



УКРАЇНА

(19) UA (11) 75865 (13) C2
(51) МПК
A61K 38/36 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСТОСУВАННЯ АНТАГОНІСТА ФАКТОРА ТКАННИНИ FVII АБО FVIIa ДЛЯ ОДЕРЖАННЯ ЛІКАРСЬКОГО ЗАСОБУ ДЛЯ ТЕРАПЕВТИЧНОГО ЛІКУВАННЯ ПАТОЛОГІЧНИХ СТАНІВ, ЯКІ ПОВ'ЯЗАНІ З МІГРАЦІЄЮ КЛІТИН АБО ХЕМОТАКСИСОМ

1

(21) 2002010325
(22) 14.07.2000
(24) 15.06.2006
(86) PCT/DK00/00401, 14.07.2000
(31) PA 1999 01023
(32) 14.07.1999
(33) DK
(31) 60/148,300
(32) 11.08.1999
(33) US
(31) PA 1999 01117
(32) 12.08.1999
(33) DK
(46) 15.06.2006, Бюл. № 6, 2006 р.
(72) Езбан Мірелла, DK, Петерсен Ларс Крістіан, DK, Сегбан Агнета, SE
(73) НОВО НОРДІСК ХЕЛС КЕА АГ, СН
(56) WO 9733995 A2, 18.10.1997.
(57) 1. Застосування агоніста фактора тканини, що індукує трансдукцію сигналу шляхом прямого зв'я-

2

зування з TF, де зазначений агоніст фактора тканини являє собою FVII або FVIIa, або їх комбінацію, для одержання лікарського засобу для терапевтичного лікування патологічних станів, що можуть бути пов'язані з міграцією клітин або які можна лікувати специфічним регулюванням міграції клітин або хемотаксисом, причому патологічні стани вибрані зі списку, який включає атеросклероз, метастаз пухлини, ріст пухлини, інвазію пухлини, метастазування, ангіогенез, загоєння ран, включаючи регенерацію стінок судин, опіки та запалення.

2. Застосування за п.1, яке відрізняється тим, що клітина являє собою клітину людини, яка експресує фактор тканини, включаючи фібробласти, клітини гладенького м'яза, клітини пухлин, кровотворні клітини, моноцити, макрофаги та епітеліальні клітини.

Було описано нову клітинорегулюючу активність фактора коагуляції VII (FVII) або антагоніста фактора тканини, наприклад, інактивованого фактора коагуляції VIIa (FVIIa) клітин, які експресують фактор тканини (TF). Даний винахід стосується способу регулювання міграції клітин або хемотаксису шляхом контактування клітини з FVIIa або іншим агоністом TF, або FVIIa або іншим антагоністом TF та визначення міграції вищезгаданої клітини. Винахід також стосується застосування FVIIa або іншого агоніста TF, або FVIIa або іншого антагоніста TF для одержання медикаменту для регулювання міграції клітин у пацієнта. Крім того, даний винахід стосується способу лікування та способу виявлення активності сполук, зокрема випробуваних ліків, які взаємодіють з міграцією клітин.

Зовнішній шлях коагуляції крові починає діяти, коли FVIIa, що циркулює у плазмі, зв'язується зі складовим білком мембрани, фактором тканини (TF). Ролі TF у коагуляції крові присвячено багато

досліджень. Вважається, що участь FVIIa як протеолітичного ферменту у послідовності коагуляції крові обмежується позаклітинним шаром клітин, які експресують TF. Про внутрішньоклітинну активність FVIIa, насамперед, ішлося, коли послідовність TF виявляла гомологію з надродиною цитокінових/інтерферонових або кровотворних рецепторів. Підклас I родини кровотворних рецепторів включає рецептори для гормону росту, пролактину, інтерлейкіни з 1 по 7, фактори стимулювання колоній гранулоцитів-макрофагів, еритропоетин та тромбопоетин. Підклас II включає TF та рецептори для інтерферону а та b.

Подібність TF до цього класу рецепторів також підтверджувалася виглядом кристалічної структури. Характерним для цього класу цитокінових рецепторів, який включає рецептори для інтерферону b та g і IL-10, є те, що їх активація веде до швидкого тирозинового фосфорилування самих рецепторів, а також підгрупи внутрішньоклітинних білків. Через кілька хвилин після первинного тиро-

(13) C2

(11) 75865

(19) UA

зинового фосфорилювання активується сукупність активованих мітогеном (Ser/Thr) кіназ (MAPK). Ці кінази розташовані в кількох паралельних сигнальних шляхах. Ретельні дослідження потенційної здатності FVIIa до внутрішньоклітинного сигналізування показали, що він викликає мобілізацію внутрішньоклітинного вільного кальцію (Ca^{2+}) в лінії клітин карциноми сечового міхура людини, J82, яка визначальним чином експресує TF, та в ендотеліальних клітинах пупкової вени, які було попередньо оброблено інтерлейкіном-1 для експресії TF, але не виявляє ніякої цитокіноподібної активації внутрішньоклітинних тирозинкіназ. Було зроблено висновок, що FVIIa, залежно від TF, викликає мобілізацію внутрішньоклітинного Ca^{2+} через активацію фосфоліпази C. Механізм, за допомогою якого FVIIa активує фосфоліпазу C, є невідомим, але активація тирозинкінази однозначно виключається.

Останні повідомлення з багатьох лабораторій свідчать, що TF може впливати на кілька важливих біологічних функцій, крім коагуляції, таких як ангіогенез, васкуляризація ембріонів та метастаз пухлин. Однак нині залишається нез'ясованою роль TF у цих біологічних процесах. Позаклітинний домен TF складається з двох модулів на зразок фібронектину III типу, як у типовому позаклітинному домені цитокінового рецептора II класу, завдяки чому існує ймовірність того, що TF може відігравати роль у трансдукції сигналу, первинній функції цитокінового рецептора. Однак TF має дуже короткий цитоплазматичний домен (довжиною лише в 21 амінокислотний залишок) і не має наближених до мембрани мотивів, які опосередковують зв'язування нерепторних Янус-кіназ (Jaks) які є важливими для сигналу цитокінового рецептора. Незважаючи на це, кілька біохімічних відкриттів вказують на функцію трансдукції сигналу для TF. Аналіз білкової послідовності TF людини вказує на можливий сайт фосфорилювання в цитоплазматичному домені, який зберігається в TF мишей, щурів та кролів. Характерні серинові залишки у цитоплазматичному хвості TF фосфорилюються в клітинах після стимуляції активатором протеїнкінази C. Цитоплазматичний хвіст TF людини фосфорилюється *in vitro* в кількох місцях при інкубуванні з лізатами U87-MG-клітин. На можливу роль цитоплазматичного домену TF у трансдукції сигналу також вказують результати досліджень, які показали, що прометастатична функція TF критично залежить від цитоплазматичного домену TF. Крім того, показано, що цитоплазматичний домен TF взаємодіє з актинозв'язувальним білком 280 (ABP-280) та підтримує зв'язування та міграції клітин через залучення ABP-280 до TF-опосередкованих адгезійних контактів.

Однак було також виявлено, що TF бере участь у певних типах сигналу в клітинах як кофактор для фізіологічного ліганда FVIIa у позаклітинному сигналі через протеолітичний механізм. Наприклад, виявлено, що зв'язування FVIIa з поверхнею клітин TF викликає внутрішньоклітинну Ca^{2+} осциляцію в багатьох клітинах, які експресують TF, короточасне фосфорилювання тирозину в моноцитах, активацію MAP-кінази, зміни експресії гена у фібробластах та посилення експресії реце-

птора урокінази у клітинах пухлин. Каталітично неактивний FVIIa (FVIIai) не здатен викликати багато з сигнальних реакцій, від осциляції Ca^{2+} до активації MAP-кінази та відновлення генів, і, очевидно, каталітична активність FVIIa може бути необхідною хоча б для якоїсь опосередкованої TF-FVIIa трансдукції сигналу. Нині ще мало відомо про сигнальний(і) шлях(и), які викликаються протеолітично активним FVIIa, та про те, яким чином сигнали, викликані FVIIa, можуть брати участь в ангіогенезі та метастазі пухлин.

Для вивчення тимчасової програми транскрипції, яка лежить в основі викликаного FVIIa реакції, у даному дослідженні автори розглянули реакцію фібробластів людини на FVIIa, використавши мікромножину кДНК. Дані показали, що клітинна експресія кількох генів у фібробластах помітно змінювалася під дією FVIIa. Одним з таких генів є Cugb1, проміжний ранній ген, який викликається фактором росту, продукт якого сприяє адгезії клітин, посилює викликаний фактором росту синтез ДНК та стимулює міграцію клітин у фібробластах та ендотеліальних клітинах.

Даний винахід стосується застосування FVII та/або FVIIa та/або іншого агоніста TF та/або FVIIai та/або іншого антагоніста TF у терапевтичному лікуванні патологічних станів, які можуть бути пов'язані з міграцією клітин або які можна лікувати специфічним регулюванням міграції клітин або хемотаксису.

В іншому аспекті винахід стосується застосування FVII та/або FVII та/або іншого агоніста TF та/або FVIIai та/або іншого антагоніста TF у терапевтичному лікуванні патологічних станів, які можуть бути пов'язані з регулюванням експресії принаймні одного гена у клітині, наприклад, Cugb1-гена.

В іншому аспекті винахід стосується способу викликання або посилення міграції клітин, який включає етап контактування вищезгаданих клітин з агоністом фактора тканини.

В одному з варіантів втілення агоністом фактора тканини є FVII або FVIIa.

В іншому аспекті винахід стосується способу зниження або інгібування міграції клітин, який включає етап контактування клітини з антагоністом фактора тканини.

В одному з варіантів втілення антагоніст фактора тканини є модифікований FVII.

В одному з варіантів втілення клітина є клітиною людини, що експресує фактор тканини, включаючи фібробласти, клітини гладенького м'яза, клітини пухлин, кровотворні клітини та епітеліальні клітини.

В одному з варіантів втілення модифікований фактор VII вибирають з-поміж фактора VII, модифікованого

дансил-Phe-Pro-Arg-	
хлорметилкетонном,	дансил-Glu-Cly-Arg-
хлорметилкетонном,	дансил-Phe-Phe-Arg-
хлорметилкетонном,	Phe-Phe-Arg-
хлорметилкетонном,	дансил-D-Phe-Pro-Arg-
хлорметилкетонном,	дансил-D-Glu-Gly-Arg-
хлорметилкетонном,	дансил-D-Phe-Phe-Arg-
хлорметилкетонном	та D-Phe-Phe-Arg-
хлорметилкетонном.	

В іншому аспекті винахід стосується способу

викликання або прискорення загоєння ран у пацієнта, який включає введення вищезгаданому пацієнтові ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка включає фактор FVIIa або фактор FVII або інший агоніст фактора тканини чи їх комбінацію.

В іншому аспекті винахід стосується способу інгібування або зниження міграції клітин, інвазії, викликаній міграцією проліферації клітин або ангіогенезу у пацієнта, який має захворювання, пов'язане з небажаною міграцією клітин, інвазією, викликану міграцією проліферації клітин або ангіогенезом, який включає введення вищезгаданому пацієнтові ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка включає антагоніст фактора тканини.

В одному з варіантів втілення хвороба або стан є розвитком первинної пухлини, інвазією пухлини або метастазом.

В іншому аспекті винахід стосується застосування агоніста фактора тканини для одержання медикаменту для викликання або посилення міграції клітин.

В іншому аспекті винахід стосується застосування антагоніста фактора тканини для одержання медикаменту для зниження або інгібування міграції клітин.

В іншому аспекті винахід стосується способу регулювання експресії принаймні одного гена у клітині, який включає етап або контактування вищезгаданої клітини з агоністом фактора тканини, або контактування вищезгаданої клітини з антагоністом фактора тканини.

В одному з варіантів втілення ген є геном, що належить до родини CCN-генів.

В іншому варіанті втілення ген вибирають з групи, яка складається з Cyr61, CTGF, допамін-D2-рецептора, EST Incyte PD 395116 або P2U нуклеотидного рецептора.

В одному з варіантів втілення ген є Cyr61-геном.

В одному з варіантів втілення регулювання викликає або посилює експресію. В іншому варіанті втілення регулювання послаблює або інгібує експресію.

В одному з варіантів втілення FVII або FVIIa або інший агоніст фактора тканини викликає або посилює експресію гена, а модифікований FVII або інший антагоніст фактора тканини послаблює або інгібує експресію гена, наприклад, якщо ген є геном, що належить до родини CCN-генів, або ген вибрано з групи, яка складається з Cyr61, CTGF, допамін-D2-рецептора, EST Incyte PD 395116 або P2U нуклеотидного рецептора.

В іншому варіанті втілення FVII або FVIIa або інший агоніст фактора тканини послаблює або інгібує експресію гена, а модифікований FVII або інший антагоніст фактора тканини викликає чи посилює експресію гена, наприклад, якщо ген являє собою ESTPD674714.

