células foram incuba das em meio fresco contendo FCS a 0,4% mais FGF2 (0,55 nM) na ausência ou na presença de diferentes antagonistas. Depois de 24 ou 48 horas, respetivamente, células foram tripsinadas e contadas em uma câmara Burker.

Expressão de *E. coli* e purificação de fragmentos de PTX3 rotulados por 6xHis recombinantes

N_{term}'PTX3 e C_{term}'PTX3 cADNs foram amplificados de pLX-PTX3 através de PCR com iniciadores contendo nucleotídeos adicionais:

PTX3-N:

(+) CACCGAGAACTCGGATGATTATGA 8 (SEQ ID 17);

(.) TTAACCTGCCGGCAGCCAGCTCC (SEQ ID 18);

PTX3-C:

(+) CACCTGTGAAACAGCTATTTTA (SEQ ID 19);

(-) TTATGAAACATACTGAGCTCC (SEQ ID 20).

Estes cADNs foram clonados no vetor de TOPO de pENTR (*Es-tojo* de clonagem TOPO direcional de pENTR, Invitrogen) e sequenciados. Por uso da tecnologia Gateway® (Invitrogen), cADNs de N_{term}-PTX3 e C_{term}-PTX3 de vetor de TOPO de pENTR foram em seguida clonados no vetor pDEST17 permitindo a inserção de um rótulo de 6xHis no C-terminal das proteínas recombinantes. Células BL21-AI de *E. coli* (Invitrogen) foram em seguida transformadas com os dois plasmídeos recombinantes e desenvolvidas em 37°C em meio de LB contendo 100 µg/mL de ampicilina. Expressão de proteína recombinante foi induzida através de incubação durante a noite em 30°C na presença de L-arabinose a 0,2%. Depois de indução, células foram ressuspensas em tampão de ligação (20 mM de fosfato de sódio, 5 M de NaCl, 10 mM de imidazol, pH 7,4) e lisadas através de sonicação. Sobrenadantes clarificados foram filtrados por meio de um filtro de 0,45 µm e carregados em uma Coluna de Afinidade de Metal Imobilizada (IMAC) Hi-Trap de 3,0 ml (Amersham Biosciences) com Níquel para purificação. A coluna foi lavada com 100 mM de imidazol em tampão de ligação e

proteínas ligadas foram eluídas com 300 mM de imidazol de acordo com instruções de fabricante. Frações foram sondadas quanto a presença da proteína recombinante através de imunomanchamento, e frações positivas foram coletadas e dessalinizadas através de cromatografia de filtração em gel (coluna Sephadex G25 PD10, Amersham) em PBS. Pureza de proteínas recombinantes foi mais elevada do que 90%, como avaliado através de SDS-PAGE seguido por manchar de prata do gel (veja Figura 2A, inserida).

Ensaio de ligação de fase sólida

Microplacas de ELISA foram incubadas durante 16 horas em 4°C com 100 µl/cavidade de NaHCO₃ a 100 mM, pH 9,6 (tampão de revestimento) contendo FGF2 (270 nM). Em seguida, cavidades foram super-revestidas durante duas horas em temperatura ambiente com leite seco a 5% em tampão de revestimento. Logo depois, 100 µl de alíquotas de PBS contendo PTX3 de tamanho natural, N_{term}-PTX3 recombinante ou C_{term}-PTX3 (todas em 44 nM) foram incubadas durante 30 minutos em 37°C nas cavidades revestidas por FGF2. Em seguida, cavidades foram sequencialmente incubadas durante uma hora em 37°C com um anticorpo anti-PTX3 policlonal de coelho (diluição de 1:2000) que reconhece ambos os fragmentos de PTX3 com eficiência similar em western blot e ELISA, um anticorpo biotinilado anticoelho (1:2000), e 100 µl de estreptavidina-rábano silvestre peroxidase (1:5000, Amersham) durante uma hora em temperatura ambiente. Em seguida, 100 µl/cavidade do substrato de cromogênio 2,29-azinobis(ácido 3-etilbenzotiazolinassulfônico) foram adicionados. Valores de absorvência foram lidos em 405 nm em uma leitora de ELISA automática. Em alguns ensaios, 100 µl de alíquotas de PBS contendo PTX3 rotulada por biotina (bPTX3) (22 nM) foram incubados durante 30 minutos em 37°C

em cavidades revestidas por FGF2 com ou sem competidores. Em seguida, cavidades foram lavadas, e a quantidade de bPTX3 ligada foi avaliada tal como descrito¹⁷. Alternativamente, peptídeos sintéticos de PTX3 foram imobilizados em cavidades de microplaca de ELISA (200 µg/cavidade) tal como descrito acima. Em seguida, FGF2 (80 nM) foi adicionado e FGF2 ligado a peptídeos imobilizados foi avaliado através de incubação de uma hora em 37°C com um anticorpo anti-FGF2 policlonal de coelho (1:7000) seguido por detecção imunocomplexa tal como descrito acima.

Mapeamento de epitopo de PTX3

Para identificar a sequência de aminoácido dos epitopos ligando-se a anticorpos anti-PTX3 monoclonais, 128 peptídeos foram dispostos em membranas de celulose através de tecnologia de síntese SPOT²³. Os 5 peptídeos eram 13 aminoácidos longos com uma fase de leitura de 3 aminoácidos. Membranas foram bloqueadas com leite a 2% em Tween-TBS (MBS) durante 16 horas em 4°C. Depois de lavagem, as membranas foram incubadas durante 90 minutos em 37°C com anticorpos monoclonais mAb MNB4 ou mAb 16B5 (ambos em diluição de 1:1000 em MBS) e em seguida 10 incubadas durante 90 minutos em 37°C com IgG anti-rato conjugada a fosfatase alcalina de coelho (1:30.000, Sigma) em MBS. Reação de cor foi desenvolvida tal como descrito²³ e intensidade do sinal foi avaliada através de análise densitométrica da membrana.

