



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 44729

(13) C2

(51) 6 A61K39/395

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ В ТКАНИНІ, СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ В ТВЕРДІЙ ПУХЛИНІ, СПОСІБ ІНДУКЦІЇ РЕГРЕСІЇ ТВЕРДОЇ ПУХЛИННОЇ ТКАНИНИ, СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ РОСТУ ТВЕРДОЇ ПУХЛИННОЇ ТКАНИНИ, СПОСІБ ЗМЕНШЕННЯ КРОВОПОСТАЧАННЯ ТКАНИНИ, СПОСІБ ІНГІБУВАННЯ АНГІОГЕНЕЗУ У ЗАПАЛЕНІЙ, АНГІОГЕННІЙ ТКАНИНІ, СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ПАЦІЄНТІВ (ВАРІАНТИ)

1

(21) 96093689
(22) 09 03 1995
(24) 15 03 2002
(86) PCT/US95/03035, 09 03 1995
(31) 08/210,715
(32) 18 03 1994
(33) US
(31) 08/366,665
(32) 30 12 1994
(33) US
(46) 15 03 2002, Бюл. № 3, 2002 р
(72) Брукс Пітер, US, Череш Девід А, US
(73) СКРІППС РІСЕРЧ ІНСТІТУТ, US
(56) Folkman M. Et al Cancer Biology, 1992, 3 89 – 96
WO 89/06536 A1, 27 07 1989
(57) 1 Спосіб інгібування ангиогенезу в ткани, включающий введение в указанную ткань композиции, содержащей ангиогенез-ингибирующее количество антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$
2 Спосіб інгібування ангиогенезу в твердой опухоли пациента, включающий - введение указанному пациенту композиции, содержащей ангиогенез-ингибирующее количество антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$
3 Спосіб індукції регресії твердої опухолі ткани у пацієнта, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ангиогенез-ингибирующего количества антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$, достаточного для ингибирования неоваскуляризации твердой опухолевой ткани
4 Спосіб інгібування росту твердої опухолі ткани у пацієнта, піддаючійся неоваскуляризації, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество ангиогенез-ингибирующего количества антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$, достаточного для ингибирования роста твердой опухолевой ткани
5 Спосіб зменшення кровоснабження ткани, необхідного для підтримання новообразования

2

указанной ткани у пациента, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей терапевтически-эффективное количество ангиогенез-ингибирующего количества антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$, достаточного для уменьшения кровоснабжения указанной ткани
6 Спосіб інгібування ангиогенезу в воспаленной, ангиогенной ткани пациента, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей ангиогенез-ингибирующее количество антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$
7 Спосіб лікування пацієнта, у якого спостерігається неоваскуляризація ретинальної ткани, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей терапевтически-эффективное количество ангиогенез-ингибирующего количества антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$
8 Спосіб лікування пацієнта від рестенозу в тканих, когда наблюдается миграция клеток гладкой мышцы после ангиопластики, включающий введение указанному пациенту композиции, содержащей терапевтически эффективное количество антагониста интегрина $\alpha_v\beta_3$
9 Спосіб по любому из пп 1-8, отличающийся тем, что указанный антагонист интегрина $\alpha_v\beta_3$ ингибирует связывание фибриногена с интегрином $\alpha_v\beta_3$, но не существенно ингибирует связывание фибриногена с интегрином $\alpha_{IIIb}\beta_3$
10 Спосіб по любому из пп 1-8, отличающийся тем, что указанный антагонист интегрина $\alpha_v\beta_3$ представляет собой анти- $\alpha_v\beta_3$ моноклональное антитело
11 Спосіб по п 10, отличающийся тем, что анти- $\alpha_v\beta_3$ моноклональное антитело специфически связывает комплекс интегрин $\alpha_v\beta_3$
12 Спосіб по п 10, отличающийся тем, что указанное антитело обладает иммунореактивными характеристиками моноклонального антитела LM609 с ATCC каталожным номером HB 9537

(13) C2

(11) 44729

(19) UA

- 13 Способ по п 10, **отличающийся** тем, что антитело является гуманизированным
- 14 Способ по п 13, **отличающийся** тем, что гуманизированное антитело обладает иммунореактивными характеристиками моноклонального антитела LM609 имеющего ATCC каталожный номер HB 9537
- 15 Способ по любому из пп 1-8, **отличающийся** тем, что указанный антагонист интегрина $\alpha_v\beta_3$ представляет собой RGD-содержащий полипептид
- 16 Способ по п 15, **отличающийся** тем, что указанный полипептид выбирают из группы, состоящей из c-(GrGDFV) (SEQ ID № 4), c-(RGfV) (SEQ ID № 5), c-(RGDFV) (SEQ ID № 7) и YTAECKPQVTRGDVE (SEQ ID № 8) и их солей
- 17 Способ по п 16, **отличающийся** тем, что указанная соль представляет собой гидрохлорид или трифторацетат
- 18 Способ по п 15, **отличающийся** тем, что указанный антагонист интегрина $\alpha_v\beta_3$ представляет собой циклический полипептид
- 19 Способ по любому из пп 2-8, **отличающийся** тем, что пациентом является человек
- 20 Способ по любому из пп 1-7, **отличающийся** тем, что указанное ангиогенез-ингибирующее количество составляет от около 0,1 мг/кг до около 300 мг/кг
- 21 Способ по п 8, **отличающийся** тем, что указанное терапевтически эффективное количество составляет от около 0,1 мг/кг до около 300 мг/кг
- 22 Способ по любому из пп 1-8, **отличающийся** тем, что указанное введение включает внутривенное, внутрисуставное, трансдермальное, внутримышечное или пероральное введение
- 23 Способ по любому из пп 1-8, **отличающийся** тем, что указанное введение включает перистальтическое введение
- 24 Способ по любому из пп 1-8, **отличающийся** тем, что указанное введение включает ежедневное введение одной или более доз в течение одного или нескольких дней
- 25 Способ по любому из пп 1-8, **отличающийся** тем, что указанное введение заключается во внутривенном введении однократной дозы

