



УКРАЇНА

(19) UA (11) 84665 (13) C2
(51) МПК (2006)
A61K 38/10
A61K 38/12
A61P 27/02 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ ОПОСЕРЕДКОВАНОГО $\alpha\beta_5$ АНГІОГЕНЕЗУ У ТКАНИНІ У ПАЦІЄНТА З НЕОВАСКУЛЯРНИМ ЗАХВОРЮВАННЯМ РОГІВКИ

1

(21) 98031297
(22) 13.08.1996
(24) 25.11.2008
(86) PCT/US96/13194, 13.08.1996
(31) 08/514,799
(32) 14.08.1995
(33) US
(46) 25.11.2008, Бюл.№ 22, 2008 р.
(72) БРУКС ПІТЕР, ЧІРЕШ ДЕВІД Е., ФРЕДЛЕН-ДЕР МАРТІН
(73) ДЗЕ СКРІППС РІСЕРЧ ІНСТІТЮТ
(56) UA A 96093689 A 18.03.1994
WO A 95/14714 01.06.1995
EP A 0578083 12.01.1994
(57) 1. Спосіб інгібування опосередкованого $\alpha\beta_5$ ангіогенезу у тканині, який містить $\alpha\beta_5$, де вказаний ангіогенез має місце у пацієнта з неоваскулярним порушенням рогівки, вибраним з групи порушень, яка складається з трансплантації рогівки, герпетичного кератиту, люетичного кератиту, птеригіуму та неоваскулярного панусу, пов'язаного з носінням контактних лінз, що включає введення

2

вказаному пацієнту композиції, що містить інгібуючу ангіогенез кількість антагоніста $\alpha\beta_5$, який являє собою RGD-вмісний поліпептид.
2. Спосіб за п. 1, де пацієнт має трансплантовану рогівку.
3. Спосіб за п. 1 або 2, в якому вказаний RGD-вмісний поліпептид вибирають з групи, що складається з:
цикло(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO 4),
цикло(Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO 6),
цикло(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (SEQ ID NO 7),
Tyr-Thr-Ala-Glu-Cys-Lys-Pro-Gln-Val-Thr-Arg-Gly-Asp-Val-Phe (SEQ ID NO 8) і
їх солей.
4. Спосіб за п. 3, в якому сіль є гідрохлоридом.
5. Спосіб за будь-яким з пп. 1-4, в якому вказаний $\alpha\beta_5$ антагоніст використовується в інгібуючій ангіогенез кількості, що складає від близько 2 мкМ до 5мМ.
6. Спосіб за будь-яким з пп. 1-5, в якому вказане введення є внутрішньоочним.

Даний винахід було створено при підтримці Уряду відповідно до Контракту Nos. CA45726 і CA50286 Національних Інститутів Здоров'я, Національного Інституту Раку. Держава має певні права на даний винахід.

Даний винахід стосується області медицини і, зокрема, способів і композицій для інгібування в тканинах ангіогенезу, опосередкованого $\alpha\beta_5$, що базується на використанні антагоністів рецептора $\alpha\beta_5$ вітронектину.

Відомо, що інтегрини - клас клітинних рецепторів, що зв'язують екстрацелюлярні матричні білки й у такий спосіб є посередниками у взаємодіях клітини з клітиною і клітини з екстрацелюлярним матриксом, називаних явищем клітинної адгезії. Однак, незважаючи на те, що багато інтегринів і їхні відповідні ліганди описані в літературі, біологі-

чна роль більшості інтегринів залишається невідомою. Рецептори інтегринів являють собою родину білків із структурно обумовленими властивостями, характерними для нековалентних гетеродимерних глікопротеїнових комплексів, утворених α - і β -субодинами.

Зараз відомо, що під рецептором вітронектину, названим так у зв'язку з притаманною йому типовою властивістю зв'язувати вітронектин, мають на увазі три різних інтегрини, позначені як $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_3$ і $\alpha\beta_5$. [Horton, Int. J. Exp. Pathol., 71: 741-759 (1990)].

$\alpha\beta_1$ зв'язує фібронектин і вітронектин. $\alpha\beta_3$ зв'язує велику кількість лігандів, включаючи фібрин, фібриноген, ламіни, тромбоспондин, вітронектин, чинник Вілебранда, остеопонтин і сіалопротеїн1 кістки. $\alpha\beta_5$ зв'язує вітронектин. Ролі цих трьох

(13) C2

(11) 84665

(19) UA

інтегринів в специфічній адгезії клітин в багатьох клітинних взаємодіях в тканинах, ще досі досліджуються. Проте, зрозуміло, що існують різні інтегрини з різними біологічними функціями, так само, як і різні інтегрини і субодиниці, що мають окремі види біологічної специфічності. Важливим розпізнавальним сайтом у ліганді для багатьох інтегринів є трипептидна послідовність аргінін-гліцин-аспарагінова кислота (RGD). RGD виявлений у всіх лігандах інтегринів, які, як зазначено вище, є рецепторами вітронектину. Цей RGD розпізнавальний сайт може бути імітований поліпептидами («пептидами»), що містять RGD-послідовність, і відомо, що такі RGD-пептиди інгібують функцію інтегринів. Важливо проте, відзначити, що в залежності від послідовності і структури RGD-пептиду специфічність інгібування може змінюватися в порівнянні зі специфічністю заданих інтегринів.

RGD-розпізнавальний сайт розглядався в огляді [Pierschbacher et al., *Nature*, 309: 30-33 (1984), Pierschbacher et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 5985-5988 (1984)]. Різні RGD-поліпептиди, що змінюють специфічність інтегринів, були також описані [Grant et al., *Cell*, 58: 933-943 (1989); Cheresh et al., *Cell*, 58: 945-953 (1989); Aumailley et al., *FEBS Letts.* 291: 50-54 (1991); Pfaff et al., *J. Biol. Chem.*, 269: 20233-20238 (1984) і в патентах США №№ 4517686, 4578079, 4589881, 4614517, 4661111, 4792525, 4683291, 4879237, 4988621, 5041380 і 5061693].

Ангіогенез, називаний також неоваскуляризацією, є процес тканинної васкуляризації, що тягне за собою ріст нових кровоносних судин, що розвиваються в тканині. Процес обумовлений інфільтрацією клітин ендотелію і клітин гладкого м'яза. Вважають, що цей процес має місце в будь-якому із трьох нижченазваних випадків: 1) Судини можуть розростатися з вже існуючих судин; 2) Новий розвиток судин може початися на основі клітин-попередників; або 3) Існуючі дрібні судини можуть збільшуватися в діаметрі. [Blood et al., *Bioch. Biophys. Acta*, 1032: 89-118 (1990)]. Відомо, що васкулярні, ендотеліальні клітини містять, принаймні, п'ять RGD-залежних інтегринів, включаючи рецептор вітронектину ($\alpha_v\beta_3$ або $\alpha_v\beta_5$), рецептор колагену Типів I і IV, рецептор ламініну ($\alpha_2\beta_1$), рецептор фібронектину (ламініну) колагену ($\alpha_3\beta_1$) і рецептор фібронектину ($\alpha_5\beta_1$). [Davis et al., *J. Cell. Biochem.*, 51: 206-218 (1993)]. Відомо, що клітина гладкого м'яза містить принаймні RGD-залежних інтегринів, включаючи $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ і $\alpha_v\beta_5$.

Ангіогенез - процес, що має важливе значення в неонатальному розвитку, він також важливий при загоєнні ран і в патогенезі великої кількості клінічно важливих захворювань, що включають запалення тканин, артрити, псоріаз, рак, діабетичну ретинопатію, плямисту дегенерацію й інші неоваскулярні захворювання очей. Ці клінічні ситуації, зв'язані з ангіогенезом, називають ангіогенними захворюваннями. [Folkman et al., *Science*, 235: 442-447 (1987)].

Ангіогенез в основному відсутній у розвинутих зрілих тканинах, незважаючи на те, що він виникає при ранозагоїнні, у циклі росту жовтого тіла. [Див., наприклад, Moses et al., *Science*, 248: 1408-1410 (1990)].

Інгібування адгезії клітин *in vitro* із використанням моноклональних антитіл, імуноспецифічних до різних α - або β -субодиниць інтегрину припускає участь рецептора $\alpha_v\beta_5$ вітронектину в клітинній адгезії різних типів клітин, включаючи міроваскулярні ендотеліальні клітини. [Davis et al., *J. Cell. Biochem.*, 51: 206-218 (1993)]. Крім того, [Nicosia et al., *Am. J. Pathol.*, 138: 829-833 (1991)] описали використання RGD-пептиду, GRGDS, для інгібування *in vitro* утворення «мікросудин» з аорти пацієнта, культивовані у колагеновому гелі.

Однак інгібування утворення «мікросудин» *in vitro* у культурах на колагеновому гелі не є копією інгібування ангіогенезу в тканині, тому що не доведено, що мікросудинні структури є такими ж, як капілярні розростання, або що утворення мікросудини в культурі на колагеновому гелі є таким же, як і неоваскулярний розвиток у інтактній тканині, такої, як тканина при артриті, тканина пухлини або тканина при такому захворюванні, де інгібування ангіогенезу є бажаним.

Роль $\alpha_v\beta_3$ в ангіогенезі була недавно підтверджена, [См. Broors et al., *Science*, 264: 569-571 (1994)]. Було показано, що інтегрин експресується на кровоносних судинах грануляційної тканини рани людини, але не в нормальній шкірі. Моноклональні антитела до $\alpha_v\beta_3$ рецептора інгібували ангіогенез, викликаний чинниками росту (цитокінами), основним чинником росту фібробластів (bFGF) і α -фактором некрозу пухлини (TNF- α), так само, як і фрагментами меланоми. Однак антагоністи інгібували тільки утворення нових, але не вже існуючих судин. Крім цього показано, що специфічні лінійні і циклічні пептиди, що містять RGD, інгібують неоваскуляризацію.

Було висловлено припущення, що інгібування ангіогенезу повинно бути корисним засобом для обмеження росту пухлин.

Інгібування ангіогенезу передбачалося: 1) інгібуванням виділення «ангіогенних молекул», таких, як bFGF (основний чинник росту фібробластів), 2) нейтралізацією ангіогенних молекул, наприклад, використанням анти-bFGF антитіл, і 3) інгібуванням реакції клітин ендотелію, на ангіогенні стимули. Цей останній напрямок вивчався, і [Folkman et al., *Cancer Biology*, 3: 89-96 (1992)] описали декілька інгібіторів ендотеліально-клітинної реакції, включаючи інгібітор колагенази, інгібітори основного мембранного обміну, ангіостатичні стероїди, інгібітори ангіогенезу, що виділяються з грибів, тромбоцитний чинник 4, тромбоспондин, препарати, використовувані при артриті, такі як D-пеніциламін і тіомолат золота, аналоги вітаміну D₃ альфа-інтерферон і їм подібні, що могли б бути використані для інгібування ангіогенезу. Додаткові передбачувані інгібітори ангіогенезу - [див. Blood et al., *Biochim. Biophys. Acta*, 1032: 89-118 (1990), Moses et al., *Science*, 248: 1408-1410 (1990), Ingber et al., *Lab. Invest.*, 59: 44-51 (1988) і US патенти №№ 5092885, 5112946, 5192744 і 5202352].

Проте, для даного винаходу про роль інтегрину $\alpha_v\beta_5$ в ангіогенезі не висловлювалося ніяких припущень, вона не була визначена, і жодний з інгібіторів, описаних у вищевказаних джерелах не був пов'язаний із інгібуванням за допомогою $\alpha_v\beta_5$.

Більш того, крім даного винаходу відсутні повідомлення, що наводять на думку про роль $\alpha_v\beta_5$ інтегрину в неоваскуляризації, особливо такої, що індукується чинниками росту, чинником судинного ендотеліального росту (VEGF), чинником- α (TGF- α), що змінює ріст, чинником росту епідермісу (EGF).

Незважаючи на те, що число чинників росту, включених у контроль ангіогенезу, лімітовано, існують різні рівні контролю за перетворенням стану спочинку в неоваскулярний стан. [Див. D'Amore, *Investigative Ophthalmol. Visual Sci.*, 35: 3974-3979 (1994)]. У той час як деякі чинники росту, що беруть участь в ангіогенезі, регулюються рівнем синтезу, інші регулюються станом активації. Ці події в клітинах відбуваються, коли судина, яка знаходиться у стані спокою, піддається неоваскуляризації внаслідок ушкодження або ішемії.

Зокрема, думають, що VEGF - головний посередник в ангіогенезі при первинній пухлині й у ішемічних захворюваннях очей. [Див. огляд Folkman, *Nature Medicine*, 1: 27-31 (1995)]. VEGF являє собою гомодимер із молекулярною масою 46 кілодальтон (кДа), що є специфічним до клітин ендотелію ангіогенним [Ferrara et al., *Endocrin. Rev.*, 13: 18-32 (1992)] і судинопроникаючим чинником, [Senger et al., *Cancer Res.*, 46: 5629-5632 (1986)], що зв'язує високо-специфічні мембранозв'язані рецептори з тирозинкіназою активністю [Jakeman et al., *J. Clin. Invest.*, 89: 244-253 (1992)].

Нещодавно було показано, що активація рецепторних тирозинкіназ прискорює пересування інтегрин-залежних клітин до екстрацелюлярних матричних білків. Зокрема, [Klemke et al., *J. Cell. Biol.*, 127: 859-866 (1994)] пропустили, що роль EGF рецепторної (EGFR) тирозинкінази в посиленні клітинної рухливості, але не адгезії FG-клітин панкреатичної карциноми людини на вітронектині за допомогою $\alpha_v\beta_5$ інтегрину. Автори дають прямий доказ того, що зв'язування EGFR EGF-лігандом підвищує тирозинкіназну активність EGFR, що відразу ж стимулює залежний від протеїнкінази C (PKC) процес, що веде до виникнення пересування $\alpha_5\beta_1$ -залежних клітин до вітронектинового субстрату, до якого клітини не спроможні мігрувати у природному стані. Таким чином, відкриття Klemke et al. дають доказ кореляції присутності цитокінів, особливо EGF з активністю інтегрину в міграції клітин. Було показано, що активація PKC бере участь у регуляції ангіогенезу в модельній системі на основі хоріоалантоїсної мембрани курчати. [Див. Tsorpanoglou et al., *J. Vasc. Res.*, 30: 202-208 (1993)]. Автори визначили специфічні активатори й інгібітори PKC, що відповідно стимулювали й інгібували ангіогенез у модельній системі.

Проте ні Klemke et al., ні Tsorpanoglou et al. не обговорювали вищеописану роль цитокінів і експресії і/або активації $\alpha_v\beta_5$ інтегрину в прискоренні ангіогенезу при різних умовах і хворобливих станах і інгібування його $\alpha_v\beta_5$ -специфічними антагоністами.

Нещодавно було експериментально показано на модельній системі захворювання очей мавпи, що ретинальна ішемія, викликана закупоркою ретинальної вени, призводила до швидкого зростання VEGF у водяних камерах ока. Цей підйом збіга-

ється з неоваскуляризацією райдужної оболонки ока, що спостерігалася і була описана: [Miller et al., *Am. J. Pathol.*, 145: 574-584 (1994)]. Додатковими даними на модельній системі проліферативної ретинопатії миші, у якій була створена гіпоксія, було показано, що VEGF матрична РНК збільшувалася протягом 6-12 часів відносної гіпоксії і залишалася збільшеною доти, поки не розвивалася неоваскуляризація. Як тільки розвиток нових кровоносних судин закінчувався, знижувалася й експресія VEGF, як описано [Pierce et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 905-909 (1995)].

Таким чином, отримані нещодавно дані на моделях ішемії з використанням тварин показують відповідність між індукцією VEGF і початком ішемії, за якою слідує неоваскуляризація. VEGF, а також і інші чинники росту, беруть участь і при інших умовах у захворюваннях, при яких має місце неоваскуляризація, як це описано [Folkman, *Nature Medicine*, 1:27-31 (1995)].

Доповідь Folkman et al. підводить результати поточних клінічних спроб контролювати небажаний ангіогенез. При клінічних іспитах пацієнти одержували лікарські засоби з інгібіторами ангіогенезу, включаючи тромбоцитний чинник 4, похідне фумагіліну, карбоксиамінотріазол і їм подібні. Проте, відсутні повідомлення про поточні терапевтичні спостереження, що підтверджують кореляцію експресії $\alpha_v\beta_5$ ангіогенезом, особливо, коли останній індуковано VEGF. Таким чином, до даного винаходу ніким не описувався і не використовувався терапевтичний прийом із використанням $\alpha_v\beta_5$ антагоністів для контролю за ангіогенезом у тканинах з розвинутим ангіогенезом, пов'язаний з участю й активацією $\alpha_v\beta_5$.

Тому, крім показаних тут звітів про дослідження $\alpha_v\beta_5$ і зв'язку чинників росту з ангіогенезом, Заявнику не відомо будь-яке інше підтвердження того, що ангіогенез може бути інгібований у тканині з поміччю інгібіторів $\alpha_v\beta_5$ -обумовленої клітинної адгезії. Зокрема, ніколи раніше не було показано, що $\alpha_v\beta_5$ функція необхідна для ангіогенезу в тканині або що $\alpha_v\beta_5$ антагоністи можуть інгібувати ангіогенез у тканині, особливо у випадку очних неоваскулярних захворювань.

Даний винахід показує, що крім плинну ангіогенезу в тканинах, що потребує $\alpha_v\beta_3$, існує також і інший новий підхід із використанням $\alpha_v\beta_5$. Таким чином, у Винаході описуються інгібітори $\alpha_v\beta_5$, що можуть інгібувати ангіогенез. Далі винахід описує, що активність $\alpha_v\beta_5$ у посиленні ангіогенезу, як його учасника, співвідноситься з чинник-ростовою (цитокіновою) активацією тирозинкіназ рецептора чинника росту і протеїнкінази C (PKC). Чинники росту (цитокіни), що діють таким чином, включають васкулярний ендотеліальний чинник росту (VEGF), що трансформує чинник росту - α (TGF- α), епідермальний чинник росту (EGF) і їм подібні.

Винахід далі описує способи інгібування ангіогенезу в тканині, що включають введення в тканину композиції, яка містить інгібуючу ангіогенез кількість $\alpha_v\beta_5$ антагоніста.

Тканина, яку слід опрацьовувати таким чином, може бути будь-якою, в якій бажано інгібування ангіогенезу, наприклад, тканини при захворюван-

нях, коли розвивається неоваскуляризація. Прикладами таких тканин служать тканини ока, де розвилася неоваскуляризація, запалення тканин, тверді пухлини, метастази, тканини, що зазнають рестенозу, і подібні їм. У кращих варіантах, неоваскуляризація, пов'язана з експресією $\alpha\beta_5$, є результатом дії чинників росту, VEGF, TGF- α і EGF.

Найкращими є способи лікування, спрямовані на інгібування VEGF-обумовленої васкуляризації в тканинах, таких як очна, де ангиогенез яскраво виражений при захворюваннях, що включають діабетичну ретинопатію (називану також проліферативною діабетичною ретинопатією), пов'язану з віком плямисту дегенерацію, передбачуваний очний гістоплазмозіс, ретинопатію передчасності, клітинну ретинопатію і неоваскулярну глаукому. У подальших кращих варіантах способи лікування передбачають інгібування ангиогенезу, що трапляється при неоваскулярних порушеннях рогової оболонки ока, які включають пересадку рогової оболонки ока, герпетичні кератити, сифілітичні кератити, птеригіум, неоваскулярний панус, пов'язаний із використанням контактних лінз і т.п.

$\alpha\beta_5$ антагоніст, використовуваний у заявлених способах, спроможний зв'язувати $\alpha\beta_5$ і конкурентно інгібувати спроможність $\alpha\beta_5$ зв'язуватися з природним вітронектиновим лігандом. Переважно антагоніст виявляє специфічність до $\alpha\beta_5$ у порівнянні з іншими інтегінами. У найбільш кращому варіанті антагоніст інгібує зв'язування вітронектину або інших лігандів, що містять RGD, із $\alpha\beta_5$, але незначно інгібує зв'язування вітронектину з $\alpha\beta_3$ або $\alpha_{11b}\beta_3$. Кращий $\alpha\beta_5$ антагоніст може бути лінійним або циклічним поліпептидом, моноклональним антитілом або його функціональним фрагментом або імітуючою органічною молекулою, яка є міметиком $\alpha\beta_5$ ліганда, що називається також органічним міметиком, усі вони специфічно взаємодіють із $\alpha\beta_5$.

Призначення $\alpha\beta_5$ антагоністів, відповідно до даного винаходу включають інтраокулярне, внутрішньовенне, трансдермальне, внутрішньосиновіальне, внутрішньом'язове й оральне введення. У інших кращих варіантах спосіб введення координують із хіміотерапевтичним режимом для контролю за розвитком пухлини і ракових метастазів.

У графічних матеріалах, що складають частину цього відкриття: Фігури 1A-1D ілюструють інгібування викликаного цитокіном ангиогенезу в роговій оболонці ока кролика за допомогою антагоністів, що являють собою α_v інтегринові антитіла.

Виникнення ангиогенезу в результаті опрацювання або bFGF, або VEGF і результати, отримані від цього з використанням антагоністів - антитіл до α інтегринів, PIF6 ($\alpha\beta_5$) і LM609 ($\alpha\beta_3$), описані в Прикладі 4. OD і OS позначають відповідно правий і лівий очі піддослідного кролика. Великі стрілки показують ангиогенез у роговиці ока, тоді як маленькі стрілки відзначають нормальні судини кон'юнктиви. Фігури 1A й AB показують картину ангиогенезу, викликаного bFGF, тоді як Фігури 1C і 1-викликаного VEGF. На Фігурах 1A і 1C показана обробка роговиці кролика PIF6, а на Фігурах 1B і 1D - обробка LM609.

Фігури 2A і 2B - гістограми, що показують середню неоваскулярну площу в мм^2 \pm стандартна помилка ($n=8$ для кожної з двох серій) після індукції відповідно або bFGF, або VEGF, після чого йшло опрацювання mAb відповідно або PIF6 або LM609. Обговорення результатів приводиться в Прикладі 4.

Фігури 3A-3F (фотографії) ілюструють ефекти від опрацювання Сам-препарату курчати антиінтегриновими антитілами. Обговорення результатів - у Прикладі 6A. Ангиогенез, викликаний або bFGF, або VEGF, після чого внутрішньовенно уводили фосфатно-сольовий буфер (PBS), для контролю, або моноклональні тіла PIF6 або LM609, описаний в написі до Фігури 1. CAM, оброблені bFGF, показані на Фігурах 3A, 3C і 3E, тоді як CAM, оброблені VEGF, показані на Фігурах 3B, 3D і 3F. Контрольні CAM після внутрішньовенних ін'єкцій PBS показані на Фігурах 3A і 3B. На Фігурах 3C і 3D показане опрацювання CAM PIF6-антитілом, а на Фігурах 3E і 3F - опрацювання CAM LM609-антитілом.

На Фігурах 4A і 4B у виді гістограми показані кількісні значення результатів, показаних на Фігурах 3A-3F. Показник ангиогенезу нанесений на графіку на вісь Y проти контролю або опрацювання антитілом, Фігури 4A і 4B відповідно показують ангиогенез, викликаний bFGF і VEGF. Обговорення результатів у Прикладі 4.

Фігури 5A-5F фотографічно ілюструють результати опрацювання синтетичним пептидом CAM препарату курчати, як описано в Прикладі 6. Ангиогенез, викликаний або bFGF, або VEGF, із наступним внутрішньовенним введенням фосфатно-сольового буфера (PBS) у якості контролю або синтетичних циклічних пептидів RGDf (SEQ ID No. 4) або RADfV (SEQ ID No. 5). CAM оброблені bFGF, показані на Фігурах 5A, 5C і 5E, тоді як CAM оброблені VEGF, показані на Фігурах 5B, 5D і 5F. Контрольні препарати CAM, що одержали внутрішньовенні ін'єкції PBS, показані на Фігурах 5A і 5B. На Фігурах 5C і 5D показані CAM, оброблені пептидом RDGf, а на Фігурах 5E і 5F - оброблені пептидом RADfV.

На Фігурах 6A і 6B у виді гістограми проілюстровані кількісні значення результатів, показаних на Фігурах 5A-5F. Показник ангиогенезу нанесений на графіку на вісь Y проти контролю або обробки антитілом. Фігури 6A і 6B відповідно показують ангиогенез, викликаний bFGF і VEGF. Результати обговорюються в Прикладі 6.

На Фігурах 7A-7E показані результати впливу антиінтегринових моноклональних антитіл і калфостину C на ангиогенез у CAM, викликаний різними цитокінами, bFGF, TNF- α , VEGF і TGF- α . Аналогічно оцінювалася дія PMA. Експерименти і результати описані в Прикладі 6. Результати нанесені на гістограму, де ангиогенез відзначають по Y-осі, а різні контроль і інгібітори - на X-осі. На Фігурах 7A-7E відповідно показаний ангиогенез, викликаний bFGF, TNF- α , VEGF, TGF- α і PMA.

Фігура 8 - гістограма, що показує результати впливу антитіл на ріст CS1 меланоми пухлини в досліджуваному CAM ембріона курчати, здійсненого, як описано в Прикладах 5C і 5D. Вага пухлини в міліграмах (мг) нанесена на вісь Y, тоді як

різні типи обробки показані на осі X. CSAT - контрольні антитіла до $\beta 1$ -субодиниці інтегрину. LM609 і PIF6 - описані вище.

Фігура 9 - гістограма, що показує результати впливу контролю в порівнянні з $\alpha\beta 5$ -пептидним антагоністом, що позначається як пептид 189 (SEQ ID No. 5) на ріст меланомної пухлини, що визначали за обсягом пухлини в мм^3 , нанесеним на Y-вісь. Експеримент і результати описані в Прикладі 8.

Фігура 10 ілюструє синтез З'єднання 7 відповідно до опису Приклада 10 A-G.

Фігура 11 ілюструє синтез З'єднання 9 відповідно до опису Приклада 10 A-C; H-I.

Фігура 12 ілюструє синтез З'єднання 10 відповідно до опису Приклада 10G.

Фігура 13 ілюструє синтез З'єднання 12 і З'єднання 14, відповідно описаних у Прикладі 10 K-L і 10 M-N.

На Фігурі 14 показані хімічні структурні формули З'єднання 15, З'єднання 16, З'єднання 17 і З'єднання 18. Детальний синтез показаних з'єднань описаний у Прикладі 10 O-R.