Ensaio de ligação de BIAcore

Um aparelho BIAcore X (BIAcore Inc, Piscataway, NJ) foi usado. Ressonância de plasmônio de superfície foi explorada para medir mudanças em índice refrativo causadas

pela capacidade de FGF2 para ligar a PTX3 imobilizada a um "sensorchip" de BIAcore. Para este propósito, PTX3 (2,2 μ M) foi deixada reagir com uma célula de fluxo de um "sensorchip" CM4 que foi previamente ativado com 50 μ i de uma mistura de 0,2 M de hidrocloreto de N-etil-N'-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida e 0,05 M de N-hidroxissuccinimida. Estas condições experimentais permitiram a imobilização de 5.000 unidades de ressonância (RUs), correspondentes a aproximadamente 0,1 pmoles de PTX3. Resultados similares foram obtidos para imobilização de gelatina, aqui usado como um controle negativo e para subtração em branco. Concentrações crescentes de FGF2 com ou sem peptídeos sintéticos de PTX3 foram em seguida injetadas em tampão de diluição (PBS mais 0,005% de tensoativo P20, 5,0 μ g/mL de CaCl_2 e MgCl_2) sobre a superfície de PTX3 durante 4 minutos (para permitir sua associação com PTX3 30 imobilizada) e em seguida lavadas até que dissociação fosse observada.

Ensaio de membrana corioalantóica de embrião de galinha (CAM)

Contas de alginato (5 μ l) contendo veículo ou 16 pmoles de FGF2 com ou sem peptídeos sintéticos de PTX3 foram preparadas tal como descrito²⁴ e colocadas no topo da CAM de ovos de galinha de White Leghorn fertilizados no dia 11 de incubação (10 ovos por grupo experimental). Depois de 72 horas, vasos sanguíneos convergindo para o implante foram contados por dois observadores de um modo duplo-cego sob um estereomicroscópio (STEMI-SR, x2/0,12; Zeiss).

Resultados

Região N-terminal de PTX3 liga FGF2

Proteína PTX3 é caracterizada por um domínio de 203 aminoácidos de C-terminal (C_{term}-PTX3) que compartilha homologia com as pentraxinas curtas clássicas CRP e SAP e por uma extensão de 178 aminoácidos N-terminal (N_{term}-PTX3) que não mostra qualquer homologia significativa com qualquer outra proteína conhecida⁸. Na tentativa de identificar o(s) domínio(s) de ligação de FGF2 antiangiogênico(s) de PTX3, as duas porções C_{term} ou N_{term}-PTX3 foram avaliadas quanto a sua capacidade de interagir com FGF2.

Observações anteriores mostraram que a superexpressão de PTX3 de tamanho natural resultou na inibição de proliferação dependente de FGF2 em células endoteliais devido à ligação de PTX3 liberada ao fator de desenvolvimento exógeno e sua sequestração no ambiente extracelular¹⁷. Nesta base, células endoteliais aórticas de murino (MAE) foram infectadas com retrovíroses abrigando PTX3 humana de tamanho natural, a extensão N-terminal de PTX3 N_{term}-PTX3, ou o C-terminal de PTX3 fundido à sequência líder de PTX3 para secreção (sC_{term}-PTX3). Células de controlo foram infectadas com um retrovírus abrigando EGFP. Células infectadas superexpressaram e liberaram as proteínas correspondentes em quantidades similares (Figura 1A) e mostraram uma taxa similar de desenvolvimento sob condições basais. No entanto, N_{term}-PTX3 superexpressão causou uma diminuição significativa na capacidade de células infectadas para proliferar em resposta a FGF2 exógeno, similar a superexpressão de PTX3 de tamanho natural (Figura 1 B). Nenhuma inibição foi ao invés exercida por superexpressão de sC_{term}-PTX3 quando comparado a células infectadas por EGFP de controlo.

Para também avaliar a capacidade de N_{term}-PTX3 de agir como um antagonista de FGF2, meios condicionados de células MAE infectadas foram avaliados quanto à capacidade de afetar proliferação dependente de FGF2 de células GM7373 endoteliais (Figura 1C). Tal como antecipado, incubação de células GM7373 com FGF2 na presença do meio condicionado de células MAE infectadas por N_{term}-PTX3 ou infectadas por PTX3 causou uma inibição significativa da atividade mitogênica do fator de desenvolvimento, enquanto os meios condicionados de células MAE infectadas por sC_{term}-PTX3 e infectadas por EGFP foram ineficazes (Figura 1 C). Nenhum dos meios condicionados causou uma inibição significativa de proliferação celular GM7373 ativada por FCS a 10%, desta forma confirmando a especificidade do efeito.

Para confirmar que a atividade de antagonista de FGF2 de N_{term}-PTX3 foi devido a sua capacidade para interagir diretamente com o fator de desenvolvimento, N_{term}-PTX3 foi expressada e purificada de células de E. coli transformadas como uma proteína rotulada por 6xHis recombinante; C_{term}-PTX3 rotulada por 6xHis recombinante purificada foi usada como um controle (Figura 2A, final). Quando avaliado quanto a interação de FGF2, PTX3 de tamanho natural e o fragmento de N_{term}-PTX3 recombinante mostraram a capacidade de ligar FGF2 imobilizado a plástico de cultura de não tecido. Nenhuma interação foi ao invés observada com C_{term}-PTX3 recombinante (Figura 2A). Consequentemente, um excesso molar de 10 vezes de N_{term}-PTX3 recombinante ou de PTX3 de tamanho natural, mas não de C_{term}-PTX3, preveniu a ligação de PTX3 biotinilada (bPTX3) a FGF2 imobilizado (Figura 2B).

Considerados juntos, estes resultados envolvem a região N-terminal de PTX3 para interação de FGF2.

Inibição de interação de FGF2/PTX3 por um anticorpo anti-N_tpr_m-PTX3 monoclonal

A análise de um grupo de anticorpos monoclonais de rato elevados contra PTX3 humana de tamanho natural identificou os anticorpos mAb-MNB4²⁰ (Número de MNB4 cat. ALX-804-464, Alexis Biochemicals) e mAb-16B5¹⁰ (Número de MNB1 cat. ALX-804-463, Alexis Biochemicals) que seletivamente ligam N_{term}-PTX3 e C_{term}-PTX3 recombinante, respectivamente, em um western blot (Figura 3A).

Para mapear os epitopos de PTX3 reconhecidos pelos dois anticorpos, os autores tomaram vantagem da técnica de síntese SPOT²³ através da qual 128 peptídeos de 13-mero de sobreposição abrangendo a sequência de PTX3 humana integral foram dispostos em uma membrana de celulose. Quando a membrana foi sondada com os dois anticorpos monoclonais, detecção imunocomplexa revelou que mAb-MNB4 reconhece o epitopo PTX3(87-99) presente na extensão N-terminal de PTX3 enquanto que mAb-16B5 reconhece o epitopo PTX3(306-312) localizado na região de C-terminal de PTX3 (Figura 3B).