- 26 Способ по любому из пп 2-4, **отличающийся** тем, что указанное введение осуществляют совместно с химиотерапией
- 27 Способ по любому из пп 2-4, **отличающийся** тем, что опухоль является метастазированной
- 28 Способ по любому из пп 2-4, **отличающийся** тем, что указанная твердая опухоль ткани представляет собой карциному
- 29 Способ по любому из пп 2-4, **отличающийся** тем, что указанная твердая опухоль ткани представляет собой опухоль легкого, поджелудочной железы, молочной железы, толстой кишки, гортани или яичника
- 30 Способ по любому из пп 1, 5-6, **отличающийся** тем, что указанная ткань является артритной тканью
- 31 Способ по п 30, **отличающийся** тем, что указанная артритная ткань присутствует у млекопитающего с ревматоидным артритом
- 32 Способ по любому из пп 1, 5-7, **отличающийся** тем, что указанная ткань представляет собой ретиальную ткань пациента с диабетической ретинопатией, а указанный ангиогенез представляет собой ретиальный ангиогенез
- 33 Способ по любому из пп 1, 5-7, **отличающийся** тем, что ткань представляет собой ретиальную ткань, а ангиогенез представляет собой ретиальный ангиогенез
- 34 Способ по п 33, **отличающийся** тем, что указанная ретиальная ткань принадлежит пациенту с диабетической ретинопатией или макулярной дегенерацией
- 35 Способ по п 1 или 8, **отличающийся** тем, что указанное введение проводят после ангиопластики
- 36 Способ по п 35, **отличающийся** тем, что указанная ангиопластика представляет собой коронарную ангиопластику
- 37 Способ по п 1 или 8, **отличающийся** тем, что указанное введение осуществляют у пациента с риском рестеноза после ангиопластики

Настоящее изобретение относится, главным образом, к области медицины и конкретно, к способам и композициям, предназначенным для ингибирования ангиогенеза тканей с использованием антагонистов витронектинового рецептора $\alpha_v\beta_3$

Интегрины представляют собой класс клеточных рецепторов, которые, как известно, связывают внеклеточные матричные белки и, в связи с этим, регулируют взаимодействия клетка-клетка и клетка-внеклеточная матрица, которые обычно обозначаются, как события адгезии клеток. Однако, хотя многие интегрины и лиганды, связывающие интегрин, описаны в литературе биологическая функция многих интегринов остается неопреде-

ленной. Интегриновые рецепторы составляют семейство белков с разделенными структурными характеристиками нековалентных гетеродимерных гликопротеиновых комплексов, образованных из α и β субъединиц

Витронектиновый рецептор, названный за его первоначальную характеристику преимущественного связывания с витронектином, как известно в настоящее время, имеет отношение к трем различным интегринам, обозначенным, как $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$. См Horton Int J Exp Pathol, 71 741-758 (1990). $\alpha_v\beta_1$ связывает фибронектин, и витронектин. $\alpha_v\beta_3$ связывает большое число лигандов, включая фибрин, фибриноген, ламинин, тромбоспондин, витронектин, фактор Виллебранда, остео-

спонтин и костный сиалопротеин I $\alpha_v\beta_5$ связывает витронектин. Специфические роли в адгезии клеток эти три интегрин играют во многих клеточных взаимодействиях в тканях исследуемых в настоящее время, однако очевидно, что имеются различные интегрины с различными биологическими функциями.

Одним из важных сайтов узнавания в лиганде для многих интегринов является аргинин-глицин-аспаргиновая кислота /RGD/ трипептидная последовательность. RGD обнаружена во всех лигандах, идентифицированных выше для витронектиновых рецепторных интегринов. Такой RGD - распознающий сайт может быть mimicked с помощью полипептидов ("пептиды"), которые содержат RGD последовательность, и такие RGD-пептиды являются известными ингибиторами интегриновой функции. Однако, важно отметить, что в зависимости от последовательности и структуры RGD -пептида, специфичность ингибирования может изменяться в отношении мишень-специфичных интегринов.

Обсуждение RGD распознающего сайта можно найти в статье Pierschbacher с соавт., в журнале *Nature* 309 30-33/1984/ и Pierschbacher с соавт., в журнале *Proc Natl Acad Sci USA*, 81 5985-5988 /1984/. Различные RGD -полипептиды различной интегриновой специфичности были также описаны Grant с соавт., в *Cell*, 58 933-943 /1989/. Cheresh с соавт., *Cell*, 58 945-953 /1989/, Aumailley с соавт., *FEBS Lett* 291 50-54 /1991/ и Plaff с соавт. *J Biol Chem* 269 20233-20238 /1994/ а также в патентах США №№ 4 517 686, 4 578 079, 4 589 881, 4 614 517, 4 661 111, 4 792 525, 4 683 291, 4 879 237, 4 988 621, 5 041 380 и 5 061 883.

Ангиогенез представляет собой процесс васкуляризации ткани, включающий рост вновь развивающихся в ткани кровеносных сосудов, и называется также неоваскуляризацией. Этот процесс опосредован инфильтрацией эндотелиальных клеток и клеток гладкой мышцы. Предполагается, что такой процесс реализуется одним из трех путей: сосуды могут прорасти из уже существующих сосудов, может иметь место de novo развитие сосудов из клеток предшественников /васкулогенез/, либо существующие мелкие сосуды могут увеличиваться в диаметре. См. Blood с соавт. *Bioch Biophys Acta* 1032 89-118 /1990/. Как известно, сосудистые эндотелиальные клетки содержат, по крайней мере, пять RGD - зависимых интегринов, включая витронектиновый рецептор $\alpha_v\beta_3$ или $\alpha_v\beta_5$, рецепторы коллагенового типа 1 и IV $\alpha_1\beta_1$, ламининовый рецептор $\alpha_2\beta_1$, фибронектин /ламелин/ коллагеновый рецептор $\alpha_3\beta_1$ и фибронектиновый рецептор $\alpha_5\beta_1$. См. статью DAVIS с соавт., в *J Cell Biochem*, 52 206-218 /1993/. Известно, что клетка гладкой мышцы содержит, по крайней мере, шесть RGD -зависимых интегринов, включая $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$.

Ангиогенез является важным процессом неонатального роста, но он столь же важен в заживлении ран и в патогенезе большого числа клинических заболеваний, таких как воспаление тканей, артриты, рост опухолей, диабетическая ретинопатия, пятнистая дегенерация в результате неоваскуляризации сетчатки глаза и при родственных

состояниях. Такие клинические состояния связанные с ангиогенезом и на них ссылаются, как на ангиогенные заболевания. См. Folkman с соавт., *Science* 235 442-447 /1987/. Ангиогенез обычно отсутствует во взрослых или зрелых тканях, однако он обычно присутствует при лечении ран и в цикле роста *Corpus leuteum*. См., например Moses с соавт., *Science*, 248 1408-1410 /1990/.