А. Визначення

Амінокислотний залишок: Амінокислота, отримана в результаті розщеплення (гідролізу) пептидних зв'язків у поліпептиді. Описані тут кислотні залишки переважно є L-ізомерами Проте залишки в D-ізомерній формі можуть заміщати будь-який L-ізомерний амінокислотний залишок доти, поки поліпептид зберігає необхідну функціональну властивість. NH_2 вільна аміногрупа на амінному кінці поліпептиду. COOH - вільна карбоксигрупа на кінці поліпептиду з карбоксильною групою. Відповідно до номенклатури стандартів поліпептидів [описаної в J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969) і, як замовлено в 37CFR §1. 822 (b) (2)], у нижченаведеній Таблиці Відповідності приводяться аббревіатури амінокислотних залишків:

Таблиця Відповідності

Символ 1-буквений	3-буквений	Амінокислота
Y	Tyr	тирозин
G	Glu	ліцин
F	Phe	фенілаланін
M	Met	метіонін
A	Ala	аланін
S	Ser	серин
I	Ile	ізолейцин
L	Leu	лейцин
T	Thr	треонін
V	Val	валін
P	Pro	пролін
K	Lys	лізин
H	His	гістидин
Q	Gln	глутамін
E	Glu	глутамінова кислота
Z	Glx	Glx або Gln
W	Thr	триптофан
R	Arg	аргінін
D	Asp	аспарагінова кислота
N	Asn	аспарагін
B	Asx	Asn або Asp

C	Cys	цистеїн
X	Xaa	невідомі і, або інші

Крім того, нижче приводяться інші відповідні позначення:

BOC	трет-бутилоксикарбоніл
DCCL	дициклогексилкарбодіімід
DMF	диметилформамід
Ome	метокси
NOBt	1-гідроксибензотриазол

Слід зазначити, що всі амінокислотні послідовності подані тут структурами, для яких ліве і праве обертання відповідає звичайному напрямку від N-кінця до C-кінця. Далі, варто зазначити, що тире на початку або кінці амінокислотної послідовності показує на пептидний зв'язок із іншим амінокислотним ланцюжком, що складається з однієї або більш залишків амінокислот.

Поліпептид: Лінійний ланцюжок із залишків амінокислот, з'єднаних між собою пептидними зв'язками між α -аміногрупою і карбоксигрупою прилягаючих друг до друга амінокислотних залишків.

Пепсид: Лінійний ланцюжок із не більш ніж 50 амінокислотних залишків, з'єднаних один з одним, як у пептиді.

Циклопептид: Пептид у виді кільця, утворений із відповідного лінійного пептиду, і віднесений до пептидів, у яких при відсутності вільних C- і N-кінців, N-кінці амінокислот відповідного лінійного пептиду зв'язані амідним зв'язком із C-кінцями амінокислот зазначеного відповідного лінійного пептиду.

Протеїн: Лінійний ланцюжок із більш ніж 50 амінокислотних залишків, зв'язаних між собою так само, як у поліпептиді.

Синтетичний пептид: Отриманий хімічним шляхом ланцюжок з амінокислотних залишків, з'єднаних друг з другом пептидними зв'язками, і при відсутності в ланцюзі природних білків і їхніх фрагментів.

В. Основні положення

Даний винахід стосується відкриття того, що ангіогенез опосередкований специфічним рецептором вітронектину $\alpha\beta 5$ і що інгібування функції $\alpha\beta 5$ пригнічує ангіогенез.

Це відкриття важливе через ту роль, яку ангіогенез грає при розвитку безлічі захворювань. Інгібуванням ангіогенезу можна втрутитися в захворювання, поліпшити симптоми, й у деяких випадках вилікувати хворобу.

Там, де ріст нових кровоносних судин викликає патологію, зв'язану з захворюванням, інгібування ангіогенезу буде зменшувати небажані результати хвороби. Прикладами їх є артрити, діабетична ретинопатія, запальні захворювання, ретиноз і інші. Там, де розвиток нових кровоносних судин супроводжується розвитком небажаної тканини, інгібування ангіогенезу буде зменшувати кровопостачання цієї тканини й у такий спосіб приводити до зменшення маси цієї тканини, яке залежить від умов кровопостачання.

Приклади показують розвиток нових кровоносних судин у відповідь на ішемію, що приводить до ангіогенезу, який розвинувся під впливом чинника росту, ріст пухлин, при яких неоваскуляризація є

неодмінною умовою для того, щоб пухлина природо-стала на декілька міліметрів у товщину і для роз-витку щільних метастазів.

Способи, запропоновані в даному винаході, є частково ефективними, тому що ця терапія дуже селективна стосовно ангіогенезу але не є такою для інших біологічних процесів. Як показано в Прикладах, тільки при рості нових судин має місце значний рівень $\alpha\beta_5$, отже, запропоновані терапев-тичні методи не діють згубно на вже розвинуті структури.

Відкриття того факту, що інгібування лише од-ного $\alpha\beta_5$ буде ефективно пригнічувати ангіогенез, допускає і розробку лікарських засобів із потенцій-но високою специфічністю і, відносно низькою ток-сичністю. Незважаючи на те, що винахід розкриває використання реагентів на основі пептидів, які ма-ють здатність інгібувати один або більш інтегринів, можна сконструювати й інші реагенти, які селектив-но інгібують $\alpha\beta_5$. Тому певні реагенти пептидної природи не мають побічного ефекту інгібування інших біологічних процесів крім тих, у яких бере участь $\alpha\beta_5$.

Наприклад, як тут роз'яснюється, можна ство-рити моноклональні антитіла, високоселективні по імуновзаємодії з $\alpha\beta_5$, але не $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_3$ або $\alpha_{11b}\beta_3$, що будуть аналогічно селективними в процесі інгі-бування функції $\alpha\beta_5$. Крім того, можуть бути син-тезовані пептиди, що містять RGD, які селективно інгібують $\alpha\beta_5$, як буде описано далі.

До даного винаходу не було відомо, що ангіо-генез і будь-який із процесів, залежних від нього, може бути інгібований *in vivo* впливом за допомо-гою реагентів - антагоністів біологічної функції $\alpha\beta_5$.

C. Способи інгібування ангіогенезу

Даний винахід пропонує спосіб інгібування ан-гіогенезу в тканині і, у результаті цього, пригнічен-ня тих викликаних ангіогенезом явищ, що відбува-ються в тканині. У загальному випадку спосіб передбачає введення в тканину композиції, що включає інгібуючу ангіогенез кількість антагоніста $\alpha\beta_5$.

Тканина-мішень, у відношенні якої застосову-ються способи даного винаходу, визначається як тканина, що містить $\alpha\beta_5$, яка характеризується помітною наявністю в ній рецептора $\alpha\beta_5$ інтегрину. Іншими словами, тканина, яка містить $\alpha\beta_5$ визна-чається наявністю $\alpha\beta_5$ рецепторного комплексу в клітинних мембранах. До таких тканин відносяться епітелії і клітини, які мезенхімно утворилися. На-явність рецептора можна визначити за допомогою ряду засобів, включаючи імунореактивність рецеп-тора стосовно антитіл $\alpha\beta_5$ інтегринового рецепто-ра, причому імунореакцію визначають у тканинах за допомогою мікроскопії, імунопреципітації, аналі-зів конкурентного лігандного зв'язування й інших аналогічних методів. Найкращі антитіла, викорис-товувані для визначення наявності $\alpha\beta_5$ у тканині, описані нижче й у Прикладі 1. Наприклад, поши-рення у нирці, шкірі і тканинах ока, знайдене мето-дом імуофлуоресцентної мікроскопії, описане в Прикладі 2.

У контексті способів даного винаходу тканина, що містить $\alpha\beta_5$, характеризується показником ан-

гіогенезу. Як раніше було описано, ангіогенез при-пускає безліч процесів, при яких має місце неовас-куляризація тканини, включаючи розростання судин, утворення нових судин або збільшення старих, вже існуючих у тканині судин, усі ці проце-си ангіогенезу протікають за участю $\alpha\beta_5$ і залежні від експресії $\alpha\beta_5$. Вважають, що за винятком про-цесів загоєння травматичної рани, утворення жов-того тіла і ембріогенезу, переважна кількість про-цесів ангіогенезу зв'язана з захворюваннями, і тому запропоновані способи даного винаходу є селективними і не дають небажаних побічних ефе-ктів.

Існує багато захворювань, при яких, як вважа-ють, ангіогенез грає важливу роль, які називають анпогенними захворюваннями. Вони включають, але не обмежені ними, запальні процеси, напри-клад, імунне і неімунне запалення, хронічний рев-матизм суглобів і псоріаз, розлади, зв'язані з не-відповідною або несвоєчасною інвазією, проліферацію капілярів в атеросклеротичних бля-шках, остеопороз, порушення, викликані раковими захворюваннями, щільні пухлинні метастази, ангі-офіброми, ретролентальну фіброплазію, гемангіо-ми, саркому Капоши і аналогічні ракові захворю-вання, при яких неоваскуляризація підтримує ріст пухлини.

Найкращими об'єктами лікування є захворю-вання очей, що супроводжуються явищем ангіоге-незу. Неоваскуляризація ока - найбільш поширена патологічна зміна, що спостерігається при більшо-сті очних захворювань, які приводять до втрати зору. Розростання нових кровоносних судин із вже існуючих хороїдальних, ретинальних або паралім-бальних судин приводить до набряків, геморагії або утворенню фіброваскулярних мембран, що обумовлює руйнування нормальних анатомічних зв'язків ока і супутньої втрати його нормальної зорової функції.

Очні захворювання, що характеризуються ан-гіогенезом, включають неоваскулярні порушення в рогівці, у тому числі при пересаджуванні рогівки, герпетичні кератити, люетичні кератити, явища неоваскуляризації, зв'язані з носінням контактних лінз, і тому подібні. Крім цього, до таких захворю-вань очей відносяться діабетична ретинопатія (DR), зв'язана з віком плямиста дегенерація (ARMD), передбачуваний очний пістоплазмозіс (POHC), ретинопатія передчасності (ROP), неова-скулярна глаукома і т.п. Хоча інгібування ангіоге-незу необов'язково виліковує існуючі в основі його захворювання, важливим є суттєве зменшення хворобливих симптомів, зв'язаних із ними.

Наприклад, 90% із 300 000 чоловік, що хворі-ють діабетом протягом 25 років, будуть мати деяку форму DR, що є ретинальним захворюванням, яке характеризується стіканням і/або проліферуван-ням кровоносних судин. Тридцять, відсотків із них будуть фактично знаходитися в дуже поганому стані, що може бути поліпшено використанням заявлених методів лікування. Щодо ARMD потріб-но відзначити, що 25% населення старіше 65 ро-ків, приблизно 630 тис., будуть мати деяку форму цього захворювання й очікується, що до 2030 року більш 6,3млн. людей занедужають ARMD. Таким чином, можливість інгібувати викликаний $\alpha\beta_5$ ангі-

огенез за допомогою заявлених у даному винаході лікарських композицій і способів лікування має величезну цінність з точки зору медицини.

Отже, способи, що інгібують ангиогенез в ураженій тканині, поліпшують симптоми хвороби і, у залежності від захворювання, можуть сприяти його лікуванню. В одному випадку, відповідно до винаходу, передбачається інгибування ангиогенезу *per se* в тканині. Ступінь розвитку ангиогенезу в тканині і ступінь інгибування, що впливає звідси, за допомогою запропонованих способів, може бути розрахована за допомогою способів, описаних у Прикладах і використовуваних для визначення $\alpha\beta_5$ -імунорепозитивних судинних структур, що утворюються знову і незрілих судинних структур шляхом імуногістохімічних процедур.

Як описувалося вище, деякі з тканин або органів, що включають упорядковані структури тканин, можуть підтримувати ангиогенез у стані захворювання, наприклад, шкіра, тканина м'язів, кишкова тканина, з'єднувальна тканина, суглоби, кістки й аналогічна тканина, в якій кровоносні судини переважно мають ангиогенну дію.

Зокрема, способи і композиції антагоністів $\alpha\beta_5$, запропоновані у винаході, терапевтично корисні для інгибування ангиогенезу, що був обумовлений чинниками росту, названими цитокінами. При фізіологічних умовах ангиогенез має високу пристосованість і, відповідно до [публікації Brooks et al., Science, 264: 569-5761 (1994)], було показано, що він активується під дією специфічних ангиогенних молекул, таких як основний чинник росту фібробластів (bFGF). Негативні регулятори ангиогенезу також описані. Ангиогенез, таким чином, регулюється складним балансом між місцевими стимуляторами й інгібіторами. [Див. D'Amore, Investigative Ophthalmol Visual Sci., 35: 3974-3979 (1994)].

Коли фізіологічний баланс між ангиогенними стимуляторами й інгібіторами, який стійко контролює природну капілярну судину, що знаходиться в спокої, порушується, що має місце при відповідних станах, викликаних захворюванням, клітини капілярів ендотелію одержують сигнал до проліферації міграції і відразу ж диференціюються з метою утворення нових кровоносних судин.

Ангиогенез характеризується як каскадне явище, що складається з ряду більш ранніх стадій, після чого слідує наступні події, як це описувалося [Leibovich у: «Роль цитокінів у процесі ангиогенезу пухлини», у «Цитокіни людини: їхня роль у захворюванні і лікуванні», вид. Aggarwal and Puri, Chapter 35, Blackwell Science, Inc.(1995)]. Початковим стадіям передують виділення ангиогенних чинників росту і цитокінів, вироблених зовнішньосудинним джерелом. Ці більш ранні події потім розвертаються в певних мікросудинах із розпадом міжклітинних функцій, порушенням експресії антигенів активації ендотеліальних клітин і протеолітичного фенотипу і початком міграції ендотеліальних клітин по певному шляху. Наступні події характеризуються аутокринною і паракринною експресією чинника росту і виникненням цитокіну усередині клітин, ендотеліальних клітин, перичитів і клітин гладкого м'яза, розвитком капілярної нирки. Ці клітини, у свою чергу, регулюють взаємодії клітин із

позаклітинним матриксом, що приводять до утворення нових функціональних капілярних вузликів із вже існуючих розвинутих судин.

Як обговорювалося тут і в розділі «Попередній рівень», літературні джерела описують зв'язок між появою чинників росту, включаючи ті з них, що зв'язані з підвищенням рівня експресії $\alpha\beta_5$, а саме, VEGF, TGF- α і EGF, із розростанням тіла пухлини і початком ангиогенезу при проліферативних неоваскулярних захворюваннях очей, як людей, так і тварин.

Таким чином, VEGF, EGF, TGF- α розглядаються серед багатьох інших як ростові чинники, що характеризуються їх здатністю стимулювати ріст клітин. Ростові чинники являють собою протеїни, які виробляються окремою клітиною, діють на клітину, що секретує, або іншу клітину. Їхня здатність діяти залежить від присутності рецепторів чинника росту, що як правило, є трансмембранними білками. Ростові чинники, такі як VEGF, називаються також цитокінами, які визначаються як поліпептидні гормони, та виробляються клітиною і впливають на ріст і метаболізм тієї ж (аутокринної) або іншої (паракринної) клітини. Термін «цитокін» не обмежений молекулами, продукованими клітинами імунної системи і модифікаторами біологічної відповіді тієї ж системи. Таким чином, термін «цитокін» визначає численний клас сполук, у якому один підклас, заснований на типі біологічної відповіді, включає ростові чинники зі стимулюючою властивістю або підсилювачі, такі як VEGF, bFGF, EGF, TGF- α і їм подібні. [Див. огляд Aggarwal et al., «Загальні і приватні властивості цитокинів і рецепторів цитокінів: Огляд», у «Цитокіни людини: їхня роль у захворюванні і лікуванні», вид. Aggarwal and Puri, Частина I, Blackwell Science, Inc. (1995)].

У цьому винаході антагоністи, специфічні до $\alpha\beta_5$ і антагоністи, що не є зрізовими чинниками, як, наприклад, антитіла проти VEGF, пропонуються для використання в інгибуванні ангиогенезу в тканині. У кращих варіантах описані тут антагоністи *avrs* корисні для інгибування ангиогенезу, викликаного чинником росту, при якому має місце експресія рецептора $\alpha\beta_5$ інтегрину. Кращими чинниками росту в цьому випадку є VEGF, EGF, TGF- α і їм подібні.

Як обговорювалося в розділі, що характеризує попередній рівень, ростові чинники EGF і VEGF зв'язуються зі своїми клітинними рецепторами, що діють як тирозинкінази. Як показано далі, активація рецептора корелює з активацією протеїнкінази C, що приводить у результаті активації $\alpha\beta_5$ до міграції специфічних клітин на вітронектиновий субстрат. Так що механізм взаємозв'язку між впливом цитокінів або чинників росту і відповідною реакцією, що виявляється в експресії інтегрину або його активації, є складним біологічним процесом. Як показано в даному винаході (див. Приклад 6A), обробка тканин моделі ока кролика і хоріоантоїсної моделі курчати цитокіном VEGF приводить до $\alpha\beta_5$ -обумовленого ангиогенезу, що залежить від активації протеїнкінази C.

Особливу перевагу має варіант цього винаходу, за яким пропонується використовувати $\alpha\beta_5$ антагоністи для інгибування в будь-якій тканині, у

якій ангиогенез індукований VEGF. Наприклад, було показано, що ішемія сітківки в різних модельних системах тварин приводить до зверхрегуляції VEGF, що виділяється Клітками Мюлера, виробітка якого викликає неоваскуляризацію в тканинах усередині ока. [Див. Miller et al., *Am. J. Path.*, 145:574-584 (1994) і Pierce et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92:905-909 (1995)].

Таким чином, відповідно до даного винаходу, тканина, яку слід обробляти, являє собою тканину сітчастої оболонки ока хворого діабетичною ретинопатією, плямистою дегенерацією, неоваскулярною глаукомою або аналогічним захворюванням відповідно до вищеописаного, а під ангиогенезом, який слід інгібувати, мається на увазі ангиогенез у сітківці, де має місце неоваскуляризація. Приклади тканин, включаючи тканини рогівки, від пацієнтів із неоваскуляризаційними явищами очей або захворюваннями, описані вище й у Прикладах. Зразкова модельна система для оцінки результатів обробки $\alpha_v\beta_5$ антагоністом даного винаходу при ретинальному ангиогенезі являє собою модель ретинальної неоваскуляризації миші, як описано в Прикладі 9. Відповідно до іншого варіанта винаходу, тканина, яку слід піддати обробці, являє собою тканину в процесі запалення, а ангиогенез, який необхідно інгібувати, являє собою ангиогенез у запаленні тканині, де йде процес запальної неоваскуляризації. У цьому випадку пропонується інгібування ангиогенезу в тканинах при артриті, характерних для хворих хронічним суглобним ревматизмом, у тканинах із запаленнями імунного і неімунного характеру, у тканинах при псоріазі і т.п.

Вважають, що цитокіни, інтерлейкін-1 і чинник некрозу пухлини а мають відношення до ревматоїдного артриту в зв'язку з їхньою безпосередньою роллю в руйнуваннях суглобів, заснований на тому, що вони викликають утворення молекул, відповідальних за адгезію на ендотеліальних клітинах і виділення ферментів. [Див. Arend et al., *Arthritis and Rheumatism*, 38: 151-160 (1995)]. Були запропоновані способи терапії, засновані на блокуванні цитокінів, цитокін-специфічних інгібіторів, а також і молекул, що забезпечують клітинну адгезію, які утворюються в даних умовах. [Див. Haskard et al., *Cell Adhesion Comm.*, 2: 235-238 (1994)].

Таким чином, інгібування ангиогенезу при артритах спрямуванням терапії на запаленість і складність зв'язаної з $\alpha_v\beta_5$ адгезії молекул є іншим кращим варіантом втілення винаходу, як і попередніх винаходів.

Ще в одному окремому випадку даного винаходу тканина, що піддається обробці, являє собою тканину пухлини пацієнта, хворого раком із метастазами, раком шкіри і раком молочної залози, гемангіомою або ангіофібромою або аналогічними раковими захворюваннями, а ангиогенез, який інгібують, являє собою ангиогенез у тканині пухлини, де має місце неоваскуляризація пухлинної тканини. Типові тканини, у яких розвиваються щільні пухлини, придатні для обробки запропонованими методами, включають тканини легені, підшлункової залози, молочної залози, товстої кишки, гортані, яєчників і подібні їм.

Роль складної мережі цитокінів, що існує в щільних пухлинах людини, є предметом розгляду

в [огляді Leek et al., *J. Leukocyte Biol.*, 56: 423-435 (1994)], висновки якого тут коротко викладаються. Вважають, що ряд цитокінів, включаючи VEGF, як кислотний, так і основний FGF (bFGF), TGF- α і - β , EGF, TNF- α , виділений із тромбоцитів чинник росту клітин ендотелію, ангиогенін, інтерферони α і γ , інтерлейкіни 1, 6 і 8 і подібні їм, впливають на різноманітні клітинні механізми ангиогенезу в злоякісних утвореннях тканин і клітинних мішеней. Наприклад, недавно було показано, що крім локалізації в різних типах пухлин, VEGF зв'язаний з ангиогенезом при карциномі молочної залози, як це описав [Brown et al., *Human Path.*, 26: 86-91 (1995)].

Пухлини, що секретують різні цитокіни й у яких локалізується ангиогенез (стосовно до даного винаходу, цитокіни VEGF, TGF- α і EGF і, як результат, ангиогенез, який виник при участі $\alpha_v\beta_5$) можуть бути ідентифіковані скринінгом зразків пухлин тканин із використанням антицитокінових, антитіл. Такі методи добре відомі будь-якому середньому фахівцю в даній галузі для зразків пухлин тканин, отриманих або культивуванням, або біопсією тканини. Антитіла до вищеописаних цитокінів комерційно доступні через Oncogene Sciences (Uniondale, NY) або Upstate Biotech. Incorporated (Lake Placid, NY). Скринінг відібраних тканинних пухлин цими засобами дозволяє оцінити потенційну інгібіторну активність $\alpha_v\beta_5$ антагоністів даного винаходу стосовно ангиогенезу.

Приклади ангиогенезу в тканинних пухлинах і його інгібування описуються в Прикладах.

Інгібування ангиогенезу в тканинах пухлин - ще один кращий варіант винаходу завдяки важливій ролі, що грає неоваскуляризація в розвитку пухлини. При відсутності неоваскуляризації в тканині пухлини остання не одержує необхідного харчування, сповільнюється її ріст, припиняється подальше розростання, вона регресує, що відразу ж приводить до некрозу і відмирання пухлини.

Інакше кажучи, даний винахід забезпечує спосіб інгібування пухлинної неоваскуляризації шляхом інгібування ангиогенезу в пухлині відповідно до методів, що пропонуються. Аналогічно винахід пропонує спосіб гальмування росту пухлини застосуванням способів, що подавляють ангиогенез.

Способи є особливо ефективними і проти утворення метастазів, тому що (1) їхнє утворення вимагає васкуляризації первинної пухлини з тим, щоб метастатичні ракові клітини могли виходити з первинної пухлини і (2) їхнє закріплення у вторинному місці розташування вимагає неоваскуляризації для підтримки росту метастазів. У зв'язаному з цим варіанті винахід пропонує використовувати цей спосіб в поєднанні з іншими терапевтичними прийомами, такими як звичайна хіміотерапія, спрямована проти щільних пухлин і для контролю за появленням метастазів. Призначення інгібітору ангиогенезу звичайно здійснюють одночасно або після хіміотерапії, хоча краще інгібувати ангиогенез після хіміотерапевтичних процедур, під час, коли тканина пухлини буде реагувати на токсичний вплив індукування ангиогенезу, щоб почати кровопостачання і підживлення пухлини тканини. Крім того, кращим є використовувати методи інгібування ангиогенезу після хірургічного втручання з приводу видалення пухлин як профілактику проти

метастазів.

Оскільки методи даного винаходу відносяться до інгібування пухлинної неоваскуляризації, ці методи можна також застосовувати для інгібування росту пухлини в тканини, інгібування утворення пухлинних метастазів і для руйнування вже розвинутих пухлин.

Нарешті, зменшення маси пухлини визначається на моделі ока кролика, як описано з метою використання в даному винаході, або за допомогою модельної системи «химерна миша: модель людини», у якій шкіра миші із сильним комбінованим імунodefіцитом (SCID) була замінена шкірою крайньої плоти людського плоду, як описано [Jan et al., J. Clin. Invest., 91: 986-996 (1996)], відкриття якого тут викладено в короткій формі. Більш пізня модель являє собою додаткову *in vivo* модель для дослідження ангиогенезу і його інгібування методами цього винаходу. Результати, отримані на модельній пухлині кролика з $\alpha\beta_5$ антагоністами даного винаходу, показані в Прикладах 5C і 6D, тоді як результати інгібування ангиогенезу з використанням моделі SCID миші описані у Прикладі 8.

Рестеноз є процес міграції клітин гладкого м'язу (SMC) і проліферації в місці підшкірної трансплюмінальної коронарної ангиопластики, що псує успішну ангиопластичну процедуру. Вважають, що міграція і проліферація SMC у процесі рестенозу може бути процесом ангиогенезу, що інгібується запропонованими тут способами. Отже, винахід також пропонує гальмування рестенозу інгібуванням ангиогенезу відповідно до методів даного винаходу у пацієнтів, що перенесли ангиопластичні процедури. Для гальмування рестенозу $\alpha\beta_5$ антагоніст призначався як правило після ангиопластичної процедури протягом приблизно від 2 до 28 днів і найбільш часто протягом перших 14 днів після процедури.

Даний винахід у всіх його проявах розроблено для лікування людей, хоча зрозуміло, що принципи риси цього винаходу показують, що він ефективний стосовно всіх ссавців, для яких може бути використаний термін «пацієнт». Зрозуміло, що під ссавцями мають на увазі тварин, яких прагнуть вилікувати (особливо - сільськогосподарських і домашніх тварин) у відповідності зі способами даного винаходу.

Запропонований спосіб інгібування ангиогенезу в тканині і застосування цих способів, що випливає з цього, для лікування захворювань, зв'язаних з ангиогенезом, включає обробку тканини, у якій розвинувся ангиогенез, або існує ризик його розвитку, композицією, що включає терапевтично ефективну кількість $\alpha\beta_5$ антагоніста, здатного інгібувати зв'язування $\alpha\beta_5$ із його природним лігандом. Таким чином, метод включає введення пацієнту терапевтично ефективної кількості фізіологічно задовільної композиції винаходу, що містить $\alpha\beta_5$ антагоніст.