Хворобливими станами, які можуть бути піддані лікуванню, є такі патологічні стани, як, наприклад, атеросклероз, ріст пухлин, інвазія пухлини, метастаз або ангіогенез. Іншими станами, які можуть бути піддані лікуванню, є, наприклад, загоєння ран, включаючи регенерацію стінок клітин та лікування опіків або запалень, або регулювання

міграції клітин *in vitro*, наприклад, ріст тканини.

ОПИС ФІГУР (fra 6011)

Фіг.1А та 1Б: Проточний цитометричний аналіз експресії TF у фібробластах (1А). Клітини забарвлювали або спряженим з моноклональним флуоресцеїнізотіоціанатом миші чи щура (FITC) антитілом миші проти IgG (незаповнена ділянка), яке застосовували як негативний контроль, або спряженим з моноклональним FITC антитілом проти фактора тканини (TF) (заповнена ділянка). На Фіг.1Б показано прокоагулянтну активність фібробластів. Фібробласти з експресією TF викликали 10-разове збільшення PCA порівняно з моноцитами без експресії TF.

Фіг.2А: Вплив FVIIa та FFR-FVIIa на викликаний PDGF-BB хемотаксис у фібробластах людини. ■ показує хемотаксичну реакцію фібробластів на різні концентрації PDGF-BB. Фібробласти, інкубовані з 100нМ FVIIa (●) або 100нМ FFR-FVIIa (○), мігрували до іншої концентрації PDGF-BB. Результати є середніми значеннями та SEM трьох окремих експериментів. Р-значення, менші за 0,05,* вважали статистично значущими (тест Ст'юдента).

Фіг.3 А-Г: Вплив різних концентрацій FVIIa або FFR-FVIIa на викликаний PDGF-BB хемотаксис у фібробластах. ■ показує міграцію фібробластів до інших концентрацій PDGF-BB. Клітини інкубували з 12,5(А), 25(Б), 50(В) та 100(Г)нМ FVIIa (●) або FFR-FVIIa (○) і піддавали аналізу у камері Бойдена з різними концентраціями PDGF-BB. Результати є середніми значеннями та SEM трьох різних експериментів. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ і *** $p < 0,001$ за тестом Ст'юдента.

Фіг.4А: Суміш трьох моноклональних антитіл проти TF блокує вплив FVIIa та FFR-FVIIa на викликаний PDGF-BB хемотаксис у фібробластах. ■ показує міграцію в напрямку PDGF-BB фібробластів без антитіл проти TF, (●) фібробласти попередньо інкубовані з антитілами проти TF та 100нМ FVIIa, та (○) фібробласти, попередньо інкубовані з антитілами проти TF та 100нМ FFR-FVIIa. Результати є середніми значеннями та SEM трьох окремих експериментів.

Фіг.5А та 5Б: Вплив FXa на хемотаксичну реакцію на PDGF-BB, викликану FVIIa. Фібробласти попередньо інкубували з 200нМ TAP (Фіг.5А) (■) або з 0,2-2мМ TAP (Фіг.5Б) (■) а потім з 100нМ FVIIa (○). TAP був присутній весь час протягом експериментів. Хемотаксис викликався різними концентраціями PDGF-BB (5А) та 0,1нг/мл PDGF-BB (5Б). Результати є середніми значеннями та SD двох окремих експериментів.

Фіг.6А: Вплив тромбіну на хемотаксичну реакцію на PDGF-BB, викликану FVIIa. Фібробласти попередньо інкубували з 5од./мл (остаточна концентрація) гірудину, а потім з 100нМ FVIIa. Гірудин був присутній весь час протягом експериментів. Хемотаксис викликався різними концентраціями PDGF-BB. ■ експериментів. Хемотаксис викликався різними концентраціями PDGF-BB. ■ показує клітини, інкубовані лише гірудином, та ● клітини з гірудином та FVIIa. Результати є середніми значеннями та SD двох окремих експериментів.

Фіг.7А: Вплив інгібування PI3'-кінази на хемотаксис у фібробластах, інкубованих з FVIIa. Клітини попередньо інкубували зі змінюваними концен-

траціями LY294002 протягом 30хв. при 37°C, а потім з 100нМ FVIIa (■) або без FVIIa (●). Інгібітор був присутній весь час протягом хемотаксичного аналізу. Хемотаксис викликався 0,1нг/мл PDGF-BB. Результати є середніми значеннями та SD двох окремих експериментів.

Фіг.8А та 8Б: Вплив інгібування PLC на хемотаксис у фібробластах, інкубованих з FVIIa. Клітини інкубували зі змінюваними концентраціями U73122 (активний інгібітор PLC) (8А) або U73343 (неактивний контроль) (8Б) протягом 30хв. при 37°C до інкубації з 100нМ FVIIa або без нього, а потім піддавали аналізу у камері Бойдена з градієнтом концентрації 0,1нг/мл PDGF-BB. Агенти були присутні весь час протягом експериментів. ■ показує клітини з U73122 або лише U73343, ● клітини з U73122 або U73343 та FVIIa. Результати є середніми значеннями та SD двох окремих експериментів.

Фіг.9: Вивільнення інозиттрифосфату (IP₃) з фібробластів, стимульованих FVIIa, лише FFR-FVIIa або у комбінації з PDGF-BB. Клітини мітили до наступного дня міо-[³H]-інозитом, інкубували з 100нМ FVIIa або FFR-FVIIa або без них за відсутності або у присутності 10нг/мл або 100нг/мл PDGF-BB. Клітини після цього піддавали аналізу на вивільнення в IP₃. Незаштрихованими стовпчиками показано клітини без FVIIa або FFR-FVIIa (контроль), заштрихованими стовпчиками показано клітини з FFR-FVIIa, і чорними стовпчиками показано клітини, інкубовані з FVIIa.

Фіг.10: Тирозинове фосфорилування PLC-γ1 у відповідь лише на PDGF-BB (контроль), FVIIa або FFR-FVIIa у комбінації з PDGF-BB. Клітини інкубували з 100нМ FVIIa або FFR-FVIIa протягом однієї години, а потім з PDGF-BB або без нього у зазначених концентраціях. Клітини піддавали лізису і тирозинове фосфорилування PLC-γ1 визначали, як описано для способів.

Фіг.1. Нозерн-блотинг на підтвердження даних, отриманих в аналізах з мікрмножиною кДНК. Десь г повної РНК (з тих самих зразків РНК, які використовували для виділення полі-(А)-РНК для утворення зондів для гібридизації мікрмножини кДНК) піддавали нозерн-блотингові й зондували ³²P-міченим Cyt61 (кДНК часткової довжини від Genomic Systems). Панель В. Сигнали гібридизації кількісно визначають за допомогою PhosphorImager (Molecular Dynamics).

Фіг.2 та 2Б. Викликана залежним від часу фактором VIIa експресія Cyt61. Нерухомі моношари WI-38 клітин обробляли фактором VIIa (5г/мл) (2А) або PDGF-BB (10нг/мл) (2Б) протягом різних періодів часу. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіоактивно міченим Cyt61. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано на нижній панелі як завантажувальний контроль РНК.

Фіг.3. Викликана залежним від дози фактором VIIa експресія Cyt61. Нерухомі моношари клітин WI-38 обробляли різними дозами фактора VIIa, 0, 0,1, 0,5, 2,0 та 5,0г/мл протягом 45хв. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіаційно міченим Cyt61. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано на нижній панелі як завантажувальний

контроль РНК.

Фіг.4. Каталітична активність фактора VIIa є необхідною для викликання експресії Cyt61. Нерухомі моношари WI-38 клітини обробляли контрольним середовищем без сироватки або середовищем без сироватки, що містило фактор VIIa (5г/мл) або інактивованим фактором VIIa активного сайту (VIIai, 5г/мл) протягом 45хв. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіоактивно міченим Cyt61. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано на нижній панелі як завантажувальний контроль РНК.

Фіг.5. Викликана фактором VIIa експресія Cyt61 не анулюється специфічними інгібіторами фактора Ха та тромбіну. Нерухомі моношари WI-38 клітин обробляли контрольним середовищем або середовищем, що містило фактор VIIa (5г/мл; 100нМ протягом 45хв. Клітини попередньо інкубували з 200нМ рекомбінантним ТАР, смуга 3) або гірудином (смуга 4) протягом 30хв. до піддання дії фактора VIIa протягом 45хв. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіаційно міченим Cyt61. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано на нижній панелі як завантажувальний контроль РНК.

Фіг.6. Вплив актиноміцину-D та циклогексिमиду на рівень викликаного фактором VIIa Cyt61 мРНК у стійкому стані. Нерухомі моношари WI-38-клітин попередньо інкубували з контрольним носієм, актиноміцином D (10г/мл) або циклогексимідом (10г/мл) протягом 30хв. до піддання клітин дії фактора VIIa (5г/мл) протягом 45хв. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіаційно міченим Cyt61. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано на нижній панелі як завантажувальний контроль РНК.

Фіг.7. Фактор VIIa викликає експресію CTGF.

Нерухомі моношари WI-38-клітин обробляли фактором VIIa (5г/мл) протягом різних періодів часу. Повну РНК (10г) піддавали нозерн-блотингові й зондували радіоактивно міченим CTGF. Забарвлення бромідом етидію 28S рибосомної РНК відповідної плями показано як завантажувальний контроль РНК.

Даний винахід стосується застосування FVII або FVIIa або іншого агоніста TF для одержання фармацевтичної композиції для викликання або посилення міграції клітин.

В іншому аспекті даний винахід стосується застосування FVII, FVIIa або іншого агоніста TF для одержання фармацевтичної композиції для викликання або прискорення загоєння ран або ангиогенезу.

У ще одному аспекті даний винахід стосується застосування FVIIai або іншого антагоніста TF для одержання фармацевтичної композиції для інгібування або запобігання міграції клітин.

В одному з варіантів втілення міграція клітин є предметом винаходу.

В іншому аспекті даний винахід стосується застосування FVIIai або іншого антагоніста TF для одержання фармацевтичної композиції для інгібування або запобігання ангиогенезові, метастазові, ростові пухлин або інвазії пухлини.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу викликання або посилення міграції клітин у пацієнта, який включає введення ефективної кількості FVII або FVIIa або іншого агоніста TF вищезгаданому пацієнтові.

У ще одному аспекті даний винахід стосується способу інгібування або запобігання міграції клітин у пацієнта, який включає введення ефективної кількості FVIIai або іншого антагоніста TF вищезгаданому пацієнтові.

У конкретному варіанті втілення ефективна кількість є денною дозою, яка становить приблизно від 5мг/кг/день до приблизно 500мг/кг/день.

В іншому варіанті втілення антагоніст TF включає модифікований FVIIa, наприклад, FFR-FVIIa.

Даний винахід забезпечує механізм активності FVII та/або FVIIa, який стосується стимуляції міграції клітин. Такий механізм пропонує запровадження залучення FVII та/або FVIIa у патологічних станах, у яких беруть участь клітини, що експресують TF, такі як ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини, фібробласти, клітини гладенького м'язу та моноцити/макрофаги. Винахід також пропонує основу для ідентифікації конкретних фармакологічних мішеней, які застосовують для терапевтичного втручання.

Таким чином, даний винахід стосується застосування FVII та/або FVIIa та/або FVIIai у терапевтичному лікуванні патологічних станів, які можуть стосуватися міграції клітин або виліковуватися специфічним регулюванням міграції клітин.

В іншому аспекті даний винахід стосується способу виявлення можливих ліків, що регулюють міграцію клітин, який включає

- а) культивування клітини, що експресує TF;
- б) вимірювання міграції клітини;
- в) інкубування клітини з випробуваними ліками

та

г) вимірювання міграції інкубованої клітини та визначення будь-якої зміни у рівні міграції порівняно з міграцією, вимірюваною на етапі (б), причому така зміна вказує на біологічну активність випробуваних ліків у вищезгаданій клітині.

Взагалі, компоненти крові, які беруть участь у так званому "каскаді" коагуляції, є проферментами або зимогенами, ферментативно неактивними білками, які перетворюються на протеолітичні ферменти під дією активатора, який сам є активованим фактором згортання. Фактори коагуляції, піддані такому перетворенню, мають загальну назву "активних факторів" і позначаються додаванням літери "а" до назви фактора коагуляції (наприклад, фактор VIIa).

Термін "цинковий комплексон" означає сполуку, яка зв'язується з фактором VIIa і викликає заміщення іонів кальцію на іони цинку у факторі VIIa, таким чином, інгібуючи активність фактора VIIa або комплексу фактор тканини-фактор VIIa (TF-FVIIa).