Quando testados quanto à capacidade de afetar interação de FGF2/PTX3, mAb-MNB4, mas não mAb-16B5, previne a capacidade de bPTX3 de ligar FGF2 imobilizado, similar a um excesso molar de PTX3 não-rotulada livre (Figura 4A). Consequentemente, mAb-MNB4 abole a capacidade de PTX3 de tamanho natural de inibir a atividade mitogênica exercida por FGF2 em células GM7373 endoteliais enquanto mAb-16B5 é ineficaz (Figura 4B). Desta forma, mAb-MNB4 reconhecendo o epitopo de PTX3(87-99) N-terminal neutraliza interação de FGF2/PTX3.

Peptídeos relacionados à N_{term}-PTX3 sintéticos como antagonistas de FGF2

Para também definir a região de ligação de FGF2 na extensão N-terminal de PTX3, os autores avaliaram a atividade de antagonista de FGF2 do peptídeo sintético PTX3(82-110), que contém o epitopo de PTX3(87-99) reconhecido pela neutralização de mAb-MNB4 (veja acima), junto com três peptídeos sintéticos distintos PTX3(31-60), PTX3(57-85), e PTX3(107-132) parcialmente abrangendo a sequência de aminoácido de N_{term}-PTX3 (Figura 5A).

Em um primeiro grupo de ensaios, os quatro fragmentos de PTX3 sintéticos foram avaliados quanto a sua capacidade de interagir com FGF2 em um ensaio de ligação de fase sólida. Tal como mostrado na Figura 5B, FGF2 livre liga a PTX3(82-110) imobilizada em plástico de cultura de não-tecido mas não a PTX3(31-60) ou PTX3(57-85) imobilizada, mostrando apenas uma interação limitada com PTX3(107-132) imobilizada.

Logo depois, ressonância de plasmônio de superfície foi explorada para avaliar a capacidade dos quatro peptídeos para afetar interação de FGF2/PTX3. Resultados mostram que FGF2 (0,8 μ M) liga a PTX3 imobilizada a um "sensorchip" de BIAcore com alta capacidade (350 a 400 RU ligadas no término da fase de injeção) (Figura 5C, painel superior). Especificidade da interação é demonstrada pela falta de ligação a um "sensorchip" revestido por gelatina. Também, concentrações crescentes de FGF2 (de 0,1 a 1,1 pM, Figura 5C, painel inferior) foram injetadas sobre a superfície de PTX3 para avaliar os parâmetros cinéticos de interação de FGF2/PTX3. Os dados de ligação demonstram que a interação ocorre com uma dissociação cinética constante (k_{off}) de 6 x

10^{-5} s^{-1} e uma associação cinética constante (K_{on}) de $0,2 \times 10^3 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$, desta forma resultando em um valor de K_d igual a $0,3 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$. Nesta base, os quatro peptídeos sintéticos de PTX3 foram avaliados quanto a sua capacidade de sequestrar FGF2 na fase móvel, desta forma prevenindo sua interação com o "sensorchip" de PTX3. Tal como mostrado na Figura 5D, PTX3(82-110) inibe a ligação de FGF2 à superfície de PTX3 de uma maneira dependente de dose com uma potência 30 vezes inferior do que aquela mostrada por PTX3 de tamanho natural livre (ID_{50} igual a $1,0 \mu\text{M}$ e $30 \mu\text{M}$ para peptídeo de PTX3 e PTX3(82-110) livre, respectivamente). Sob as mesmas condições experimentais, nenhum efeito inibidor foi ao invés exercido por peptídeos de PTX3(31-60), PTX3(57-85), e PTX3(107-132) (Figura 5D e outros dados coletados). Também, um peptídeo sintético misturado com composição de aminoácido igual a PTX3(82-110) [sPTX3(82-110), Tabela 1] mostrou um efeito inibidor limitado ($ID_{50} > 3000 \mu\text{M}$) (Figura 5D), desta forma indicando que a sequência de aminoácido primária em PTX3(82-110) é de importância para interação de FGF2.

A capacidade de peptídeo de PTX3(82-110) de ligar FGF2 induziu os autores a avaliar sua capacidade para agir como um antagonista de FGF2. Quando testados em células de GM7373 endoteliais, ambas as PTX3 de tamanho natural e PTX3(82-110) inibem a atividade mitogênica exercida por FGF2 exógeno, enquanto que peptídeos de PTX3(82-110), PTX3(31-60), PTX3(57-85), e PTX3(107-132) misturados foram ineficazes (Figura 5E). Curvas de resposta a dose confirmaram que a atividade de antagonista de FGF2 de PTX3(82-110) era dependente de dose (ID_{50} igual $30 \mu\text{M}$ e 30 nM para PTX3(82-110) e PTX3, respectivamente).

Identificação de uma sequência de ligação de FGF2 linear mínima na extensão de PTX3 N-terminal

Considerados juntos, os dados acima indicam que a sequência 82-110 de aminoácido linear na extensão de PTX3 N-terminal desempenha um importante papel em interação de FGF2. Na tentativa de identificar uma sequência de ligação de FGF2 linear mínima, três peptídeos sintéticos de sobreposição PTX3(82-96), PTX3(82-101), e PTX3(97-110) abrangendo a sequência de PTX3(82-110) integral (Figura 6A e Tabela 1) foram avaliados quanto à capacidade de interagir com FGF2 em um ensaio de ligação de fase sólida. Sob as mesmas condições experimentais, FGF2 livre liga a PTX3(97-110) imobilizada, assim como a PTX3(82-110) parental e PTX3 de tamanho natural, sem interação com PTX3(82-96) ou PTX3(82-101) (Figura 6B). Consequentemente, PTX3(97-110) liga FGF2 na fase móvel, desta forma prevenindo sua interação com PTX3 imobilizada a um "sensorchip" de BIAcore (Figura 6C). A atividade inibidora de PTX3(97-110) foi similar àquela mostrada pelo peptídeo parental PTX3(82-110), enquanto que PTX3(82-96) e PTX3(82-101) foram ineficazes (Figura 6C). De acordo com estas observações, PTX3(97-110), mas não PTX3(82-96) ou PTX3(82-101), inibe a atividade mitogênica exercida por FGF2 em células GM7373 endoteliais (Figura 6D).