Было предположено, что ингибирование ангиогенеза может служить полезной терапией ограничения роста опухолей. Ингибирование ангиогенеза может осуществляться

1/ ингибированием выделения таких "ангиогенных молекул", как β FGF /фактор роста фибробласта/,

2/ нейтрализацией ангиогенных молекул, например путем использования анти- β FGF антител, и

3/ ингибированием реакции эндотелиальной клетки на ангиогенную стимуляцию. Последнему варианту было уделено внимание и Folkman с соавт., (*Cancer BioLiqu*, 3 89-96, 1992) описал несколько ингибиторов эндотелиального клеточного ответа, включая коллагеназный ингибитор, базовый мембранный циклический ингибитор, ангиостатические стероиды, ингибиторы ангиогенеза грибкового происхождения, тромбоцитный фактор 4, тромбоспондин, такие артритные лекарства, как D -пеницилламин и тиомолат золота, аналоги витамина D₃, альфа-интерферон и многие другие препараты, которые могут использоваться для ингибирования ангиогенеза. Другие предложенные ингибиторы ангиогенеза описаны Blood с соавт., *Bioch Biophys Acta*, 1032 89-118 /1990/, Moses с соавт. *Science* 248 1408-1410 /1990/, Ingber с соавт. *Zab Invert*, 59 44 51 /1988/ и также в патентах США №№ 5 092 885, 5,112 946, 5 192 744, и 5 202 352. Ни один из ингибиторов ангиогенеза, описанный ранее, не обладал способностью ингибировать $\alpha_v\beta_3$ RGD - содержащие пептиды, ингибирующие витронектиновый рецептор $\alpha_v\beta_3$, также был описан Aumailley с соавт. *FEBS Lett* 291 50 54 /1991/, Choi с соавт. *J Vasc Surg*, 19 125-134 /1994/, Smith с соавт., *J Biol Chem*, 265 12267-12271 /1990/ и Pfaff с соавт. *J Biol Chem* 269 20233-20238 /1994/. Однако, до момента создания настоящего изобретения роль интегрин $\alpha_v\beta_3$ в развитии ангиогенеза не была предположена или установлена.

Ингибирование клеточной адгезии *in vitro* с использованием моноклональных антител, иммуноспецифичных для различных интегриновых субъединиц α или β вовлекает $\alpha_v\beta_3$ в адгезию клеток большого числа типов, включая микрососудистые эндотелиальные клетки. См. Davis с соавт., *J Cell Biol* 51 206-218 /1993/. Кроме этого, Nicosia с соавт. *Am J Pathol* 138 829-833 /1991/, описали использование RGD -пептида GBG-DS для *in vitro* ингибирования образования "микрососудов" крысиной аорты, культивируемой в коллагеновом геле. Однако, ингибирование образования "микрососудов" *in vitro* в коллагеновых гелевых культурах не является моделью ингибирования ангиогенеза в ткани, поскольку не показано, что микрососудистые структуры аналогичны капиллярным наростам, или что образование микрососудов в колла-

геновой гелевой культуре аналогично росту новых сосудов в интактной ткани, например в артритной ткани, опухолевой ткани или вольной ткани, где желательна ингибирование ангиогенеза

Поэтому, помимо сообщенных выше исследований, Заявители неожиданно обнаружили другую демонстрацию, того факта, что ангиогенез может ингибироваться в тканях с использованием ингибиторов клеточной адгезии. Главным образом, никогда ранее не было показано, что $\alpha_v\beta_3$ функция требуется для ангиогенеза в тканях, или что $\alpha_v\beta_3$ антагонисты могут ингибировать ангиогенез в тканях

В настоящем изобретении продемонстрирован тот факт, что ангиогенез в тканях требует наличия интегрина $\alpha_v\beta_3$ и что ингибиторы $\alpha_v\beta_3$ могут ингибировать ангиогенез. Обнаружение этого факта также демонстрирует то, что антагонисты других интегринов, например, $\alpha_v\beta_5$ или $\alpha_v\beta_1$ не ингибируют ангиогенез, возможно по причине их незначительности для развития ангиогенеза

В этой связи, в изобретении описываются способы ингибирования ангиогенеза в тканях, включающие применение на ткани композиции, включающей ангиогенез-ингибирующее количество $\alpha_v\beta_3$ - антагониста

Лечению может подвергаться любая ткань, для которой желательна ингибирование ангиогенеза, такая как "больная" ткань, где происходит неоваскуляризация. Примерами таких тканей могут служить воспаленная ткань, твердые опухоли, метастазы, ткани, подверженные ретинозу, и другие ткани

Используемый в настоящем изобретении $\alpha_v\beta_3$ -антагонист способен связывать $\alpha_v\beta_3$ и полностью ингибировать способность $\alpha_v\beta_3$ связываться с природным лигандом. Предпочтительно, чтобы такой антагонист обладал специфичностью в отношении $\alpha_v\beta_3$ по сравнению с другими интегринами. Согласно особенно предпочтительному воплощению $\alpha_v\beta_3$ -антагонист ингибирует связывание фибриногена или другого RGD - содержащего лиганда с $\alpha_v\beta_3$ но несущественно ингибирует связывание фибриногена с $\alpha_{11b}\beta_3$. Предпочтительным $\alpha_v\beta_3$ - антагонистом может служить полипептид, или моноклональное тело или их функциональный фрагмент, который иммунореагирует с $\alpha_v\beta_3$

На чертежах, составляющих часть настоящего описания показано следующее

На фиг 1А - 1Д проиллюстрировано распределение в ткани интегринах субъединиц β_3 и β_1 в случае нормальной кожи и кожи в процессе заживления ран, обозначенной, как гранулированная ткань. Иммуногистохимия с использованием антител к β_3 и β_1 осуществлялась, как описано в примере 3А. На фиг 1А и 1В, соответственно, проиллюстрирована иммунореактивность анти- β_3 в нормальной коже и в гранулированной ткани. На фиг 1С и 1Д, соответственно, проиллюстрирована иммунореактивность анти- β_1 в нормальной коже и в гранулированной ткани

На фиг 2А - 2Д соответственно показано тканевое распределение фактора фон Виллебранда и ламининовых лигандов, которые, соответственно, связывают интегринах субъединицы β_3 и β_1

в нормальной коже и в коже в процессе заживления ран, обозначенной, как гранулированная ткань. Иммуногистохимию с использованием антител на фактор фон Виллебранда /анти- vWF /и ламинин /анти-ламинин/ осуществляли, как описано в Примере 3В. На фиг 2А и 2В, соответственно, проиллюстрирована иммунореактивность анти-vWF в нормальной коже и в гранулированной ткани. Фиг 2С и 2Д, соответственно, показывают иммунореактивность анти-ламинина в нормальной коже и в гранулированной ткани

На фиг 3А - 3Д продемонстрировано распределение витронектинового интегрина рецептора, $\alpha_v\beta_3$ в биопсии ткани рака мочевого пузыря, рака толстой кишки, рака молочной железы и рака легких, соответственно. Иммуногистохимию с использованием LM609 антитела к $\alpha_v\beta_3$ проводили, как описано в примере 3С