Дозування коливається в залежності від введення $\alpha\beta_5$ антагоніста, що залежить від форми антагоніста і його сили, як описується тут далі, а його кількості досить великі для досягнення бажаного ефекту, при якому ангиогенез і симптоми захворювання, викликані їм, поліпшуються. Дозування не повинне бути надмірним, щоб не викликати

шкідливих побічних ефектів, таких як синдроми гіперв'язкості, набряк легені, серцева недостатність і т.п. Загалом, дозування, буде залежати від віку, стану, статі, ступеня захворювання пацієнта і може бути визначена відповідним фахівцем. У випадку утруднень дозування може бути також відрегульоване конкретним лікарем. $\alpha\beta_5$ антагоніст являє собою молекулу, що блокує або інгібує фізіологічну або фармакологічну активність $\alpha\beta_5$ інгібуванням активності зв'язування рецептора з його лігандом, а саме, вітронектином. Кращими $\alpha\beta_5$ антагоністами можуть бути моноклональні антитіла, пептид або молекула органічного походження, що імітує ліганд $\alpha\beta_5$.

Терапевтично ефективна кількість - це така кількість $\alpha\beta_5$ антагоніста, що досить для здійснення ступеня інгібування ангиогенезу в обробленій тканині, тобто кількість, що пригнічує ангиогенез. Інгібування ангиогенезу може бути виміряно *in situ* за допомогою імуногістохімії, як описано тут, або іншими методами, відомими фахівцям у даній області. Оскільки $\alpha\beta_5$ антагоніст може бути у формі органічної молекули, що імітує $\alpha\beta_5$ ліганд, пептиду, який містить RGD, моноклональних антитіл до $\alpha\beta_5$ або їхніх фрагментів або міметика $\alpha\beta_5$ рецептора, варто розуміти, що дієвість і, отже, вираження «терапевтично ефективна» кількість може змінюватися. Однак, як показано поданими тут аналітичними методами, кваліфікований фахівець може легко оцінити дієвість можливого кандидата на роль $\alpha\beta_5$ антагоніста даного винаходу.

Дієвість $\alpha\beta_5$ антагоніста може бути оцінена за допомогою багатьох засобів, включаючи інгібування ангиогенезу в Сам-аналізі, дослідження *in vivo* ока кролика і виміром інгібування зв'язування природного ліганду з $\alpha\beta_5$, як тут описано, і подібними дослідженнями

Кращий $\alpha\beta_5$ антагоніст має здатність істотно інгібувати зв'язування природного ліганду, такого як вітронектин, із $\alpha\beta_5$ у розчині при концентраціях антагоніста менше, ніж 0,5 мікромольної (μM), переважно менше 0,1 μM , і, більш переважно, менше 0,05 μM . Термін «істотно» означає, що, принаймні, 50-процентне зменшення зв'язування вітронектину спостерігається при інгібуванні під дією $\alpha\beta_5$ антагоніста, і при 50% інгібування називається тут розміром IC_{50} .

Найкращий $\alpha\beta_5$ антагоніст виявляє виборність стосовно $\alpha\beta_5$ у порівнянні з іншими інтегринами. Так що кращий $\alpha\beta_5$ антагоніст істотно інгібує зв'язування вітронектину і $\alpha\beta_5$, але істотно інгібує зв'язування вітронектину з іншим інтегрином, таким як $\alpha\beta_1$, $\alpha\beta_3$ або $\alpha_{11\beta_3}$. Найкращим є $\alpha\beta_5$ антагоніст, який показує у 10-100 разів більш низьку IC_{50} активність при інгібуванні зв'язування вітронектину і $\alpha\beta_5$ у порівнянні з IC_{50} активністю при інгібуванні зв'язування вітронектину з іншим інтегрином. Приклади аналізів по вимірюванню IC_{50} активності при інгібуванні зв'язування вітронектину з інтегрином описуються в Прикладах.

Терапевтично ефективна кількість $\alpha\beta_5$ антагоніста цього винаходу, що представляє собою моноклональні антитіла, є як правило такою кількістю, що при введенні у формі фізіологічно задовільної композиції досить для досягнення концент-

рації в плазмі від приблизно 0,01 мікрограм (μg) на мілілітр (μl) до приблизно 100 $\mu\text{g}/\text{мл}$, переважно від приблизно 1 $\mu\text{g}/\text{мл}$ до приблизно 5 $\mu\text{g}/\text{мл}$, а як правило - біля 5 $\mu\text{g}/\text{мл}$.

Установлене по-різному дозування може коливатися від $\sim 0,1 \text{ мг/кг}$ до $\sim 300 \text{ мг/г}$, переважно від $\sim 0,2 \text{ мг/кг}$ $\sim 200 \text{ мг/кг}$, переважно від $\sim 0,5 \text{ мг/кг}$ до $\sim 20 \text{ мг/кг}$ при однократному або дробному введенні щодня протягом одного або декількох днів.

Коли антагоніст являє собою фрагмент моноклонального антитіла, його кількість може бути легко відрегульована з зарахуванням маси фрагменту в порівнянні з масою антитіла. Переважна молярна концентрація в плазмі становить від 2 мікромолярної (μM) до ~ 5 мілімолярної (mM) і ще краще $\sim 100 \mu\text{M}$ $\sim 1 \text{ mM}$ антагоніста на основі антитіла.

Терапевтично ефективна кількість $\alpha_v\beta_5$ антагоніста цього винаходу, що є поліпептидом або іншою маленькою подібною за розміром молекулою, що імітує ліганд $\alpha_v\beta_5$ як правило відповідає такій кількості поліпептиду, що при введенні у виді фізіологічно задовільної композиції є достатньою для одержання в плазмі концентрації від $\sim 0,1$ мікрограм (μg) на мілілітр (мл) до $\sim 200 \mu\text{g}/\text{мл}$, переважно від $\sim 1 \mu\text{g}/\text{мл}$ до $\sim 150 \mu\text{g}/\text{мл}$. З огляду на то, що маса поліпептиду біля 500 грамів на моль, краща концентрація його в плазмі, яка виражена в молях, становить від ~ 2 мікромолярної (μM) до 5 мілімолярної (mM), і переважно становить від $\sim 100 \mu\text{M}$ до 1 mM поліпептидного антагоніста.

Іншими словами, дозування з зарахуванням маси тіла може коливатися від приблизно 0,1 мг/кг до приблизно 300 мг/кг і переважно становить від приблизно 0,2 мг/кг до приблизно 200 мг/кг , при однократному або дробному введенні щодня протягом одного або декількох днів.

Моноклональний антитіла, поліпептиди або органічні міметики даного винаходу можуть вводитися парентерально за допомогою ін'єкцій або поступової інфузії. Незважаючи на те, що тканина, яку треба обробити, як правило доступна для систематичного введення ліка, і тому найбільш часто застосовується внутрішньовенне введення лікарських композицій, для інших тканин пропонуються інші засоби доставки у випадках, коли необхідно забезпечити спрямовану доставку ліка в тканину-мішень. Таким чином, моноклональні антитіла, поліпептиди або органічні міметики даного винаходу можуть вводитися внутріокулярно, внутрішньовенно, внутрішньочеревинно, внутрішньом'язово, підшкірно, внутріпорожнинним або трансдермальним шляхом, а також за допомогою перистальтичних засобів.

Терапевтичні композиції, що містять $\alpha_v\beta_5$ антагоніст даного винаходу, звичайно вводяться внутрішньовенно, наприклад, ін'єкцією однократної дози. Що стосується терапевтичної композиції даного винаходу, термін «однократна доза» відноситься до фізично дискретних елементів, придатних для дозування об'єкту в об'єднаній формі, при цьому розраховано, що кожна одиниця (елемент) містить визначену заздалегідь кількість активного початку для забезпечення бажаного терапевтичного ефекту в сполученні з прийнятним розчинни-

ком, наприклад, носієм або в'язким.

Як показано в одному окремому випадку в Прикладах, $\alpha_v\beta_5$ антагоніст вводиться у виді єдиної дози внутрішньовенно.

Композиції вводяться способом, сумісним із складом, що дозується, і в терапевтично ефективній кількості. Кількість, що вводиться і тривалість введення залежать від об'єкта, здатності його організму переробити активний інгредієнт і бажаного ступеня терапевтичного впливу. Точні кількості активного інгредієнту, що необхідно ввести, залежать від рішення практикуючого лікаря, і специфічні для кожного. Однак, тут розкриті коливання прийнятних дозувань при систематичному використанні, і вони залежать від способу введення. Відповідні способи введення також різні, але вони характеризуються початковим способом введення, за яким слідує повторні дози при 1-годинному або великих інтервалах такої ін'єкції або іншого способу введення. Або ж пропонується беззупинна внутрішньовенна інфузія, достатня для підтримки в крові концентрацій у межах, установлених для лікування *in vivo*.

Д. Лікарські композиції

Даний винахід пропонує лікарські композиції, корисні для проведення терапії, описаної тут. Лікарські композиції даного винаходу містять фізіологічно прийнятний носій разом із $\alpha_v\beta_5$ антагоністом, описаним тут, розчинним або диспергованим у ньому в якості активного інгредієнту. Переважно лікарська композиція на основі $\alpha_v\beta_5$ антагоніста не є імуногенною при введенні тварині або людині в терапевтичних цілях. Ужиті тут терміни «фармацевтично прийнятний», «фізіологічно задовільний» і їхні граматичні варіації, використовувані у відношенні до композицій, розчинників і реагентів, застосовуються різнозначно й означають, що ці матеріали придатні для введення або нанесення ссавцю без небажаних фізіологічних ефектів, таких як нудота, запаморочення, розлади шлунка і т.п.

Приготування фармакологічної композиції, що містить активні інгредієнти, розчинені або дисперговані в ній, добре відомо фахівцям і не обмежується винятково її складом. Звичайно такі композиції готують готовими до введення або у виді рідкого розчину, або суспензій, однак, тверді форми, придатні для приготування розчину або суспензії в результаті розчинення, також можуть бути приготовлені. Препарат може бути також отриманий емульгуванням.

Активний інгредієнт може бути змішаний із наповнювачами, що є фармацевтично прийнятними і сумісними з активним інгредієнтом у кількостях, придатних для використання в терапевтичних способах, описаних тут. Придатними наповнювачами і розріджувачами є, наприклад, вода, фізрозчин, декстроза, гліцерин, етанол і т.п. і їхні комбінації. Крім того, за бажанням композиція може містити незначні кількості допоміжних речовин, таких як змочувальні або агенти, що емульгують, які створюють рН агенти і їм подібні, які збільшують ефективність активного інгредієнту.

Лікарська композиція, відповідно до винаходу, може включати фармацевтично прийнятні солі її компонентів. Фармацевтично прийнятні солі,

отримані при взаємодії з кислотами (утворені вільними аміногрупами поліпептиду), утворюються при впливі неорганічних кислот, таких як соляна і фосфорна кислоти, або органічних кислот, таких як оцтова, винна, мигдальна кислота й ін. Солі, утворені вільними карбоксильними групами, можуть бути отримані на основі неорганічних основ, таких як, наприклад, гідроксиди натрію, калію, амонію, кальцію, заліза, і таких органічних основ як ізопропіламін, триметиламін, 2-етиламіноетанол, гістидин, прокаїн і т.п. Найкраще є сіль від HCl при використанні для одержання циклічних поліпептидних $\alpha\beta_5$ антагоністів.

Фізіологічно придатні носії є добре відомими в даній галузі. Прикладами рідких носіїв є стерильні водяні розчини, які не містять ніяких речовин, крім активних інгредієнтів і води, або містять буфер, такий як натрій-фосфатний при фізіологічному значенні pH, фізіологічний розчин або обидва з них, наприклад, фосфатно-буферний фізіологічний розчин. Далі, водяні носії можуть містити більш, ніж одну буферну сіль, а також і солі, такі, як хлорид натрію і калію, декстрозу, поліетиленгліколь і ін. розчинені речовини.

Рідкі композиції можуть також містити рідкі фази крім і для виключення води. Прикладами таких додаткових рідин є гліцерин, рослинні масла, такі як бавовняне масло й емульсії типу вода-масло.

Лікарська композиція, який містить інгібуючу ангіогенез кількість $\alpha\beta_5$ антагоніста, відповідно до винаходу, як правило складається таким чином, щоб кількість антагоніста, що міститься в ній, була, принаймні, 0,1ваг. відсотка на загальну вагу композиції. Ваговий відсоток відображує співвідношення ваги інгібітору до загальної ваги композиції. У такий спосіб, наприклад, 0,1ваг. відсоток є 0,1 грама інгібітору на 100 грам загальної ваги композиції.

Е. Антагоністи інтегрину $\alpha\beta_5$

Антагоністи, використовувані в заявлених способах для інгібування ангіогенезу в тканинах, можуть являти собою різні сполуки, до яких відносяться сполуки, взаємодіючі з $\alpha\beta_5$ у такий спосіб, що функціональні взаємодії з природними $\alpha\beta_5$ лігандами порушуються. Приклади антагоністів включають аналоги або міметики $\alpha\beta_5$, отримані на основі лігандзв'язуючої частини (сайта) на $\alpha\beta_5$, міметики природного ліганду $\alpha\beta_5$, які імітують структурну область, що бере участь у взаємодіях при зв'язуванні $\alpha\beta_5$ -ліганда, поліпептиди з послідовністю, відповідною функціональному зв'язуючому домену природного ліганду, специфічному для $\alpha\beta_5$, особливо, відповідній домену, що містить RGD, природного ліганду $\alpha\beta_5$, і антитіла, які взаємодіють або з $\alpha\beta_5$, або з природним лігандом, лігандом, усі з них виявляють антагоністичну активність, як це тут описано.

1. Поліпептиди

Як окремий випадок, у винаході заявляються $\alpha\beta_5$ антагоністи, що представляють собою поліпептиди.

Поліпептидний (пептидний) $\alpha\beta_5$ антагоніст може мати характеристику послідовності або природного ліганду $\alpha\beta_5$, або самого $\alpha\beta_5$ у ділянці, де відбувається взаємодія $\alpha\beta_5$ із лігандом, і мати

$\alpha\beta_5$ антагоністичну активність, як було зазначено. Кращий пептидний $\alpha\beta_5$ антагоніст містить RGD трипептид і відповідає своєю послідовністю природному ліганду, конкретно - у ділянці, що містить RGD.

Кращі поліпептиди, що містять RGD, мають послідовність, відповідну амінокислотній послідовності частини, що містить RGD, природного ліганду $\alpha\beta_5$, такого як вітронектин, послідовність якого добре вивчена.

Як указувався раніше, переважний пептид - антагоніст $\alpha\beta_5$ більш вибірково інгібує зв'язування саме $\alpha\beta_5$ із його природним лігандом (лігандами), чим інших інтегринів. Ці $\alpha\beta_5$ -специфічні пептиди є найкращими, принаймні, тому, що специфічність до $\alpha\beta_5$ зменшує виникнення небажаних побічних ефектів, наприклад, інгібування інших інтегринів. Ідентифікація переважних пептидних $\alpha\beta_5$ антагоністів, селективних стосовно $\alpha\beta_5$, може бути легко проведена, звичайним дослідженням інгібування зв'язування, наприклад, ELISA-методом, описаним у Прикладах.

В окремому випадку даного винаходу поліпептид містить не більш, чим приблизно 100 амінокислотних залишків, переважно не більш ~60 залишків, ще більш переважно не більш ~30 залишків. Пептиди можуть бути лінійними або циклічними, хоча особливо переважно циклічні. Кращі пептиди описуються в Прикладах.

Варто розуміти, що розглянутий поліпептид має бути не стільки ідентичним амінокислотній послідовності природного ліганду $\alpha\beta_5$, скільки повинний містити послідовність, необхідну для протидії зв'язуванню $\alpha\beta_5$ ліганду з $\alpha\beta_5$, і бути здатним до функціонування в якості $\alpha\beta_5$ антагоніста в експерименті, такому як ті, що тут описані.

Власне кажучи, поліпептид являє собою аналог, фрагмент або хімічне похідне поліпептиду, амінокислотна послідовність якого визначена тут як для поліпептиду, що є $\alpha\beta_5$ антагоністом. Тому розглянутий поліпептид може бути підданий різним змінам, заміщенням, доповненням і делеціям, у випадку, де такі перетворення забезпечують певні переваги його використання. У цьому відношенні поліпептидний $\alpha\beta_5$ антагоніст даного винаходу відповідає, але не ідентичний, послідовності якогось уже розглянутого пептиду, у послідовності якого було зроблена одна або більш змін, і він зберігає здатність функціонувати як $\alpha\beta_5$ антагоніст в одному або декількох описаних тут експериментах.

У такий спосіб, поліпептид може являти собою який різновид із безлічі пептидних похідних, що включають аміді, кон'югати з протеїнами, циклізовані пептиди, полімеризовані пептиди, аналоги, фрагменти, хімічно модифіковані пептиди і їм подібні похідні.

Термін «аналог» припускає будь-який поліпептид, що має амінокислотну послідовність, значною мірою ідентичну послідовності, спеціально обговореній тут, у якій один або більш залишків були обережно заміщені функціональним аналогічним залишком, і який виявляє активність $\alpha\beta_5$ антагоніста, як тут зазначено. Приклади таких м'яких заміщень одного неполярного (гідрофільного) залиш-

ку, такого як ізолейциновий, валіновий, лейциновий або метіоніновий іншим, заміщення одного полярного (гідрофільного) залишку іншим, наприклад, між аргініном і лізином, між глутаміном і аспарагіном, між гліцином і серином, заміщення одного основного залишку, такого як лізин, аргінін або гістидин на іншою, або заміщення одного кислотного залишку, такого як аспарагінова або глутамінова кислота іншим. Вираження «обережне заміщення» припускає також використання хімічно модифікованого залишку замість немодифікованого залишку, що забезпечує прояв таким поліпептидом необхідної інгібуючої активності.

«Хімічне похідне» відноситься до сполуки на основі поліпептиду, у якій один або більш залишків хімічно модифікований у результаті реакції бічної функціональної групи. Такі модифіковані молекули включають, наприклад, такі, у яких вільні аміногрупи були перетворені в аміногідрохлориди, *p*-толуолсульфонільні групи, карбобензоксид-, трет-бутил-оксикарбонільні групи, хлорацетильні або формільні групи. Вільні карбоксильні групи можуть бути відповідним чином перетворені в солі, метиловий й етиловий ефіри або інші типи ефірів або гідразидів. Вільні гідроксильні групи можуть бути перетворені в *O*-ацильні або *O*-алкільні похідні. Імідазольний азот гістидину може бути перетворений у *N*-імбензилгістидин. Сюди ж як хімічні похідні включені пептиди, які містять одне або більш похідних природних амінокислот, із двадцятьох стандартних амінокислот. Наприклад: *A*-гідроксипролін може бути замінений проліном; 5-гідроксилізин може бути замінений лізином; 3-метилгістидин може бути замінений гістидином; гомосерин може бути замінений серином, а орнітин може бути замінений лізином. Поліпептиди даного винаходу можуть також включати поліпептид, що має одне або більш доповнень і/або делецій або залишків, що відповідає послідовності поліпептиду, послідовність амінокислотних залишків якого тут показана остільки, оскільки зберігається необхідна активність.

Термін «фрагмент» відноситься до будь-якого поліпептиду, що має амінокислотну послідовність більш коротку, чим поліпептид, амінокислотна послідовність якого тут показана.

У випадку, коли поліпептид даного винаходу має послідовність, яка не ідентична послідовності природного ліганду $\alpha\beta_5$, це частіше усього є результатом того, що були зроблені одне або більш обережних або необережних заміщень у структурі, звичайно не більш ніж на приблизно 30 відсотків і, переважно, не більш, чим 10 відсотків амінокислотних залишків заміщаються. Додаткові залишки можуть бути додані до кожного або обох кінців послідовності поліпептиду з метою створення «лінкера», за допомогою якого поліпептиди даного винаходу можуть бути зручно приєднані до підкладинки твердої матриці, або носія.

Підкладинки, тверді матриці і носії, які можуть бути використані з поліпептидами даного винаходу, описані нижче.

Лінкери з амінокислотних залишків як правило включають принаймні один такий залишок, більш часто - від 1 до 10 залишків, але не утворюють епітопу ліганду $\alpha\beta_5$. Типовими амінокислотними за-

лишками, що входять до складу лінкера, є тирозин, цистеїн, лізин, глутамінова й аспарагінові кислоти і їм подібні. Крім того, розглянутий поліпептид може відрізнятися, якщо не зазначено особо, від природної послідовності ліганду $\alpha\beta_5$ тим, що його амінокислотний ланцюжок модифікований ацилюванням NH_2 -кінця, наприклад, ацетилюванням або амідуюванням тіогліколевої кислоти, амідуюванням кінця, що містить карбоксил, наприклад, аміаком, метиламіном і ін. модифікаціями кінців ланцюжка. Модифікація кінців корисна, як відомо, для зниження чутливості до розщеплення протеїназою і тому служить для пролонгування часу напівжиття поліпептидів у розчинах, особливо в біологічних рідинах, де можуть бути присутніми протеази. У цьому відношенні циклізація пептидів також є корисною модифікацією кінців і є особливо кращою через стабільність структур, що утворюються при циклізації через біологічні активності, які спостерігаються для таких циклічних пептидів, як тут описано.

Будь-який пептид даного винаходу може використовуватися у виді фармацевтично прийнятної солі. Відповідними кислотами, які здатні утворювати солі з пептидами даного винаходу, є неорганічні кислоти, такі як трифтороцетова (TFA), соляна (HCl), бромістоводнева, хлорна, азотна, тіоціанова, сірчана, фосфорнооцетова, пропіонова, гліколева, молочна, півовиноградна, щавлева, малінова, бурштинова, малеїнова, фумарова, антранілова, корична, нафтиленсульфонова, сульфанілова кислоти і т.п. Сіль HCl особливо переважна.

Відповідними основами, здатними утворювати солі з пептидами цього винаходу, є неорганічні підстави, такі як гідроксиди натрію, калію, амонію і їм подібні, і органічні підстави, такі як моно-, ди- і триалкіл- або арилами́ни (наприклад, триетиламін, діізопропіламін, метиламін, диметиламін і їм подібні) і необов'язково заміщені етаноламіни (наприклад, етаноламін, диетаноламін і т.д.).

Пептид даного винаходу, називаний тут власне кажучи поліпептидом, може бути синтезований будь-яким способом, відомим для фахівця в області хімії поліпептидів, включаючи методи з застосуванням рекомбінантних ДНК. Методики хімічного синтезу, такі як твердофазний синтез за типом Merrifield'a, є кращими в зв'язку з вимогами чистоти, антигенної специфічності, відсутності небажаних побічних продуктів, простоти технології і т.п. Виклад більшості придатних способів можуть бути знайдені в [Steward et al., «Твердофазний синтез пептидів», W. H. Freeman Co., San-Francisco, 1969; Bodansky et al., «Синтез пептидів», John Wiley & Sons, Sec. Ed. 1976; J. Meienhofer, «Гормональні білки і пептиди», Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32: 221-96 (1969) Fields et al., Int. J. Peptide Protein Res., 35: 161-214 (1990); і патент США №4244944 на твердофазний синтез пептидів, і Schroeder et al., «Пептиди», Vol I, Academic Press (N-Y), 1965], по класичному синтезі в розчинах, кожний із яких зазначений тут у виді посилання. Відповідні захисні групи, придатні для цих способів синтезу, описуються у вищевказаних джерелах і в [J. F. W. Me Orie, «Захисні групи в органічній хімії». Plenum

Press, New York, 1973], що зазначений тут як посилавання.

У цілому запропоновані способи твердофазного синтезу включають послідовне приєднання одного або більш амінокислотних залишків і відповідно захищених амінокислотних залишків до ланцюга пептиду, що нарощується. Природно, що аміногрупа, або карбоксильна група першого амінокислотного залишку захищається відповідним захисним угрупованням, який вибірково видаляється. Інша, захисна група, що вибірково видаляється, застосовується для амінокислот, які містять реакційноздатну бічну групу, наприклад, лізину.

Керуючись способом твердофазного синтезу, захищену або модифіковану амінокислоту приєднують до інертної твердої підкладки, використовуючи для цього незахищену карбоксильну або аміногрупу. Захисна група аміно- або карбоксильної групи потім віддаляється з тільки що приєднаного амінокислотного залишку, і наступна амінокислота (відповідно захищена) потім також приєднується і так далі. Після того, як усі бажані амінокислоти нанизані у відповідній послідовності, захисні групи кінцевих і бічних груп, що залишилися, (і твердої підкладки) послідовно або відразу ж віддаляються, і одержують кінцевий лінійний поліпептид.

Отримані в результаті лінійні пептиди можуть бути перетворені, наприклад, відповідно до того, як тут описано, у відповідні циклічні пептиди. Прикладом може служити спосіб циклізації пептидів, описаний [Limmer et al., *Peptides* 1992, p.p. 393-394, ESCOM Science Publishers, B.V., 1993]. Як правило метиловий ефір захищеного трет-бутоксикарбонілом пептиду розчиняють у метанолі, додають розчин гідроксиду натрію і здійснюють реакцію в отриманій суміші при 20°C для гідролітичного видалення метилефірної захисної групи. Після випару розчинника з підкисленого водяного розчину екстрагують трет-бутоксикарбонілзахищений пептид із допомогою етилацетату. Трет-бутоксикарбонільний захист потім видаляють у м'яких умовах при підкисненні при сорозчиненні діоксану. Отриманий у такий спосіб лінійний пептид із знятим захистом із вільними аміно- і карбоксикінцями, переводять у відповідний циклопептид взаємодією в суміші дихлорметану і диметилформаміду розведеного розчину лінійного пептиду з дициклогексилкарбодіімідом у присутності 1-гідрокси-бензотріазолу і N-метилморфоліну.

Отриманий циклопептид потім очищають хроматографією.

Найкращий спосіб твердофазного синтезу циклопептидів описаний [Gurrath et al., *Eur. J. Biochem.*, 210: 911-921 (1992)] і описаний у Прикладах. Пептиди, найкращі для використання в запропонованих способах стосовно до тканин, спочатку ураженим ангіогенезом, викликаним $\alpha\beta_5$, описані в Прикладах і включають поліпептиди показані в SEQ ID Nos. 4, 6, 7, 8 і 9.

2. Моноклональні антитіла

В даному винаході, як окремих випадок, описуються $\alpha\beta_5$ антагоністи, що являють собою моноклональні антитіла, які специфічно взаємодіють із $\alpha\beta_5$ і інгібують зв'язування $\alpha\beta_5$ із його природ-

ним лігандом, як вже описувалося. Винахід також описує лінії і методи одержання моноклональних антитіл.

Моноклональні антитіла, відповідно до даного винаходу, являють собою молекули антитіл, які 1) інгібують зв'язування вітронектину з $\alpha\beta_5$. Переважні моноклональні антитіла, які переважно зв'язуються з $\alpha\beta_5$, являють собою моноклональні антитіла, що мають імунореактивні специфічні характеристики mAb P1F6 і mAb P5H9, які описуються в Прикладах.