Para também investigar a sequência de ligação de FGF2 linear mínima abrangendo peptídeo PTX3(97-110), os autores analisaram a ligação dos seguintes peptídeos menores a FGF2 através de medição de sua interação com PTX3 imobilizada a um "sensorchip" de BIAcore: PTX3(97-107), PTX3(97-104), PTX3(100-104) e PTX3(100-110), (Figura 6E). Peptídeos PTX3(97-107) e PTX3(100-104) mostraram uma ligação significativa a FGF2. Em contraste, peptídeos

PTX3(97-104) e PTX3(100-110) não previnem a ligação de FGF2 livre a PTX3 imobilizada a um "sensorchip" de BIA-core. (Figura 6E). Desta forma, PTX3(100-104) parece representar a sequência de aminoácido de ligação de FGF2 linear mínima na extensão de PTX3 N-terminal. Conseqüentemente, PTX3(100-104) inibe proliferação de célula endotelial induzida por FGF2.

Peptídeos relacionados à N_{term}-PTX3 sintéticos inibem a atividade angiogênica de FGF2

Para avaliar a capacidade de peptídeos relacionados à N_{term}-PTX3 para afetar neovascularização induzida por FGF2 *in vivo*, esponjas de gelatina adsorvidas com FGF2 sozinho ou adicionadas com peptídeos de PTX3 foram implantadas no topo de CAMs de embrião de galinha de 11 dias de idade. Tal como mostrado na Figura 7, contas de alginato adsorvidas com FGF2 (16 pmoles/embrião) exercem uma resposta angiogénica potente quando comparado a contas adsorvidas com veículo (vasos macroscópicos convergindo para o implante sendo igual a 44 ± 7 e 11 ± 5 vasos/embrião para os dois grupos experimentais, respectivamente). De acordo com as observações *in vitro*, a resposta angiogénica dependente de FGF2 *in vivo* foi significativamente reduzida (28 ± 5 vasos/embrião, $p < 0,05$ por ANOVA) pela adição de 3,0 nmoles de peptídeo de PTX3(82-110) nos implantes de FGF2 (Figura 7). Conseqüentemente, 80 nmoles de PTX3(97-110) causaram uma inibição de 50% na resposta angiogénica ativada por FGF2; nenhum efeito foi ao invés exercido por PTX3(82-96).

Discussão

Os autores mostram que interação de FGF2 é mediada pela extensão N-terminal em PTX3. Também, ensaios desempenhados com neutralização de anticorpos monoclonais e peptídeos relacionados a PTX3 sintéticos identificam a sequência linear de aminoácido PTX3(97-110) como responsável por esta interação. Estas conclusões são com base nas seguintes evidências experimentais: i) as pentraxinas curtas CRP e SAP são aglutinantes de FGF2 ineficientes ¹⁷ a despeito de sua homologia de sequência com o C-terminal de PTX3⁷; ii) transdução retroviral do fragmento N-terminal PTX3(1-178) (N_{term}-PTX3), mas não de sC_{term}-PTX3, inibe a atividade mitogênica exercida por FGF2 exógeno em células endoteliais; iii) N_{term}-PTX3 recombinante, mas não C_{term}-PTX3, liga a FGF2 imobilizado e inibe interação de PTX3/FGF2; iv) o anticorpo monoclonal mAb-MNB4, mapeando o epítipo linear PTX3(87-99), previne interação de FGF2/PTX3 e abole o antagonista de atividade de FGF2 de PTX3 em células endoteliais; v) o peptídeo sintético PTX3(82-110) e os peptídeos menores PTX3(97-110), PTX3(97-107) e PTX3(100-104), mas não outros peptídeos com base em diferentes regiões do terminal de N de PTX3, previnem interação de FGF2/PTX3 por ligação de FGF2, desta forma inibindo proliferação de célula endotelial dependente de FGF2 *in vitro* e angiogênese *in vivo*.

PTX3 é produzida por macrófagos²⁷, fibroblastos⁹, mioblastos ²⁸, microglia²⁹, e células endoteliais⁸, indicando que ela pode exercer funções parácrinas e autócrinas no endotélio. Similarmente, vários estímulos, inclu-ndo os mediadores inflamatórios IL-1 e óxido nítrico induzem expressão de FGF2 em células endoteliais que sofrem uma alça autócrina de estimulação. Desta forma, células endoteliais e outros tipos de célula podem expressar ambos PTX3 e FGF2. Desta forma, PTX3 produzida por

células inflamatórias ou pelas próprias células endoteliais pode afetar a atividade autócrina e parácrina exercida por FGF2 em endotélio *in vitro* e *in vivo*. Isto deve permitir uma fina modulação de neovascularização por meio da produção de ambos inibidores e estimuladores de angiogênese.

FGF2 é um fator de desenvolvimento pleiotrópico que estimula vários tipos de célula de origem endodérmica e mesodérmica³². Por esse motivo, o papel exercido por FGF2 em várias condições patofisiológicas não é limitado a sua atividade angiogénica. Por exemplo, FGF2 estimula a migração e proliferação de fibroblastos durante cicatrização de ferimento e de células de músculo liso durante aterosclerose^{33,34} e restenose³⁵. Também, ele pode favorecer sobrevivência celular neuronal e proliferação celular glial no sistema nervoso central lesionado³⁶. Em todas estas condições, a produção concomitante de PTX3^{37,38} modula a atividade exercida por FGF2 nestas células. Realmente, PTX3 inibe ativação de célula de músculo liso dependente de FGF2 *in vitro* e espessamento da íntima depois de lesão arterial *in vivo*⁸.

Em conclusão, os autores demonstram pela primeira vez que terminal de N de PTX3 é envolvido em interação de FGF2. PTX3 é um recetor de reconhecimento padrão solúvel multifuncional nas estradas transversais entre imunidade inata, inflamação, deposição de matriz, e fertilidade feminina. Ela exerce sua atividade multifuncional por interação com numerosos ligantes com propriedades moleculares distintas.

REFERÊNCIAS

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 DM, Whitehead AS. 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 MB, Baltz ML. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. *Adv Immunol.* 1983; 34:141-212.
4. Du Cios TW. The interaction of C-reactive protein and serum amyloid P component with nuclear antigens. *MolBiol Rep.* 1996; 23:253-260.
5. Gewurz H, Zhang XH, Lint TF. Structure and function of the pentraxins. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7:54-64.
6. Nauta AJ, Daha MR, 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 AR, Cardozo T, Abagyan R, Altmeyer A, Wisniewski HG, 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 EM, 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 GW, Lee TH, Vilcek J. TSG-14, a tumor necrosis

factor-and IL-1-inducible protein, is a novel member of the pentaxin family of acute phase proteins. J Immunol. 1993;150:1804-1812.