Придатним антагоністом TF згідно з винаходом може бути сполука, яка утворює комплекси з цинком, наприклад, дигідроксамат або дигідрозид з гідроксаматною або гідрозидною групами, розміщеними відносно одна одної в такій позиції, що вони здатні утворювати комплекс з іоном цинку. Сполука, яка утворює комплекси з цинком, діє у

комбінації з FVIIa. Іони Zn^{2+} справляють свою інгібіторну дію у конкуренції зі стимулюючим впливом іонів Ca^{2+} . Передбачається, що іони Zn^{2+} зміщують іони Ca^{2+} з одного або кількох місць зв'язування кальцію з FVIIa. Сполуки, які утворюють комплекси з цинком, наприклад, гідроксамати та гідрозиди, здатні діяти як потужні підтримувачі зв'язування іонів цинку у конкуренції з іонами кальцію. Специфічні сполуки, таким чином, посилюють інгібування цинком активності комплексу фактор VIIa/фактор тканини. Активність фактора VIIa у комплексі з фактором тканини може інгібуватися через механізм, у якому цинковий комплексон зв'язується з фактором VIIa і забезпечує заміщення Ca^{2+} на Zn^{2+} . Цим комплексон справляє модулюючий вплив на TF при нормальній концентрації вільних іонів Ca^{2+} та Zn^{2+} у крові.

Термін FVII" або "фактор VII" означає "однотанцюговий" (зимогенний) фактор коагуляції VII. Термін "Фактор VIIa" або "FVIIa" означає "дволанцюговий" активований фактор коагуляції VII, розщеплений шляхом специфічного розщеплення у пептидному зв'язку Arg152-Ile153. FVII та FVIIa очищують від крові або виробляють рекомбінантними способами. Зрозуміло, що практичне втілення описаних авторами способів не залежить від шляху отримання очищеного фактора VIIa, а отже, даний винахід можна вважати таким, що охоплює застосування будь-яких препаратів фактора VII або FVIIa, придатних для застосування. Перевагу віддають FVIIa людини. До FVII або FVIIa також належать варіанти FVII, у яких заміщено один або кілька амінокислотних залишків.

Термін "модифікований фактор VII", "інетивований FVN" або "FVIIai" означає FVIIa, який має принаймні одну модифікацію в його каталітичному центрі, яка значною мірою інгібує здатність модифікованого FVIIa до активації FX та FIX. Терміни можуть використовуватися переміжно. До таких модифікацій належать амінокислотне заміщення (або заміна) одного або кількох каталітичних тривалентних залишків Ser 344, Asp 142 та His 193, а також модифікація каталітичних тривалентних залишків інгібіторами серинпротеази, такими як орґанофосфорні сполуки, сульфанілфторид, пептидгалометилкетон або азапептид. FFR-FVIIa є одним з прикладів похідної FVIIai, яку одержують шляхом блокування активного центра FVIIa необоротним інгібітором,

D-фенілаланін-L-фенілаланін-L-арґінінін-хлорметилкетон (FFR смк). Іншими придатними похідними FVIIai є інетивовані FVIIa, одержані або одержувані шляхом блокування активного центра L-фенілаланін-L-фенілаланін-L-арґінінін-хлорметилкетон, дансил-L-фенілаланін-L-фенілаланін-L-арґінінін-хлорметилкетон, або дансил-D-фенілаланін-L-фенілаланін-L-арґінінін-хлорметилкетон, причому перевагу віддають FFR-FVIIa (FVIIa, інеитований FFR смк).

Термін "білкова кіназа" означає фермент, здатний фосфорилувати серин та/або треонін та/або тирозин у пептидах та/або білках.

Термін "випробувані ліки" означає будь-який зразок, який має біологічну функцію або справляє біологічний вплив на клітинну систему. Цей зразок може бути зразком біологічного матеріалу, такого

як мікробний або рослинний екстракт, або може бути зразком, який містить сполуку або суміш сполук, одержані шляхом органічного синтезу або генної інженерії.

Термін "агоніст TF" охоплює сполуки, які включають

- а) трансдукцію сигналу шляхом прямого зв'язування з TF (наприклад, FVIIa),
- б) стимуляцію MAPK-каскаду,
- с) відміну інгібування MAPK (наприклад, інгібіторів РТРази), агоністами яких є випробувані ліки, визначені вище.

Термін "Антагоніст TF" включає

- а) реагенти, які конкурують з FVIIa у зв'язуванні з TF без трансмісії, наприклад, FVIIai,
- б) реагенти, які зв'язуються з FVIIa і перешкоджають зв'язуванню з TF, наприклад, гідроксамат цинку,
- в) реагенти, які інгібують трансдукцію сигналу, перешкоджаючи елементам MAPK-каскаду,
- г) реагенти, які зв'язуються з FVIIa/TF і перешкоджають трансмісії,
- д) реагенти, які зв'язуються з FVIIa/TF/FX і перешкоджають трансмісії,
- е) реагенти, які блокують активацію фактора X людини, каталізовану комплексом фактор тканини/фактор VIIa,

антагоністами яких є випробувані ліки, визначені вище.

Термін "фармакологічні мішені" означає білок, який може змінювати міграцію клітин, що експресують TF.

Термін "ген-репортер" означає послідовність ДНК, яка, будучи транскрибованою, виробляє білок, який може бути виявлений.

Термін "елемент SRE-промотора" означає послідовність ДНК, яка зв'язується з факторами транскрипції, викликаними компонентами, присутніми у сироватці.

Термін "клітина, що експресує TF" означає будь-яку клітину ссавця, що експресує TF.

Термін "фосфорилування білка" означає фосфорилування серину та/або треоніну та/або тирозину у пептидах та/або білках.

Модуляцію або регулювання міграції клітин визначають як здатність FVIIa або іншого агоніста TF, або FVIIai або іншого антагоніста TF 1) збільшувати або зменшувати поточну, нормальну або аномальну міграцію клітин, 2) викликати нормальну міграцію клітин та 3) викликати аномальну міграцію клітин.

Модуляцію або регулювання експресії гена визначають як здатність FVIIa або іншого агоніста TF, або FVIIai або іншого антагоніста TF 1) збільшувати або зменшувати поточну, нормальну або аномальну міграцію клітин, 2) викликати нормальну міграцію клітин та 3) викликати аномальну міграцію клітин.

У цьому контексті термін "лікування" охоплює як профілактику негативного стану, так і регулювання вже існуючого стану з метою інгібування або мінімізації стану. Таким чином, профілактичне введення FVIIa або іншого агоніста TF, чи FVIIai або іншого антагоніста TF, охоплюється терміном "лікування".

У цьому контексті терміном "одна одиниця" ви-

значають кількість фактора VII, присутнього в 1мкл нормальної плазми, яка відповідає приблизно 0,5мг білка. Після активації 50 одиниць відповідають приблизно 1мкг білка.

У цьому контексті терміном "пацієнт" визначають будь-яку тварину, зокрема, ссавця, наприклад, людину. Термін "суб'єкт" застосовується переміжно з терміном "пацієнт".

Скорочення

TF	фактор тканини
FVII	фактор VII в його одноланцюговій, неактивованій формі
FVIIa	фактор VII в його активованій формі
RFVIIa	рекомбінантний фактор VII в його активованій формі
FVIIai	модифікований (інактивований) фактор VII
FFR-FVIIai	фактор VII, інактивований шляхом реакції з D-Phe-L-Phe-L-Arg-хлорметилкетон

Фактор тканини (TF) є клітинним рецептором для фактора FVIIa (FVIIa), і комплекс є основним ініціатором коагуляції крові. Авторами було досліджено вплив зв'язування FVIIa зв'язування з TF на міграцію клітин та трансдукцію сигналу фібробластів людини, що експресують велику кількість TF. Фібробласти, інкубовані з FVIIa, мігрували до градієнта концентрації PDGF-BB при концентрації, приблизно у сто разів нижчій, ніж потрібна для фібробластів, не зшитих з FVIIa. Антитіла проти TF інгібували збільшення хемотаксису, викликане FVIIa/TF. Крім того, з інгібуванням в активній ділянці FVIIa (FFR-FVIIa) спостерігали помітне пригнічення хемотаксису, викликаного PDGF-BB. Виключалася можливість викликання гіперхемотаксису утворенням FXa та активністю тромбіну.

FVIIa викликав вироблення інозит-1,4,5-трифосфату тією ж мірою, що й PDGF-BB; вплив FVIIa та PDGF-BB був додатковим. FFR-FVIIa не викликав ніякого вивільнення інозит-1,4,5-трифосфату. Реакція міграції клітин до PDGF-BB та FVIIa повністю блокувалася інгібітором PLC, що вказувало на те, що активація PLC є важливою для реакції. Таким чином, зв'язування FVIIa з TF, незалежно від коагуляції, може модулювати клітинні реакції, такі як хемотаксис, і каталітична активність FVIIa є необхідною.

Вважають, що TF виконує свою функцію у метастазі клітин пухлин, але її механізм ще не відомий. Однак у зовсім новій роботі (Ott et al.) було розпізнано актинозв'язувальний білок 280 (ABP-280) як ліганд для цитоплазматичного домену TF, який забезпечує молекулярний шлях, яким TF може підтримувати метастаз клітин пухлин. Однак молекулярні сигнали та біологічні функції, перетворені FVIIa/TF, і досі є мало зрозумілими.

Фібробласти людини мають конститутивну експресію TF. Ці клітини також експресують рецептори для тромбоцитарного фактора росту (PDGF). PDGF викликає у клітинах-мішенях мітогенність, реорганізацію актинів та спрямовану міграцію клітин (хемотаксис). Раніше авторами було продемонстровано, що PDGF-BB є ефективним хемотаксичним фактором для фібробластів людини, і що хемотаксична реакція опосередковується класом β -рецепторів. Таким чином, ці клітини було вибра-

но для дослідження ймовірної трансдукції сигналу та міграції клітин, викликаних зв'язуванням FVIIa з TF.

Нижче авторами вперше демонструється чіткий взаємозв'язок між сигналом, викликаним зв'язуванням FVIIa з TF та клітинною реакцією на фактор росту. Авторами представлено дані, згідно з якими у фібробластах людини комплекс FVIIa/TF веде до гіперхемотаксичної реакції на PDGF-BB. Крім того, інгібований в активній ділянці FVIIa (FFR-FVIIa) залежно від дози пригнічує спрямовану міграцію до PDGF-BB. Шляхом застосування специфічних інгібіторів до PLC та фосфатидилінозит-3'-кінази (PI3'-кінази) також демонструється, що гіперхемотаксична реакція на PDGF-BB, викликана сигналом FVIIa/TF, залежить від активності фосфоліпази C (PLC), але не залежить від PI3'-кінази. FVIIa та PDGF-BB викликали вироблення інозит-1,4,5-трифосфату (IP₃), одного з других посередників, вивільнених після активації PLC, адитивним шляхом.

TF конститутивно експресується на плазматичній мембрані багатьох позасудинних клітин, таких як фібробласти стромы у судинній адвентиції та в фіброзних капсулах печінки, селезінки та нирок. Таким чином, експресія TF виявляється у місцях, які є фізично відокремленими від циркулюючої крові і забезпечують кровоспинну оболонку. Очевидно, у разі поранення цей бар'єр захищає організм від кровотечі. Однак TF може індукуватися у моноцитах/макрофагах, судинних клітинах гладенького м'яза, ендотеліальних клітинах та у багатьох клітинах пухлин різними агентами, включаючи цитокіни та фактори росту. Індукція на транскрипційному рівні швидко відбувається після стимуляції, вказуючи на TF як на пов'язаний з ростом безпосередній ранній ген.

У даному дослідженні автори вивчали роль TF як сигнального рецептора. Було показано, що фібробласти людини з конститутивною експресією TF після зшивання FVIIa мігрують до найнижчої концентрації PDGF-BB. Лише TF/FVIIa не викликає підвищення спонтанної міграції, тобто безладної міграції. Таким чином, комбінація внутрішньоклітинної трансдукції сигналу через FVIIa/TF та фактора росту PDGF-BB була необхідною для досягнення реакції рухливості. Обов'язковим є не лише зв'язування з TF, але й каталітична активність TF/FVIIa, оскільки інгібований в активній ділянці FVIIa не викликає реакції міграції. Крім того, інгібіторні моноклональні антитіла перешкоджали посиленню хемотаксичної реакції з боку FVIIa. Авторами також виключили можливість непрямого сигналу через FXa або тромбін, оскільки TAP та гірудин не мають впливу на викликаний FVIIa/TF хемотаксис. Натомість авторами було виявлено, що підвищення концентрації FFR-FVIIa активно інгібує викликаний PDGF-BB хемотаксис. Фібробласти, інкубовані з FFR-FVIIa, демонстрували повністю нормальну безладну міграцію. Інгібіторний вплив FFR-FVIIa на викликаний PDGF-BB хемотаксис не спостерігався у присутності комбінації антитіла проти TF, таким чином, виключаючи ймовірність токсичності FFR-FVIIa. Результати свідчать, що не клітини, які експресують PDGF β-рецептори та TF, а скоріше комплекс FVIIa/TF є важливим

для хемотаксичної реакції на PDGF-BB.