Термін «антитіла» або «молекула антитіла» у різних граматичних формах використовується тут як загальна назва, що відноситься до родини молекул імуноглобулінів і/або імунологічно активних частин молекул імуноглобулінів, тобто молекул, які містять частину (сайт) антитіла, що забезпечує зв'язування, або паратоп.

«Зв'язуючий сайт антитіла» є структурною частиною молекули антитіла, що включає варіабельні і гіперваріабельні ділянки важких і легких ланцюгів, які специфічно зв'язують антиген.

Прикладами антитіл, використовуваних у даному винаході, є інтактні імуноглобулінові молекули, у значній мірі інтактні імуноглобулінові молекули і ті частини молекули імуноглобуліну, які містять паратоп, включаючи ті частини, який відомі в даній області і позначаються як Fab, Fab', F(ab')₂ і F(v), а також називані як фрагменти антитіла.

В іншому кращому варіанті у винаході пропонується усічена молекула імуноглобуліну, що містить Fab фрагмент, отримана на основі моноклонального антитіла даного винаходу. Fab фрагмент із відсутнім Fc рецептором є розчинним і має терапевтичні переваги у відношенні сироваткового часу напівжиття і діагностичних переваг у способах використання розчинного Fab фрагменту. Одержання розчинного Fab фрагменту загально відомо в області імунології і може бути виконане безліччю способів.

Наприклад, Fab і F(ab')₂ частини (фрагменти) антитіл одержують протеолітичною дією папаїну і пепсину, відповідно, на, в основному, інтактні антитіла способами, що добре відомі. [Див., наприклад, патент США №4342566]. Fab' частини антитіл також добре відомі, і їх одержують із F(ab')₂ частин із наступним відновленням дисульфідних зв'язків, що з'єднують частини двох важких ланцюгів, меркаптоетанолом, за яким випливає алкілювання отриманого меркаптанового похідного білка таким реагентом, як йодацетамід. Антитіла, що містять інтактні молекули імуноглобулінів, є кращими і використані тут як ілюстративні. Вираження «моноклональні антитіла» у його різних граматичних формах відноситься до родини молекул антитіл, які містять тільки один різновид зв'язуючого антитільного сайту, здатного специфічно взаємодіяти з особливим епітопом. У такий спосіб, моноклональне антитіло звичайно виявляє один єдиний вид специфічності зв'язування (афінність) у відношенні того епітопу, із яким воно взаємодіє. Тому моноклональне антитіло може містити молекулу антитіла, що має багато сайтів зв'язування, кожний із яких є, імуноспецифічним для різного епітопу, тобто є біспецифічним моноклональним антитілом.

Моноклональні антитіла - це звичайно антитіла, отримані з клонів однієї єдиної клітини, названої гібридомом, яка робить (продукує) тільки один вид антитіл. Гібридомна клітина утворена злиттям клітини, що продукує антитіло, і клітини мієломи або іншої клітинної лінії, що самовідтворюється. Одержання таких антитіл першими описали [Kohler and Milstein, *Nature*, 256: 495-497 (1975)], опис яких доводиться тут у вигляді посилання. Інші додаткові методи описав [Lola, «Моноклональні антитіла: Підручник по техніці одержання», CRC Press, Inc. (1987)]. Проявлені гібридами, отримані таким шляхом, можуть бути далі досліджені на присутність антитіл, які імуноспецифічні до ссвр5 і придатні для інгібування зв'язування $\alpha\beta_5$ із природними лігандами.

Коротко, для створення гібридом, із якої одержують композицію моноклональних антитіл, мієломну або іншу клітинну лінію, що самовідтворюється, зливають із лімфоцитами, отриманими із селезінки ссавця, гіперімунованого джерелом $\alpha\beta_5$.

Краще щоб лінія клітин мієломи, використовувана для одержання гібридом, була отримана від тієї ж самої особи, що і лімфоцити. Звичайно кращею твариною-ссавцем буває миша лінії 129C1X*. Мієломи миші, придатні для використання в даному винаході, включають гіпоксантин-аміноптерин-тимідин-чутливі (HAT) клітинні лінії P3x63-Ад 8.653 і Sp2/0-Ag14, які одержують із American Tumor Culture Collection, Rockville, MD, під позначеннями CRL 1580 і CRL 1581, відповідно.

Звичайно клітини селезінки зливають із клітинами мієломи за використанням поліетиленгліколю (PEG) 1500. Злиті гібриди відбираються по їхній чутливості до HAT Гібридом, що продукує моноклональні антитіла даного винаходу, ідентифікують імуноферментним методом (ELISA), модифікація якого описується в Прикладах.

Моноклональні тіла даного винаходу можуть бути також отримані за допомогою культивування моноклональної гібридомної культури на поживному середовищі, що містить гібридому, яка продукує антитіла відповідної специфічності. Культура підтримується в умовах і протягом часу, необхідного для виділення гібридомом антитіл у середовище. Потім середовище, що містить антитіла, збирають. Далі антитіла можуть бути виділені добре відомими способами.

Середовища, використовувані для одержання цих речовин, добре відомі, а також комерційно доступні, і являють собою синтетичні культуральні середовища, гібридних мишей і тп. Прикладом синтетичного-середовища є мінімальне основне середовище [DMEM; Dulbecco et al., *Virology* 8: 396, 1959], доповнена 4,5мг/л глюкози, 20мМ глутаміну і 20% фетальної сироватки теляти. Прикладом штаму гібридної миші є Balb/c.

Інші методи одержання моноклональних антитіл, клітини гібридом або культури гібридомних клітин також добре відомі. Див., наприклад, метод виділення моноклональних антитіл із імунологічних рецепторів, описаний [Sastry et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 5728-5732 (1989) і Huse et al., *Science*, 246: 1275-1281 (1989)].

У даному винаході пропонуються також гібри-

домна клітина і культури, що містять, клітини гібридом, які продукують моноклональні антитіла винаходу. Особливо кращою є лінія клітин гібридом, яка продукує моноклональні антитіла mAb P1F6 і mAb P5H9, одержання яких описано в Прикладах.

Як окремий випадок, у винаході заявляються моноклональні антитіла, що мають імуноспецифічні характеристики, mAb P1F6 або mAb P5H9.

Без спеціального експериментування можливо також визначити, чи має моноклональне антитіло ту ж саму (тобто еквівалентну) специфічність (імуноспецифічні характеристики), як і моноклональне антитіло даного винаходу, з'ясуванням, чи перешкоджає перше зв'язуванню останнього з попередньо відібраною призначеною молекулою-мішенню. Якщо випробуване моноклональне антитіло конкурує з моноклональним антитілом даного винаходу, що виявляється в зменшенні зв'язування моноклонального антитіла даного винаходу в стандартних експериментах по конкуруванню в зв'язуванні з призначеною молекулою, яка знаходиться в стані твердої фази, тоді імовірно, що обидва моноклональні антитіла зв'язуються з тим самим або близько родинним епітопом.

Ще один спосіб визначення, чи володіє моноклональне антитіло такою ж специфічністю, що і моноклональне антитіло даного винаходу, полягає в пре-інкубації моноклонального антитіла за винаходом з призначеною молекулою-мішенню, з якою воно нормально взаємодіє, і наступному додаванні випробуваного моноклонального антитіла з подальшим визначенням, чи виявляє випробуване моноклональне антитіло зниження здатності зв'язуватися з молекулою-мішенню. Якщо у випробуваного моноклонального антитіла його здатність до зв'язування інгібована, то, по всій імовірності, воно наділене точно такою ж або функціонально еквівалентною епітопною специфічністю, що і моноклональне антитіло даного винаходу.

Додатковий шлях визначення, чи має яке-небудь моноклональне антитіло специфічність моноклонального антитіла цього винаходу, полягає у визначенні амінокислотної послідовності CDR ділянок розглянутих антитіл. Молекули антитіл, що мають ідентичну або функціонально еквівалентну амінокислотну послідовність у їх GDR ділянках, мають однакову специфічність зв'язування. Методи секвенування поліпептидів є добре відомими.

Імуноспецифічність антитіла, його здатність зв'язуватися з молекулою-мішенню і супутня афінність, що виявляється антитілом відносно епітопу, визначаються епітопом, із яким антитіло специфічно взаємодіє. Епітопна специфічність визначається, принаймні, частково, амінокислотною послідовністю варіабельної частини важкого ланцюга імуноглобуліну антитіла і, частково, амінокислотною послідовністю частини легкого ланцюга.

Використання вираження «маючий специфічність зв'язування» показує, що еквівалентні моноклональні антитіла мають ті самі або подібні, характеристики імуноної взаємодії (зв'язування) і конкурують у зв'язуванні з попередньо наміченою молекулою-мішенню.

Отримані від людини моноклональні антитіла

мають особливі переваги перед моноклональними антитілами миші, оскільки вони використовуються для лікування людей. Зокрема, людські антитіла не виходять так швидко з обороту, як чужорідні антигени. Крім того, людські антитіла не активують імунну систему таким же чином, як чужорідні антигени і чужорідні антитіла. Способи одержання людських антитіл у цілому добре відомі і можуть бути легко застосовні для антитіл даного винаходу.

У такий спосіб, винахід в окремому варіанті пропонує моноклональне антитіло, отримане від людини шляхом щеплення для введення компонентів імунної системи людини без суттєвого втручання в здатність антитіла зв'язувати антиген.

3. Міметики, специфічні до $\alpha\beta_5$

Цей винахід показує, що в ньому можуть використовуватися $\alpha\beta_5$ антагоністи взагалі, антагоністи, які можуть являти собою поліпептиди, антитіла й інші молекули, називані «міметиками», які мають здатність заважати здійсненню функції $\alpha\beta_5$. Найкращими є антагоністи, що специфічно порушують функцію $\alpha\beta_5$ і не втручаються в активність інших інтегринів.

У цьому змісті очікується, що безліч реагентів можуть опинитися придатними для використання в способах, що тут описуються, оскільки ці реагенти мають біологічну активність, яка вимагається. Ці реагенти, в основному, називаються міметиками, тому що вони мають здатність імітувати ліганд $\alpha\beta_5$, включений у функціональну взаємодію рецептора і ліганду шляхом блокування домену рецептора, що зв'язує ліганд, і в такий спосіб пригнічувати нормальну функцію. В альтернативному варіанті $\alpha\beta_5$ антагоніст може бути міметиком рецептора, а не його ліганду.

Міметиком може бути будь-яка молекула, відмінна від антитіла або від пептиду, отриманого на основі ліганду, який виявляє вищеописані властивості. Це може бути синтетичний аналог пептиду, сполука, якій придана форма зв'язуючої «кишені», відповідній формі вищеописаного домену, що обумовлює зв'язування, або інша молекула. Кращі міметики даного винаходу являють собою молекули органічної природи, і тому вони називаються органічними міметиками. Найкращі органічні міметики, які діють як $\alpha\beta_5$ антагоністи, будучи міметиками ліганду $\alpha\beta_5$, це сполуки 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 і 18, як описано в Прикладі 10.

Структура $\alpha\beta_5$ міметика може бути досліджувана будь-яким із безлічі методів аналізу структури, відомих у даній області для вивчення структури молекул, включаючи молекулярне моделювання, аналіз на основі двомірного ядерного магнітного резонансу (2-М ЯМР), рентгенокристалографію, випадковий скринінг пептиду, пептидного аналога або інших хімічних полімерних бібліотек і аналогічні методи, використовувані при створенні лікарських засобів.

Через те, що в даному визначенні наданий достатній доказ структури, це показує, що $\alpha\beta_5$ антагоніст може бути невеликим пептидом, моноклональним антитілом або органічною молекулою, існують різні хімічні структури, які беруть участь у прояві функціональної властивості селективного

інгібування $\alpha\beta_5$, структура об'єкта, що є $\alpha\beta_5$ антагоністом, корисного в запропонованих способах, не повинна бути занадто обмеженою, а включає будь-який $\alpha\beta_5$ міметик, як визначено вище.

Ф. Способи ідентифікування антагоністів $\alpha\beta_5$

Винахід також описує аналітичні способи для ідентифікування можливих $\alpha\beta_5$ антагоністів для використання відповідно до поданих способів. У цих аналітичних способах для передбачуваних речовин оцінюють їхню можливість інгібування зв'язування $\alpha\beta_5$ із природними лігандами і далі оцінюють їхню здатність інгібування ангиогенезу в тканині.

У першому аналізі вимірюють ангиогенез у хоріоалантоїсній мембрані курчати (CAM), і це дослідження називається Сам-дослідження Сам-дослідження вже було детально описано і потім було використано для виміру ангиогенезу і неоваскуляризації в тканинах пухлин. [Див. Ausprunk et al., *Am. J. Pathol.*, 79: 597-618 (1975); Ossonsky et al., *Cancer Res.*, 40: 2300-2309 (1980)]. Сам-дослідження є добре відома дослідницька модель для ангиогенезу *in vivo*, тому що відбувається неоваскуляризація всієї тканини. Дійсні кровоносні судини ембріона курчати виростають усередині CAM або усередині тканини, що виросла на CAM.

Як було показано тут, Сам-дослідження ілюструє інгібування неоваскуляризації, засноване як на кількості, так і на поширенні росту нових судин. Далі, легко контролювати ріст будь-якої тканини, трансплантованої на CAM, наприклад, пухлинної тканини. Нарешті, це дослідження особливо корисно, тому що в цій системі існує внутрішній контроль токсичності.

Ембріон курчати піддається впливу будь-якого реагенту тесту. Так що стан здоров'я ембріона є показником токсичності.

Другий аналіз, за допомогою якого вимірюють ангиогенез, є модель ока кролика *in vivo*, і він називається аналіз за допомогою ока кролика. Цей аналіз детально був описаний і потім був використаний для виміру й ангиогенезу і неоваскуляризації в присутності ангиогенних інгібіторів, таких як талідомід. [Див. D'Amato et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 91: 4082-4085 (1994)].

Аналіз за допомогою ока кролика - добре відома модель для дослідження ангиогенезу *in vivo*, оскільки неоваскуляризаційний процес, ілюстрований тим, як зростають кровоносні судини від краю рогівки усередину її, легко візуалізується через природно прозору рогівку ока. Крім того, і довжина, і ступінь стимуляції або інгібування неоваскуляризації або регресії неоваскуляризації може бути легко контрольована в часу.

Нарешті, кролик піддається впливу будь-якого реагенту, застосовуваного в тесті, так що стан здоров'я кролика є показником токсичності реагенту тесту.

Третій аналітичний метод вимірює інгібування прямого зв'язування природного ліганду, вітронектину з $\alpha\beta_5$, і кращий варіант детально описується в Прикладах. За допомогою цього аналізу звичайно вимірюють ступінь інгібування або зв'язування, природного ліганду, такого як вітронектин, із виділеним $\alpha\beta_5$ твердофазним методом ELISA, інгібу-

вання якого обумовлено $\alpha\beta_5$ -специфічним інгібуванням.

У такий спосіб, цей метод аналізу може бути також застосований для того, щоб ідентифікувати сполуки, які виявляють специфічність стосовно $\alpha\beta_5$ і не інгібують зв'язування природних лігандів з іншими інтегринами. Аналіз специфічності здійснюється за допомогою паралельно проведених аналізів типу ELISA, де і $\alpha\beta_5$, і інші інтегрини одночасно піддаються скринінгу в окремих комірках у відношенні відповідної здатності кожного зв'язувати природний ліганд, а для випробуваної сполуки - інгібувати відповідні здатності інтегринів зв'язувати попередньо обраний ліганд.

Приклади.

Наступні приклади даного винаходу є ілюстративними і не повинні, звичайно, розцінюватися, зокрема, як такі, що обмежують його. Більш того, такі зміни винаходу, відомі зараз або удосконалені пізніше, які будуть у компетенції фахівця в даній галузі, повинні бути розцінені як такі, що підпадають під обсяг винаходу, який заявлено в даній заявці.

Одержання моноклональних антитіл, специфічних до $\alpha\beta_5$

Моноклональні антитіла, PIF6 і P5H9, були отримані за допомогою стандартних гібридомних методів імунізацією RBF/DnJ миші клітинами карциноми легені A549, як описане [Wayner et al., J. Cell Biol., 113: 919-929 (1991)], відкриття якого тут приведене як посилання. У імунізованих мишей видаляли селезінки і зливали з клітинами мієломи Ns-1/FOX-NY. Гібридами, що продукують антитіла, які спрямовані до рецепторів вітронектину клітин карциноми, скринігували специфічним інгібуванням UCLA-P3 адгезії на поверхнях, що містять вітронектин, як описано Wayner et al., і клонували при обмеженні розведення в шарах живильника тимоцитів.

Було показано, що моноклональні антитіла і PIF6, і P5H9 специфічно взаємодіють із $\alpha_v \beta_5$ комплексом і не взаємодіють із субодиницею α_v із субодиницею β_5 або з іншими інтегринами. Моноклональні антитіла PIF6 комерційно доступні від Gibco BRL (Life Technology, Inc., Gaithersburg, MD), а моноклональні антитіла P5H9 можуть бути отримані від Fred Hutchinson Cancer Research Institute, Seattle, WA.

Інші моноклональні антитіла, специфічні до $\alpha\beta_5$, для використання в цьому винаході можуть бути отримані подібним чином і охарактеризовані, як тут описано. Крім того, $\alpha\beta_5$ специфічні моноклональні антитіла одержують злиттям клітин селезінки, виділеної з мишей, яких імунізували рецептором $\alpha\beta_5$ У неочищеній або очищеній формі. Очищення $\alpha\beta_5$ - процедура, добре знайома будь-якому кваліфікованому фахівцю у сфері біології інтегринів, була також описана [Smith et al., J. Biol. Chem., 265: 11008-11013 (1990)], робота якого приведена тут як посилання. Очищений виділений рецептор готують як імуноген для імунізування мишей, як описано в Розділі E2 і, в основному, відповідно до того, як описано [Kohler and Milstein, Nature, 256: 495-497 (1975)], робота яких тут приведена як посилання. Отримані гібридомні клони

перевіряли на здатність взаємодії з імуногеном і потім охарактеризували, як описані в нижченаведених Прикладах.

2. Характеристика специфічності моноклональних антитіл проти $\alpha\beta_5$ і використання в картуванні розподілу експресії $\alpha\beta_5$ у тканині

A. Специфічність до вітронектину

Було показано, що моноклональні антитіла P5H9, отримані в Прикладі 1 за способом [Wayner et al., J. Cell Biol., 113: 919-929 (1991)] блокують приєднання клітин карциноми UCLA-P3 до вітронектину, не впливаючи на приєднання клітин до колагену або фібронектину. Імунопреципітацією гетеродимеру, що складається з α -ланцюга (160kD) і β -ланцюга (95 kD) при невідновлюючих умовах було також показано, що ті самі клітини містять тільки $\alpha_v \beta_5$ вітронектиновий рецептор і немає жодного, який був би специфічний до $\alpha\beta_5$. Було також показано, що визначений за допомогою P5H9 $\alpha\beta_5$ рецептор бере участь у зв'язуванні клітин меланоми M21 і клітин карциноми H2981 із вітронектином. Моноклональні антитіла PIF6 мають таку ж імуноспецифічну спрямованість.

B. Імунофлуоресценція з антитілами до рецептора інтегринів

При загоєнні ран мембрани основ кровоносних судин виробляють декілька адгезивних білків, включаючи чинник Вілебранда, фібронектин і фібрин. Крім цього, деякі члени родини інтегринових рецепторів адгезії виділяються на поверхні клітин гладкого м'яза, що культивуються, і клітин ендотелію. [Див.: Cheresh, Proa Natl. Acad. Sci., USA, 84: 6471 (1987); Janat et al., J. Cell Physiol., 151: 588 (1992); Cheng et al., J. Cell Physiol., 139:275 (1989)].

На додаток до структури і функції субодиниці β_5 інтегрину був описаний розподіл її в тканині за допомогою картування з використанням інших моноклональних антитіл до β_5 [Pasqualini et al., J. Cell Sci., 105:101-111 (1993)], на що тут вказано посиланням.

Вищезгадані моноклональні антитіла, специфічні до субодиниці β_5 , подібні тим, що описані в Прикладі 1, виділялися гібридомами, що були отримані з використанням клітин селезінки миші, імунізованої клітинами лінії карциноми легені людини A549. Гібридами виділяли при позитивному фарбуванні поверхні клітин A549 із супернатанту культури гібридами і імунопреципітацією $\alpha\beta_5$ -комплексів з екстрактів поверхнево-мічених A549. Моноклональні антитіла потім використовували для картування розподілу β_5 -субодиниці в тканинах нормального тимуса, шкіри і нирки людини. Зразки товщиною 4 мікрони були отримані зрізанням із заморожених тканинних блоків при криостатній мікротомії для наступного фарбування стрептавідін - біотин імунопероксидазою у присутності антитіл, специфічних до β_5 -інтегринів, отриманих, як описано в посиланні на Pasqualini et al.

Результати фарбування зрізів тимуса показали розподіл β_5 на кровоносних судинах, корпускулах Hassal'a, кортикальних і медулярних клітинах строми і мембранах основ. Результати на зрізах шкіри показали β_5 на базальному шарі епідермісу і на стінках інших дермальних кровоносних судин, а результати на зрізах нирки показали фарбування

гломерулярних частин, сполучених гломерулярних органів, близько розташованих звитих і об'єднаних трубочок. У такий спосіб, розподіл β_5 є неоднорідним і стосовно різних типів клітин, включаючи, що особливо важливо, клітини капілярів ендотелію, результати фарбування яких відповідали результатам фарбування клітин ендотелію пупочної венни, які культивувались.

С. Імунофлуоресценція ретинальної людської тканини пацієнтів із захворюванням очей з антитілами до рецептора інтегринів

Очна неоваскуляризація - найбільш поширена зміна, що спостерігається у переважній більшості захворювань очей, яка приводить до катастрофічної втрати зору. Ріст нових кровоносних судин із вже існуючих хороїдальних, ретинальних або паралюмбальних судин може приводити до набряку, геморагії й утворенню фіброваскулярних мембран, що приводять до руйнування нормальних анатомічних зв'язків ока і супутній втраті нормальної функції зору.

При фізіологічних умовах ангіогенез у сильно-му ступені контролюється і, як було показано, активується специфічними ангіогенними цитокінами, такими як основний чинник росту фібробластів (bFGF) і чинник некрозу пухлини α (TNF- α). Як описано [Brooks et al., Science, 264: 569-571 (1994)], було показано, що моноклональні антитіла до $\alpha\beta_5$ блокують ангіогенез, викликаний і bFGF і TNF- α , у модельній системі, що включає Сам-модель, описану нижче. Як описано в Прикладах 4-6, моноклональні антитіла, специфічні до $\alpha\beta_5$, блокують особливий шлях ангіогенезу, особливо той, що індукований васкулярним ендотеліальним чинником ріст а (VEGF), чинником росту α (TGF- α), що трансформує, і епідермальним чинником росту (EGF).

У такий спосіб, як описано тут у відношенні даного винаходу, два шляхи ангіогенезу визначаються різними інтегринами, $\alpha\beta_3$ і $\alpha\beta_5$. Для дослідження експресії і ролі цих інтегринів при захворюваннях очей людини були отримані епіретинальні неоваскулярні мембрани і субретинальні неоваскулярні мембрани en bloc при вітректомії від хворих проліферативною діабетичною ретинопатією (PDR). Ці хворі були клінічно обстежені і відібрані для гістологічного дослідження на базі активного проліферативно-васкулярного захворювання, зареєстрованого при клінічному обстеженні і fundus fluorescein angiografією. Отриману тканину негайно заморожували в Tissue Tek кріо-запобіжнику і секціонували.

Коли тканини цих пацієнтів досліджували за допомогою імунофлуоресценції, кровоносні судини давали позитивну реакцію на інтегрин $\alpha\beta_3$, як показане імуноспецифічністю моноклональних антитіл миші LM609. Розподіл інтегрину, як видно, обмежувався кровоносними судинами і відповідав фарбуванню кровоносних судин за допомогою маркера, чинника Вілебранда, що картувалось за допомогою кролячих антитіл до цього чинника імуноспецифічності візуалізувались або кон'югантом родаміну з антимишиним імуноглобуліном, або кон'югантом флуоресцеїну з антикролиним імуноглобуліном, використання обох забезпечувало

визначення місцезнаходження розміщення інтегрини й антитіл, специфічних до кровоносних судин.

Проби, отримані на основі здорових очей або від пацієнтів з атрофічними мембранами без кровоносних судин, що активно проліферують, показали при імунофлуоресценції негативну реакцію на інтегрин $\alpha\beta_3$.

Паралельно ті ж самі тканини аналізували імуногістологічним методом на присутність і розподіл $\alpha\beta_5$ за допомогою моноклональних антитіл PIF6, імуноспецифічних до $\alpha\beta_5$, описаного в Прикладі 1.

Фарбування показало, що $\alpha\beta_5$ був присутній на кровоносних судинах, і його місцезнаходження визначалося по розподілу чинника Вілебранда. Однак для неоваскулярних тканин також виявлялася недостатня флуоресценція з PIF6 антитілами, $\alpha\beta_5$, що показують більш велике поширення. Це контрастувало з даними $\alpha\beta_3$, який обмежувався кровоносними судинами.

При порівнянні даних імунофлуоресцентного фарбування мембран для $\alpha\beta_3$ і $\alpha\beta_5$ з антитілами LM609 і PIF6, відповідно, зразок фарбування стінки кровоносної судини був фактично ідентичний тому, що і $\alpha\beta_3$, і $\alpha\beta_5$ виявлялися на поверхні знову проліферуючих кровоносних судин людини при неоваскулярних очних захворюваннях, таких як діабетична ретинопатія.

Описані тут результати показують, у такий спосіб, що $\alpha\beta_5$ інтегриновий рецептор вибірково експресується в специфічних типах тканини, у яких протікає ангіогенез відповідно до того, як це було видно за допомогою неоваскулярних мембран від пацієнтів із гострим проліферативним неоваскулярним захворюванням. Ці тканини, поряд із тканинами, не захищеними у відношенні спеціальних чинників росту, що описані нижче в Прикладах 4-6, забезпечують ідеальні мішені для терапевтичних аспектів цього винаходу.

3. Одержання синтетичних пептидів

Циклічні поліпептиди, використовувані в практиці способів даного винаходу, були синтезовані з використанням стандартних методик твердофазного синтезу, як це описано, наприклад, [Merri-field, Adv. Enzymol., 32: 221-296 (1969); Fields G.B. and Noble R. L., Int. J. Peptide Protein Res., 161-214 (1990)].