10. Bottazzi B, Vouret-Craviari V, Bastone A, De Gioia L, Matteucci C, Peri G, Spreafico F, Pausa M, D'Ettorre C, Gianazza E, Tagliabue A, Sal-mona 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 DJ, Day AJ, Siracusa G, Romani L, Mantovani A. PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in 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 Vasc 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, Iacuitti G, Signorini S, Avanzini F, Pizzetti Maggioni AP, Moccetti T, Metra M, Cas LD, Ghezzi P, Sipe JD, Re 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.
20. Grinspan JB, Mueller SN, Levine EM. Bovine endothelial cells transformed in vitro by benzo(a)pyrene.

J Cell Physiol. 1983; 114:328-338.

21. Presta M, Maier JA, 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.

22. Frank R, Overwin H. SPOT synthesis. Epitope analysis with arrays of synthetic peptides prepared on cellulose membranes. Methods Mol Biol. 1996; 66: 149-169.

23. 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.

24. Emsley J, White HE, O'Hara BP, Oliva G, Srinivasan N, Tickle IJ, Blundell TL, Pepys MB, Wood SP. Structure of pentameric human serum amyloid P component. Nature. 1994; 367:338-345.

25. Eriksson AE, Cousens LS, Weaver LH, Matthews BW. Three-dimensional structure of human basic fibroblast growth factor. Proc.Natl.Acad.Sci. U.S.A. 1991; 88:3441-3445.

26. 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.

27. Introna M, Alies W, Castellano M, Picardi G, De Gioia L, Bottazzai B, Peri G, Breviario F, Salmona M, De Gregorio L, Dragani TA, Srinivasan N, Blundell TL, Hamilton TA, Mantovani A. Cloning of mouse ptx3, a new member of the pentraxin gene family expressed at

extrahepatic sites. *Blood*. 1996; 87:1862-1872.

28. 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.

29. Samaniego F, Markham PD, Gendelman R, Gallo RC, Ensoli B. In-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.

30. Ziche M, Parenti A, Ledda F, Dell'Era P, Granger HJ, Maggi CA, Presta M. Nitric oxide promotes proliferation and plasminogen activator production by coronary venular endothelium through endogenous bFGF. *Circ Res*. 1997;80:845-852.

31. Rifkin DB, Moscatelli D. Recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. 1989;109:1-6.

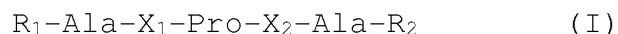
32. Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M. T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91 :2890-2894.

34. Peoples GE, Blotnick S, Takahashi K, Freeman MR, Klagsbrun M, Eberlein TJ. 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 U S A*. 1995; 92:6547-6551.

35. Reidy MA, 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 Sei*. 1993;14:337-342.
37. Ravizza T, Moneta D, Bottazzi B, Peri G, Garlanda C, Hirsch E, Richards GJ, 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 MS, Zimmer S, Bottazzi B, Garlanda C, Mantovani A, Hansson GK. Production of the long pentraxin PTX3 in advanced atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22: e 10-14.

REIVINDICAÇÕES

1. Peptídeo de ligação de FGF2, de fórmula I:



em que:

X₁ é um aminoácido selecionado entre Arg e Lys;
X₂ é um aminoácido selecionado entre Cys e Thr;
R₁ está ausente ou consiste na sequência de aminoácido selecionado a partir de SEQ ID N9: 1 e SEQ ID N9: 3;
R₂ está ausente ou consiste na sequência de aminoácido selecionado a partir de SEQ ID N9: 2 e SEQ ID Ne: 4, com as seguintes condições: quando R₁ está ausente, também R₂ está ausente; quando R₁ é a sequência de aminoácido de SEQ ID Ng: 1, R₂ é a sequência de aminoácido de SEQ ID N9: 2; quando R₁ é a sequência de aminoácido de SEQ ID N9: 3, R₂ é uma sequência de aminoácido selecionada entre SEQ ID N9: 2 e SEQ ID N9: 4; um precursor ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos.

2. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1, em que X₁ é Arg.
3. Peptídeo de acordo com a reivindicação 1 ou 2, em que X₂ é Cys.
4. Peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a em que consiste na sequência de aminoácido selecionada entre SEQ ID N9: 5, SEQ ID N9: 6, SEQ ID NQ: 7 e SEQ ID N9: 10.

5. Molécula de ácido nucleico, que codifica o peptídeo de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores ou hibridiza com o ácido nucleico acima, ou inclui uma sequência degenerada dos mesmos.
6. Vetor de expressão, em que compreende a molécula de ácido nucleico de acordo com a reivindicação 5.
7. Célula hospedeira transformada com o vetor de expressão de acordo com a reivindicação 6.
8. Célula hospedeira de acordo com a reivindicação 7, em que o peptídeo é secretado ou expresso na superfície de membrana da célula.
9. Peptídeo das reivindicações 1 a 4, em que é usado como um medicamento.
10. Peptídeo das reivindicações 1 a 4 para ser usado contra uma doença conduzida aproximadamente por uma angiogênese alterada.
11. Peptídeo de acordo com a reivindicação 10, em que a angiogênese alterada é provocada por uma ativação alterada do fator de desenvolvimento FGF2.
12. Peptídeo de acordo com a reivindicação 10 ou 11, em que a doença é selecionada do grupo consistindo em doença artrítica, metástase de tumor, retinopatia diabética, psoríase, inflamação crônica, arteriosclerose ou tumor.
13. Peptídeo de acordo com a reivindicação 12, em que o tumor é selecionado do grupo de: sarcoma, carcinoma, carcinoide, tumor ósseo ou tumor neuro endócrino.

14. Peptídeo das reivindicações da 1 à 4 que é usado contra a doença associada com proliferação dependente de FGF2 não controlada de fibroblastos ou células musculares lisas, cicatrização ligada a resposta fibroblástica excessiva, e restenose depois da angioplástica.

15. Composição farmacêutica, que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz do peptídeo como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 4 e diluentes e/ou excipientes e/ou adjuvantes adequados.