Виявлений авторами факт того, що FVIIa збільшує вироблення IP₃, та раніше отримані дані щодо викликаного FVIIa/TF осциляції Ca²⁺, зокрема, у клітинах MDCK, є надійним підтвердженням ідеї, згідно з якою PLC активується сигналом FVIIa/TF у багатьох клітинах. До того ж, гіперхемотаксична реакція у фібробластах людини на PDGF-BB, викликана FVIIa/TF, блокувалася залежно від дози інгібітором PLC. Раніше авторами було виявлено подібну гіперхемотаксичну реакцію на PDGF-BB у мутантних клітинах PDGF β-рецептора Y934F, які виявляли підвищення фосфорилювання та активацію PLC-γ1. У цих клітинах підвищене фосфорилювання PLC-γ1 співвідносилось з утричі вищим виробленням IP₃ порівняно з експресуючими PDGF β клітинами дикого типу. Комбінація FVIIa/TF та PDGF-BB викликала приблизно подвійне підвищення вироблення IP₃ у фібробластах людини. Однак викликане FVIIa/TF вироблення IP₃ не співвідносилось з фосфорилюванням PLC-γ1. Тирозинове фосфорилювання PLC-γ2, викликане FVIIa/TF не можна виключати, але воно є малоімовірним, оскільки експресія PLC-γ2 у фібробластах людини є дуже низькою. Крім того, внутрішньоклітинна частина TF не має власної активності тирозинкінази білка. Ці результати вказують на те, що FVIIa/TF викликає активацію β та/або δ PLC ізомерів. В аналізі вивільнення IP₃ середовище культури клітин доповнювали 0,1% FBS, що містила лише приблизно 0,1нМ FXa. Авторами було виявлено, що для викликання вироблення IP₃ є необхідною концентрація понад 20нМ FXa. Механізм, через який активуються β або δ PLC ізомери, залишається нез'ясованим. Можливо, активація пов'язана з взаємодією між TF та домішковим білком мембрани.

Останнім часом було ідентифіковано зв'язок TF з цитоскелетом. Було продемонстровано молекулярну взаємодію між цитоплазматичним доменом TF та філаміновим білком ABP 280, що зв'язує актин. Крім того, було виявлено, що TF перебуває у тісному контакті з актином та філаміновими білками, що зв'язують актин, такими як α-актинін та ABP280 у ламеллоподіях та гофрованих ділянках мембрани у поширенні епітеліальних клітин. ABP 280, член підроддини філамінів, є необхідним для нормального функціонування ламеллоподій, а отже, дуже важливим для рухливості клітин. PI3'-кіназа та PLC ізоферменти беруть участь у хемотаксичних реакціях, таких як мобілізація актинов'язувальних білків. У попередніх дослідженнях автори спостерігали, що шлях PI3'-кінази у викликаному PDGF-β рецептором хемотаксисі, очевидно, є менш важливим у клітинах з надмірною експресією та підвищеною активністю PLC-γ1. Це також стосувалося клітин з FVIIa, зв'язаним із TF. Це свідчить про те, що величина активації PI3'-кінази та PLC ізоферментів визначає, який з цих шляхів домінуватиме. Зведені до купи, ці дані авторів показують, що міграція клітин є важливою морфогенною функцією, викликану сигналом FVIIa/TF.

Хемотаксис відіграє вирішальну роль у загоєнні ран, ангіогенезі та метастазі. Хемотаксис також є важливим компонентом у утворенні атеро-

склеротичних бляшок. У цих процесах різні клітини експресують TF, а також PDGF та рецептори PDGF.

Рестеноз є основним ускладненням, яке трапляється після процедури втручання в непрохідні артерії. PDGF бере участь у реакції стінок судин (утворенні неоінтими) на механічне пошкодження, опосередковуючи міграцію та проліферацію клітин гладенького м'яза та фібробластів. Авторами було вперше продемонстровано, що FVIIa, який зв'язується з експресуючими TF клітинами виявляє підвищену хемотаксичну реакцію на PDGF, яка є незалежною від коагуляції.

На даний час мало що відомо про сигнальні шляхи, викликані протеолітично активним VIIa, та про те, яким чином сигнали, викликані VIIa, можуть брати участь у клітинних процесах. Можливо, FVIIa здатен викликати експресію регуляторів росту, які діють нижче для викликання клітинних процесів. Для дослідження цієї можливості у даній роботі авторами вивчалися зміни у транскрипційній програмі у фібробластах людини у відповідь на піддання дії VIIa з застосуванням мікрочножини кДНК, що містять понад 8000 окремих генів людини. Авторами було вибрано фібробласти, оскільки ці клітини зазвичай контактують із сироваткою, що містить фактори росту та активовані фактори згорання у зв'язку з пошкодженням судин через фізичні (наприклад, хірургію) та патофізіологічні умови. Тимчасова програма експресії гена, яку спостерігали в реакції на сироватку, свідчить про те, що фібробласти є запрограмованими на сприйняття різкої дії сироватки не як загального мітогенного подразника, а як специфічного фізіологічного сигналу. Характеризація транскрипційної активації у реакції на сироватку та фактори росту також свідчить про те, що фібробласти є активними учасниками діалогу між різними клітинами, які разом контролюють запалення, ангіогенез та загоєння ран.

Аналіз мікрочножини кДНК з мРНК, виділеною з фібробластів, підданих дії VIIa протягом 90хв., виявляє підвищуювальну регуляцію Cug61. Нозерн-блотинг підтверджував викликану VIIa експресію Cug61 у фібробластах. Хоча й не так сильно, як у фібробластах, VIIa також посилює експресію Cug61 у судинних клітинах гладенького м'яза. Викликання експресії Cug61 залежить від каталітичної активності FVIIa, оскільки FVIIa не здатен викликати експресію Cug61. Хоча фактор Ха та тромбін також можуть викликати експресію Cug61 (дані показано), ці сполуки не беруть участі у викликаній FVIIa експресії Cug61. Авторами не було виявлено жодних доказів утворення слідів фактора Ха та тромбіну в даній експериментальній системі. Крім того, специфічний інгібітор фактора Ха та тромбіну не мали значного впливу на викликану FVIIa експресію Cug61.

Cug61 є безпосереднім раннім геном, який транскрипційно активується факторами росту сироватки у фібробластах. Він кодує багатий на цистеїн гепарин-зв'язаний білок масою 40кДа, який асоціюється з позаклітинним матриксом та поверхнями клітин. Cug61 належить до родини виникаючих генів збережених та модулярних білків, яка характеризується присутністю N-кінцевого секреторного сигналу, за яким ідуть чотири модулярні

структурні домени та 38 цистеїнових залишків, які значною мірою зберігаються серед членів родини. Ця родина білків нині складається з шістьох окремих членів, включаючи Cug61, фактор росту сполучної тканини (CTGF) та пташиний протоонкопротеїн Nov (таким чином, названа CCN-родиною) (CCN-родину докладніше [описано у роботі Lau et al., *Exp. Cell Res* 248: 44-57, 1999]). Виявлено, що Cug61-білок (i) стимулює приєднання та поширення ендотеліальних клітин приблизно так, як це робить фібронектин, (ii) посилює вплив bFGF та PDGF на інтенсивність синтезу ДНК фібробластів та судинних ендотеліальних клітин, (iii) стимулює міграцію клітин як у фібробластах, так і в ендотеліальних клітинах. Останні дослідження показують, що Cug61 діє як ліганд на інтегрин $\alpha\beta_3$, рецептор адгезії, який бере участь у сигналі, який регулює багато клітинних процесів, включаючи ангіогенез та метастаз пухлин. Очищений Cug61-білок виявляв стимулюючу дію на спрямовану міграцію ендотеліальних клітин мікросудин людини у культурі залежним від $\alpha\beta_3$ шляхом і викликає утворення нових судин роگیвки щурів. Крім того, експресія Cug61 у клітинах пухлин стимулює ріст пухлин та васкуляризацію.

На основі представлених даних, які показують, що FVIIa викликає експресію Cug61 у фібробластах, можна твердити, що індукований FVIIa Cug61, діючи через інтегрин $\alpha\beta_3$, відповідає за опосередковану FVIIa міграцію клітин та метастаз пухлин. Таким чином, Cug61 зв'язує FVIIa-TF протеолітичний сигнал з сигнальним шляхом інтегрину. Спостереження, згідно з якими каталітична активність VIIa є необхідною для міграції клітин гладенького м'яза та клітин пухлин і метастаз пухлин, не суперечать іншим спостереженням, згідно з якими каталітична активність FVIIa є необхідною для індукції Cug61.

Крім Cug61, VIIa також може індукувати інші регулятори, які можуть опосередковувати викликані FVIIa біологічні реакції. Було виявлено, що зв'язування FVIIa з TF поверхні клітин у клітинах раку підшлункової залози здатні до селективної надмірної експресії uPAR гена. Раніше автори з застосуванням технології диференціального показу продемонстрували підвищуювальну регуляцію транскрипції гена полі(A)полімерази у фібробластах, підданих дії FVIIa. Хоча цікаво було б з'ясувати, чи фільтр не містить PAR кДНК, якщо мікрочножина кДНК також виявляє диференціальну експресію PAR. Крім Cug61, дана мікрочножина кДНК також виявляє диференціальну експресію чотирьох інших генів (див. результати), але коефіцієнт диференціальної експресії був дуже близьким до граничного значення. Оскільки у попередніх експериментах автори не могли підтвердити їх диференціальну експресію шляхом нозерн-блотингу, а також за відсутності будь-яких наведених даних щодо здатності цих генних продуктів опосередковувати викликані FVIIa біологічні реакції, автори проаналізували їх експресію докладніше. Однак, оскільки CTGF є молекулою, структурно спорідненою з Cug61, і виявляє такі ж біологічні реакції, як і Cug61, авторами було досліджено експресію CTGF навіть незважаючи на те, що відносний показник експресії CTGF в обробленому FVIIa

зразку порівняно з контрольним зразком у мікроножині кДНК становить 1,8 (2 є оцінкою з завищеною похибкою для реальної величини у випробуванні). Дані показали, що FVIIa також викликав експресію CTGF, і динаміка викликаного VIIa експресії CTGF була подібною до динаміки Cyr61.

Хоча CTGF поводить себе дуже схоже до Cyr61, між ними існують тонкі розбіжності. Наприклад, (а) CTGF виявляє природну мітогенність, а Cyr61 не має природної мітогенної активності, але посилює викликаний фактором росту синтез ДНК, (б) Cyr61 стимулює хемотаксис, а CTGF стимулює і хемотаксис, і хемокінез, (в) хоча і Cyr61, і CTGF є ECM-асоційованими сигнальними молекулами, CTGF секретується у середовище культури. Таким чином, можливо, що FVIIa регулює клітинні функції за місцем через Cyr61, хоча й діє на відстані від свого місцезнаходження через секрецію CTGF.

Режим для кожного пацієнта, який має бути підданий лікуванню FVIIa або іншим агоністом TF чи FVIIai або іншим згаданим авторами антагоністом TF, визначається спеціалістами. Денна доза, яка має вводитись при терапії, визначається лікарем і залежить від конкретної застосовуваної сполуки, від шляху введення та від маси та стану пацієнта. Ефективною кількістю є відповідна денна доза приблизно від 5мг/кг/день до 500мг/кг/день, в оптимальному варіанті - приблизно від 10мг/кг/день до 300мг/кг/день, ще краще - приблизно від 15мг/кг/день до 200мг/кг/день, найкраще - приблизно від 20мг/кг/день до 100мг/кг/день.

FVIIa або інший агоніст TF чи FVIIai або інший антагоніст TF вводять як одиничну дозу, але його також можуть вводити як багаторазові дози, в оптимальному варіанті - з інтервалами 4-6-12 годин, залежно від дози та стану пацієнта.

FVIIa або інший агоніст TF чи FVIIai або інший антагоніст TF вводять внутрішньовенно або шляхом безперервного чи пульсуючого вливання, або вводять прямо у відповідне місце, наприклад, шляхом ін'єкції прямо у пухлину. FVIIa або інший агоніст TF чи FVIIai або інший антагоніст TF в оптимальному варіанті вводять шляхом внутрішньовенних ін'єкцій і у кількості приблизно 100-100000 одиниць на 1кг маси тіла, краще - у кількості приблизно 250-25000 одиниць на 1кг маси тіла, що відповідає приблизно 5-500мкг/кг, дозі, яка може повторно вводитись 2-4 рази за 24 години.

Традиційні способи одержання фармацевтичних композицій, які можуть бути застосовані згідно з даним винаходом, описано, наприклад, у Remington's Pharmaceutical Sciences, 1985.

Композиції, застосовувані згідно з цим винаходом, одержують способами, які є зрозумілими спеціалістам.