На фиг 4 показана типичная микрофотография САМ настоящего изобретения лишенной кровеносных сосудов в необработанном 10-дневном курином эмбрионе. Препарат описан в Примере 5В

На фиг 5А - 5С проиллюстрировано распределение в ткани интегринов β_1 и $\alpha_v\beta_3$ в препарате САМ настоящего изобретения. На фиг 5А показано распределение β_1 субъединицы в необработанном 10-дневном препарате САМ, как детектировано с помощью иммунофлуоресцентной иммунореактивности с использованием CSAT, анти- β_1 антителом. На фиг 5В показано распределение $\alpha_v\beta_3$ рецептора в необработанном 10-дневном препарате САМ, как детектировано с помощью иммунофлуоресцентной иммунореактивности с LM609, анти- $\alpha_v\beta_3$ антителом. На фиг 5С показано распределение рецептора $\alpha_v\beta_3$ в обработанном β FGF 10-дневном препарате САМ, как детектировано с помощью иммунофлуоресцентной иммунореактивности с LM609, анти- $\alpha_v\beta_3$ антителом. Методы лечения и полученные результаты описаны в примере 5С

На фиг 6 проиллюстрировано количественное определение в столбце диаграммы относительной экспрессии $\alpha_v\beta_3$ и β_1 в необработанных и обработанных β FGF 10-дневных препаратах САМ, в соответствии с описанным в Примере 6А. Среднее значение интенсивности флуоресценции отложено по оси -Y, а интегринах профили отложены по оси X

На фиг 7А - 7С проиллюстрирован внешний вид необработанного 10-дневного САМ, образца САМ, обработанного β FGF, и образца САМ, обработанного TNF α , соответственно, методики и результаты описаны в примере 6А

Фиг 8А - 8Е иллюстрируют влияние актуальной обработки антителом на FGF-индуцированный ангиогенез на 10 день САМ, как это описано в Примере 7А1/. На фиг 8А показан необработанный САМ препарат, лишенный кровеносных сосудов. На фиг 8В продемонстрирована инфильтрация новой сосудистой сети в область, предварительно лишенную сосудистой системы, индуцированную β FGF обработкой. Фиг 8С, 8Д и 8Е, соответственно, демонстрируют эффекты антител против β_1 /антитело- β_1 , CSAT/ $\alpha_v\beta_5$ /анти- $\alpha_v\beta_5$ Р3С2/ и $\alpha_v\beta_3$ /анти- $\alpha_v\beta_3$, LM609/

На фиг 9А - 9С проиллюстрировано влияние внутривенной инъекции синтетического пептида 66203 на ангиогенез, индуцированный опухолью, как описано в примере 7Д2. На фиг 9А показано отсутствие ингибиторного эффекта внутривенной обработки контрольным пептидом /контрольная пептидная опухоль/ на ангиогенез вызванный индукцией опухоли. Ингибирование такого ангиогенеза путем внутривенной инъекции пептида 66203 /циклическая RGD опухоль/ представлено на фиг 9В. Отсутствие ингибирующего эффекта или цитотоксичности на зрелые пресуществующие сосуды после внутривенного вливания пептида 66203 в область, примыкающую к опухоли-обработанной области показано на фиг 9С /циклический RGD соседствующий с CAM/.

На фиг 10А - 10С проиллюстрирован эффект внутривенного применения моноклональных антител на ангиогенез, индуцируемый фактором роста, как это описано в примере 7В1. /Фиг 10А демонстрирует индуцированный с помощью β FGF ангиогенез без обработки антителом /контрольный эксперимент/. Ингибирование ангиогенеза не имеет место когда аналогичный препарат был обработан анти- $\alpha_v\beta_3$, антителом P3G2, как это показано на фигуре 10В.

Ингибирование ангиогенеза реализуется при обработке анти- $\alpha_v\beta_3$, антителом LM609, как это показано на фиг 10С.

Фиг 11А - 11С иллюстрируют эффект на эмбрионный ангиогенез после местного применения анти-интегриновых антител, как описано в примере 7С. Ангиогенез не ингибируется в результате обработки 6-дневного CAM анти- β_1 , и анти- $\alpha_v\beta_5$ антителами, соответственно, что показано на фиг 11А и 11В. Напротив, обработка анти- $\alpha_v\beta_3$ антителом LM609 приводит к ингибированию образования кровеносных сосудов, как это показано на фиг 11С.

На фиг 12 произведено количественное определение числа сосудов, входящих в опухоль в препарате CAM, как это описано в примере 7Д1. На этом графике число сосудов нанесено на ось Y, как результат местного применения или CSAT /анти- β_1 /, LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ или P3G2/, анти- $\alpha_v\beta_3$ /.

Фиг 13А - 13Д иллюстрируют сравнение между весами мокрых опухолей через 7 дней после обработки и первоначальными весами, как описано в примере 9А1/а. Каждая полоса представляет среднее \pm SE 5-10 опухолей на группу. Используемые опухоли были производными человеческой меланомы /M21-L/ /Фиг 13А/, рака поджелудочной железы /Fq/ /Фиг 13В/, легочной карциномы /UCLAP-3/ /Фиг 13С/ и ларингеальной карциномы /Her3/ /Фигура 13Д/. CAM-препараты и внутривенно обработанные PBS, CSAT /анти- β_1 / или LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / Графики показывают вес опухоли, значение которого нанесено на ось Y в результате внутривенного применения или CSAT /анти- β_1 /, LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / или PBS как показано на оси X.

На фиг 14А и 14В показаны гистологические срезы опухолей, обработанных P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_5$ / /фигура 14А/ и LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / фигура 14В, и окрашенных гематоксилином и эозином, как это описано в примере 9А1/а. Как показано на фиг 14А

опухоли, обработанные контрольным антителом /P3G2/, демонстрировали большое число жизнеспособных и активно делящихся опухолевых клеток, о чем свидетельствовали митотические значения /показаны стрелками сверху/, а также множественные кровеносные сосуды /стрелки/ по всей строме опухоли. Напротив, очень небольшое количество, если оно вообще определялось, жизнеспособных опухолевых клеток или кровяных сосудов детектировалось в клетках, обработанных LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / как показано на фигуре 14В.