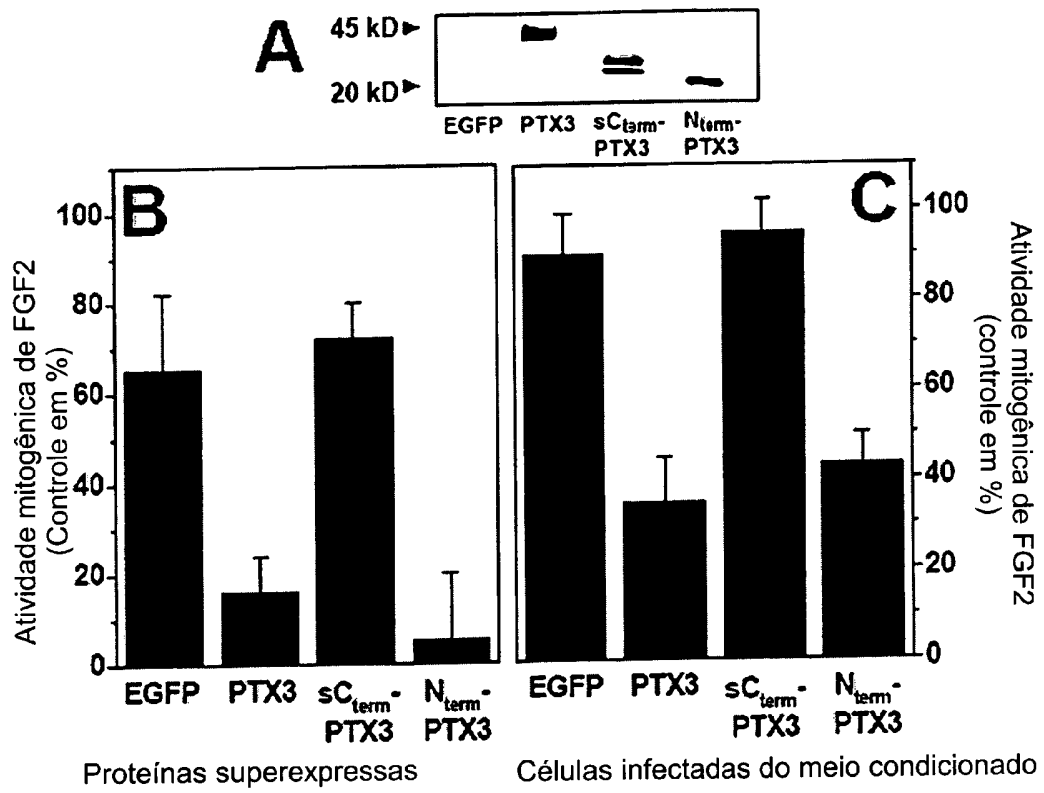


FIG. 1

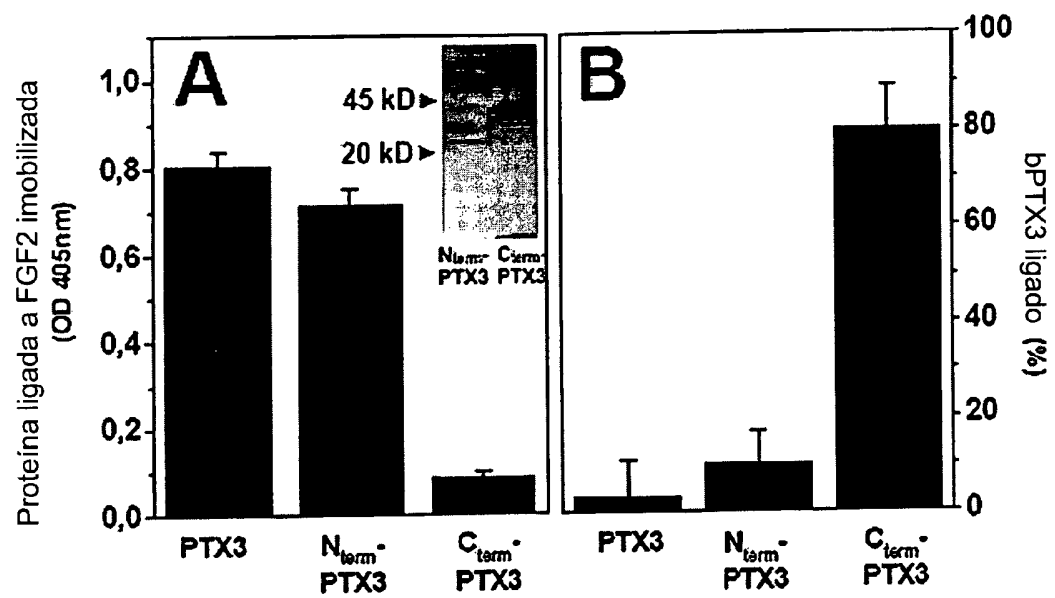


FIG. 2