Стисло кажучи, фармацевтичні композиції, придатні для застосування згідно з даним винаходом, одержують шляхом змішування FVII, FVIIa або іншого агоніста TF або FVIIai або іншого антагоніста TF, в оптимальному варіанті - в очищеній формі, з придатними ад'ювантами та придатним носієм або розріджувачем. До придатних фізіологічно прийнятних носіїв або розріджувачів належать стерильна вода та сольовий розчин. До придатних ад'ювантів у даному разі належать кальцій, білки (наприклад, альбуміни) або інші інертні пеп-

тиди (наприклад, гліцилгліцин) або амінокислоти (наприклад, гліцин або гістидин) для стабілізації очищеного фактора VIIa. Іншими фізіологічно прийнятними ад'ювантами є невідновлювальні цукри, поліспирти (наприклад, сорбіт, маніт або гліцерин), полісахариди, такі як декстрини з низькою молекулярною масою, детергенти (наприклад, полісорбат) та антиоксиданти (наприклад, бісульфіт та аскорбат). Ад'юванти, як правило, є присутніми у концентрації від 0,001 до 4% (маса/об'єм). Фармацевтична композиція також може містити інгібітори протези, наприклад, аprotинін, та консерванти.

Композиції стерилізують, наприклад, шляхом фільтрування крізь фільтр, що затримує бактерії, шляхом включення до композицій стерилізуючих агентів, шляхом опромінення композицій або шляхом нагрівання композицій. Вони також можуть вироблятися у формі стерильних твердих композицій, які можуть бути розчинені у стерильній воді або якомусь іншому стерильному середовищі, придатному для ін'єкцій до або безпосередньо перед застосуванням.

В різних аспектах даний винахід стосується:

Способу регулювання експресії принаймні одного гена в клітині, який включає етапи:

- а) контактування вищезгаданої клітини з фактором VII (а) або антагоністом фактора тканини,
- б) визначення експресії вищезгаданого гена у вищезгаданій клітині.

Вищезгаданого способу, в якому вищезгадана клітина є судинною клітиною людини, що експресує фактор тканини, включаючи фібробласти та клітини гладенького м'яза.

Способу, в якому вищезгаданий ген вибирають з групи, яка складається з Cyr61, CTGF, рецептора допаміну D2, EST Incyte PD 395116 або P2U нуклеотидного рецептора.

Способу, в якому вищезгаданий антагоніст фактора тканини є модифікованим фактором VII (а), відомим як фактор VIIai.

Способу, в якому експресію вищезгаданого гена посилюють.

Способу, в якому експресію вищезгаданого гена інгібують або мінімізують.

Способу посилення експресії вищезгаданого гена, який охоплює контактування клітини з фактором VIIa.

Способу інгібування експресії вищезгаданого гена, який охоплює контактування клітини з модифікованим фактором VII, відомим як FVIIai.

Способу, в якому вищезгаданий ген є EST PD674714.

Способу регулювання міграції клітин, який включає етапи:

- а) контактування вищезгаданої клітини з фактором VIIa або антагоністом фактора тканини;
- б) визначення міграції вищезгаданої клітини.

Способу, в якому вищезгадана клітина є клітиною людини, яка експресує фактор тканини, включаючи фібробласти, клітини гладенького м'яза, клітини пухлин, кровотворні клітини та епітеліальні клітини.

Способу, в якому антагоніст фактора тканини є модифікованим фактором VIIa, відомим як фактор VIIai.

Способу, в якому модифікований фактор VII

вибирають з-поміж дансил-Phe-Pro-Arg-хлорметилкетону, дансил-Glu-Gly-Arg-хлорметилкетону, дансил-Phe-Phe-Arg-хлорметилкетону та Phe-Phe-Arg-хлорметилкетону.

Спосіб посилення міграції клітин, який охоплює контактування клітини з FVIIa або агоністом фактора тканини.

Спосіб зниження або інгібування міграції клітин, який охоплює контактування клітини з антагоністом фактора тканини.

Спосіб викликання або прискорення загоєння ран у пацієнта, який охоплює введення вищезгаданому пацієнтові ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка включає фактор VIIa або агоніст фактора тканини.

Спосіб інгібування інвазивності клітин пухлин, який охоплює контактування вищезгаданих клітин з ефективною кількістю антагоніста фактора тканини.

Спосіб інгібування міграції клітин, інвазії, викликанної міграцією проліферації клітин або ангіогенезу у пацієнта, який має захворювання або стан, пов'язані з небажаною міграцією клітин, інвазією, викликанною міграцією проліферації клітин, або ангіогенезом, який охоплює введення вищезгаданому пацієнтові ефективної кількості фармацевтичної композиції, яка включає а антагоніст фактора тканини.

Спосіб, в якому хвороба або стан є розвитком первинної пухлини, інвазією пухлини або метастазом.

Спосіб, в якому антагоніст фактора тканини є модифікованим фактором VII, відомим як FVIIai.

Застосування фактора VIIa або антагоніста фактора тканини для одержання медикаменту для регулювання міграції клітин.

Застосування, згідно з яким фактор VIIa використовують для одержання медикаменту для посилення міграції клітин.

Застосування, згідно з яким антагоніст фактора тканини використовують для одержання медикаменту для зниження або інгібування міграції клітин.

Спосіб, в якому антагоніст фактора тканини є модифікованим фактором VIIa, відомим як фактор FVIIai.

Застосування, згідно з яким модифікований фактор VII вибирають з-поміж дансил-Phe-Pro-Arg-хлорметилкетону, дансил-Glu-Gly-Arg-хлорметилкетону, дансил-Phe-Phe-Arg-хлорметилкетону та Phe-Phe-Arg-хлорметилкетону.

Даний винахід далі пояснюється на нижчеподаних прикладах, які, однак, не можна вважати такими, що обмежують обсяг захисту. Особливості, викладені у вищеподаному описі та у нижчеподаних прикладах, можуть як окремо, так і у їх комбінації, бути суттєвими для реалізації винаходу в його різноманітних формах.

ПРИКЛАДИ

Приклад 1

Одержання FVIIa

Очищений фактор VIIa людини, придатний для застосування у даному винаході, в оптимальному варіанті одержують за технологією рекомбінантної

ДНК, [наприклад, як описано в роботі Hagen et al., Proc.Natl.Acad.Sci. USA 83: 2412-2416, 1986, або як описано в Європейському патенті №200 421 (ZymoGenetics)]. Фактор VIIa, одержаний за рекомбінантною технологією, може бути автентичним фактором VIIa або більш або менш модифікованим фактором VIIa, за умови, що такий фактор VIIa має практично таку ж саму біологічну активність щодо коагуляції крові, що й автентичний фактор VIIa. Такий модифікований фактор VIIa може бути одержаний шляхом модифікації послідовності нуклеїнової кислоти, що кодує фактор VII, або шляхом зміни амінокислотних кодонів, або видалення деяких амінокислотних кодонів у нуклеїнової кислоти, що кодує природний FVII відомими способами, наприклад, шляхом сайт-специфічного мутагенезу.

Фактор VII також може бути одержаний способами, [описаними в роботах Broze and Majerus, J.Biol. Chem. 255 (4): 1242-1247, 1980, та Hedner and Kisiel, J.Clin.Invest. 71: 1836-1841, 1983]. Ці способи забезпечують фактор VII без помітної кількості інших факторів коагуляції крові. Можна одержати навіть ще більше очищений препарат фактора VII, додавши гель-фільтрацію як остаточний етап очищення. Фактор VII після цього перетворюють на активований FVIIa відомими засобами, наприклад, кількома різними білками плазми, такими як фактор XIIa, IX а або Xa. В альтернативному варіанті, як [описано в роботі Bjoem et al. (Research Disclosure, 269 September 1986, pp. 564-565)], фактор VII може бути активований шляхом пропущення його через іонообмінну хроматографічну колонку, таку як Mono Q[®] (Pharmacia fine Chemicals) або іншим подібним способом.

Приклад 2

Одержання FVIIai

Модифікований фактор VII, придатний для застосування у даному винаході, одержують, наприклад, як [описано у Міжнародних публікаціях №№92/15686, 94/27631, 96/12800 та 97/47651 ZymoGenetics/Novo Nordisk].

Приклад 3

Вплив FVIIa та FFR-FVIIa на хемотаксичну реакцію фібробластів на PDGF-BB

Фібробласти, які експресують активний TF (Фіг.1A та Фіг.1B) інкубували з 100нМ FVIIa і висівали у верхній частині модифікованої камери Бойдена; водночас під фільтр з мікропорами 150мкм додавали середовища, які містили 10% FBS та PDGF-BB у різних концентраціях. Міграцію клітин в умовах додавання під фільтр середовища, яке містило 10% FBS без PDGF-BB, використовували як міру безладної міграції і розраховували як 100% міграцію. Значну міграційну реакцію реєстрували при концентрації 0,01нг/мл PDGF-BB у клітинах, стимульованих FVIIa порівняно з 1нг/мл PDGF-BB для клітин, не зшитих з FVIIa, тобто при 100-разовій різниці у концентрації (Фіг.2A). При 0,01-0,1нг/мл PDGF-BB міграційна реакція на FVIIa посилювалася залежно від дози, починаючи з 25нМ, і з максимальним ефектом при 50-100нМ FVIIa (Фіг.3A-D). Ніякого збільшення безладної міграції не спостерігали після активації за допомогою FVIIa. Для того, щоб перевірити, чи є протеолітично активний FVIIa обов'язковим для гіперхемотак-

сичної реакції на PDGF-BB, фібробласти також інкубували з 100нМ FFR-FVIIa і піддавали аналізу у камері Бойдена таким самим чином (Фіг.2А). Ніякого збільшення хемотаксису не спостерігали з FFR-FVIIa при низьких концентраціях PDGF-BB, 0,01-1нг/мл. На відміну від цих концентрацій, досягали явного пригнічення хемотаксису, викликаного 10-50нг/мл PDGF-BB, за допомогою 100нМ FFR-FVIIa (Фіг.2А та 3А-Г). Коли фібробласти попередньо інкубували з сумішшю трьох різних антитіл проти TF, а потім з FVIIa або FFR-FVIIa, міграційна реакція на PDGF-BB була ідентичною реакції фібробластів без присутності ліганда, зв'язаного з TF (Фіг.4А). Стороннє моноклональне антитіло проти IgG не перешкоджало ні гіперхемотаксисові, викликаному FVIIa, ані інгібуванню міграційної реакції, викликаній FFR-FVIIa (дані не показано). Присутність антитіл до IgG антитіл або трьох антитіл проти TF не змінювала безладної міграції фібробластів (дані не показано).

Приклад 4

Гіперхемотаксична реакція не опосередковується FXa або тромбіном

Оскільки викликана FVIIa трансдукція сигналу, що веде до гіперхемотаксичної реакції на PDGF-BB, залежала від каталітичної активності FVIIa, важливо було визначити, чи зустрічається сигнал безпосередньо, чи через FXa або тромбін, генерований комплексом FVIIa/TF. Підвищена міграційна реакція, перетворена FVIIa/TF, блокувалася 0,2-10мкМ антикоагулянтного пептиду кліща (TAP), який специфічно блокує активну ділянку FXa і перешкоджає подальшій активації каскаду коагуляції, що веде до утворення тромбіну (Фіг.5А, 5Б). Так само й додавання 50д./мл гірудину, специфічного інгібітора тромбіну не мало ніякого впливу на викликаний FVIIa/TF гіперхемотаксис (Фіг.6А). TAP та гірудин не впливали на міграцію фібробластів у реакції на PDGF без присутності FVIIa ліганда (Фіг.5А, 5Б, 6А).

Таким чином, видається малоімовірним, що вплив FVIIa на хемотаксис є опосередкованим активацією FX або тромбіну.

Приклад 5

Гіперхемотаксична реакція на PDGF-BB залежить від PLC-залежних шляхів, але не залежить від P13'-кінази.

Останнім часом було виявлено, що активація P13'-кінази є важливою для викликаного PDGF β -рецептором хемотаксису. Таким чином, авторами було досліджено, чи здатен LY294002, специфічний інгібітор P13'-кінази, блокувати хемотаксичну реакцію, викликану сигналом FVIIa/TF. Фібробласти попередньо обробляли LY294002 у зазначених концентраціях протягом 30 хвилин при 37°C перед додаванням 100нМ FVIIa і піддавали аналізу у камері Бойдена, як було описано. Концентрацію PDGF-BB підтримували незмінною на рівні 0,1нг/мл протягом усього дослідження, тобто на дуже низькому рівні, при якому FVIIa/TF викликав значну хемотаксичну реакцію. LY294002 був присутній весь час протягом експериментів. На Фіг.7А показано, що міграційна реакція на PDGF-BB, опосередкована сигналом FVIIa/TF, не зазнавала впливу інгібування P13'-кінази.