Фиг 15А - 15Е соответствуют M21L опухолям, обработанным пептидами как описано в Примере 9А1 /b, и они представляют собой следующее:

Фиг 15А, контрольный циклический RAD пептид /69601/, фиг 15В, циклический RGD пептид /66203/, фиг 15С, соседняя CAM ткань, взятая из того же эмбриона, обработанного циклическим RGD пептидом /66203/ и на фиг 15Д представлено сильное увеличение /13х/ опухолей, обработанных контрольным RAD /69601/, а на 15Е показано увеличение при обработке циклическим RGD пептидом /66203/. Фиг 15Д показывает нормальные сосуды из опухоли, обработанной RAD контрольным пептидом 69601/. На фиг 15Е приведены примеры разрушенных кровеносных сосудов из опухолей, обработанных циклическим RGD пептидом /66203/ /стрелки/.

На фиг 16 - 16Е показано ингибирование ангиогенеза под действием антагонистов ангиогенеза в модельном анализе *in vivo* на кроличьем глазу, в соответствии с описанным в примере 10. На фиг 16А и 16В изображен ангиогенез кроличьего глаза в присутствии BFGF и mAbPIF6 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / На фиг 16С, 16Д и 16Е показано ингибирование ангиогенеза кроличьего глаза в присутствии β FGF и mAbLM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ /.

На фиг 17 представлена диаграмма показывающая как можно создать *in vivo* модель человек-мышиную модель, что описано в примере 11А. Часть кожи мыши SC1Д заменили на человеческую неонатальную крайнюю плоть и давали системе залечиваться в течение 4 недель. После залечивания прививки человеческую крайнюю плоть инокулировали клетками человеческой опухоли. В течение следующих 4 недель проявлялась измеримая опухоль, которая состояла из человеческой опухоли с человеческой сосудистой системой, проходящей из человеческой плоти в человеческую опухоль.

На фиг 18 проиллюстрирован процент единичных клеток, полученных от CAM обработанной mAb и пептидом и окрашенных Apop Tag, как установлено FACS анализом и описано в примере 12А и 12В, соответственно. Черные и полосатые столбцы представляют собой клетки эмбрионов, обработанных за 24 и 48 часов до анализа, соответственно. Каждый столбец представляет среднее \pm SE трех измерений. CAM обрабатывали mAb LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / или CSAT /анти- β_1 / или PBS, как описано в Примере 12А2. CAM также обрабатывали циклическим пептидом 69203 /цикло-RGDfY, обозначаемым, как пептид 203/ или контрольным циклическим пептидом 69601 /цикло-RADfY, обозначаемым как пептид 601/, как это описано в примере 12В.

На фиг 19А и 19В проиллюстрированы объединенные результаты суспензий отдельных клеток САМ из эмбриона обработанного либо CSAT /анти-β₁/ /фиг 19А/ или LM609 /анти-α_vβ₃/ /фиг 19В/, окрашенных Арор Тао и йодистым пропидием и проанализированных методом FACS, как описано в Примере 12С. По оси Y отложены результаты окрашивания Арор Тао в числе клеток /Апоптоз/, по оси X отложены результаты соответствующие окрашиванию йодистым пропидием /содержание ДНК/. Горизонтальные линии представляют собой отрицательный вход для окрашивания Арор Тао. Левая и правая панели показывают на клетки САМ, из эмбрионов, обработанных CSAT /анти-β₁/ /фиг 19А/ и LM609 /анти-α_vβ₃/ /фиг 19В/. Осуществляли анализ клеточного цикла, определяя примерно 8 000 событий на состояние

Фиг 20А - 20С. Представляют собой изображения САМ ткани из CSAT /анти-β₁/ обработанных эмбрионов, а фигуры 20Д - 20Р отображают САМ ткани из LM609 /анти-α_vβ₃/ обработанных эмбрионов полученных как описано в примере 12С. Фиг 20А и 20Д демонстрируют ткани, окрашенные Арор Таа и визуализированные методом флуоресценции /FITC/ суперналоженным на DAPI изображением. На фиг 20В и 20Е показаны те же ткани, окрашенные mAb LM609 /анти-α_vβ₃/ и визуализированные с помощью флуоресценции /родамин/. На фиг 20С и 20F представлены изображения тех же тканей, окрашенных как Арор Таг, так и LM609, причем желтое окрашивание свидетельствует о сококализации. Полосы в левой и правой панели составляют 15 и 50мкм, соответственно.

А. Обозначения

Аминокислотные остатки. Аминокислота образуется в ходе химического переваривания /гидролиз/ полипептида по его пептидной связи. Описанные в тексте аминокислотные остатки предпочтительно находятся в "L" изомерной форме. Однако, остатки находящиеся в "D" изомерной форме могут быть заменены на любой L-аминокислотный остаток, если полипептид сохраняет желаемое функциональное свойство. NH₂ относится к свободной амино-группе на аминоконце полипептида. COOH относится к свободной карбокси-группе, присутствующей на С-конце полипептида. Придерживаясь стандартной полипептидной номенклатуры /описанной в J. Biol. Chem. 243:3552-59 /1968/ и принятой 37 CFP §1 822/ы/2/, сокращенные названия аминокислотных остатков представлены в следующей Таблице Соответствия.

Таблица соответствия

1-буквенный	Символ	Аминокислота
Y	Tyr	тирозин
G	Gly	глицин
F	Phe	фенилаланин
M	Met	метионин
A	Ala	аланин
S	Ser	серин
I	Ile	изолейцин

L	Leu	лейцин
T	Thr	треонин
V	Val	валин
P	Pro	пролин
K	Lys	лизин
H	His	гистидин
Q	Gln	глутамин
E	Glu	глутаминовая кислота
Z	Glx	Glu и/или Gln
W	Trp	триптофан
R	Arg	аргинин
D	Asp	аспаргиновая кислота
N	Asn	аспарагин
B	Asx	Asn и/или Asp
C	Cys	цистеин
X	Xaa	неизвестна/ другое

Кроме этого в тексте используются следующие другие сокращения:

BOC	трет-бутилоксикарбонил
DCCI	дициклогексилкарбодиимид
DMF	диметилформамид
OMe	метокси
HOBT	1-гидроксисбензотриазол

Следует отметить, что все аминокислотные последовательности представлены в тексте формулами, левая и правая ориентация которых представлены в традиционном направлении от аминоконца к карбокси-концу. Кроме этого следует также отметить, что штрих в начале или конце аминокислотной последовательности указывает на пептидную связь со следующей последовательностью одного или более аминокислотных остатков.

Полипептид относится к линейному ряду аминокислотных остатков, связанных друг с другом пептидными связями между алфа-амино группой и карбокси группой непрерывной аминокислотной последовательностью.

Пептид. Этот термин в контексте изобретения относится к линейным рядам не более примерно 50 аминокислотных остатков связанных друг с другом, как в полипептиде.