Два грами (г) BOC-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-OMe (SEQ ID No. 1) були спочатку розчинені в 60 мілілітрах (мл) метанолу, до якого був доданий 1,5мл 2N розчин гідроксиду натрію в плин 2 години із суміші. Потім суміш перемішували протягом 3 годин при 20 градусах C (20°C). Після випарювання залишок переносили у воду і підкислювали розведеною HCl до рН 3, екстрагували етилацетатом. Екстракт висувували над Na₂SO₄, знову, випарювали й отриманий BOC-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-OH (SEQ ID No. 2) перемішували при 20°C в плин 2 години із 20мл 2N HCl у діоксані. Отриману суміш піддавали випарюванню до одержання H-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val-OH (SEQ ID No. 3), який згодом розчиняли в суміші 1800мл дихлорметану і 200мл диметилформаміду (DMF), після чого охолоджували до 0°C. Далі 0,5г циклогексилкарбодіміду (DCCl), 0,3г 1-гідроксибензотриазолу (HOBt) і 0,25г N-

метилморфоліну добавляли послідовно при перемішуванні.

Отриману суміш струшували наступні 24 години при 0°C і потім при 20°C ще 48 годин. Розчин концентрували й обробляли різнорідним іонообмінником на підкладинці для видалення солей.

Після того, як на закінчення смола була віддалена фільтрацією, очищений розчин випарювали і залишок очищували хроматографією, що завершалася виділенням цикло (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val), позначеного також окремим буквеним кодом як c-RCDf V (SEQ ID No.4). Маленькими літерами в пептиді позначені амінокислоти в D-формі, а великими - у L-формі.

Циклічний контрольний пептид, цикло (Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (також позначений окремим буквеним кодом як RADf) (SEQ ID No 5) був отриманий, як описано вище. Попередньо було показано, що циклопептид c-RADfV (SEQ ID No. 5) інгібує зв'язування фібриногену з інтегрином $\alpha_v\beta_3$ і не інгібує зв'язування фібриногену з інтегрином $\alpha_{11b}\beta_3$ або $\alpha_5\beta_1$ [Pfaff et al., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238, 1994]]

Інші пептиди, що є специфічними інгібіторами зв'язування природних лігандів із $\alpha_v\beta_3$, одержують подібним способом і перевіряють на специфічність і міру активності, як описується в наступних прикладах Вони включають наступні пептиди, отримані аналогічно: цикло (Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (SEQ ID No. 6) і цикло (Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (SEQ ID No. 7). Пептиди, що мають амінокислотні послідовності Tyr-Thr-Ala-Glu-Cys-Lys-Pro-Gln-Val-Thr-Arg-Gly-Asp-Val-Phe (SEQ ID No. 8) і цикло (Arg-Gly-Asp-D-Phe-Asn-MeVal) (SEQ ID No. 9) також були синтезовані. У SEQ ID No. 9 частка «Me» у MeVal означає, що валін у положенні 6 є метильованим.

4. Інгібування ангиогенезу, викликане чинником росту в присутності $\alpha_v\beta_5$ антагоністів, вимірює методом моделі ока кролика *in vivo*

Дію анти- $\alpha_v\beta_5$ антагоністів на ангиогенез, викликаний чинником росту, спостерігали в природно прозорих структурах, прикладом чого є рогівка ока. Нові кровоносні судини зростають по ободку рогівки, яка має багате кровопостачання, у напрямку до центру рогівки, у якому як правило відсутні кровоносні судини. Стимулятори ангиогенезу, такі як VEGF і TGF- α у застосуванні до рогівки, викликають ріст кровоносних судин від ободка до центру. Антагоністи ангиогенезу в застосуванні до рогівки інгібують ріст нових кровоносних судин від ободка. У такий спосіб, рогівка перетерплює ангиогенез за допомогою інвазії ендотеліальних клітин від ободка рогівки в щільно заповнену колагеном тканину рогівки, який легко побачити. Метод моделі ока кролика тому забезпечує *in vivo* модель для прямого спостереження стимуляції й інгібування ангиогенезу в результаті введення сполук безпосередньо в рогівку ока.

A. Метод *in vivo* моделі ока кролика

1) Ангиогенез, індукований чинниками росту

Ангиогенез був індукований чинниками росту *in vivo* методом моделі ока кролика й описується нижче.

а. Приготування гідронових гранул, що містять чинник росту і моноклональні антитіла

Гідронові полімерні гранули, що містять чинник росту і моноклональні антитіла (mAbs) готували за методом D'Amato et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4082-4085 (1994). Окремі гранули (пелети) містили 750нг чинника росту (називаного також цитокином), особливо - bFGF або VEGF, зв'язані із сукралфатом (carafate) (Carafet, Marion Merrell Dow Corporation, Cincinnati, OH) для стабілізації цитокинів і забезпечення їхнього слабкого виділення в навколишню тканину. Крім того, були приготовлені гідронові гранули, що містять або 40 μ г mAb P1F6 (анти- $\alpha_v\beta_5$) або контрольні антитіла LM609 (анти- $\alpha_v\beta_3$), у ФСБ.

Усі випробувані mAbs виділяли з асцитної рідини добре відомими способами з використанням афінної хроматографії на колонці з Протеїн-A Сефарозою Cl-4B. Елюований імуноглобулін був діалізований проти ФСБ і оброблений Detoxi-гелем (Pierce Chemicals, Rockford, IL) для видалення ендотоксину. Було показано, що ендотоксин є потенційно ангиогенним і стимулює запалення. Моноклональні антитіла тому перевірялися на присутність ендотоксину за допомогою методу хромогенного limulus амебоцитного лізату (Bio Whittaker, Walkersville, MD) і для дослідження моделі ока кролика використовувалися тільки ті mAbs, у яких не виявлявся ендотоксин.

Гранули поміщали в спеціально приготовлені тefлонові стрижні, що були на 2мм просвердлені усередину. Приблизно 12 μ л формувального матеріалу було поміщено усередину кожного стрижня і піддано полімеризації протягом ночі в стерильній камері. Потім гранули стерилизували ультрафіолетовим опроміненням.

Групи по 8 тварин були використані для експериментів на парах очей, кожній тварині вводили гідронові частки, що містили призначений цитокін із призначеним антитілом або контрольним імуноглобуліном. Зокрема, кожному кролику в одну рогівку хірургічно імплантувалась гідронна гранула, що містить або bFGF, або VEGF у сполученні з mAb P1F6, а інша оброблялась bFGF, або VEGF у сполученні з mAb LM609. Окремі гранули імплантували усередину хірургічно створених «кишень», утворених проміжною строю рогівки кролика в стерильній техніці з використанням Wild model M691 діючого мікроскопа, оснащеного променерозсіювачем і оснащеного камерою для фотографування окремих рогівок. У стромі рогівки була сформована «кишень» 3мм \times 5мм за допомогою 69 Beaver Blade насічкою розміром 3мм до половини товщини рогівки. Строма була розсічена по периферії з захопленням райдужки і гранулу імплантували усередину її краю по окружності на відстані 2мм від диску. Протягом наступних 12 днів цитокини і mAbs дифундували з імплантованих гранул у навколишню тканину, впливаючи тим самим на ангиогенез від ободка рогівки.

Ліву і праву рогівки відповідно позначили як OS і OD. Потім здійснювали спостереження за рогівками протягом 12 днів. На 10 день після операції були зроблені фотографії, коли неоваскуляризація максимальна. Отримані на фотографіях результати вищеописаних експериментів по обробці сукупністю цитокинів/mAb показані на Фігурах 1A-1D. Паралельний розрахунок mAb інгібування ци-

токін-індукованого ангіогенезу показаний на Фігурах 2A і 2B. На Фігурах 1A і 1D, коли рогівки були піддані дії відповідно комбінацій bFGF/PIF6 і VEGF/LM609, ангіогенез із набряками помітний, як це показано великими стрілками. Тому антитіла до $\alpha\beta_5$, PIF6, не інгібували bFGF-індукований ангіогенез ефективно. Аналогічно, антитіла до $\alpha\beta_3$ LM609, не інгібували ефективно VEGF-індукований ангіогенез.

Коли ж у моделі кролика, використовували комбінації bFGF/LM609 і VEGF/PIF6, викликаний цитокіном ангіогенез, навпроти, був інгібований антитілами, як показано на Фігурах 1B і 1C відповідно. На цих Фігурах показано, що нормальні кон'юнктивальні лімбальні судини, показані маленькими стрілками, демонструють ефективність інтегринових антитіл при інгібуванні одного типу ангіогенезу, викликаного цитокіном.

Вплив імуноспецифічності специфічних до інтегрину mAb на вищеописаний ангіогенез, викликаний цитокіном, також кількісно показаний на Фігурах 2A і 2B. Ангіогенез стимулювали bFGF, або VEGF, як показано відповідно на Фігурах 2A і 2B. Піддані обробці очі були сфотографовані оперативним мікроскопом Wild' a, оснащеним камерою Nikon.

Фотографії були зроблені на плівці для слайдів Kodak Ektachrom 64T, і зображення були перекладені на комп'ютер-асистуєме зчитування з використанням Biorad's Molecular Analyst 1.1 Software після acquisition. Модель GS670, являє собою денситометр. Гістограми, що ілюструють значення неоваскулярна площа \pm стандартна помилка ($n=8$ для кожної з двох серій) після витримки з mAbs PIF6 і LM609.

Як показано на Фігурі 2A, LM609 зменшували викликаний bFGF-ангіогенез на 86% ($p<0,005$, парний t-тест) у порівнянні з обробкою PIF6 пари очей тієї самої тварини. Коли VEGF використовувався для стимуляції ангіогенезу, як показано на Фігурі 2B, позитивний ефект спостерігався там, де PIF6 зменшували розмір площі неоваскуляризації на 60% ($p<0,03$, парний t-тест) у порівнянні з LM609-обробленими очима, при якій спостерігався мінімальний ефект на VEGF-індукований ангіогенез.

Важливо, що вплив спеціальних mAb виявлявся тільки на кровоносних судинах, що утворилися знову, тоді, як на перилімбальні судини, що утворилися раніше, не діяла обробка mAb, це наводить на думку про те, що ефекти, які спостерігаються, характерні для кровоносних судин рогівки, що утворюються знову.

Подібні дослідження були виконані з синтетичними пептидами, отриманими в Прикладі 3 і, як описано нижче, для використання з метою інгібування цитокін-індукованого ангіогенезу, який специфічно корелюється експресією $\alpha\beta_5$.

Для підтвердження цих результатів, які показують, що на ангіогенез, викликаний спеціальним цитокіном, впливає тільки один тип антитіл до інтегрину, особливо, що рецептор $\alpha\beta_5$ інтегрину відіграє роль у VEGF-індукованому ангіогенезі, оцінювали вплив комбінацій цитокінів і антитіл до інтегрину на іншу неоваскулярну модель хоріоалантоїсної мембрани курчати (CAM), що показано в наступному Прикладі.

5. Ангіогенез із препаратом хоріоалантоїсної мембрани курчати (CAM)

A Характеристика вихідного CAM

1) Одержання CAM

Ангіогенез може бути індукований у хоріоалантоїсній мембрані курчати (CAM) після того, як нормальний ембріонічний ангіогенез привів до утворення первинних кровоносних судин. Було показано, що ангіогенез розвивається як реакція на специфічні цитокіни або фрагменти пухлини, як описане [Leibovich et al., Nature, 329-630 (1987); Ausprunk et al., Am. J. Pathol., 79: 597 (1975)]. CAMи готували з ембріона курчати з наступними індукуванням ангіогенезу і його інгібуванням, як описано нижче й у Прикладі 6 із $\alpha\beta_5$ антагоністами даного винаходу.

Десятиденні ембріони курчат були отримані від Mc Intyre Poultry (Lakeside, CA) і інгібувалися при 37°C і 60% вологості. Невеликий отвір було пророблено в шкаралупі безпосередньо над повітряним мішечком за допомогою маленького вправного свердла (Dremel, Division of Emerson Electric Co. у Racine, WI). Другий отвір було зроблено на широкому кінці яйця в районі, вільному від кровоносних судин ембріона, попередньо визначеному перевіркою яйця на світло. До початкового отвору був застосований вакуум, що привів до відриву CAM (хоріоалантоїсної мембрани) від мембрани шкаралупи і створенню фальшивого повітряного мішка над CAM. Вікно площею 1,0 сантиметр (см) x 1,0см було вирізано через шкаралупу над опалою CAM із використанням маленької моделі шліфувального колеса (Dremel). Маленьке вікно дозволяло безпосередній доступ до нижчележачої CAM. Отриманий препарат CAM був потім використаний через 10 днів ембріогенезу, при додатковому розвитку ангіогенезу. Препарат використовували в даному винаході для індукування ангіогенезу, знову виникаючого у відповідь на обробку цитокіном.

2) Гістологія CAM

Для того, щоб проаналізувати мікроскопічну структуру CAM ембріона курчати, із заморожених блоків робили зрізи товщиною шість мікрон (μm) за допомогою кріостатної мікротомії для імунofлюоресцентного аналізу.

Характерним для неопрацьованих 10-денних CAM є область, позбавлена кровоносних судин. Тому що ангіогенез у Сам-системі є додатковим до стадії ембріогенезу, ця система використовується в даному винаході для стимуляції різними цитокінами зародження і розвитку нових судин із вже існуючих областей, що примикають, в області CAM, у яких на цей час відсутні судини. Як показано за допомогою Сам-моделі й у наступних прикладах, незважаючи на те, що кровоносні судини перетерплюють новий ріст при нормальному ембріогенезі або індукуються цитокінами, кровоносні судини експресують $\alpha\beta_3$ і $\alpha\beta_5$.

B. Ангіогенез, індукований чинниками росту

Як було показано, ангіогенез індукується цитокінами або чинниками росту, як описано в Прикладі 4 на моделі ока кролика. В описаних тут експериментах ангіогенез у препараті рогівки кролика, описаному в Прикладі 4, був подібним чином індукований чинниками росту, які негайно застосову-

вали на кровоносних судинах CAM, як тут описано.

Ангіогенез розвивався при поміщенні фільтрувального диска (Whatman Filter paper No. 1) розмірами 5 міліметрів (мм) x 5мм, насиченого розчином солі HBSS Balanced Salt Solution (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY) або HBSS, що містить попередньо відібрані цитокіни при попередньо обраній концентрації, тобто для перевірки ефекту на ангіогенез, на CAM десятиденного ембріона курчати в область, вільну від кровоносних судин, а віконця були потім запечатані стрічкою. Ангіогенез контролювали фотомікроскопією через 72 години. CAM були досуха заморожені, потім 6μм кріостатні висічені сегменти фіксували в ацетоні й офарблювали імунофлуоресценцією, як описані в Прикладі 2B і 2C із 10μг/мл обраних антитіл до інтегрину, включаючи ті, які специфічні до $\alpha\beta_5$, як описано в Прикладі 1.

Попередні дослідження Brooks et al., Science, 264: 569-571 (1994) показали, що кровоносні судини легко видимі в препаратах, оброблених і bFGF, і TNF- α , але не присутні в неопрацьованих CAM. Автори також показали, що експресія $\alpha\beta_3$ збільшується слідом за bFGF-індукованим ангіогенезом. У той час як експресія інтегрину β_1 не змінювалася від того, що було видно на неопрацьованому CAM, β_1 також легко виявлявся на стимульованих кровоносних судинах.

Ці опубліковані відкриття показали, що в обох випадках і людини, і курчати кровоносні судини, що включилися в ангіогенез, показують збільшену експресію $\alpha\beta_3$. Узгоджуючись із цим, експресія $\alpha\beta_3$ на ендотеліальних клітинах, що культивуються, визивалася різними цитокінами *in vitro*, як описане [Janat et al., J. Cell Physiol. 151: 588 (1992); Enenstein et al., Exp Cell Res., 203: 499 (1992); Swerlick et al., J. Invest Derm. 99: 715 (1993)].

У цьому винаході зараз був досліджуваний особливий шлях стимуляції ангіогенезу, що протікає за участю цитокінів, який залежить від експресії й активації незвичайного адгезивного рецептора інтегрину $\alpha\beta_5$. Результат виявлення реакції CAM, як тут описано, на цитокіни VEGF, TGF- α і EGF у зв'язку з експресією $\alpha\beta_5$, ангіогенезом і інгібуванням його $\alpha\beta_5$ антагоністами описаний у Прикладі 6.

С. Ангіогенез, викликаний пухлинами

Для вивчення ролі $\alpha\beta_5$ в ангіогенезі, викликаному пухлинами, варіабельно вирощені виділені із CAM 17-денного ембріону курчати, як описано [Brooks et al., J. Cell Biol., 122: 1351 (1993)], як описано тут, фрагменти різних $\alpha\beta_5$ -негативних людських меланом і карцином використовувалися в Сам-дослідженнях.

Ангіогенез індукували в системі Сам-дослідження безпосереднім прикладанням пухлинного фрагменту на CAM. Приготування CAM ембріона курчати ідентичне описаній вище процедурі. Замість паперового фільтрувального диска фрагмент вагою від 50 міліграмів (мг) до 55мг від однієї $\alpha\beta_5$ -негативної пухлини, отриманої з суспензії клітинної лінії, описаної нижче, поміщали на CAM в область, вихідно вільну від кровоносних судин.

Клітинні лінії, рабдоміосаркома, мієлоїд (HL-60

або KG-1) і лімфоїд (Т-клітини -Jurkat HPB/ALL, PEER, і різні лінії В-клітин), описані [Pasqualini et al., J. Cell Sci., 105: 101-111 (1993)], використовували для вирощування щільних пухлин людини на CAM ембріона курчати. Одна клітинна суспензія різних клітинних ліній спочатку застосовується для CAM у загальному обсязі 30μл стерильного HBSS. Віконця запечатують стрічкою, і ембріони інкубуються протягом 7 днів для забезпечення росту людських пухлинних уражень. До кінця 7-го дня, на 17-й день розвитку ембріону пухлини вирізують із CAM і звільняють від навколишньої CAM тканини. Пухлини розрізають на фрагменти в 50-55мг для використання в ангіогенезі. Фрагменти пухлин поміщують у нову серію CAM 10-денних ембріонів курчати, як описано в Прикладі 5A, в область, де відсутні кровоносні судини.

Пухлини, що розвилися *in vivo* на CAM ембріона курчати з, або без місцевого або внутрішньовенного застосування цитокінів, що індукують $\alpha\beta_5$, (VEGF, TGF- α або EGF) потім офарблюються для установлення факту експресії $\alpha\beta_5$ при mAbs, PIF6 або P5H9, як описано раніше. Ці пухлинні Сам-препарати потім обробляються, як описано в Прикладах 6C і 6D, для оцінки розміру впливу антитіл і пептидів на індукований пухлиною ангіогенез.

В окремому випадку клітини меланоми хом'яка. CS-1, отримані від Dr. Caroline Damsky з Університету Каліфорнії в Сан-Франциско, були використані в Сам-дослідженні для створення пухлин меланоми. Після пересаджування приблизно 50мг CS-1 пухлинного фрагменту на новий CAM 10-денного ембріону курчати, в окремі препарати вводили внутрішньовенно ін'єкції 100μг, або 300μг PIF6 антитіла, LM609 антитіла або контроль CSAT (анти- β_1) антитіло. Додатковим контролем служив препарат, який ніяк не оброблявся. Результати обговорюються нижче, у Прикладі 6D.

6. Інгібування ангіогенезу, вимірюване методом CAM-дослідження

А Інгібування ангіогенезу, викликаного чинником росту, внутрішньовенним введенням інгібіторів

Вплив на обумовлений чинником росту ангіогенез моноклональних антитіл, внутрішньовенно введених у Сам-препарати, визначали для використання в якості *in vivo* модельної системи цього винаходу.

Слідом за активною неоваскуляризацією судини раптом припинили розвиток, експресія $\alpha\beta_5$ зменшилася до рівнів, не обумовлених імунофлуоресцентним аналізом. Ця регуляція експресії $\alpha\beta_5$ у кровоносних судинах, що перетерплюють ангіогенез, яка контрастувала з нестачею (відсутністю) експресії в зрілих судинах, обумовлює унікальну можливість даного винаходу контролювати і інгібувати ангіогенез як показано нижче відповідно до того, як змодельовано в системі Сам-досліджень ангіогенезу.

Приготування препаратів CAM ембріона курчати для внутрішньовенних ін'єкцій, власне кажучи, було такимож, як описано вище.

Ангіогенез був спочатку індукований у 10-денних ембріонах курчати використанням фільтрувального диска, просоченого чинником росту. Зокрема, у перших аналізах ангіогенез викликали

витримкою з bFGF, або з VEGF, кожний у концентрації 150нг/мл.

Для використання чинників росту під час процедури просвічування були відібрані опуклі кровоносні судини і були зроблені мітки на шкаралупі яйця, щоб відзначити ці позиції. У шкаралупі були просвердлені отвори, CAM відділені і на них були потім поміщені шматочки фільтрувального паперу, просоченого чинником росту. Віконця були запечатані стерильною стрічкою, і ембріони були поміщені в інкубатор.

Через двадцять чотири години друге маленьке віконце було пророблено на боковій стороні яєчної шкаралупи безпосередньо над опуклими кровоносними судинами, відібраними попередньо. Зовнішня шкаралупа яйця була акуратно віддалена при збереженні ембріонічних мембран непошкодженими. Мембрана шкаралупи була зроблена прозорою за допомогою маленької краплі мінерального масла (Perkin-Elmer Corp. Norwalk, CT), завдяки чому кровоносні судини було легко спостерігати. Потім у кровоносні судини, помітні на CAM із індуючим чинником росту були введені фосфатно-сольовий буфер (PBS), 75μг очищених стерильних антитіл до інтегрину або 75μг синтетичних пептидів (циклічний пептид RGDfV, SEQ ID No. 4 і контрольний циклічний пептид RADfV, SEQ No. 5) у ФСБ (PBS). Віконця запечатувались стрічкою, і ембріони інкубували до 72 годин.

Фільтрувальні диски і характерні навколишні CAM тканини були сфотографовані стереомікроскопом (Фігури 3A-3F і Фігури 5A-5F) і визначали значення ангіогенного індексу +/- стандартна помилка для 12 CAM для кожного випадку (Фігури 4A-4B і Фігури 6A-6B). Ангіогенез обраховувався для кожного ембріона подвійно, шляхом аналізування кількості і ступеня довжини кровоносних судин у межах площі кожного диска. Розміри результатів розподілялися від 1 (низький) до 4 (високий) і індекс ангіогенезу визначали відніманням базової одиниці (1) від усіх цифр.

Специфічність інгібування інтегринів за допомогою антитіл у процесі ангіогенезу, викликаного чинником росту, у Сам-моделях відбивала те, що спостерігалось на моделях рогівки кролика, описаних вище. Як відповідно показано на Фігурах 3A і 3B, і bFGF, і VEGF викликали ангіогенез у контрольному PBS-обробленому CAM. Обробка специфічними до $\alpha\beta_5$ антитілами PIF6, однак, привела до інгібування VEGF-індукованого ангіогенезу, як показано на Фігурі 3D, хоча не було помічене інгібування bFGF-індукованого ангіогенезу, що видно на Фігурі 3C. Навпроти, LM609 $\alpha\beta_3$ -специфічні антитіла інгібували bFGF-індукований ангіогенез (Фігура 3E), але робили невеликий вплив на ангіогенез у VEGF-індукованому CAM (фігура 3F). Ці результати показані також на заштрихованих діаграмах Фігур 4A і 4B, відповідно для bFGF- і VEGF-оброблених CAM, у яких індекс ангіогенезу нанесений проти витримки з LM609 або PIF6 при контролі, що характеризується відсутністю показника витримки з антитілом. Таким чином, інгібування ангіогенезу, викликаного чинником росту, за допомогою інтегрин-специфічних антитіл залежить від типу чинника росту.

Обробка пептидами, що містять RGD, підтвер-

джує вищезгадані результати. У присутності PBS, як показано на Фігурах 5A і 5B, витримка з bFGF і VEGF приводила до ангіогенезу в контрольному CAM. На противагу цьому циклічний пептид-антагоніст RGDfV (SEQ ID No. 4), що імітує і $\alpha\beta_3$, і $\alpha\beta_5$ знищує ангіогенез, індукований як bFGF, так і VEGF. Циклічний пептид RADfV (SEQ ID No 5) не впливає на ангіогенез ні в bFGF, ні в VEGF-оброблених препаратах CAM. Результати показані також на Фігурах 6A і 6B, де індекс ангіогенезу bFGF і VEGF-стимульованих CAM нанесені графічно і показують обробку випробуваними і контрольними пептидами. У такий спосіб, ці відкриття разом із тими, що спостерігалися на рогівці кролика, показують, що bFGF- і VEGF-індукований ангіогенез визначається різними, але не гомологічними α -специфічними інтегринами, які, однак, обидва можуть інгібуватися циклопептидом RGDfV.

Додаткові подібні дослідження виконувалися із синтетичними пептидами, отриманими, як описано в Прикладі 3, із тим, щоб визначити пептиди, що показують специфічність до $\alpha\beta_5$, але не $\alpha\beta_3$ -зв'язаного ангіогенезу. Дослідження були також виконані з органічними речовинами, приготовленими, як описано в Прикладі 10.

Специфічність інгібування інтегринів антитілами при індукованому чинником росту ангіогенезі була надалі підтверджена і зміцнена поширенням експериментів по вивченню впливу на виникнення ангіогенезу чинників росту, таких як чинник некрозу пухлини α (TNF- α), що трансформує чинник росту α (TGF- α) або форболовий ефір, 4-(3-форбол-12-міристан-13-ацетат (PMA).

Вищевказані чинники росту (цитокіни), включаючи bFGF і VEGF, по окремоті були використані при концентрації 1,0мкг/мл стосовно до Сам-моделі 10-денного віку, відповідно до описаного раніше. PMA використовувалася в концентрації 20нг/мл.

Через 24 години після обробки чинником росту на Сам-модель по окремоті впливали антитілами, LM609 і PIF6, або інгібітором протеїнкінази C (PKC), кальфостином C, або однократно інтраваскулярною дозою, як описано вище, або шляхом місцевого застосування, як описано нижче, у наступному прикладі. Для інтраваскулярних ін'єкцій протягом наступних трьох днів використовували антитіла при концентрації 75мкг на ембріон і кальфостин C в дозі 100нМ.

На 13-й день фільтрувальні диски і зв'язана із CAM тканина були розсічені і піддані аналізу на ангіогенез за допомогою стереомікроскопу. Ангіогенез обраховувався двоюким непрямим чином шляхом аналізу кількості і міри довжини кровоносних судин у межах площі диска. Розміри варіювалися від низкою (1) до високої (4). Індекс ангіогенезу визначався вирахуванням фонові 1 із усіх цифр. Експерименти повторювалися 2-4 рази з 5-6 ембріонами на експеримент.