Для того, щоб дослідити, чи бере участь ви-

кликана FVIIa/TF хемотаксична реакція в активації специфічної до фосфатидилінозиту фосфоліпази C (PLC), автори попередньо інкубували фібробласти з різними концентраціями U73122, специфічного інгібітора PLC, протягом 30 хвилин при 37°C до додавання 100нМ FVIIa; клітини після цього піддавали аналізу хемотаксису у присутності інгібітора. Як негативний контроль використовували близький аналог, U73343, без впливу на PLC. Концентрацію PDGF-BB підтримували незмінною на рівні 0,1нг/мл і в цих експериментах. Попередня обробка клітин активним інгібітором PLC U73122 інгібувала гіперхемотаксичну реакцію на 0,1нг/мл PDGF-BB залежно від дози, з повним інгібуванням при 1мкМ (Фіг.8А та 8Б). При застосуванні неактивованого аналога U73343 не спостерігали ніякого впливу на хемотаксис.

Приклад 6

FVIIa/TF викликає активацію PLC

Для подальшого дослідження значення активності PLC для гіперхемотаксичної реакції автори також аналізували прямий вплив FVIIa/TF на активність PLC у фібробластах. Активація PLC веде до вироблення двох інших посередників, інозит-1,4,5-трифосфату (IP₃) та діацилглицерину. Фібробласти інкубували з міо-[³H]-інозитом до наступного дня, а потім з 100нМ FVIIa або FFR-FVIIa протягом 60 хвилин, після чого здійснювали інкубацію з PDGF-BB або без нього у зазначених концентраціях. Обробка 100нМ самого FVIIa протягом 60 хвилин викликала вивільнення IP₃ у фібробластах на тому самому рівні, що й при 10нг/мл та 100нг/мл самого PDGF-BB (Фіг.9). Крім того, комбінація 100нМ FVIIa та 10нг/мл або 100нг/мл PDGF-BB подвоювала вивільнення IP₃. Інгібований в активній ділянці FVIIa не викликав вивільнення IP₃. Ці результати явно свідчать, що PLC активується після зв'язування FVIIa з TF.

Приклад 7

Фосфорилування PLC- γ 1 не посилюється сигналом TF/FVIIa у фібробластах

Для того, щоб визначити, чи відповідає ізоформ PLC- γ 1, який активується певними рецепторами тирозинкінази, за підвищення активності PLC, викликане FVIIa/TF, досліджували тирозинове фосфорилування PLC- γ 1. Фібробласти інкубували за відсутності або у присутності 100нМ FVIIa чи FFR-FVIIa протягом однієї години, після чого стимулювали 0, 2, 10 або 100нг/мл PDGF-BB. Через 5 хвилин інкубації клітини піддавали лізисові і PLC- γ 1 піддавали імунопреципітації, відокремлювали шляхом SDS-PAGE і піддавали імуноблот-аналізові антитілом проти фосфотирозину. Якщо при підвищенні концентрації PDGF-BB спостерігали значне підвищення фосфорилування PLC- γ 1 тирозином, то додавання самого FVIIa до фібробластів не викликало ніякого фосфорилування PLC- γ 1 тирозином (Фіг.10). Крім того, комбінація FVIIa та PDGF-BB у різних концентраціях не викликала ніякого подальшого фосфорилування порівняно зі стимуляцією самим PDGF-BB (Фіг.10). FFR-FVIIa не мав ніякого впливу на фосфорилування PLC- γ 1 тирозином (Фіг.10). Таким чином, за підвищення активності PLC після FVIIa-стимуляції відповідають інші ізоформи PLC, крім PLC- γ 1.

Приклад 8 Способи

Культури клітин. Фібробласти крайньої плоти людини, AG1518 та AG1523 вирощували до злиття у MEM Ігла з 10% сироватки ембріона великої рогатої худоби (FBS). Перед застосуванням клітини відщеплювали шляхом трипсинізації (2,5мг/мл протягом 10хв. при 37°C), промивали у збалансованому соляному розчині Хенка і ресуспендували у MEM Ігла з 10% FBS або у середовищі Хема з додаванням 0,1% FBS.

Білки. FVIIa людини (Novo Nordisk A/S, Gentofte, Данія), експресували й очищали, як описано [29]. FFR-FVIIa (Novo Nordisk) одержували шляхом блокування FVIIa в активній ділянці D-Phe-L-Phe-L-Arg-хлорметилкетонм. Рекомбінантний антикоагулянтний пептид кліща (TAP) було люб'язно надано доктором П. Власюком (Dr. P. Vlasuk), Corvas (Сан-Дієго, Каліфорнія). Гірудин було придбано у Sigma. LY294002, U73122 та U73343 було отримано від Biomol (Plymouth Meeting, Пенсильванія). Моноклональні антитіла проти TF, TF8-5G9, TF9-5B7 та MTFH-1 (Morrissey, J.H., Fair, D.S., Edgington, T.S. Monoclonal antibody analysis of purified of and cell-associated tissue factor. *Thromb. Res.* 52, 247-261 (1988)) було люб'язно надано доктором Джеймсом Г. Моррісеем (Dr. James H. Morrissey) з Організації медичних досліджень штату Оклахома (Oklahoma Medical Research Foundation). Антитіло проти фосфотирозину, PY99 було отримано із Санта-Круз, Каліфорнія.

Проточна цитометрія. Поверхневу експресію TF аналізували шляхом імунофлуоресценції проточним цитометром (Coulter Epics XL-MCL, Beckman Coulter, Fullerton, Каліфорнія, Coulter Electronics, США). Інструмент градували щодня за допомогою калібрувальних гранул Immuno-Check™ або Flow Check™ (Coulter). Для експериментів непрямої імунофлуоресценції фібробласти AG1518 або AG1523 двічі промивали PBS, що містив 0,1% альбуміну сироватки великої рогатої худоби (BSA), інкубували протягом 30хв. на льоді з міченим флуоресцеїн-ізотіоціанатом (FITC) моноклональним антитілом TF проти людини (4508CJ, American Diagnostica, Greenwich, Ct., США). Як негативний контроль, використовували моноклональним антитілом IgG1 проти аспергілонігерглюкозооксидази (Dakopatts). Для кожного зразка визначали середню інтенсивність флуоресценції (MFI) та відсоток позитивних клітин.

Визначення активності TF. Прокоагулянтну активність TF визначали, [як описано в роботі Lindmark et al. (Lindmark, E., Tenno, T., Chen, J., Siegbahn, A. IL-10 inhibits LPS-induced human monocyte tissue factor expression in whole blood. *Br. J. Haematol.* 102, 597-604 (1998))]. Стисло кажучи, аліквоти, що містили $0,2 \times 10^5$ фібробластів AG1518 або AG1523, двічі промивали PBS, поміщали у лунки 96-лункового мікротитрувального планшета (Nunc, Roskilde, Данія). Прокоагулянтну активність вимірювали шляхом двоетапного амідолітичного аналізу, в якому хромогенний субстрат, S-2222 (Chromogenix, Molndal, Швеція), розщеплювали FXa, який, у свою чергу, активували з FX комплексом TF/FVIIa. У лунки додавали реакційну суміш,

що містила кінцеву концентрацію 0,6мМ S-2222, 2мМ CaCl₂ та фактори коагуляції з концентрату фактора Prothromplex-T™ TIM4 (Baxter, Відень, Австрія) у кінцевій концентрації 1од./мл FVII та 1,2од./мл FX і визначали зміну оптичної густини при 405нм після 30-хвилинної інкубації при 37°C. Вимірювання здійснювали тричі.

Аналіз хемотаксису. Міграційну реакцію фібробластів піддавали аналізу за допомогою технології "leading front" у модифікованій камері Бойдена, [як було описано раніше (Siegbahn, A., Hanimacher, A., Westermarck, B., Heldin, C-H. Differential effects of the various isoforms of platelet-derived growth factor on chemotaxis of fibroblasts, monocytes, and granulocytes. *J. Clin. Invest.* 85, 916-920 (1990) та Nister, M., Hammacher, A., Mellstrom, K., Siegbahn, A., Ronnstrand, L., Westermarck, B., Heldin, C-H. A glioma-derived PDGFA chain homodimer has different functional activities from a PDGF AB heterodimer purified from human platelets. *Cell* 52, 791-799 (1988))]. Фільтр з мікропорами (розмір пори 8мкм) тримали вкритим розчином колагену 1 типу при кімнатній температурі до наступного дня. Фільтри висушували у повітряній сушарці протягом 30 хвилин безпосередньо перед використанням. Фібробласти крайньої плоти людини AG1523 вирощували до злиття у MEM Ігла з додаванням 10% FBS. Клітини відщеплювали шляхом трипсинізації (2,5мг/мл протягом 10 хвилин при 37°C) і суспендували у MEM Ігла з 10% FBS. Фібробласти перед аналізом інкубували протягом 10 хвилин з FVIIa або FFR-FVIIa або без них. На фільтри камери Бойдена поміщали сто мікролітрів суспензії клітин (2×10^5 клітин/мл). PDGF-BB розводили у середовищі для аналізу (MEM Ігла з 10% FBS) і додавали під фільтр у камеру. Клітини інкубували протягом 6 годин при 37°C у зволоженої камері, що містила 95% повітря/5% CO₂. FVIIa або FFR-FVIIa були присутні весь час протягом експерименту. Фільтри після цього забирали, фіксували в етанолі, забарвлювали барвником Mayer's Hemalun і вставляли. Міграцію вимірювали як відстань між двома найдальшими переміщеними ядрами фібробластів одного потужного поля (12,5x24) у центрі. Відстань міграції в кожному фільтрі розраховували як середнє значення замірів для принаймні трьох різних частин фільтра. Експерименти здійснювали з двома-чотирма окремими фільтрами для кожної концентрації гемоатрантанта. Для кожної серії експериментів за контроль брали міграцію фібробластів до середовища для аналізу.

У випадках, коли використовували моноклональні антитіла проти TF або інгібітори фактора коагуляції, TAP та гірудин, клітини попередньо інкубували протягом 10 хвилин з цими агентами, потім з FVIIa або FFR-FVIIa або без них перед здійсненням аналізу хемотаксису. Антитіла, TAP або гірудин також були присутні протягом усього експерименту з хемотаксисом. В експериментах, коли випробували вплив на міграційну реакцію різних інгібіторів, LY294002, U73122 або U73343, клітини попередньо інкубували протягом 30 хвилин з інгібіторами у зазначених концентраціях, і інгібітори також були присутні весь час протягом експериментів.

Аналіз вивільнення інозиттрифосфату (IP_3). Шестилункові планшети з напівзлитими культурами AG1518 фібробластів людини інкубували до наступного дня (приблизно 20 годин) 2мкМ ^{3}H -інозиту (Amersham) у 2мл F12 Хема з 0,1% FBS. Середовище змінювали на F12 Хема з 0,1% FBS (що містив 2мМ $CaCl_2$) та 20мМ LiCl і клітини інкубували протягом 15 хвилин при 37°C. Клітини після цього інкубували за відсутності або у присутності 100нМ FVIIa або 100нМ FFR-FVIIa протягом однієї години. Додавали PDGF-BB (0, 10 або 100нг/мл), і інкубація тривала протягом 10 хвилин при 37°C. Аналіз IP_3 здійснювали, [як було описано раніше у роботі Еріксона та ін. (Eriksson, A., Nanberg, E., Ronnstrand, L., Engstrom, U., Hellman, U., Rupp, E., Carpenter, G., Heldin, C.-H., Claesson-Welsh, L. Demonstration of functionally different interactions between phospholipase C- γ and the two types of platelet-derived growth factor receptors. *J. Biol. Chem.* 270, 7773-7781 (1995))].

Аналіз викликаного агоністом фосфорилювання PLC- γ 1. Напівзлиті культури AG1518 витримували з сироваткою до наступного дня (приблизно 20 годин) у середовищі, яке містило 0,1% FBS, а потім інкубували за відсутності або у присутності 100нМ FVIIa або FFR-FVIIa протягом однієї години, після чого інкубували з 0, 2, 10 або 100нг/мл PDGF-BB протягом 5 хвилин при 37°C. Клітини піддавали лізисові і PLC- γ 1 осаджували практично так, [як було описано раніше (Hansen, K., Johnell, M., Siegbahn, A., Rorsman, C., Engstrom, U., Wemstedt, C., Heldin, C.-H., Ronnstrand, L. Mutation of a Src phosphorylation site in the PDGF β -receptor leads to increased PDGF-stimulated chemotaxis but decreased mitogenesis. *EMBO J.* 15, 5299-5313 (1996)) антисироваткою проти PLC- γ 1, отриманою шляхом імунізації кролів пептидом, який відповідав карбокси-кінцеві великої рогатої худоби PLC- γ 1 (Arteaga, C.L., Johnson, M.D., Todderud, G., Coffey, R.J., Carpenter, G., Page, D.L. Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C- γ 1 in primary human breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 10435-10439 (1991))]. Зразки відокремлювали за допомогою SDS-PAGE і піддавали імуноблот-аналізові антитілом проти фосфотирозину PY99.