Циклический пептид является производным соответствующего линейного пептида, относится к пептиду, в котором не существуют N- или С-концы и в котором соответствующие линейные пептидные N-терминальные формы и амидная связь с С-терминальным карбоксилатом существуют, как часть указанного линейного пептида. Термин белок /протеин/ относится к линейным сериям из более, чем 50 аминокислотных остатков, связанных друг с другом, как в полипептиде.

Синтетический пептид относится к химически полученной цепи аминокислотных остатков, связанных друг с другом пептидными связями, которые не содержат встречающиеся в природе белки и их фрагменты.

В. Общие соображения

Настоящее изобретение относится главным

образом к тому открытию, что ангиогенез опосредован специфическим витронектиновым рецептором $\alpha_v\beta_3$ и что ингибирование $\alpha_v\beta_3$ функции ингибирует ангиогенез. Такое открытие является важным из-за роли, которую играет ангиогенез в большом числе заболеваний. В результате ингибирования ангиогенеза можно вмешиваться в ход заболевания, улучшать симптомы и, в ряде случаев, излечивать заболевание.

В том случае, когда рост новых кровеносных сосудов вызывается или вносит вклад в патологию, связанную с заболеванием, ингибирование ангиогенеза будет уменьшать вредные эффекты такого заболевания. Примеры таких заболеваний включают ревматоидный артрит, диабетическую ретинопатию, воспалительные заболевания, респираторные и т.п. В том случае, когда рост новых кровеносных сосудов требуется для поддержки роста вредной ткани, ингибирование ангиогенеза приведет к понижению подачи крови в ткань и тем самым, внесет вклад в уменьшение образовавшейся тканевой массы, основанной на условиях подачи крови. Примеры такого рода включают рост опухолей, в которых неоваскуляризация является постоянным требованием, с тем, чтобы размер опухоли достиг нескольких миллиметров в толщину и для образования твердых опухолевых метастазов.

Способы настоящего изобретения эффективны частично, поскольку такая терапия высоко селективна в отношении ангиогенеза, а не для других биологических процессов. Как показано в примерах, лишь рост новых сосудов содержит достаточное количество $\alpha_v\beta_3$ и поэтому терапевтические методы не оказывают вредного влияния на зрелые сосуды. Кроме этого, $\alpha_v\beta_3$ не является широко распространенным в нормальных тканях и в основном обнаруживается селективно на новых сосудах, что застраховывает тот факт, что такая терапия может селективно избирать мишенью рост новых сосудов.

Открытие того факта, что ингибирование лишь $\alpha_v\beta_3$ эффективно ингибирует ангиогенез, позволяет создавать терапевтические композиции с потенциально высокой специфичностью и поэтому с относительно низкой токсичностью. Таким образом, хотя настоящее изобретение раскрывает использование реагентов на базе пептидов, обладающих способностью ингибировать один или более интегринов, можно применять и другие реагенты, которые более селективно ингибируют $\alpha_v\beta_3$, и поэтому не оказывают побочных эффектов ингибирования других биологических процессов, кроме опосредуемых $\alpha_v\beta_3$.

Так, например, как показано в настоящем изобретении, существует возможность получения моноклональных антител, высоко селективных в отношении иммунной реакции с $\alpha_v\beta_3$, которые аналогичным образом, селективны в ингибировании $\alpha_v\beta_3$ функции. Кроме этого, RGD-содержащие пептиды могут применяться в качестве селективных агентов в ингибировании $\alpha_v\beta_3$, как будет описано ниже.

Перед открытием настоящего изобретения не было известно, что ангиогенез и любые процессы, зависящие от ангиогенеза, могут ингибироваться

in vivo с применением реагентов, являющихся антагонистами биологической функции $\alpha_v\beta_3$.

Способы ингибирования ангиогенеза

Настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования ангиогенеза в ткани и в результате ингибируются события в ткани, которые зависят от ангиогенеза. Обычно такой способ включает применение на ткани композиции, включающей ангиогенез-ингибирующее количество $\alpha_v\beta_3$ -антагониста.

Как указывалось ранее, ангиогенез ответствен за большое число процессов, включающих неоваскуляризацию ткани, включая "прорастание", васкулогенез или расширение сосудов, причем все такие ангиогенезные процессы опосредованы и зависят от экспрессии $\alpha_v\beta_3$. За исключением случаев заживления травматической раны, образования corpus leuitem и эмбриогенеза, полагают, что большая часть ангиогенезных процессов связана с заболеваниями и поэтому использование терапевтических методов настоящего изобретения является селективным для таких заболеваний и не дает вредных побочных эффектов.

Имеется большое число заболеваний, в которых предполагается, что важным их фактором является ангиогенез и в этом отношении можно сослаться на ангиогенные заболевания, не ограничиваясь только ими, такие как воспалительные расстройства, например иммунные и неиммунные воспаления, хронический артикулярный ревматизм и псориаз, нарушения связанные с неправильной и несвоевременной инвазией сосудов, такие как диабетическая ретинопатия, неоваскулярная глаукома, респираторные, капиллярная пролиферация в атеросклеротических бляшках и остеопороз, а также нарушения связанные с развитием рака, такие как твердые опухоли, метастазы твердых опухолей, ангиофибромы, ретролентальная фиброплазия, гемангиома, саркома Капоши и подобные раковые заболевания, которые требуют неоваскуляризации для поддержки роста опухоли.

Таким образом, способы ингибирующие ангиогенез в заболевших тканях облегчают симптомы заболевания и, в зависимости от типа заболевания, могут способствовать излечению заболевания. Согласно одному из воплощений, настоящее изобретение охватывает ингибирование ангиогенеза, per se, в тканях. Степень ангиогенеза в ткани и поэтому степень ингибирования достигаемая настоящими методами, может быть оценена большим числом способов, например, теми, что описаны в Примерах детекции $\alpha_v\beta_3$ -иммуноположительной зрелости и структуры зародившихся сосудов с помощью иммуногистохимии.

Следует иметь в виду, что большое число тканей или органов, состоящих из организованной ткани, могут поддерживать ангиогенез в болезненном состоянии, причем к таким тканям и органам могут относиться кожа, мышцы, кишки, соединительная ткань, суставы, кости и т.д., то есть те случаи, когда кровеносные сосуды способны вторгаться в систему в результате ангиогенного стимулирования.

Таким образом, в одном из случаев ткань, подвергаемая лечению, представляет собой воспаленную ткань и ангиогенез, подвергаемый инги-

бириванию, представляет собой ангиогенез воспаленной ткани, когда реализуется неоваскуляризация воспаленной ткани. В случае таких нарушений способ изобретения предусматривает ингибирование ангиогенеза в артритных тканях, как это имеет место у пациентов с хроническим артериальным ревматизмом, в иммунных или неиммунных воспаленных тканях, в псориазных тканях и т.п.