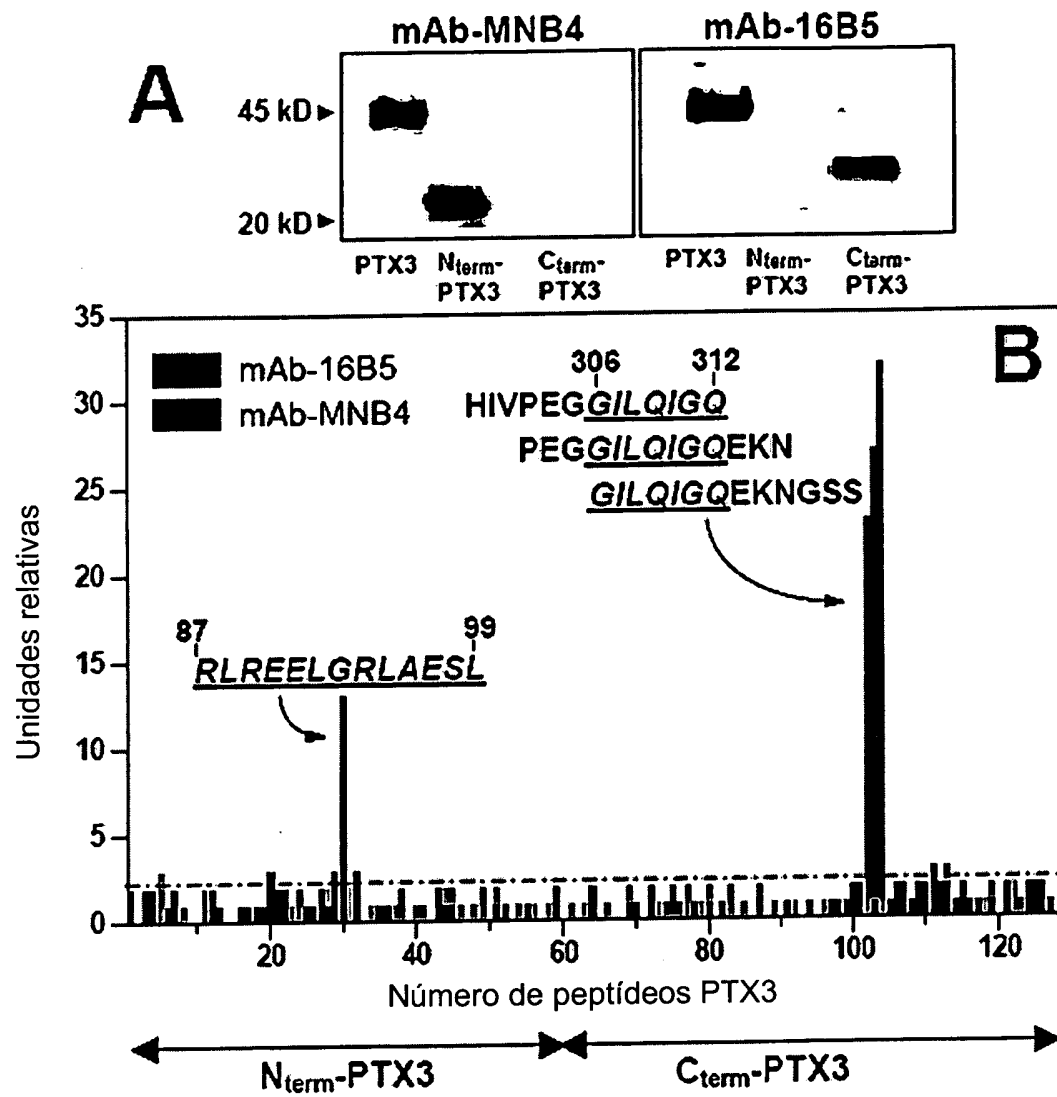


FIG. 3

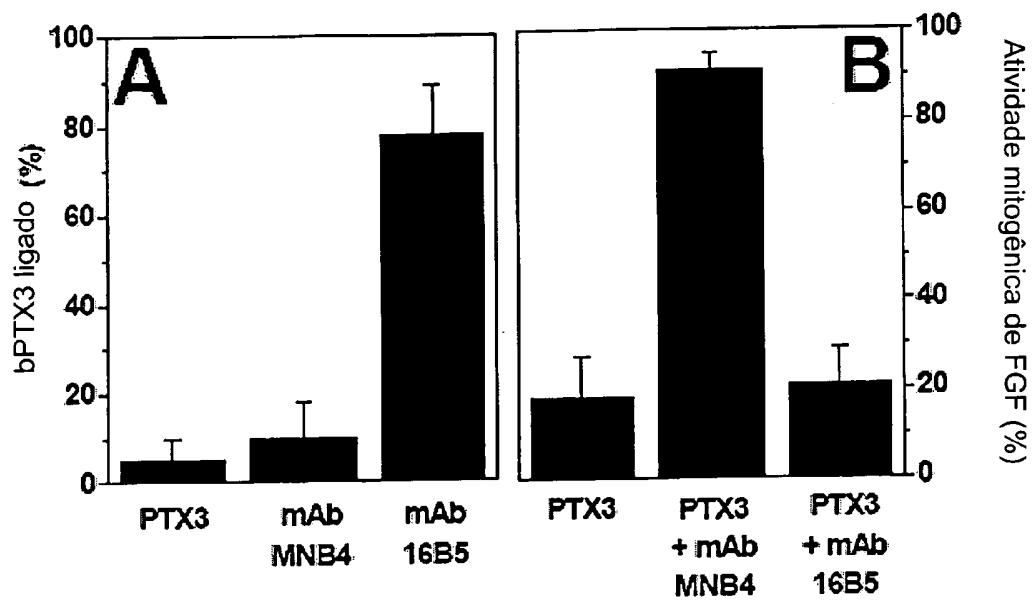


FIG. 4

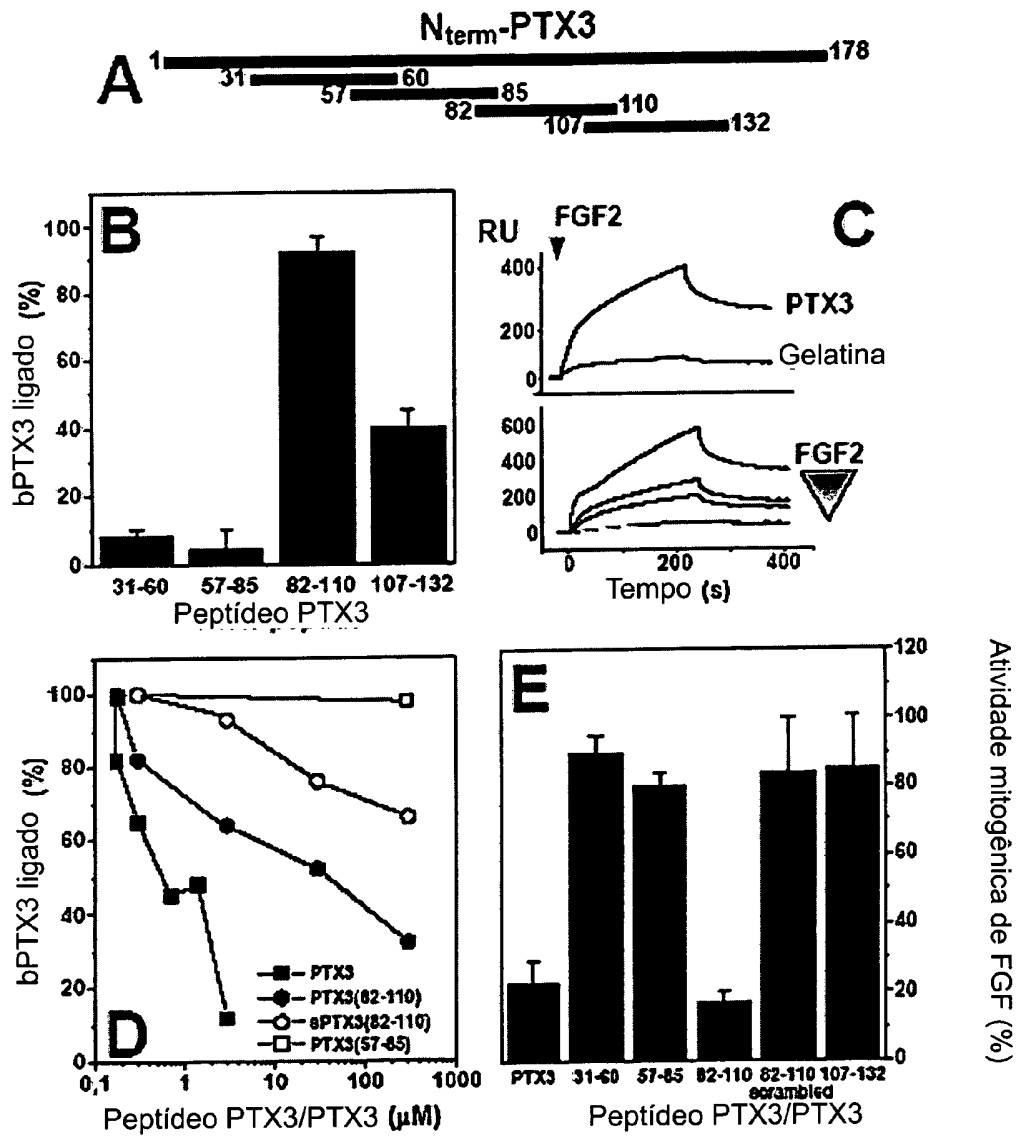