Статистичний аналіз. Дані аналізували, використовуючи Statistica TM для пакета Windows (StatSoft, Tulsa, Оклахома, США). Т-тест Ст'юдента для залежних зразків застосовували для визначення статистичної значущості між різними наборами даних. Р-значення <0,05 вважали статистично значущими.

Білки. Рекombінантний VIIa людини, отриманий у подарунок від Novo Nordisk (Gentofte, Данія), відтворювали у стерильній воді у концентрації від 1 до 1,3мг/мл. Базові розчини VIIa перевіряли на наявність слідів забруднення ендотоксином, застосовуючи лізат *limulus*-амебоцитів (Bio Whittaker), і їх виявлено не було (рівень виявлення 30пг). Рекombінантний антикоагулянтний білок кліща (TAP) було люб'язно надано Джорджем Власюком (George Vlasuk) (Corvas, Сан-Дієго, Каліфорнія), а рекombінантний гірудин отримували від Sigma (Сент-Луїс, Міссурі) або Calbiochem (Сан-Дієго, Каліфорнія). Очищений фактор Ха лю-

дини та тромбін отримували від Enzyme Research Laboratories (Southbend, Індіана).

Мікрмножина кДНК. Клітини WI-38 культивували до 80% злиття, і сироватку відбирали протягом 24 годин для досягнення нерухомого стану, як описано вище. Культуральне середовище заміняли свіжим DMEM без сироватки (з додаванням 5мМ $CaCl_2$) і залишали стабілізуватися на 2год. в інкубаторі. Після цього клітини обробляли очищеним рекombінантним VIIa (5мкг/мл) протягом 90хв. Наприкінці 90хв. обробки з необроблених (контрольних) та оброблених VIIa клітин видобували повну РНК, використовуючи Trizol (GIBCO BRL). Полі-(A)-РНК очищали подвійним пропущенням через колонку для виділення мРНК Oligo Tex, як описано в інструкції виробника (Qiagen). Вісімсот нг (800нг) високоочищеної полі-(A)-РНК з контрольних та оброблених VIIa клітин відправляли на аналіз мікрмножини кДНК (Human UniGEM V microarray, Genome Systems Inc, Сент-Луїс, Міссурі).

Нозерн-блотинг. Повну РНК одержували, застосовуючи реагент TRIZOL з нерухомого моношару клітин WI-38, які піддавали дії VIIa, та інші матеріали, як описано в Результатах. Нозерн-блотинг здійснювали, застосовуючи стандартну процедуру. Тобто, 10мкг повної РНК фракціонували за розміром шляхом гель-електрофорезу в гелях 1% агарози/6% формальдегіду і переносили на нітроцелюлозну мембрану шляхом капілярного блотингу. Нозерн-блоти попередньо гібридизували при 42°C з розчином, що містив 50% формаміду, 5 \times SSC, 50мМ Tris. HCl, pH7,5, 0,1% пірофосфату натрію, 1% SDS, 1% полівінілпіролідону, 1% Ficoll, 25мМ EDTA, 100мкг/мл ДНК денатурованого молочка лосося та 1% BSA і гібридизували з зондом кДНК ^{32}P -міченого Cyt61 (10берт/мл). Гібридизовані мембрани експонували перед рентгенівською плівкою Dupont NEF або Fuji RX. Для кількісного визначення мембрани експонували перед люмінофорним екраном протягом 1-4год. і експоновані екрани аналізували у пристрої PhosphorImager (Molecular Dynamics), застосовуючи програму "квантування зображення". Для отримання середніх значень одиниці (результати підрахунків) різних експериментів нормалізували до зовнішнього контролю (результату для обробленого контролем зразка).

Хромогенний аналіз. Клітини WI-38 культивували в 96-лунковому планшеті і забезпечували їх нерухомість, як описано вище. Після промивання клітин у лунки, що містили клітини, або лунки, вкриті буфером (без клітин), додавали FVIIa (5мкг/мл) у 1,00мкг кальційвмісного буфера. Після 30хв. інкубації у лунки додавали 25мкг хромогенних субстратів для фактора Ха та тромбіну, тобто, Chromozym X та Chromozym TH. Після 3год. проявлення кольору планшети зчитували у рідері. Використовувані як контроль клітини інкубували зі слідовими концентраціями фактора Ха (від 50 до 0,1нг/мл) або тромбіну (від 0,1 до 0,002од./мл). Не спостерігали ніякої різниці в оптичній густині при 450нМ між VIIa, доданим до клітин або VIIa, доданим у лунки, які не містили клітин. Показник зчитування був нижчим за показники, отримані при найнижчій концентрації фактора Ха або тромбіну, і він представляє хромогенну активність VIIa.

Приклад 9

Мікрмножина кДНК. Нерухомі фібробласти піддавали дії контрольного середовища без сироватки або середовища без сироватки з додаванням Vlla (5мкг/мл) протягом 90хв. (три колби T-75 для кожної обробки). Після обробки збирали повну РНК і виділяли полі-(А)-РНК. Шістьсот нг мРНК мітили флуоресценцією Су3 або Су5, а потім гібридизували з UniGem Human V, що містив 8000 перевічених послідовностей EST, які представляли до 5000 відомих генів людини (послуги було надано безкоштовно Genome System Inc). Контрольний планшет, у якому відома концентрація контрольної кДНК вступала у реакцію генерації зонда, застосовується для вимірювання чутливості та відстеження реакції зворотної транскрипції, очищення та визначення ефективності гібридизації, і загальна картина якості та ефективності аналізу свідчили про успішність процесу гібридизації. Загальний аналіз експериментальних даних виявив мінімальні розбіжності в сигналах гібридизації між контрольним та обробленим VII зразками. Лише невелика кількість генів виявляла помірну диференціальну експресію. Авторами було виявлено підвищувальну регуляцію 5 генів (3,5-2-разове підвищення при обробці Vlla) в той час, як один ген виявляв знижувальну регуляцію після обробки Vlla (2,4-разове зниження) (+/-2 є оцінкою з завищеною похибкою для визначення мінімальної величини реальних коефіцієнтів). Ідентичність підданого 3,5-разовій підвищувальній регуляції гена не виявлялася через його природу. Іншими генами, підданими підвищувальній регуляції Vlla, є Cug61 (2,5-разова), рецептор допаміну D2 (2,2-разова), EST Incyte PD 395116 (2-разова) та P2U нуклеотидний рецептор (2-разова). Цікаво зазначити, що CTGF, ген, який належить до родини Cug61, виявляв 1,8-разове підвищення в оброблених Vlla клітинах порівняно з контрольними клітинами. Підданим знижувальній регуляції транскриптом в оброблених Vlla клітинах був ESTPD674714. Для подальшого аналізу авторами було вибрано Cug61.

Приклад 10

Підтвердження диференціальної експресії Cug61. Для підтвердження даних, отриманих для мікрмножини, автори піддавали зразок РНК з контрольних та оброблених Vlla клітин (ті ж самі зразки РНК, які використовували для одержання полі-(А)-РНК для генерації зонда у мікрмножині) нозерн-блотингові й зондували радіаційно міченим Cug61 кДНК. Дані показують, що Cug61 кДНК зонд гібридизувався з окремим транскриптом (приблизно 2,0кб) РНК, виділеної з контрольних та оброблених Vlla клітин. Однак інтенсивність сигналу гібридизації була значно вищою в РНК, виділеній з оброблених Vlla клітин (Фіг.1). Квантизація сигналу гібридизації виявила, що експресія Cug61 була у 2,8 рази вищою в клітинах, підданих дії Vlla, ніж в оброблених контролем клітинах.

Приклад 11

Динаміка викликаного Vlla експресії Cug61. Для визначення динаміки експресії Cug61 нерухомі фібробласти обробляли протягом різних періодів часу 5мкг/мл Vlla. Видобували повну РНК і піддавали нозерн-блотингові. Як показано на Фіг.2, експресія Cug61 посилювалася залежно від часу в оброблених Vlla клітинах. Експресія досягала піку приблизно на 45 хвилині, а після цього знижувалася до базового рівня за 2-3 год. Оскільки повідомлялося, що експресія Cug61 у фібробlastах миші після стимуляції сироваткою та фактором росту зберігалася протягом кількох годин (до 8-10 год.), перш ніж відбувалося пригнічення, автори дослідили вплив сироватки та PDGF на динаміку експресії Cug61 в нерухомих фібробlastах людини, WI-38. Як показано на Фіг.2Б, Cug61 експресується лише на короткий час після стимуляції PDGF і повністю пригнічується через 2 год. після додавання стимулятора. Подібні результати було отримано для викликаного сироваткою експресії Cug61 (дані не показано).

Приклад 12

Викликана фактором Vlla залежно від дози експресія Cug61. Для визначення залежності від дози Vlla нерухомі фібробlastи обробляли різними дозами FVlla (від 0,1 до 5мкг/мл) протягом 45хв., а потім зразки повної РНК з клітин піддавали нозерн-блотингові. Як показано на Фіг.3, обробка фібробlastів 0,1мкг/мл FVlla була достатньою для викликання експресії Cug61, а концентрація у плазмі FVII(a) (0,5мкг/мл, 10нМ в результаті забезпечувала значну реакцію, наближену до максимальної).

Приклад 13

Каталітична активність фактора Vlla є необхідною для індукції Cug61. Для того, щоб перевірити, чи є каталітична активність Vlla необхідною для індукції Cug61, клітини WI-38 обробляли Vlla та інактивованим в активній ділянці FVlla (FVIIai) протягом 45хв., і шляхом нозерн-блотингу визначали експресію Cug61. Як показано на Фіг.4, FVIIai не викликав експресії Cug61, що свідчило про необхідність протеолітичної активності FVlla. У цьому контексті важливо зазначити, що FVIIai зв'язувався з TF поверхні клітин з такою самою або вищою спорідненістю порівняно з FVlla. Малоімовірно, що викликана Vlla експресія Cug61 в даних експериментах була результатом генерації нижчерозташованих факторів коагуляції, FXa та тромбіну. Через застосування чутливих хромогенних аналізів ми не виявили ніяких свідчень генерації фактора Ха та тромбіну в нашій експериментальній системі (чутливість виявлення 10пг). Крім того, специфічні інгібітори фактора Ха та тромбіну, тобто, антикоагулянтний білок кліща та гірудин, відповідно, не могли відмінити викликану Vlla експресію Cug61 (Фіг.5).

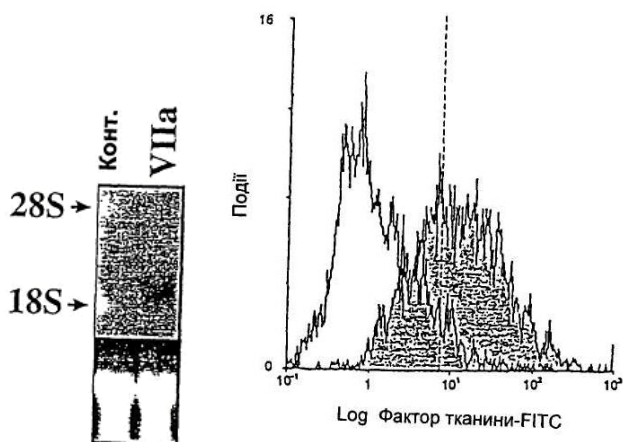
Приклад 14

Участь транскрипційного механізму у зумовленому Vlla рівні мРНК Cug61 у стійкому стані. Для того, щоб дослідити, чи бере транскрипція участь в опосередкованому Vlla підвищенні рівня мРНК Cug61 у стійкому стані, нерухомі клітини WI-38 інкубували з актиноміцином-D (10мкг/мл) протягом 30хв. перед додаванням Vlla протягом 45хв. Як показано на Фіг.6, актиноміцин-D інгібував стимулюючий вплив Vlla. Ці дані вказують на транскрипційний механізм для індукції Cug61.

Для того, щоб дослідити, чи є de novo синтез білка необхідним для індукції Cug61 пРНК з боку Vlla, клітини WI-38 попередньо обробляли інгібіто-

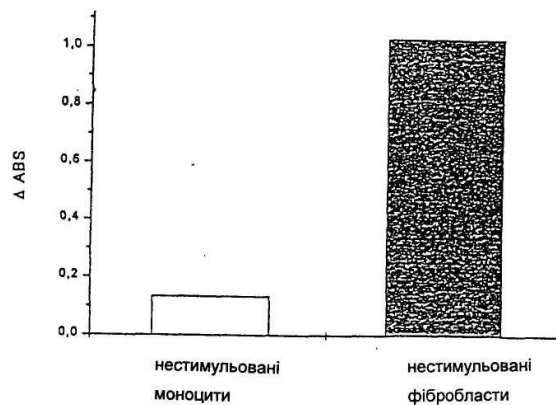
ром синтезу білка циклогексїдом до піддання клітин дії VIIa протягом 45хв. Як показано на Фіг.6, стимулюючий вплив VIIa не блокувався циклогек-

сїдом. Фактично, циклогексїд помітно збільшував викликаний VIIa рівень мРНК Cug61 у стійкому стані.