Пациент, подвергаемый лечению с помощью метода настоящего изобретения, согласно большинству решений, желательно представляет собой человека, хотя следует иметь в виду, что принципы изобретения показывают, что оно эффективно в отношении всех млекопитающих, которые подпадают под термин "пациент". В этом контексте под млекопитающим понимается любая его разновидность для которого желательно лечение заболевания, связанного с ангиогенезом, особенно это относится к разновидностям сельскохозяйственных и домашних млекопитающих.

Согласно другому родственному решению, ткань подлежащая лечению представляет собой ткань сетчатки пациента больного диабетической ретинопатией, пятнистой дегенерацией или неоваскулярной патологией и ангиогенез, подлежащий ингибированию, представляет ангиогенез ткани сетчатки, когда реализуется неоваскуляризация ткани сетчатки.

Согласно другому воплощению, ткань, подлежащая лечению, представляет опухолевую ткань пациента с твердой опухолью, метастазами, раком кожи, раком молочной железы, большим гемангиомой или ангиофибромой и другими видами рака, и ангиогенез, подлежащий ингибированию представляет собой ангиогенез опухолевой ткани, в которой реализуется неоваскуляризация опухолевой ткани. Типичными твердыми опухолевыми тканями, обрабатываемыми методами изобретения, могут быть ткани легких, поджелудочной железы, молочной железы, толстой кишки, гортани, яичников и аналогичные ткани. Примеры ангиогенеза опухолевых тканей и его ингибирование описано в Примерах.

Ингибирование ангиогенеза опухолевой ткани является особенно предпочтительным воплощением изобретения в связи с важной ролью неоваскуляризации в росте опухоли. В отсутствие неоваскуляризации опухолевой ткани, такая ткань не получает требуемых питательных веществ, снижается ее рост, прекращается дополнительный рост, она регрессирует и в конечном счете становится некротической тканью, приводя к гибели опухоли.

Говоря другими словами, настоящее изобретение обеспечивает способ ингибирования опухолевой неоваскуляризации путем ингибирования ангиогенеза опухоли, в соответствии с методом настоящего изобретения. Аналогичным образом, изобретение обеспечивает способ ингибирования роста опухоли в результате практической реализации методов ингибирования ангиогенеза.

Способы изобретения особенно эффективны при их применении против развития метастазов поскольку /1/ их образование требует васкуляризации первичной опухоли так, что метастазные

клетки рака могли бы входить в первичную опухоль и

/2/ их образование на второй стадии требует неоваскуляризации для поддержки роста метастазов.

Согласно родственному воплощению, настоящее изобретение охватывает практическую реализацию способа, связанного с другими терапиями, например, с традиционной химиотерапией, направленной против твердых опухолей, и для контроля образования метастазов. Применение ингибитора ангиогенеза обычно проводится в ходе или после химиотерапии, хотя иногда предпочтительно ингибировать ангиогенез после режима химиотерапии, когда опухолевая ткань будет ответственна за токсичный "шторм" индукцией ангиогенеза для регенерации при условии подачи к опухолевой ткани крови и питательных веществ. Кроме этого, предпочтительно применять методы ингибирования ангиогенеза после хирургических операций, в которых твердые опухоли были удалены в качестве профилактики метастазов.

Несмотря на то, что настоящие способы направлены на ингибирование опухолевой неоваскуляризации такие методы могут также применяться для ингибирования роста опухолевой ткани, ингибирования образования опухолевых метастазов и регрессии образовавшихся опухолей. Представленные примеры демонстрируют регрессию образовавшихся опухолей после единичного внутривенного применения $\alpha_v\beta_3$ антагониста настоящего изобретения.

Рестеноз представляет собой процесс миграции и пролиферации клеток гладкой мышцы (SMC) в место подкожной транслюминальной коронарной ангиопластики, что затрудняет успех ангиопластики. Миграция и пролиферация SMC в ходе рестеноза может рассматриваться, как процесс ангиогенеза, который ингибируется методами настоящего изобретения. Поэтому, настоящее изобретение также предусматривает ингибирование рестеноза путем ингибирования ангиогенеза, согласно методу изобретения, у пациента после применения методов ангиопластики. Для ингибирования рестеноза $\alpha_v\beta_3$ -антагонист обычно применяют после ангиопластики через 2-28 дней и, как правило, в течение 14 дней после операции.

Настоящий метод ингибирования ангиогенеза в тканях и поэтому также предназначенный для практической реализации методов лечения, связанных с ангиогенезом заболеваний, заключается в контактировании ткани с развившимся аутогенезом, или при риске его появления, с композицией, включающей терапевтически эффективное количество антагониста, способного ингибировать $\alpha_v\beta_3$ осуществляя связывание с его природным лигандом. Таким образом, такой способ заключается в применении на пациенте терапевтически эффективного количества физиологически переносимой композиции, содержащей $\alpha_v\beta_3$ -антагонист изобретения.

Дозированные интервалы для введения $\alpha_v\beta_3$ -антагониста зависят от формы антагониста, и его мощности, как это описано далее в тексте, и составляют достаточно большие количества для обеспечения желаемого эффекта, согласно кото-

рому ангиогенез и симптомы заболевания, опосредованные ангиогенезом, подвергаются улучшению. Дозировка не должна быть столь высокой, чтобы вызывать нежелательные побочные эффекты, например, синдромы гипервязкости, легочную эдему, сердечные нарушения, связанные с перегрузкой, и т.п. Обычно, дозировка будет меняться в зависимости от возраста, состояния больного, пола и степени заболевания пациента и она может быть определена специалистом. Такая дозировка также может регулироваться индивидуальным терапевтом в случае осложнений.

Терапевтически эффективное количество представляет собой такое количество $\alpha_v\beta_3$ -антагониста, которое достаточно для обеспечения измеримого ингибирования ангиогенеза в обрабатываемой ткани, например, ангиогенез-ингибирующее количество. Ингибирование ангиогенеза может быть измерено *in situ* методом иммуногистохимии, как описано в настоящем документе или другими методами, известными специалистам.

Поскольку $\alpha_v\beta_3$ антагонист может принимать вид мимикрирующего $\alpha_v\beta_3$, и RGD-содержащего пептида, анти- $\alpha_v\beta_3$ моноклонального антитела или его фрагмента, следует убедиться что мощность и поэтому экспрессия "терапевтически эффективного" количества могут изменяться. Однако, как показано методами анализа изобретения, специалист в данной области может легко оценить мощность $\alpha_v\beta_3$ -антагониста /кандидата настоящего изобретения.