FIG. 5

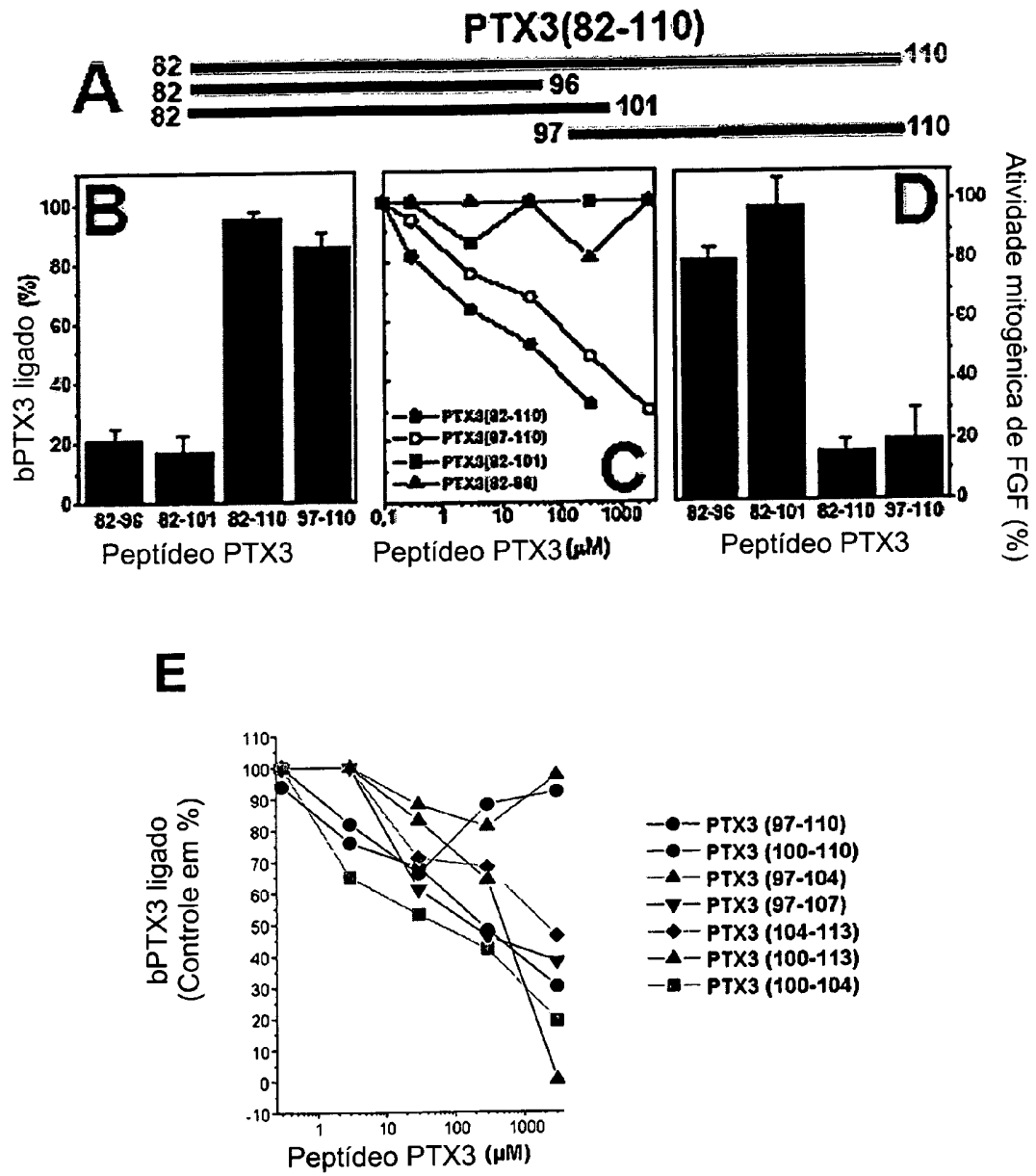


FIG. 6

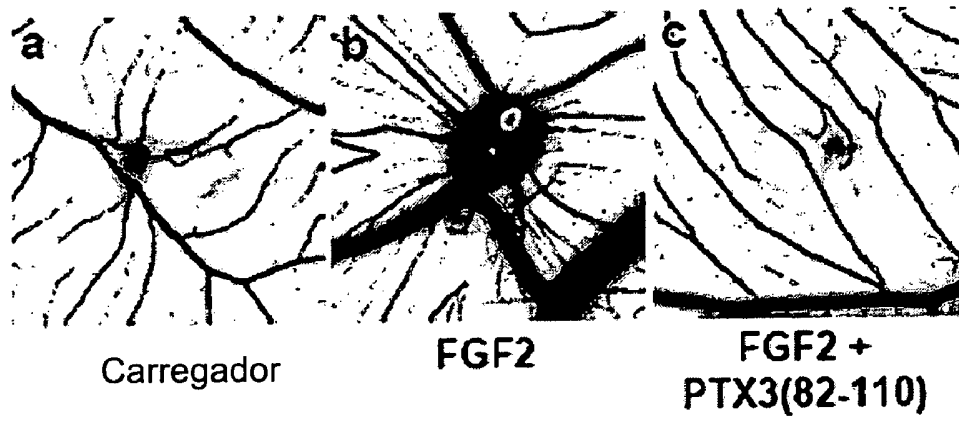


FIG. 7