Як показано відповідно на Фігурах 7A і 7B, антитіла до $\alpha\beta_3$, LM609, блокували ангіогенез у відповідь на дію bFGF- і TNF- α , тоді як антитіла до $\alpha\beta_5$, PIF6 виявляли невеликий ефект інгібування. Навпаки, як показано відповідно на Фігурах 7C-7E, PIF6 були ефективні при інгібуванні ангіогенезу,

індукованого VEGF TGF- α або PMA, у той час як LM609 не були в стані зробити це.

PMA, потенційний причинний чинник ангіогенезу, здатний активувати протеїнкіназу C (PKC), інтра-целюлярну родину серинових треонінових кіназ. Тому ми також перевіряли вплив кальфостину C, інгібітору PKC, на ангіогенез у CAM курча. Кальфостин C блокував ангіогенез, викликаний PMA (Фігура 7E) так само, як і викликаний VEGF і TGF- α (відповідно показаний на Фігурах 7C і 7D), у той час як робив мінімальний ефект на ангіогенез, що протікає за участю bFGF і TNF- α (відповідно показаний на Фігурах 7A і 7B).

У цілому ці результати показують існування двох зовсім відмінних друг від друга шляхів ангіогенезу, де один залежить від сигналу, зв'язаного з $\alpha\beta_3$, який у значній мірі незалежний від PKC, як було раніше описано [Brooks et al., Sci. 264: 569-571 (1994)], а другий шлях стимулюється трансдукційним сигналом при участі avPs, який вирішальним чином залежить від активації PKC.

Крім вищеописаних експериментів для визначення локалізації PIF6 і LM609 mAbs у CAM тканинах, у які внутрішньовенно були введені LM609, фіксовані зрізи були піддані обробці 2,5% БСА в HBSS протягом 1 години при кімнатній температурі з наступним фарбуванням 1:250 розведенням мічених родаміном вторинних антитіл кози з антитілами миші (Таго). Зрізи потім аналізувалися за допомогою Цейсівського імуофлуоресцентного складового мікроскопа.

В. Інгібування викликаного чинником росту ангіогенезу місцевим застосуванням інгібіторів

Для того щоб визначити, чи грає $\alpha\beta_5$ активну роль в ангіогенезі, фільтрувальні диски, насичені чинниками росту, описаними вище, містяться на CAM для індукування ангіогенезу з наступним застосуванням або PIF6, або LM609.

Диски потім обробляли 50мл HBSS, що містить 25мг mAb у загальному обсязі 25мкл стерильного HBSS у 0.24 і 48 годин. Через 72 години CAM збиралися і містилися в чашку Петрі (35мм) і промивалися один раз 1мл PBS. Нижній бік фільтрувального паперу і тканини CAM потім аналізувалися за допомогою Olympus стереомікроскопу з двостулчастим пристроєм і з двома окулярами. Інгібування ангіогенезу розцінювалося як суттєве, коли CAM показували >50% зменшення інфільтрації в кровоносних судинах CAM безпосередньо під диском. Експерименти повторювалися 4 рази на кожне антитіло, із 6-7 ембріонами в кожному експерименті.

Щоб перевірити вплив антитіл до інтегринів на зрілі судини, що вже розвилися, які представляють нормальний розвиток судин, що примикають до областей, де судини відсутні, фільтрувальні диски, просочені антитілами, поміщали на васкуляризовані області CAM від 10-денних ембріонів, який не оброблялися місцево цитокіном.

Сам-дослідження виконувалися також із синтетичними пептидами даного винаходу, щоб визначити вплив циклічних і лінеаризованих пептидів на індукований чинником росту ангіогенез. Вісім мкг пептидів, отриманих як описано вище, були по окремоті поміщені в стерильний HBSS загальним обсягом 25мкл. Розчин пептидів використовувався

для приготування CAM негайно і потім знову на 24 і 48 годин. Через 72 години фільтрувальний папір і тканини навколо CAM розрізали і розглядали відповідно до описаного вище. Подібні дослідження були виконані для органічних речовин, як описано в Прикладі 10.

С. Інгібування ангіогенезу, викликаного пухлиною, місцевим застосуванням

1) Обробка моноклональними антитілами

На додаток до досліджень ангіогенезу, описаних вище, де оцінювалися ефекти від застосування анти- $\alpha\beta_5$ антитіл і пептидних антагоністів, досліджували також роль $\alpha\beta_5$ в ангіогенезі, викликаному пухлиною. У якості індуктора використовували тканини людини, що не містили $\alpha\beta_5$, попередньо вирощені і виділені із CAM 17-денного ембріона курчати. Фрагменти готували, як описано в Прикладі 5C

Як описано вище, на фрагменти пухлини місцево впливали антитілами окремо при концентрації 25мкг у 25мкл HBSS, і потім запечатували віконця стрічкою. Антитіла добавляють знову таким же чином на 25-й і 48-й годину. Через 72 години пухлини і тканини навколо CAM аналізують, як зазначено вище.

Як описано в Прикладі 5C, пухлини спочатку одержували трансплантуванням клітинних ліній людини, які не експресують інтегрин $\alpha\beta_5$, на CAM 10-денні ембріони курчати.

Для того, щоб підрахувати ефект mAbs на ангіогенез, викликаний пухлиною, кровоносні судини, що входять у пухлину в межах фокального плану CAM, підраховуються в стереомікроскопі з двостулчастим пристроєм і двома окулярами.

Синтетичні пептиди, отримані в Прикладі 3, і органічні речовини, отримані в Прикладі 10, також застосовувалися місцево на Сам-модельній системі ангіогенезу, викликаного пухлиною, як описано вище. Аналогічно визначали дію пептидів і органічних речовин на життєздатність судин.

D. Інгібування ангіогенезу, викликаного пухлиною, при внутрішньовенному застосуванні

1) Обробка моноклональними антитілами

Індуковані пухлиною кровоносні судини, отримані як описано вище, були також оброблені антитілами, які вводили внутрішньовенно. CS-1 меланомні пухлини поміщували на препарати CAM, як описано в Прикладі 5C, віконця запечатувалися стрічкою, через 24 години від 100 до 300мкг очищених mAbs були введені однократно внутрішньовенно в кровоносні судини ембріона курчати, як було описано. Ембріони потім інкубували протягом 7 днів. Поширення ангіогенезу спостерігали, як було описано раніше. Після цього періоду пухлини розрізалися й аналізувалися з урахуванням їхньої ваги для визначення ефекту впливом антитіл на ріст або інгібування пухлини.

Результати обробки CS-1 пухлин 300мкг $\alpha\beta_5$ -специфічних антитіл PIF6 показані на Фігурі 8. Вага пухлини різко зменшувалася до менш ніж 50мг, якщо порівнювати неопрацьовані з CSAT-обробленими пухлинами. $\alpha\beta_3$ -специфічні антитіла, LM609, також інгібували ріст пухлини, однак менш ефективно, ніж PIF6. Порівнянні результати були отримані з пухлинами, обробленими 100мкг PIF6. Таким чином, PIF6 були ефективними в при-

гнічені ангіогенезу, протікаючого за участю $\alpha\beta_5$ у пухлинній моделі на Сам-препаратах, який приводить до різкого зменшення клітинної маси пухлини.

2) Обробка синтетичними пептидами або органічними речовинами

Аналізувався також вплив пептидних або органічних речовин на індуковане пухлиною розростання судин у системі Сам-досліджень.

Використовувався пухлинний Сам-препарат, описаний вище за винятком того, що крім внутрішньовенної ін'єкції mAb, у видиму частину кровоносних судин внутривенно вводили окремо синтетичні пептиди й органічні речовини, відповідно приготовлені, як описано в Прикладах 3 і 10.

7. Ідентифікація специфічних до $\alpha\beta_5$ антагоністів, визначених методом ліганд-рецепторного зв'язування

$\alpha\beta_5$ -імунізовані антитіла і синтетичні пептиди, отримані відповідно в Прикладах 1 і 3, скринували по визначенню їхньої здатності перешкоджати зв'язуючій активності $\alpha\beta_5$, $\alpha\beta_3$ і $\alpha_{11b}\beta_3$ рецепторів у методі зв'язування очищених ліганду-рецептора. Метод, що вивчає таке зв'язування, був описаний [Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 10003-10007 (1993); Smith et al., J. Biol. Chem., 265: 11008-11013 (1990), Pfaff et al., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238 (1994)], роботи яких доводяться тут як посилання.

Описаний метод ідентифікування антагоністів у дослідженні ліганд-рецепторного зв'язування, у якому рецептор іммобілізований на твердому носії, а ліганд і антагоніст розчинні. Також описаний метод аналізу ліганд-рецепторного зв'язування, у якому ліганд іммобілізований на твердому носії, а рецептор і антагоніст розчинні.

Коротко кажучи, обрані очищені інтегрини окремо іммобілізуються в комірках Titertek мікротитратора при концентрації, встановленій 50 нанограм (нг) на комірку. Очищення рецепторів, використовуваних у дослідженнях зв'язування ліганду з рецептором, добре відомі в даній області і легко виконуються методами, знайомими фахівцю в цій області. Після інкубації протягом 18 годин при 4°C ділянки неспецифічного зв'язування на планшеті блокуються 10мг/мл бичачого сироваткового альбуміну (BSA) у Трис-сольовому буфері. Для вивчення інгібування перевіряються різні концентрації обраних антитіл або пептидів на їхню здатність блокувати зв'язування ¹²⁵I-вітронектину або інші мічені ліганди з рецепторами інтегринів $\alpha\beta_5$, $\alpha\beta_3$, $\alpha\beta_1$, $\alpha_{11b}\beta_3$.

Незважаючи на те, що ці ліганди показують оптимальне зв'язування з окремим інтегрином, вітронектин із $\alpha\beta_5$ і $\alpha\beta_3$, а фібриноген із $\alpha_{11b}\beta_3$, вивчення інгібування зв'язування з використанням або антитіл, або пептидів для блокування зв'язування вітронектину з будь-яким рецептором забезпечує точне визначення кількості у мікромолях (μм) пептиду, необхідного для напівмаксимального інгібування зв'язування рецептора з лігандом. Ізотопно-мічені ліганди використовуються в концентраціях 1нМ і зв'язування оспорується в окремих випадках у відношенні немічених синтетичних пептидів. Після трьох годин інкубації вільний ліганд, що не зв'язався, віддаляється промиванням, а

зв'язаний ліганд детектується гамма-лічильником.

У такий спосіб, описаний тут ліганд-рецепторний метод використовується для скринування і циклічних, і лінійних синтетичних пептидів поряд із моноклональними антитілами й органічними речовинами, що виявляють селективну специфічність стосовно окремого інтегринового рецептора, особливо $\alpha\beta_5$, які використовуються як антагоністи вітронектинового рецептора ($\alpha\beta_5$) у даному винаході.

8. Регресія in vivo росту тканини пухлини за допомогою $\alpha\beta_5$ -антагоністів, яка визначена методом: хімерна миша - людина

In vivo модель хімерна миша:людина була відтворена, заміною порції шкіри від SCID миші шкірою крайньої плоти плоду людини. In vivo модель хімерна миша: людина була приготовлена в основному відповідно до опису [Yan et al., J. Clin. Invest., 91: 986:996 (1993)].

Коротко - 2см² квадратних шматочки шкіри було хірургічно віддалено в SCID миші (вік 6-8 тижнів) і замінено шкірою крайньої плоти людини. Миша була анестезована і з кожного бічного боку голінням була віддалена вовна з ділянок площею 5см². Дві обкреслені круглої форми ділянки живої тканини площею 2см² були приготовлені видаленням шкіри до глибини фасції. Тканини шкіри такого ж розміру, отримані від крайньої плоти людського плоду, були поміщені усередину западин і захисту. Пересаджену тканину покривали Band-Aid, який закріплював шкіру. Для прикриття рани використовували також стрічку з тканини з мікропорами.

Після приживлення пересадженої тканини людську шкіру інюкулювали клітинами меланоми. Клітинну лінію меланоми людини M21L використовували для одержання твердої пухлини людини на тканині шкіри, пересадженій на SCID мишу. Суспензія кліток 2x10⁶ M21L ін'єкціювали інтрадермально в пересаджену тканину людини. Потім протягом 2-4 тижнів спостерігали за ростом помітних пухлин людини на мишах.

Після того, як утворилася помітна пухлина, або 250мкг пептиду (в обсязі 100 мкл), що має послідовність SEQ ID No 9 (циклічний пептид Arg-Gly-Asp-D-Phe-Asn-метильований Val, що містить RGD) або контрольний пептид, цикллічний Arg-pAla-Asp-D-Phe-Val, внутрішньочеревино вводили миші 3 рази в тиждень протягом 3 тижнів. Наприкінці цього періоду пухлину витягували й аналізували по вазі і гістології.

Результати показані на Фігурі 9, де обсяг пухлини в мм³ відзначений по Y-осі проти обробки пептидом на X-осі. Випробуваний пептид із послідовністю SEQ ID No.9, відзначений на Фігурі як пептид 189, значно зменшував обсяг пухлини до приблизно 25мм³ у порівнянні з контрольним пептидом (позначеним як пептид 601), де обсяг пухлини був більшим, ніж 300мм³.

Таким чином, блокування $\alpha\beta_5$ рецептора внутрішньовенним введенням $\alpha\beta_5$ антагоніста-пептиду 189 привели до регресії пухлини меланоми в цій модельній системі в такому ж аспекті, як і на моделі CAM і моделі ока кролика, як описувалося раніше.

Хімерна модель SCID/людина, описана вище, використовувалася також для оцінки ефективності

інших $\alpha\beta_5$ антагоністів і органічних речовин, останні з яких одержували, як описано в Прикладі 10.

9. Одержання моделі «миша:миша» для ретинального ангіогенезу, що протікає за участю $\alpha\beta_5$ і його інгібування $\alpha\beta_5$ антагоністами

Базуючись на спостереженнях у Прикладі 2С за експресією $\alpha\beta_3$ і $\alpha\beta_5$ у ретинальній неоваскулярній тканині, використовували нову мишину модель для вивчення ефектів циклічних пептидних антагоністів обох інтегринів ретинального ангіогенезу, що систематично вводились. У тільки що народжених мишей ретинальні судини розвиваються протягом перших двох тижнів постнатального періоду, протягом цього часу поверхнева ретинальна мускулатура утворює багату високорозвинену мережу судин, що дає початок оптичному нервовому центру і поширенню по периферії для розвитку ретинальної поверхні таким шляхом, який спостерігається в усіх ссавців і людини [Jiang et al., *Glia*, 15: 1-10 (1995)].

Для моделювання новонародженим мишам підшкірно вводили двічі в день протягом чотирьох днів, починаючи з дня 0, циклічний пептид RGDfV (SEQ ID No. 4) (названий також як пептид 203) або контрольний пептид RADfV (SEQ ID No. 5). У п'ятий постнатальний день утворення видалляли і фіксували в 4,0% параформальдегіді (PFA) при кімнатній температурі.

Для того, щоб кількісно оцінити ретинальний ангіогенез миші, вимірювали відстань від центру оптичного нерва до найбільш віддаленої точки одиначної судини, обраної в кожному із шести рівних секторів навколо 12-ї години на годиннику. Величина, що показує відстань, підраховували й усереднювали з подібними даними, отриманими від усього приплоду. Щоб обчислити загальний обсяг ретинальних кровоносних судин, весь зразок сканували в 2,0мм оптичних перетинах і берегли digitally. «Seed» функція в Bio-Rad's Lasersharp Software була потім використана і для рахунку кубічних pixels у кожній секції як відправний пункт. «Макро» писалося для підсумовування обсягів усіх секцій і визначення величини усіх васкулярних структур.

При безпосередньому вимірі росту судин у двох вимірах із фотографій систематично вводили пептидний антагоніст 203 інгібував ретинальний васкулогенез. відносно контрольного пептиду, на 44% (N=9, $p < 0,0000001$, парний t-тест). Між неопрацьованими новонародженими мишами і п'ятиденною мишею, що одержує пептид 203, не було статистичної різниці, так що пептид ефективно інгібує васкулогенез. Крім того, статистичної різниці немає між неопрацьованою п'ятиденною мишею і мишею такого ж віку, що одержує контрольний пептид. У такий спосіб, інгібування ретинального васкулогенезу в RGDfV-обробленої новонародженої миші в порівнянні з неопрацьованими аналогами ефективно на 100%.

Використовуючи більш кількісний метод, з огляду на тривимірну природу росту судин, можна бачити, що 78% зменшення ретинального васкулярного обсягу у тварин, оброблених пептидом 203, порівнене з контролем. Розмір об'єму судин на п'ятий день після народження у тварин, оброб-

лених пептидом 203, був $3,6 \times 10^6 \mu\text{m}^3$, а у контрольних тварин $15,7 \times 10^6 \mu\text{m}^3$. Об'єм, зайнятий ретинальними кровоносними судинами в неопрацьованих новонароджених мишей, був непомітним у порівнянні з п'ятиденними мишами, обробленими пептидом 203.

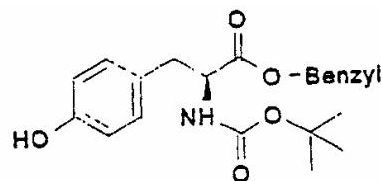
Результати, отримані вище, показали, що антагоністи специфічно блокують утворення нових кровоносних судин без ефекту на судини, що вже виникли. Результати показують, що патологія ретинального неоваскулярного захворювання відмінна від тих, який спостерігаються при субретинальному неоваскулярному захворюванні і що антагоністи $\alpha\beta_5$ ефективні для лікування пацієнтів із захворюванням обох очей, зв'язаним з ангіогенезом. Подібні дослідження виконувалися з органічними міметиками - $\alpha\beta_5$ антагоністами, отриманими, як описано в Прикладі 10.

10. Одержання $\alpha\beta_5$ антагоністів, що являють собою органічні речовини

Нижче описується синтез органічних антагоністів $\alpha\beta_5$ Сполук 7, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 17 і 18, він показаний також на відзначених фігурах. Отримані органічні речовини, називані органічними міметиками в даному винаході, використовуються потім у способах інгібування ангіогенезу, що розвився за участю $\alpha\beta_5$.

Для кожного способу синтезу, описаного нижче, вимірювалися показники оптичного обертання на Perkin-Elmer 241 спектрофотометрі UV і видимий спектр фіксувався на Beckmann DU-70 спектрометрі. ^1H і ^{13}C ЯМР-спектру реєстрували при 400 і 500МГц Bruker AMX-400 і AMX-500 спектрометром. Характеристики високого дозволу мас-спектрометрії фіксувалися VG ZAB-ZSE мас-спектрометром в умовах швидкого атомного бомбардування (FAB). Колоночна хроматографія виконувалася на силікагелі з 70-230меш. Препаративна рідина (TLC) хроматографія виконувалася на Merck Art. 5744 (0,5мм). Точки плавлення визначали на апараті Thomas Hoover.

А. Сполука 1: t-Вос-L-тирозин-бензиловий ефір, приведений на Фігурі 10

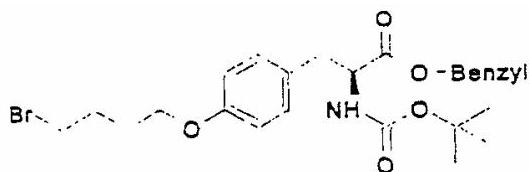


Сполука 1 (у ній Benzyl = бензил)

До розчину N-(трет-бутоксикарбон)-L-тирозиу (t-Вос-L-тирозиу (1,0 еквівалентів, Aldrich) у 0,10М (М) метиленхлориду додали дициклогексилкарбодіімід (DCC) (1,5 еквівалента) при 25°C і потім перемішували протягом 1 години. Далі, додавали 1,5 еквіваленту бензилового спирту і суміш перемішували ще протягом 12 годин при 25°C Реакційну суміш потім розчиняли в етилацетаті (0,10М) і двічі промивали (2X) водою, один раз (1X) розсолон і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли під вакуумом і не-

очищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем. Сполука 1, t-BOC-L-тирозинбензиловий ефір може бути також комерційно доступний через фірму Sigma.

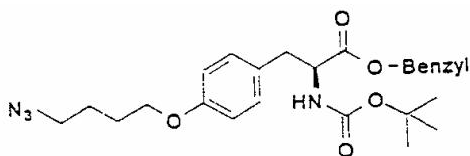
В. Сполука 2: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(4-бромбутилокси)-феніл-2-N-трет-бутилоксикарбоніл-пропіонової кислоти, приведений на Фігурі 10, стадія i



Сполука 2 (у ній Benzyl = бензил)

Суміш t-BOC-L-тирозинбензинового ефіру (2 грами, 5,38ммоль, синтезований, як описано вище), 1,4-дибромбутану (1,9мл, 16,2ммоль; Aldrich), карбонату натрію (5г) і 18-краун-6 (0,1г, Aldrich) нагрівали при 80°C протягом 12 годин. Після охолодження відфільтровували осад і реакційну суміш випарювали досуха під вакуумом. Неочищений продукт очищали кристалізацією за допомогою 100% гексану до виходу 2,5г (92%) Сполуки 2.

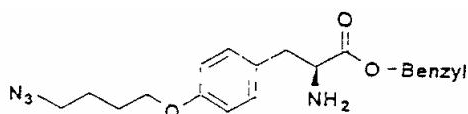
С. Сполука 3: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(4-азидобутилокси)-феніл-2-N-трет-бутилоксикарбоніл-пропіонової кислоти, приведений на Фігурі 10, стадія ii



Сполука 3 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 2 (2,5г, 4,9ммоль) перемішували з азидом натрію (1,6г, 25ммоль) у диметилформаміді (DMF) (20мл) при 25°C протягом 12 годин. Розчинник випарювали, і залишок обробляли водою (приблизно 10мл) і двічі екстрагували етилацетатом. Органічні шари збирали, об'єднували, висушували над сульфатом магнію і випарювали до виходу 2,0 грамів (90%) Сполуки 3 у виді безбарвного сиропу. FAB-MS. 469 (M^+H^+).

D. Сполука 4: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл-2-амінопропіонової кислоти, приведеної на Фігурі 10, стадія iii

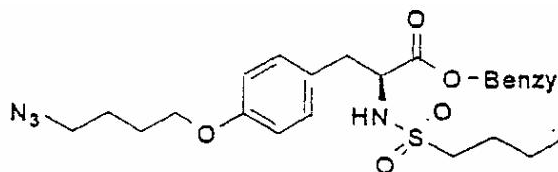


Сполука 4 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 3 (2,0г, 4,4ммоль) розчиняли в трифтороцтовій кислоті (TFA, 2мл) і перемішували 3 години при кімнатній температурі. Випарювання у

вакуумі дало 1,6 грама (кількісно). Сполуки 4 у виді безбарвного сиропу, що використовувався на наступній стадії без додаткової обробки. FAB-MS: 369 (M^+H^+).

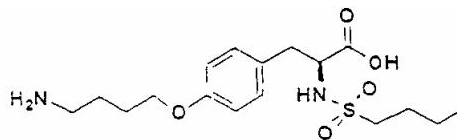
E. Сполука 5: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл-2-бутилсульфонамідпропіонової кислоти, приведений на Фігурі 10, стадія iv



Сполука 5 (у ній Benzyl = бензил)

Суміш сполуки 4 (1,6г, 4,3ммоль), хлориду бутансульфонової кислоти (0,84мл, 6,6ммоль) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метиленхлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім випарювали і залишок розчиняли в етилацетаті, промивали розведеною HCl водним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт був очищений флеш-хроматографією (силікагель, толуол, етилацетат 15:1) до одержання Сполуки 5 у виді аморфної маси з виходом 1,4 грама (67%).

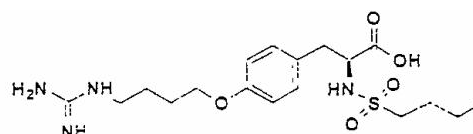
F. Сполука 6: (S)-3-(4-(4-амінобутилокси) феніл-2-бутилсульфонамідпропіонової кислоти, приведена на Фігурі 10, стадія v



Сполука 6

Сполуку 5 (1,3г, 2,6ммоль) розчиняли в 20мл етилацетату, метанолу, води 5/3/1 і 0,2мл трифтороцтової кислоти (TFA) і гідрогенірували воднем (1 атмосфера, Parr Shaker апарат) при 25°C в присутності 100мг паладію (10% на деревному вугіллі). Через 3 години каталізатор відфільтровували і розчинник випарювали до одержання Сполуки 6 у виді масляного залишку. Після люфілізації з води 1,0 грам (кількісно) Сполуки 6 одержували у виді білого порошку FAB-MS: 373 (M^+H^+).

G. Сполука 7: (S)-3-(4-(4-Гуанідинобутилокси)феніл-2-бутилсульфонамідпропіонової кислоти, приведена на Фігурі 10, стадія vi

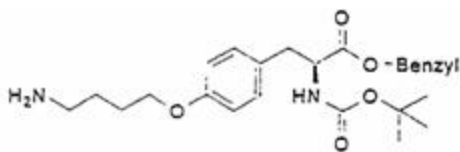


Сполука 7

Сполуку 6 (200мг, 0,5ммоля), 3,5 диметилпіразол-1-карбоксамідинітрат (DPFN) (170мг, 0,8ммоля, Aldrich Chemical Company) і триетиламін (0,15мл, 1,0ммоля) у диметилформаміді (DMF, 5мл) нагрівали при 60°C протягом 12 годин. Після охолодження розчинник відганяли у вакуумі і залишок очищали ВЕЖХ (Lichrocrat RP-18, градієнт ацетонітрил/вода+0,3% TFA 99:1 до 1:99) до виходу 50мг (25%) Сполуки 7 у виді білого аморфного порошку, після ліофілізації. FAB-MS: (M^+H^+).

т. пл. 70°C.

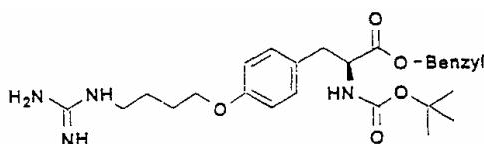
Н. Сполука 8: (S)-3-(4-(4-амінобутилокси)феніл)-2-N-трет. Бутилоксикарбонілпропіонова кислота, приведена на Фігурі 11, стадія ii



Сполука 8 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 3 (0,5г, 1,07ммоля) розчиняли в 10мл суміші етилацетат/метанол/вода 5/3/1 і 0,1мл трифтороцтової кислоти (TFA) і гідрогенірували воднем (1 атмосфера; Parr Shaker апарат) при 25°C в присутності 30мг паладію (10% на деревному вугіллі). Через 3 години каталізатор відфільтровували, а розчинник відганяли до одержання Сполуки 8 у виді масляного залишку. Після ліофілізації з води одержували 370мг (кількісно) Сполуки 8 у виді білого порошку. FAB-MS: 353 (M^+H^+).