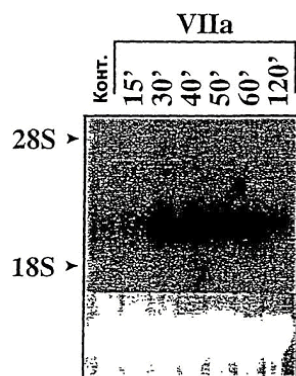


Фіг. 1

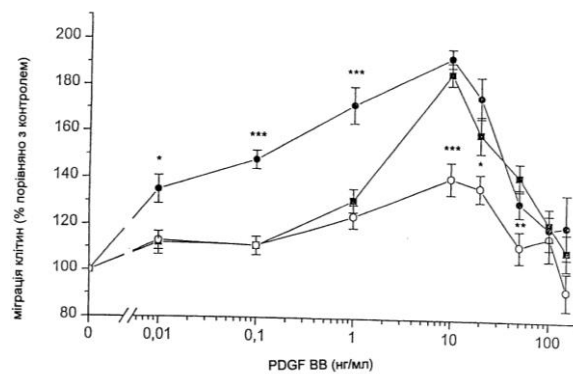
Фіг. 1А



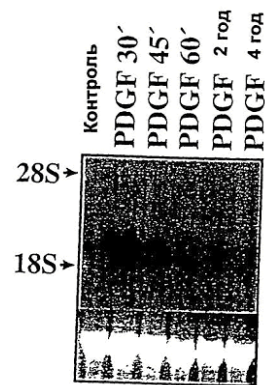
Фіг. 1Б



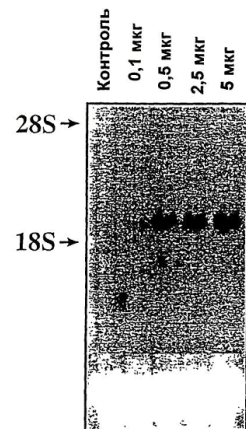
Фіг. 2



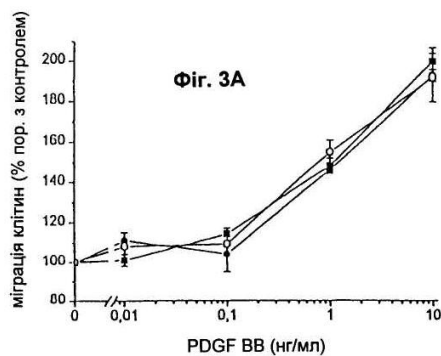
Фіг. 2А



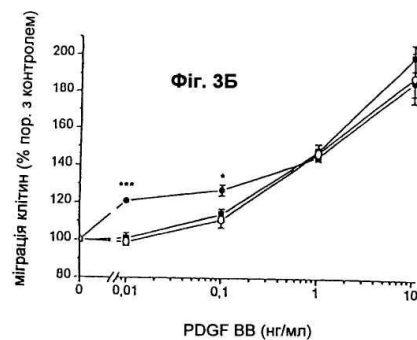
Фіг. 2Б



Фіг. 3



Фіг. 3А



Фіг. 3Б

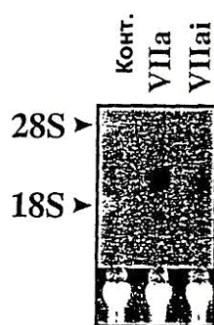
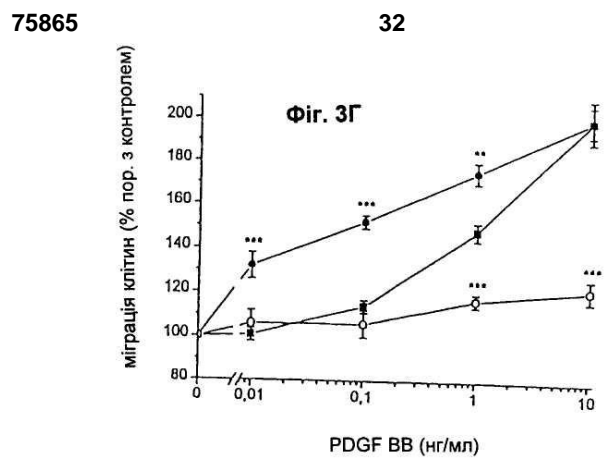
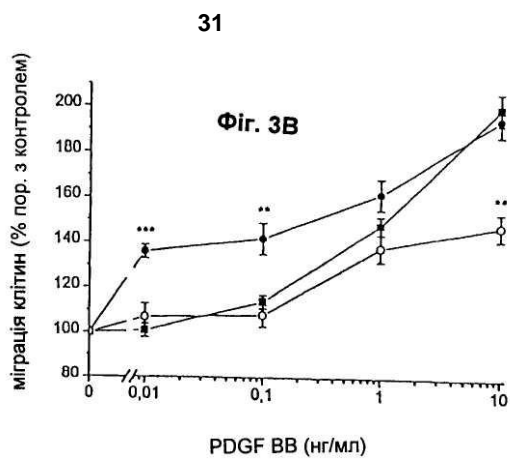


Fig. 4

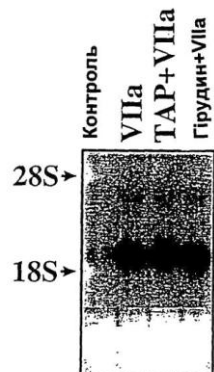


Fig. 5

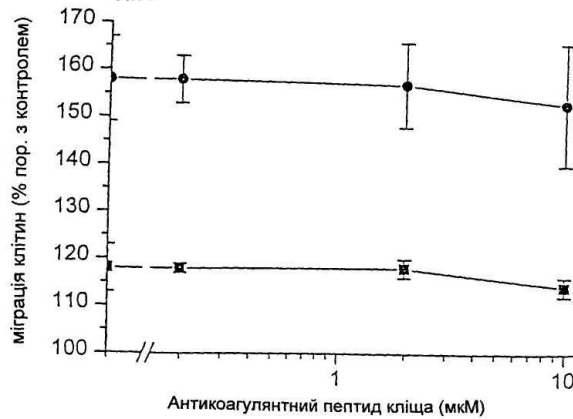


Fig. 5B

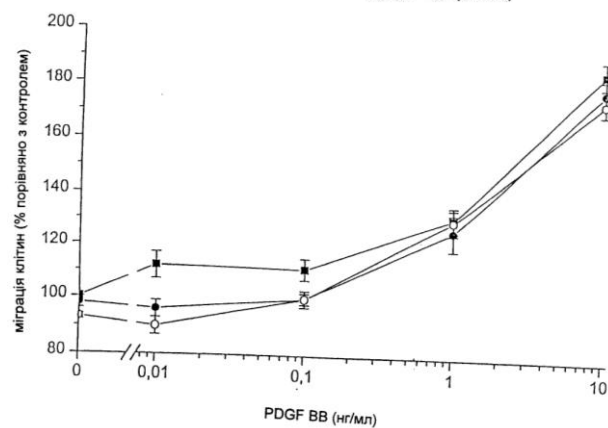


Fig. 4A

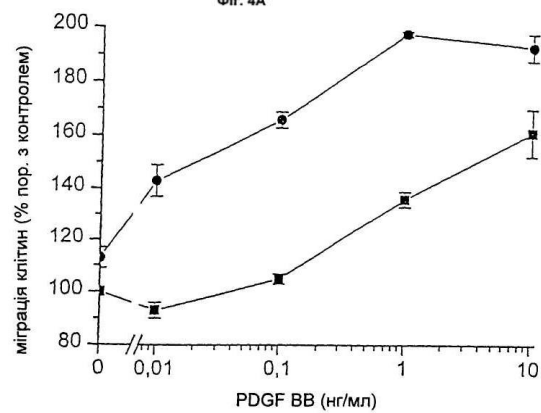


Fig. 5A

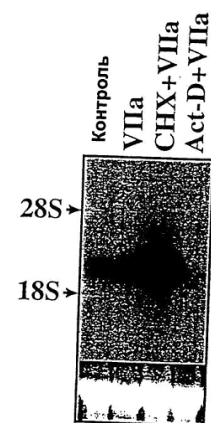
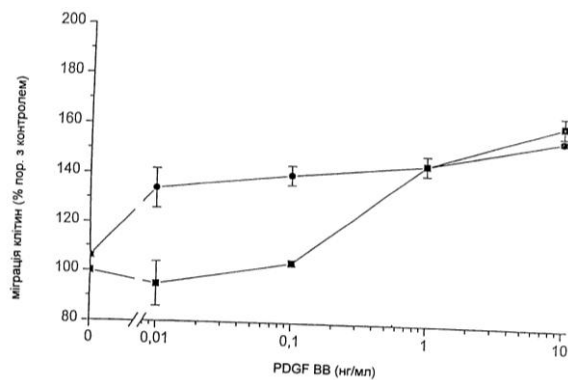
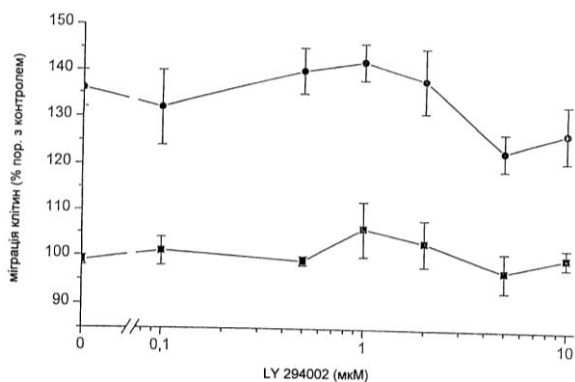


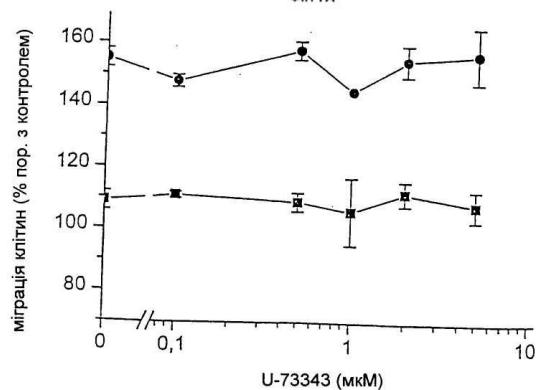
Fig. 6



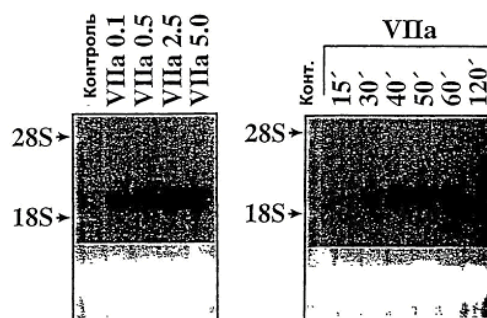
Фиг. 6А



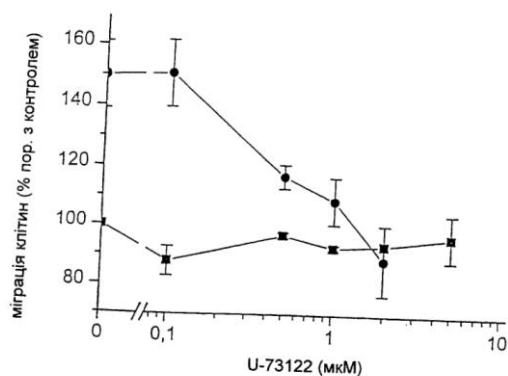
Фиг. 7А



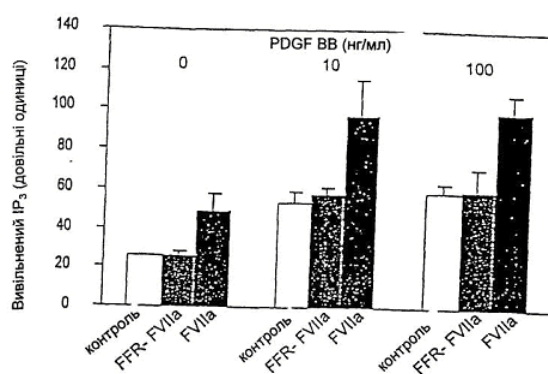
Фиг. 8Б



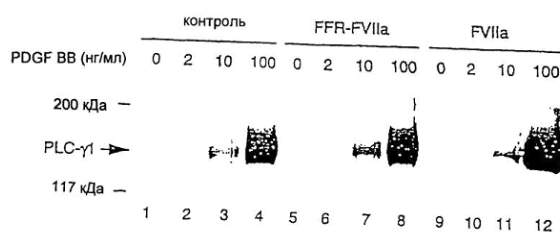
Фиг. 7



Фиг. 8А



Фиг. 9



Фиг. 10