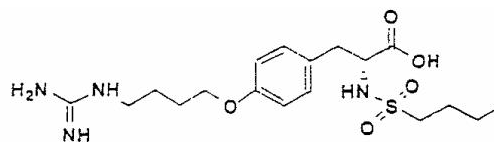
I. Сполука 9: (S)-3-(4-(4-Гуанідинобутилокси)феніл)-2-N-трет. Бутилоксикарбонілпропіонова кислота, приведена на Фігурі 11, стадія iv



Сполука 9 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 8 (200мг, 0,5ммоля), 3,5-диметилпіразол-1-карбоксамідинітрат (DPFN) (140мг, 0,8ммоля; Aldrich Chemical Company) і триетиламін (0,15мл, 1,0ммоля) у диметилформаміді (DMF, 5мл) нагрівали при 60°C протягом 12 годин. Після охолодження розчинник відганяли у вакуумі і залишок очищали ВЕЖХ (Lichrocrat RP-18, градієнт ацетонітрил, вода+0,3% TFA 99:1 до 1:99) до одержання 160мг (90%) Сполуки 9 у виді білого аморфного порошку, після ліофілізації. FAB-MS: 375 (M^+H^+).

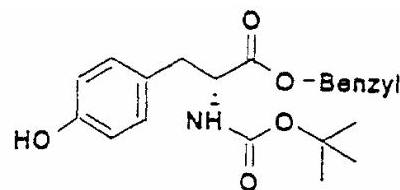
Г. Сполука 10: (R)-3-(4-(4-гуанідинобутилокси)-феніл)-2-бутилсульфонамідпропіонова кислота, приведена на Фігурі 12, стадії i-ii



Сполука 10

Ідентична синтезу Сполуки 7 послідовність реакцій була використана для одержання D-тирозинового аналогу 10, 205мг який було отримано у виді білого аморфного матеріалу FAB-MS: 415 (M^+H^+) у такий спосіб із використанням проміжних Сполук 100-600 для одержання Сполуки 10.

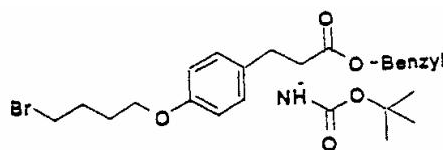
1) Сполука 100: t-Вос-D-тирозинбензиловий ефір, приведений на Фігурі 12



Сполука 100 (у ній Benzyl = бензил)

До розчину N-(трет-бутоксикарбонил)-D-тироzinу (t-Вос-L-тирозин) (1,0 еквівалент, Aldrich) у 0,10М метиленхлориді добавляли дициклогексилкарбодіімід (DCC) (1,5 еквівалента) при 25°C і залишали перемішуватися протягом 1 години. Далі добавляли 1,5 еквіваленту бензинового спирту і суміш перемішували 12 годин при 25°C Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою. IX розсолем і висушували над сульфатом магнію Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем.

2) Сполука 200: Бензиловий ефір (R)-3-(4-(4-бром-бутилокси)феніл)-2-N-трет-бутилоксикарбонілпропіонової кислоти, приведений на Фігурі 12, стадія i

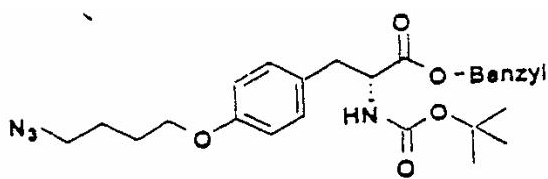


Сполука 200 (у ній Benzyl = бензил)

Суміш t-Вос-D-тирозинбензинового ефіру (2 грами, 5,38ммоля синтезований, як описано вище), 1,4-дибромбутану (1,9мл, 16,2ммоля, Aldrich), карбонат натрію (5г) і 18-краун-16 (0,1г; Aldrich) нагрівали при 80°C протягом 12 годин. Після охолодження відфільтровують осад і реакційну суміш випарюють досуха у вакуумі. Неочищений продукт очищали кристалізацією з використанням 100% гексану до одержання Сполуки 200 із виходом 2,5г (92%).

3) Сполука 300: Бензиловий ефір (R)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл)-2-N-трет. Бутилоксикарбонілпропіонової кислоти, приведеної на Фігурі 12, стадія ii

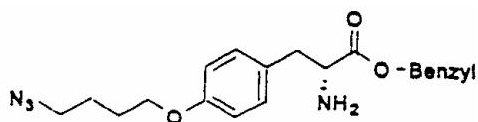
53



Сполука 300 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 200 (2,5г, 4,9ммоль) перемішували з азидом натрію (1,6г, 25ммоль) у диметилформаміді (DMF) (20мл) при 25°C протягом 12 годин. Потім розчинник відганяли і залишок обробляли водою (приблизно 10мл) і екстрагували двічі етилацетатом. Органічні шари об'єднували, висушували над сульфатом магнію і випарювали до одержання Сполуки 300 (вихід 2,0 грами, 90%) у виді безбарвного сиропу; FAB-MS: 469 (M^+H^+).

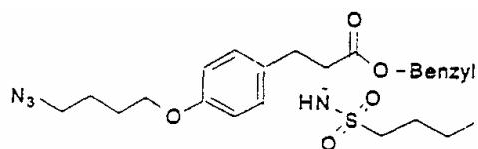
4) Сполука 400: Бензиловий ефір (R)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл-2-амінопропіонової кислоти. I, приведений на Фігурі 12, стадія iii



Сполука 400 (у ній Benzyl = бензил)

Сполуку 300 (2,0г, 4,4ммоль) розчиняли в трифтороцтовій кислоті (TFA, 2мл) і перемішували 3 години при кімнатній температурі. Випарювання у вакуумі приводило до одержання 1,6г (кількісно) Сполуки 400 у виді безбарвного сиропу, який без подальшого очищення використовувався на наступному етапі. FAB-MS: 369 (M^+H^+).

5) Сполука 500: Бензиловий ефір (R)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл-2-бутилсульфонамідопропіонової кислоти, приведений на Фігурі 12, стадія iv



Сполука 500 (у ній Benzyl = бензил)

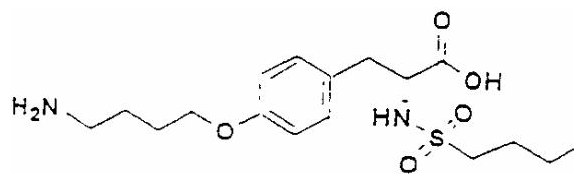
Суміш Сполуки 400 (1,6г; 4,5ммоль), хлориду 10-камфорсульфонової кислоти (0,84мл, 6,6ммоль) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метиленхлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім випарювали і залишок розчиняли в етилацетаті, промивали розведеною HCl, водяним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт очищували флеш-хроматографією (силікагель, толуол/ етилацетат 15:1) до одержання Сполуки 500 із виходом 1,4г (67%) у виді аморфної осад.

6) Сполука 600: (R)-3-(4-(4-амінобутилокси)феніл-2-бутилсульфонамідопропіонової кислоти, приведеної на Фігурі 12, стадія v

84665

54

приведена на Фігурі 12. стадія v



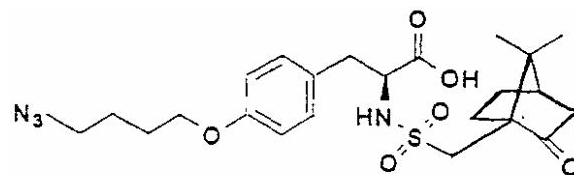
Сполука 600

Сполуку 500 (1,3г, 2,6ммоль) розчиняли в 20мл суміші етилацетат/метанол/вода 5/3/1 і 0,2мл трифтороцтової кислоти (TFA) і гідрогенірували воднем (1 атмосфера; Parr Shaker апарат) при 25°C в присутності 100мг паладію (10% на деревному вугіллі). Через 3 години каталізатор відфільтровували і розчинник випарювали до одержання Сполуки 600 у виді масляного залишку. Після ліофілізації з води 1,0 грам (кількісно) Сполуки 600 одержували у виді білого порошку. FAB-MS: 373 (M^+H^+).

7) Сполука 10: (R)-3-(4-(4-Гуанідинобутилокси)феніл-2-бутилсульфонамідопропіонової кислоти, приведена на Фігурі 12, стадія vi

Сполуку 600 (200мг; 0,5ммоль), 3,5-диметилпіразол-1-карбоксаміддинітрат (DPFN) (170мг; 0,8ммоль, Aldrich Chemical Company) і триметиламін (0,15мл; 1,0ммоль) у диметилформаміді (DMF; 5мл) нагрівали при 60°C протягом 12 годин. Після охолодження розчинник відганяли під вакуумом і осад очищували БЕЖХ (Lichrocrat RP-18, градієнт ацетонітрил/ вода+0,3% TFA 99:1 до 1:99) до одержання Сполуки 10 із виходом 50мг (25%) у виді білого аморфного порошку, після ліофілізації. FAB-MS: 415 (M^+H^+), т. пл.: 70°C.

К. Сполука 11: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(4-азидобутилокси)феніл-2-(10-камфорсульфонамідопропіонової кислоти, приведеної на Фігурі 13



Соединение 11

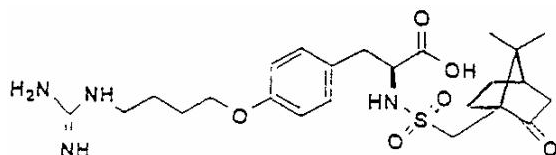
Суміш Сполуки 4 (1,0г; 2,7ммоль) хлориду 10-камфорсульфонової кислоти (6,6ммоль; Aldrich Chemical Company) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метиленхлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім випарювали і залишок розчиняли в етилацетаті, промивали розведеною HCl, водяним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт очищали флеш-хроматографією (силікагель, толуол/етилацетат 15:1) до одержання 1,4 граму (67%) Сполуки 11 у виді аморфної осад.

Л. Сполука 12: (S)-3-(4-(4-Гуанідинобутилокси)феніл-2-(10-камфорсульфонамідопропіонової кислоти, приведеної на Фігурі 13, стадія i-ii

55

84665

56



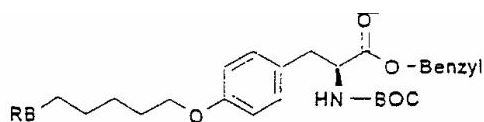
Сполука 12

Сполука 12 була отримана після гідрогенування і гуанілування Сполуки 11 у відповідності з наступними умовами:

Стадія i: Сполуку 11 (1,3г (2,6ммоль) розчиняли в 20мл суміші етилацетата/метанол/вода 5/3/1 і 0,2мл трифтороцтової кислоти і гідрогенірували воднем (1 атмосфера; Parr Shaker апарат) при 25°C в присутності 100 мг паладію (10% на деревному вугіллі). Через 3 години каталізатор відфільтровували і розчинник відганяли до одержання проміжного аміну у вигляді масляного залишку. Після ліофілізації з води 1,0 грам (кількісно) проміжного аміну було отримано у вигляді білого порошку, який піддавався наступному:

Стадія ii: Отримана вищезгадана проміжна амінна сполука (200мг; 0,5ммоль), 3,5-диметилпіразол-1-карбоксамідинітрат (DPFN) (170мг; 0,8ммоль; Aldrich Chemical Company) і триетиламін (0,15мл; 1,0ммоль) у диметилформаміді (DMF, 5мл) нагрівали при 60°C протягом 12 годин. Після охолодження розчинник випарювали під вакуумом, а залишок очищали HPLC (Lichrocrat RP-18, градієнт ацетонітрил/вода+0,3% TFA 99:1 до 1:99) до одержання Сполуки 12 із виходом 50мг (25%) у вигляді білого аморфного порошку, після ліофілізації. FAB-MS: 509,6 (M^+H^+).

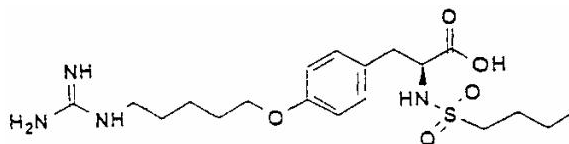
М. Сполука 13: Бензиловий ефір (S)-3-(4-(5-бром-пентилокси) феніл-2-N-трет. бутілоксикарбоніл-пропіонової кислоти, приведений на Фігурі 13



Сполука 13 (у ній Benzyl = бензил)

Суміш t-Вос-L-тирозинбензилового ефіру (4,5грам, 12,1ммоль, Сполука 1, синтезована, як зазначено вище), 1,5-дибромпентан (5мл, 36,7ммоль Aldrich), карбонат натрію (10г) і 18-краун-16 (0,25г, Aldrich) нагрівали при 80°C протягом 12 годин. Після охолодження відфільтровували осад, і реакційну суміш випарювали досуха під вакуумом. Неочищений продукт потім очищали кристалізацією, використовуючи 100% гексан, до одержання Сполуки 13, вихід 5,35г (85%).

N. Сполука 14: (S)-3-(4-(5-Гуанідинопентилокси)-феніл-2-бутилсульфонамідпропіонова кислота, приведена на Фігурі 13, стадії i-v

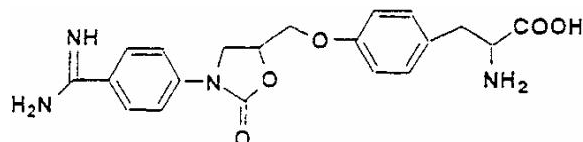


Сполука 14

П'ятистадійний ланцюг реакцій бромно-азидного обміну Вос-розщеплення, сульфонування хлоридом бутансульфонової кислоти, гідрогенізації і гуанілірування за допомогою DPFN виконувалася ідентично вищеописаним процедурам із використанням проміжних Сполук 1-6 для утворення Сполуки 7 або процедурам із використанням Сполук 100-600 для утворення Сполуки 10, як описано вище. Сполука 14 була отримана у вигляді білого порошку. FAB-MS: 429 (M^+H^+).

О. Сполука 15: Дигідрохлорид 3-(4-амідинфеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-аміноетил)фенокси)метил-2-оксазолідину приведений на Фігурі 14

1) Синтез вихідної речовини 2-N-вос-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату для Сполуки 15



Сполука 15

Вихідна речовина 2-N-Вос-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонат було отримано етерифікацією (D або L) N-(трет-бутоксикарбоніл)-L(D)-тирозином (t-Вос-L (D) -тирозин) (1,0 еквівалент; Sigma) у 0,10М метанолі і розведеної 1% HCl. Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 12 годин і потім нейтралізували карбонатом калію, потім розчиняли в етилацетаті (0,10М) і промивали 2X водою, IX розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці з силікагелем до одержання 2-N-Вос-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату.

2. Синтез вихідної речовини 3-р-N-Вос-амідино-феніл-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідину для Сполуки 15: 3-стадійна процедура, що полягає в наступному:

р-Аміно-бензонітрил (1,0 еквівалент; Aldrich) у метиленхлориді (0,10М) перемішували з 2,3-епокси-пропанолом (1,0 еквівалент; Aldrich) протягом 12 годин при 25°C. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений 4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил переводився на наступну стадію, що полягає в наступному:

4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил (1,0 еквівалент, описаного вище) у диметилформаміді (0,10М) при 25°C перемішували з диетилкарбонатом (1,1 еквівалента, Aldrich) і трет-бутилатом натрію (1,1 еквівалента, Aldrich) при 110°C протягом 6 годин. Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою, IX розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений

продукт був потім очищений хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідину, який направлявся на наступну стадію, що полягає в наступному

3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідин (1,0 еквівалент, описаного вище) у метиленхлориді (0,10M) при 25°C перемішували з 1,1 еквівалента сірководню, 1,1 еквівалента метилюдіду і 1,1 еквівалента ацетату амонію. Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин і потім розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання амідину, що був спрямований на наступну стадію, яка полягає в наступному:

1,0 еквівалента амідину, синтезованого, як описано вище, було захищено 1,1 еквівалента BOC-OM(2-BOC-оксіміно)-2-феніл-ацетонітрил; Aldrich) у метиленхлориді (0,10M) при 25°C і перемішували протягом 6 годин. Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений продукт етерифікували в 0,10M метиленхлориді і 1,1 еквівалента метансульфонілхлориду. Реакційну суміш, перемішували при 0°C протягом 6 годин і потім охолоджували заливанням водою (5 еквівалентів), потім розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-р-N-BOC-амідинофеніл-5-метансульфоніл-оксиметил-2-оксазолідину.

3) Зв'язування проміжних 2-N-BOC-аміно-3-(4-гідроксифеніл) пропіонату з 3-р-(4-BOC-амідинофеніл)-Б-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідином для утворення захищеної форми Сполуки 15, 3-(4-BOC-амідинофеніл)-5-(4-(2-метокси-карбоніл-2-N-BOC-аміноетил)фенілоксилметил-2-оксазолідину

Суміш 1,9 граму 2-N-BOC-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату (описаного вище), 20мл диметилформаміду (DMF) і Na (1,0 еквівалент) перемішували 30хв при кімнатній температурі. Після перемішування додали 1,8 граму 3-р-N-BOC-амідинофеніл-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідину (описаного вище) у 10мл диметилформаміду (DMF) і перемішували ще 15хв при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видаляли у вакуумі і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання захищеної форми Сполуки 15, 3-(4-BOC-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-BOC-аміноетил)фенілоксилметил-2-оксазолідину, який направлявся на наступну стадію.

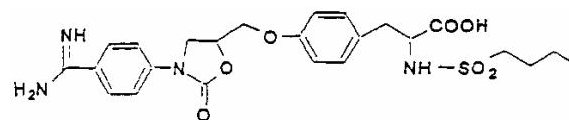
4) Зняття захисту з захищеної форми Сполуки 15 і утворення Сполуки 15: дигідрохлорид 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-

аміноетил)фенокси)-метил-2-оксазолідину, Фігура 14

Обробка захищеної форми Сполуки 15 для утворення Сполуки 15: дигідрохлорид 3-(4-BOC-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-BOC-аміноетил)фенілоксилметил-2-оксазолідину (1,0 еквівалент, синтезований, як описано вище) 4мл 2N NaOH протягом 4 годин при кімнатній температурі. У суміш потім було додано по краплях 40мл 2N розчину HCl у діоксані при 0°C-25°C протягом 3 годин. Реакційну суміш потім заливали бікарбонатом натрію (5 еквівалентів), розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання Сполуки 15: дигідрохлорид 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-аміноетил)фенокси)-метил-2-оксазолідину, т.пл. 165°C (d).

Р. Сполука 16: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-бутилсульфоніламіноетил)фенокси)-метил-2-оксазолідинон, приведенне на Фігурі 14

1) Синтез вихідної речовини 2-N-бутилсульфоніл-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату для Сполуки 16



Сполука 16

Вихідна речовина 2-N-бутилсульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонат одержували етерифікацією ((D або L) тирозину) (1,0 еквівалент; Sigma) у 0,10M метанолі і розбавляли 1% HCl. Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 12 годин і потім нейтралізували карбонатом натрію, потім розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсоллом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли під вакуумом і неочищений продукт потім направляли на наступну стадію:

Суміш вищевказаної сполуки (4,3ммоль) хлориду бутансульфонові кислоти (6,6ммоль) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метиленхлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш випарювали і залишок розчиняли в етилацетаті, промивали розведеною HCl, водяним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт очищали флеш-хроматографією (силікагель; толуол/етилацетат 15:1) до одержання зазначеної сполуки.

2) Синтез вихідної речовини 3-р-N-BOC-амідинофеніл-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідину для Сполуки 16: 3-стадійна процедура, що полягає у наступному:

р-Аміно-бензонітрил (1,0 еквівалент, Aldrich) у метиленхлориді (0,10M) перемішували з 2,3-епокси-пропанолом (1,0 еквівалент; Aldrich) протягом 12 годин при 25°C. Розчинник потім видаляли під вакуумом і неочищений 4-(2,3-

дигідроксипропіламіно) бензонітрил направляли на наступну стадію, що полягає у наступному:

4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил (1,0 еквівалент, описаного вище) у диметилформаміді (0,10M) при 25°C перемішували з диетилкарбонатом (1,1 еквівалента Aldrich) і трет, бутилатом натрію (1,1 еквівалента, Aldrich) при 110°C протягом 6 годин. Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсолом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли під вакуумом і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-(4-ціано-феніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідину, що направляли на наступну стадію, яка полягає у наступному:

3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідин (1,0 еквівалент, описаного вище) у метиленхлориді (0,10M) при 25°C перемішували з 1,1 еквіваленту сірководню, 1,1 еквівалента метиліодиду і 1,1 еквівалента ацетату амонію. Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин і розбавляли етилацетатом (0,10M), промивали 2X водою, 1X розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім видалили під вакуумом і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання амідину, який направляли на наступну стадію, що полягає у наступному:

1,0 еквівалент амідину, синтезованого, як зазначене вище, захищають 1,1 еквівалента ВОС-ОМ(2-(ВОС-оксиіміно)-2-фенілацетонітрилу, Aldrich) у метиленхлориді (0,10M) при 25°C і перемішували протягом 6 годин. Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт етерифіціювали в 0,10M метиленхлориду, і 1,1 еквівалента метансульфонілхлориду. Реакційну суміш перемішували при 0°C протягом 6 годин і заливали водою (5 еквівалентів) і потім розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-р-N-ВОС-амідинофеніл-5-метансульфоніл-окси-метил-2-оксазолідину.

3) Зв'язування проміжних 2-N-бутилсульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату з 3-р-M-Вос-амідинофеніл-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідину для утворення захищеної форми Сполуки 16: 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-бутилсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідину

Суміш 1,9 граму 2-N-бутилсульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату (описаного вище), 20мл диметилформаміду (DMF) і NaH (1,0 еквівалент) перемішували 30 хвилин при кімнатній температурі. Після перемішування додали 1,8 граму 3-р-N-ВОС-амідинофеніл-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідину (описаного вище) у 10мл диметилформаміду (DMF) і перемішували ще 15 хвилин при кімнатній температурі. Реакційну суміш розбавили етилацетатом (0,10M), промили 2X водою, 1X розсолом і вису-

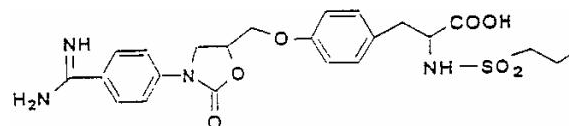
шили над сульфатом магнію. Розчинник потім відігнали під вакуумом і неочищений продукт очищували хроматографією на колонці із силікагелем до одержання захищеної форми Сполуки 16, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-бутилсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідину, який направляли на наступну стадію.

4) Зняття захисту зі Сполуки 16 і одержання Сполуки 16: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-бутилсульфоніламіноетил) фенокси) метил-2-оксазолідину, Фігура 14

Обробляли захищену Форму Сполуки 16, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-бутил-сульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідину (1,0 еквівалент; синтезовану як описано вище) 4мл 2N NaOH протягом 4 годин при кімнатній температурі. До суміші добавляли по краплях 40мл 2N розчину HCl у діоксані при 0°C-25°C протягом 3 годин. Реакційну суміш заливали бікарбонатом натрію (5 еквівалентів) і розбавляли етилацетатом (0,10M), промивали 2X водою, 1X розсолом і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання Сполуки 16: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-бутилсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідину, т. пл. 236-237°C.

Q. Сполука 17: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-пропілсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідин, приведений на Фігурі 14

1) Синтез вихідної речовини 2-N-пропілсульфоніл-аміно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату для Сполуки 17:



Сполука 17

Вихідну речовину 2-N-пропілсульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонат одержували етерифікацією ((D або L) тирозину) (1,0 еквівалент, Sigma) у 0,10M метанолі і 1% розведень HCl. Реакційну суміш перемішували при 25°C протягом 12 годин і потім нейтралізували карбонатом натрію, розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, 1X розсолом, висушували, над сульфатом магнію. Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт направляли на наступну стадію:

Суміш вищевказаної сполуки (4,3ммоль) хлориду пропілсульфонові кислоти (6,6ммоль, Aldrich) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метилен-хлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш випарюють і залишок розчиняють у етилацетаті, промивають розведеною HCl, водним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт очищали флеш-хроматографією (силікагель, толуол/етилацетат 15:1) до одержання зазначеної сполуки.

2) Синтез вихідної речовини 3-р-N-Вос-

амідинофеніл-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідинону для Сполуки 17: 3-стадійна процедура, що полягає в наступному:

р-Амінобензонітрил (1,0 еквівалент; Aldrich) у метиленхлориді (0,10М) перемішували з 2,3-епокси-пропанолом (1,0 еквівалент, Aldrich) протягом 12 годин при 25°C. Розчинник потім відганяли у вакуумі і неочищений 4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил направляли на наступну стадію:

4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил (1,0 еквівалент, як описано вище) у диметилформаміді (0,10М) при 25°C перемішували з диетилкарбонатом (1,1 еквівалента, Aldrich) і трет-бутилатом калію (1,1 еквівалента, Aldrich) при 110°C протягом 6 годин. Далі реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою, 1X розсолем і висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією до одержання 3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідину, який направляли на наступну стадію:

3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідину (1,0 еквівалент, як описано вище) у метиленхлориді (0,10М) при 25°C перемішували з 1,1 еквівалента сірководню, 1,1 еквівалента метиліодиду і 1,1 еквівалента ацетату амонію. Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин і розбавляли етилацетатом (0,10М), промивали 2X водою, 1X розсолем і висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання амідину, який направляють на наступну стадію, що полягає в наступному

1,0 еквівалент амідину, синтезованого, як описано вище, захищали 1,1 еквівалента ВОС-ОМ-{2-(ВОС-оксиіміно)-2-фенілацетонітрилу; Aldrich) у метиленхлориді (0,10М) при 25°C і перемішували протягом 6 годин. Далі реакційну суміш розбавили етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою, 1X розсолем, висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли у вакуумі і неочищений продукт етерифіціювали в 0,10М метиленхлориді і 1,1 еквівалентах метансульфонілхлориду. Реакційну суміш перемішували 6 годин при 0°C і заливали водою (5 еквівалентів), потім розбавляли етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою, 1X розсолем, висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли під вакуумом і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-р-N-Вос-амідинофеніл-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідинону.

3) Зв'язування проміжних 2-N-пропілсульфоніл-аміно-3-(4-гідроксиФеніл)пропіонату з 3-р-N-Вос-амідинофеніл)-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідином для утворення захищеної форми Сполуки 17; 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-пропілсульфоніламіноетил)-феніоксилметил-2-оксазолідинону

Суміш 1,9 грамів 2-N-пропілсульфоніламіно-3-(4-гідроксиФеніл)пропіонату (як описано вище); 20мл диметилформаміду (DMF) і NaH (1,0 еквівалент) перемішували 30 хвилин при кімнатній тем-

пературі Після перемішування добавляли 1,8 грамів

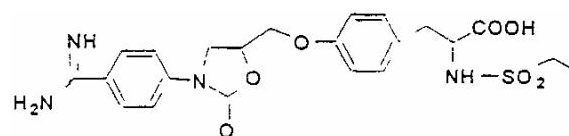
3-р-N-Вос-амідинофеніл-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідинону (як описано вище) у 10мл диметилформаміду (DMF) і перемішували ще 15 хвилин при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім розбавили етилацетатом (0,10М) і промивали 2X водою, 1X розсолем і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли у вакуумі і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання захищеної форми Сполуки 17, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-пропілсульфоніламіноетил)-феніоксилметил-2-оксазолідинону, який направляли на наступну стадію.

4) Зняття захисту зі Сполуки 17 для утворення Сполуки 17: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-пропілсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідинон, Фігура 14

Обробляли захищену форму Сполуки 17, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-пропіл-сульфоніламіноетил)феніоксил-метил-2-оксазолідинон (1,0 еквівалент, синтезований, як описано вище) 4мл 2N NaOH протягом 4 годин при кімнатній температурі. Потім до суміші добавляли по краплях 40мл 2N розчину HCl у діоксані при 0°C-25°C протягом 3 годин. Реакційну суміш потім заливали бікарбонатом натрію (5 еквівалентів) і розбавили етилацетатом (0,10М), промили 2X водою, 1X розсолем, висушили над сульфатом магнію. Розчинник відганяли під вакуумом і неочищений продукт був потім очищений хроматографією на колонці із силікагелем до одержання Сполуки 17: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-пропілсульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідинону: т. пл.. 200°C (d).

R. Сполука 18: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-сульфоніламіноетил)фенокси)метил-2-оксазолідинон, показаний на Фігурі 14

1) Синтез вихідної речовини 2-N-етилсульфоніл-аміно-3-(4-гідроксиФеніл)пропіонату для Сполуки 18



Сполука 18

Вихідна речовина 2-N-етилсульфоніламіно-3-(4-гідроксиФеніл)пропіонат одержували етерифікацією ((D або L) тирозину) (1,0 еквівалент Sigma) у 0,10М метанолі і розведений 1% HCl. Реакційну суміш перемішували при 25°C 12 годин і потім нейтралізували карбонатом натрію і розбавляли етилацетатом (0,10М), промивали 2X водою, 1X розсолем і висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли у вакуумі і неочищений продукт направляли на наступну стадію:

Суміш зазначеної сполуки (4,3ммоля), хлориду етилсульфонової кислоти (6,6моль, Aldrich) і триетиламіну (1,5 еквівалента) перемішували в метиленхлориді (20мл) протягом 12 годин при кімнатній температурі. Реакційну суміш потім випарювали і

залишок розчиняли в етилацетаті, промивали розведеною HCl, водняним розчином бікарбонату натрію і водою. Після випарювання досуха неочищений продукт очищали флеш-хроматографією/силікагель, толуол/етилацетат 15:1/ до одержання зазначеної сполуки.

2) Синтез вихідної речовини 3-р-N-Вос-амідинофеніл-5-метансульфонілокси-метил-2-оксазолідинону для Сполуки 18; 3-стадійна процедура, що полягає в наступному:

р-Амінобензонітрил (1,0 еквівалент; Aldnch) у метиленхлориді (0,10M) перемішували з 2,3-епоксипропанолом (1,0 еквівалент; Aldnch) протягом 12 годин при 25°C. Розчинник потім видаляли у вакуумі і неочищений 4-(2,3-дигідроксипропіламіно)бензонітрил направляли на наступну ступень, що полягає в наступному 4-(2,3-дигідрокси-пропіламіно)бензонітрил (1,0 еквівалент, як описано вище) у диметилформаміді (0,10M), при 25°C перемішували з диетилкарбонатом (1,1 еквівалента; Aldnch) і трет бутилатом калію (1,1 еквівалента, Aldnch) при 110°C протягом 6 годин. Далі реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) промивали 2X водою, IX розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідинону, який направляли на наступну стадію:

3-(4-ціанофеніл)-5-гідроксиметил-2-оксазолідинон (1,0 еквівалента, як описано вище) у метиленхлориді (0,10M) при 25°C перемішували з 1,1 еквівалента сірководню, 1,1 еквівалента метилюдіду і 1,1 еквівалента ацетату амонію. Реакційну суміш перемішували протягом 6 годин і потім розбавляли етилацетатом (0,10M), промивали 2X водою, 1X розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли у вакуумі і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання аміді ну, що направляли на наступну стадію.

1,0 еквівалент аміді ну, синтезованого, як описано вище, захищали 1,1 еквівалента ВОС-NO(2-(ВОС-оксиіміно)-2-фенілацетонітрил, Aldnch: у метиленхлориді (0,10M) при 25°C і перемішували протягом 6 годин. Потім реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, IX розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник відганяли у вакуумі і неочищений продукт етерифіціювали в 0,10M метиленхлориді і 1,1 еквіваленті метансульфонілхлориду. Реакційну суміш перемішували при 0°C протягом 6 годин і заливали водою (5 еквівалентів), потім розбавляли етилацетатом (0,10M) промивали 2X водою, IX розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли у вакуумі і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання 3-р-N-Вос-амідинофеніл-5-метансульфоніл-оксиметил-2-оксазолідинону.

3) Зв'язування проміжних 2-N-етилсульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонату з 3-р-(4-Вос-амідинофеніл)-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідином і утворення захищеної форми Сполуки 18, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-етил-

сульфоніламіноетил)феніюксилметил-2-оксазолідинону

Суміш 1,9 граму 2-N-етил-сульфоніламіно-3-(4-гідроксифеніл)пропіонат (як описане вище), 20мл диметилформаміду (DMF) і NaH (1,0 еквівалент) перемішували 30 хвилин при кімнатній температурі. Після перемішування додали 1,8 граму 3-р-N-ВОС-амідинофеніл-5-метансульфонілоксиметил-2-оксазолідинону (описаного вище) у 10мл диметилформаміду (DMF) і перемішували ще 15 хвилин при кімнатній температурі. Реакційну суміш розбавляли етилацетатом (0,10M) і промивали 2X водою, IX розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник видаляли у вакуумі і неочищений продукт очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання захищеної форми Сполуки 18, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-етилсульфоніламіноетил)-феніюксилметил-2-оксазолідинону що направляли на наступну стадію.

4) Зняття захисту з захищеної форми Сполуки 18 і утворення Сполуки 18: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-етилсульфоніламіноетил)-фенокси)-метил-2-оксазолідинону Фігура 14

Обробляли захищену форму Сполуки 18, 3-(4-Вос-амідинофеніл)-5-(4-(2-метоксикарбоніл-2-N-етил-сульфоніламіноетил)феніюксил-метил-2-оксазолідинону (1,0 еквівалент, синтезований, як описано вище) 4мл 2N NaOH протягом 4 годин при кімнатній температурі. До суміші потім додавали по краплях 40мл розчину 2N HCl у діоксані при 0°C-25°C протягом 3 годин. Реакційну суміш потім заливали бікарбонатом натрію (5 еквівалентів) і розбавляли етилацетатом (0,10M), промивали 2X водою, 1X розсоллом, висушували над сульфатом магнію. Розчинник потім відганяли під вакуумом і неочищений продукт потім очищали хроматографією на колонці із силікагелем до одержання Сполуки 18: 3-(4-амідинофеніл)-5-(4-(2-карбокси-2-N-етилсульфонтаміо-етил)фенокси)метил-2-оксазолідинону, т. пл. 212°C(d).

Вважається, що вищенаведені описані рекомендації є суттєвими, щоб дати можливість будь-якому фахівцю в даній області відтворити цей винахід. Дійсно, різні модифікації винаходу додатково до того, що тут показано й описано, будуть з зарахуванням описаного очевидними для фахівців у даній області і підпадають під обсяг винаходу відповідно до заявлених пунктів, що додаються.

Список послідовностей

(1) Загальна інформація

(i) Заявник: The Scripps Research Institute

(ii) Назва винаходу: Способи і композиції; корисні для інгібування ангіогенезу; що розвивується при участі $\alpha_v\beta_5$

(iii) Кількість послідовностей: 9

(iv) Форма, що читається комп'ютером

(A) Тип носія: гнучкий диск

(B) Комп'ютер: PC сумісний із IBM

(C) Операційна система: PC-DOS/MS-DOS

(D) Програме забезпечення: Patentin Release

#

1.0, Version #1. 25

(v) Дані цієї заявки:

(A) Номер заявки: PCT/US96/

- (B) Дата подачі: 13 серпня 1996
 (C) Класифікація:
 (vi) Дані попередньої заявки:
 (A) Номер заявки: US 08/514, 799
 (B) Дата подачі: 14 серпня 1995
 (2) Інформація для SEQ ID No:1:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 5 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: лінійна
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = BOC
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 4
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Phe
 (зауваження = приставка «D» у D-Phe означає,
 що фенілаланін у положенні 4 є D-амінокислотою)
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 5
 (D) Інша інформація: /позначення - Ome
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID No:1
 Arg - Gly - Asp - Phe - Val
 1 5
 (2) Інформація для SEQ ID No: 2
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 5 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: лінійна
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = BOC
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 4
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Phe
 (зауваження = приставка «D» у D-Phe означає,
 що фенілаланін у положенні 4 є D-амінокислотою)
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 5
 (D) Інша інформація: /позначення = OH
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID No: 2:
 Arg - Gly - Asp - Phe - Val
 1 5
 (2) Інформація для SEQ ID No:3:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 5 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: лінійна
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (iv) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = H
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид

- (B) Місце розташування: 4
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Phe
 (зауваження = приставка «D» у D-Phe означає,
 що фенілаланін у положенні 4 є D-амінокислотою)
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 5
 (D) Інша інформація: /позначення = OH
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID No: 3:
 Arg - Gly - Asp - Phe - Val
 1 5
 (2) Інформація для SEQ ID No: 4:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 5 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: кільцева
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = цикло
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 4
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Phe
 (зауваження = приставка «D» у D-Phe означає,
 що фенілаланін у положенні 4 є D-амінокислотою)
 (xi) Опис послідовності: SEQ ID No: 4:
 Arg - Gly - Asp - Phe - Val
 1 5
 (2) Інформація для SEQ ID No: 5:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 5 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: кільцева
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = цикло
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 4
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Phe
 (зауваження = приставки «D» у D-Phe означає,
 що фенілаланін у положенні 4 є D-амінокислотою)
 (xi) Опис послідовності SEQ ID No: 5:
 Arg - Ala - Asp - Phe - Val
 1 5
 (2) Інформація для SEQ ID No:6:
 (i) Характеристики послідовності:
 (A) Довжина: 6 амінокислот
 (B) Тип: амінокислота
 (D) Топологія: кільцева
 (ii) Тип молекули: пептид
 (v) Тип фрагменту: внутрішній
 (vi) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 1
 (D) Інша інформація: /позначення = цикло
 (ix) Характеристика:
 (A) Найменування/Ключ: Пептид
 (B) Місце розташування: 2
 (D) Інша інформація: /позначення = D-Arg

67

84665

68

(зауваження = приставка «D» у D-Arg означає, що фенілаланін у положенні 2 є D-амінокислотою)

(xi) Опис послідовності: SEQ ID No:6:

Arg - Gly - Asp - Phe - Val
1 5

(2) Інформація для SEQ i No:7:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 5 амінокислот

(B) Тип: амінокислота

(D) Топологія: кільцева

(ii) Тип молекули: пептид

(v) Тип фрагменту: внутрішній

(ix) Характеристика

(A) Найменування/Ключ: Пептид

(B) Місце розташування: 1

(i) інша інформація/позначення = цикло

(ix) Характеристика:

(A) Найменування/Ключ: Пептид

(B) Місце розташування: 5

(D) Інша інформація: ,позначення = D-Val

(зауваження = приставка «D» у D-Val означає,

що валін у положенні 5 є D-амінокислотою)

(xi) Опис послідовності: SEQ ID No: 7:

Arg - Gly - Asp - Phe - Val
1 5

(2) Інформація для SEQ ID No:8:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 15 амінокислот

(B) Тип: амінокислота

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(xi) Опис послідовності:

Tyr Thr Ala Glu Gys Lys Pro Gln Val Thr Afg Gly Asp Val Phe

1 5 10 15

(2) Інформація для SEQ ID No: 9:

(i) Характеристики послідовності:

(A) Довжина: 6 амінокислот

(B) Тип: амінокислота

(D) Топологія: лінійна

(ii) Тип молекули: пептид

(v) Тип фрагменту: внутрішній

(ix) Характеристика:

(A) Найменування/Ключ: Пептид

(B) Місце розташування: 4

(D) Інша інформація ,позначення = D-Phe

(зауваження = приставка «D» у D-Phe означає, що фенілаланін у положенні є D-амінокислотою)

(ix) Характеристика:

(A) Найменування/Ключ: Пептид

(B) Місце розташування: 6

(D) Інша інформація: ,позначення = MeVal

(зауваження = префікс «Me» у MeVal означає, що валін у положенні 6 є метильованим валіном)

(xi) Опис послідовності: SEQ-ID No: 9:

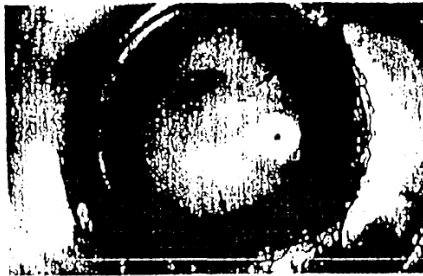
Arg - Gly - Asp - Phe - Asn - Val
1 5

Фіг. 1A

OD: анти- $\alpha_v\beta_5$

(P1F6)

FGF



VEGF



Фіг. 1C

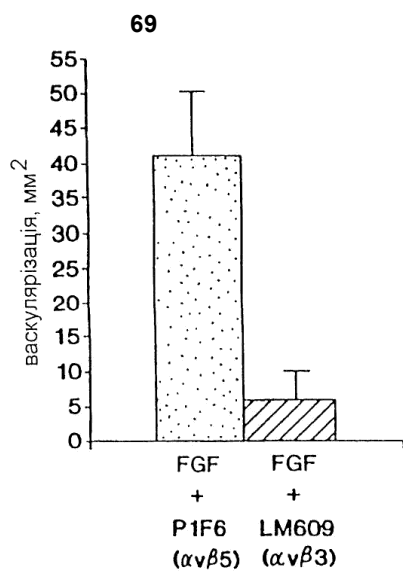
Фіг. 1B

OS: анти- $\alpha_v\beta_5$

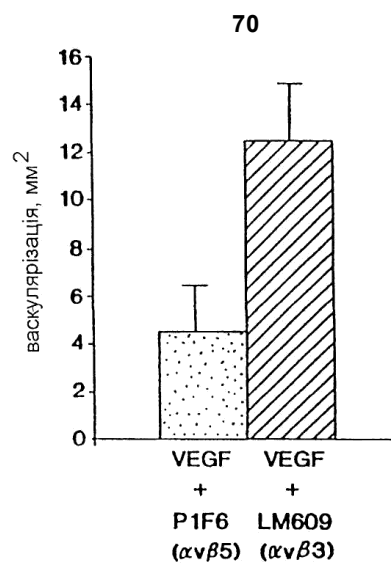
(LM609)



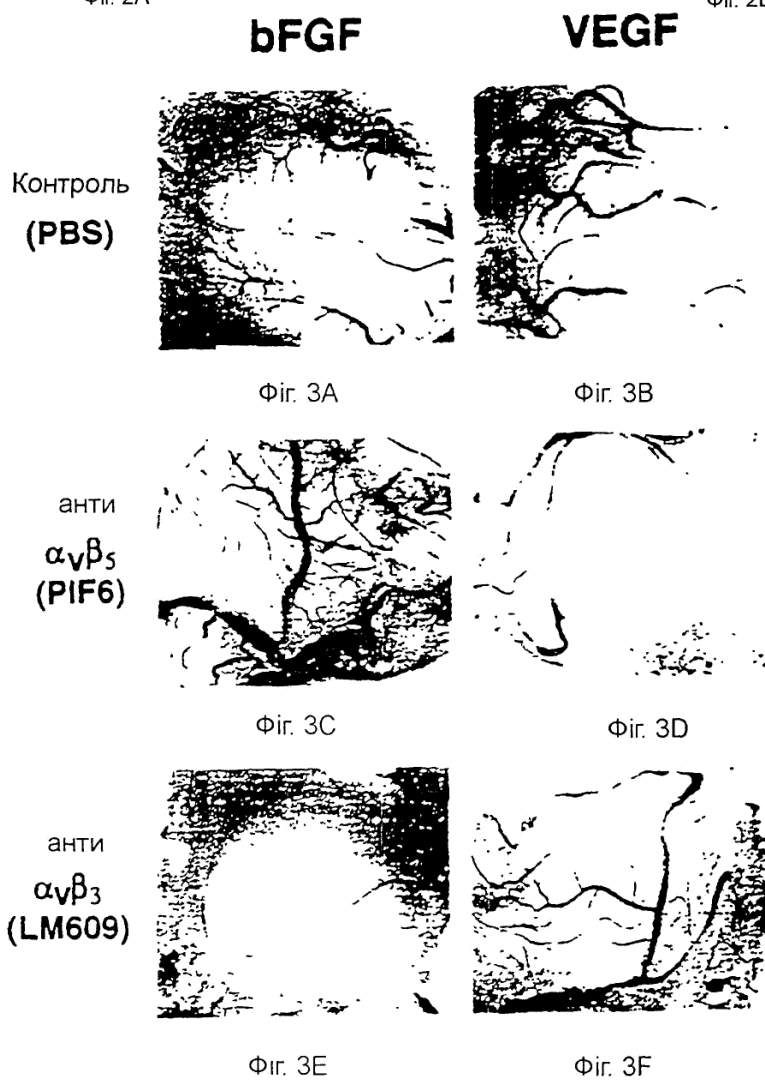
Фіг. 1D

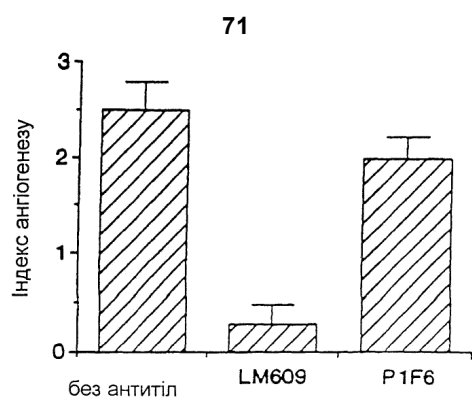


Фіг. 2A

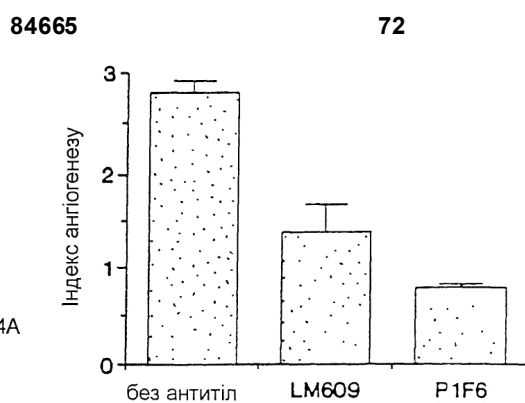


Фіг. 2B





Фіг. 4А



Фіг. 4В

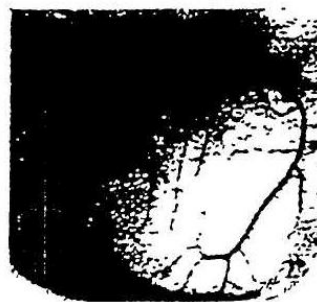
bFGF

VEGF

Без пептиду



Фіг 5А



Фіг 5В

Циклічний пептид
(RGDfV)

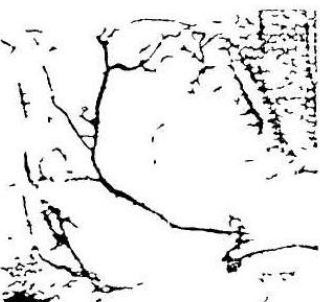


Фіг 5С



Фіг 5D

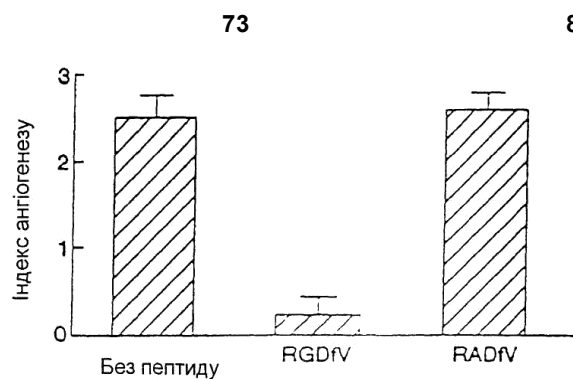
Циклічний пептид
(RADfV)



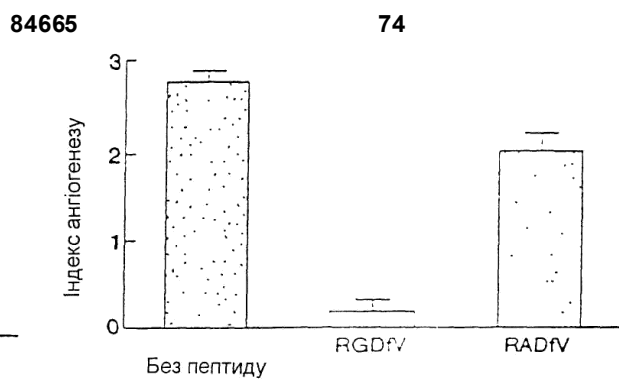
Фіг 5Е



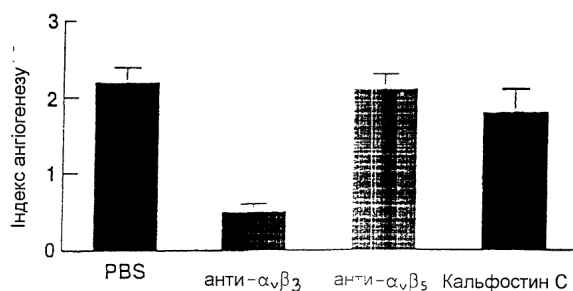
Фіг 5F



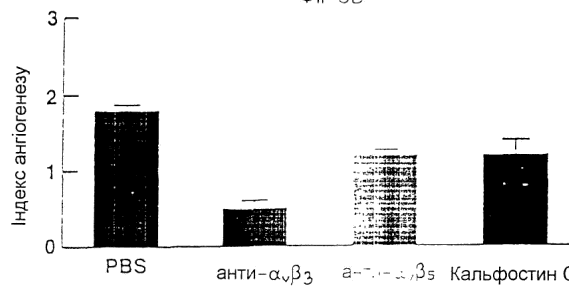
Фіг 6A



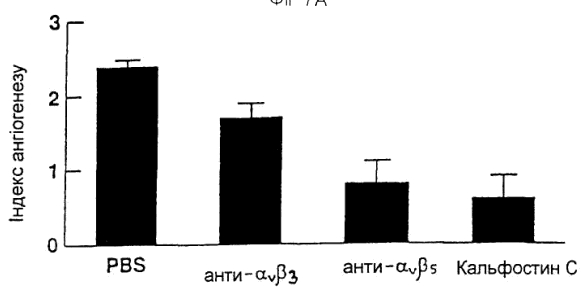
Фіг 6B



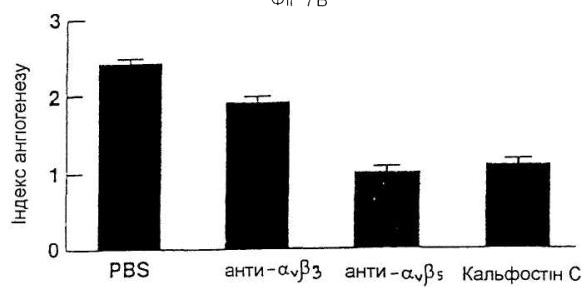
Фіг 7A



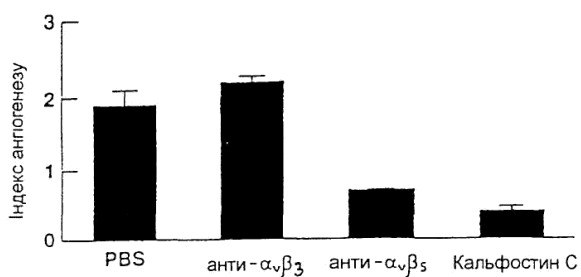
Фіг 7B



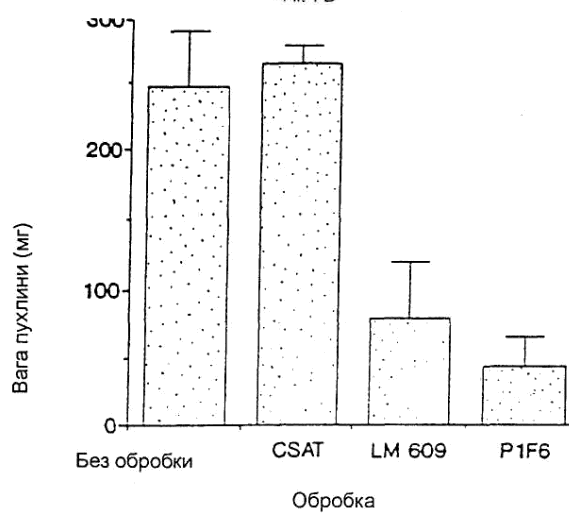
Фіг 7C



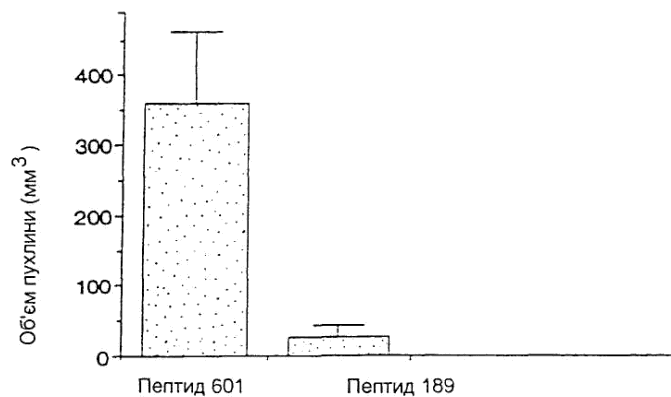
Фіг 7D



Фіг 7E



Фіг. 8



Фіг. 9