Мощность $\alpha_v\beta_3$ -антагониста может быть измерена множеством способов, включая ингибирование ангиогенеза в анализе CAM, *in vivo* анализе на глазах кролика, в *in vivo* анализе с использованием химерного мышь-человека и путем измерения ингибирования связывания природного лиганда с $\alpha_v\beta_3$, причем все эти анализы описаны в тексте или с помощью аналогичных анализов.

Предпочтительный $\alpha_v\beta_3$ антагонист обладает способностью существенно ингибировать связывание такого природного лиганда, как фибриноген или витронектин, с $\alpha_v\beta_3$ в растворе при концентрациях антагониста менее 0,5 микромоля /мкМ/, предпочтительно, менее 0,1 мкМ и более предпочтительно менее 0,05 мкМ. Под термином "существенно" подразумевается, что, по крайней мере, 50% снижение связывания фибриногена наблюдается в результате ингибирования в присутствии антагониста и на 50% ингибирование ссылаются, как на значение IC_{50} .

Более предпочтительный $\alpha_v\beta_3$ -антагонист проявляет селективность в отношении $\alpha_v\beta_3$ по сравнению с другими интегринами. Так например, предпочтительный $\alpha_v\beta_3$ антагонист существенно ингибирует связывание фибриногена с $\alpha_v\beta_3$, но не существенно ингибирует связывание фибриногена с такими другими интегринами, как $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ или $\alpha_{11b}\beta_3$. Особенно предпочтительным является $\alpha_v\beta_3$ антагонист, проявляющий в 10 - 100 раз более низкую активность по значению IC_{50} при ингибировании связывания фибриногена с $\alpha_v\beta_3$ по сравнению с IC_{50} активностью при ингибировании связывания фибриногена с другим интегрином. Примеры анализов измерения IC_{50} активности при

ингибировании связывания фибриногена с интегрином описаны в Примерах изобретения.

Терапевтически эффективное количество $\alpha_v\beta_3$ антагониста изобретения в виде моноклонального антитела обычно составляет такое количество, которое при применении в физиологически переносимой композиции достаточно для достижения концентрации плазмы в диапазоне от 0,01 микрограмм / μ г/ на миллилитр /мл/ до 1000 мкг/мл, предпочтительно, 1 мкг/мл - 5 мкг/мл и обычно около 5 мкг/мл. Иначе говоря, дозировка может изменяться от 0,1 мг/кг до 300 мг/кг, предпочтительно, от 0,2 мг/кг до 200 мг/кг, наиболее предпочтительно 0,5 мг/кг до 20 мг/кг, при применении одной или более дозировки ежедневно в течение одного или нескольких дней.

В том случае, когда антагонист находится в виде фрагмента моноклонального антитела, такое количество может легко регулироваться на основании отношения массы фрагмента относительно массы всего антитела. Предпочтительная концентрация плазмы в молярном выражении составляет от приблизительно 2 микромолярной / μ M/ до 5 миллимолярной /mM/ и, предпочтительно, от около 100 мкМ до 1 mM антительного антагониста.

Терапевтически эффективное количество $\alpha_v\beta_3$ -антагониста изобретения в виде полипептида или другого молекулярного $\alpha_v\beta_3$ миметика аналогичного малого размера, обычно составляет такое количество полипептида, которое при введении в физиологически толерантной композиции, достаточно для достижения концентрации плазмы от около 0,1 микрограмма / μ г/ на миллилитр /мл/ до приблизительно 200 мкг/мл, предпочтительно, от около 1 мкг/мл до приблизительно 150 мкг/мл. В расчете на полипептид с массой около 500 г/моль, предпочтительная концентрация плазмы в молярном выражении составляет от около 2 микромолярной / μ M/ до около 5 миллимолярной /mM/ и предпочтительно около 100 мкМ-1 mM полипептидного антагониста. Иначе говоря, дозировка в расчете на вес тела может изменяться в интервале от около 0,1 мг/кг до около 300 мг/кг, предпочтительно, от около 0,2 мг/кг до около 200 мг/кг при применении одной или более доз ежедневно в течение от одного до нескольких дней.

Моноклональные антитела или полипептиды изобретения могут быть введены парентерально путем инъекции или постепенного вливания в течение времени. Хотя ткань, подлежащая лечению, обычно доступна в организме в результате системного применения и поэтому лечение, как правило, проводят путем внутривенных инъекций терапевтических композиций, подразумеваются и другие ткани и распределяющие устройства в том случае, когда существует вероятность того, что целевая ткань содержит молекулу-мишень. Так, например, моноклональные антитела или полипептиды изобретения могут применяться внутривенно, внутрибрюшинно, внутримышечно, подкожно, внутрь полости, трансдермально, и могут вводиться с помощью перистальтических средств.

Терапевтические композиции, содержащие моноклональное антитело, или полипептид изобретения обычно применяются внутривенно, например путем инъекции единичной дозировки.

Термин "единичная дозировка", в том случае, когда он используется в отношении терапевтической композиции настоящего изобретения, относится к физически дискретным единицам, используемым в качестве единичных дозровок для субъекта, причем каждая единичная дозировка содержит определенное количество активного материала, рассчитанное с целью достижения желаемого терапевтического эффекта совместно с требуемым разбавителем, например носителем или связующим. Согласно одному из предпочтительных решений изобретения, как показано в Примерах, $\alpha\beta\gamma$ -антагонист применяют внутривенно в виде единичной дозы.

Композиции изобретения применяют способом, совместимым с формой дозировки, и в терапевтически эффективном количестве. Количество, подлежащее применению и длительность применения зависят от объекта применения, емкости системы субъекта, способной утилизировать активный ингредиент, и степени желаемого терапевтического эффекта. Точные количества активного ингредиента требуемые для применения зависят от мнения практикующего врача и различны для каждого индивидуума. Однако, подходящие дозировочные интервалы для систематического применения указаны в описании и они зависят от типа применения. Подходящие режимы применения тоже могут изменяться, но, как правило, производят начальное применение с последующими повторяющимися дозами с интервалами в один или более часов с последующей инъекцией или другими применениями. Однако, с другой стороны предусматриваются также непрерывные внутривенные вливания, достаточные для поддержания концентрации в крови в интервалах, специфичных для *in vivo* терапии.

Как продемонстрировано настоящими примерами, ингибирование ангиогенеза и регрессия опухоли происходят уже на 7 день после начального контактирования с антагонистом. Дополнительное или пролонгированное воздействие антагониста предпочтительно в период от 7 дней до 6 недель, предпочтительно в период 14-28 дней.

В соответствии с родственным решением приведенные Примеры демонстрируют взаимосвязь между ингибированием $\alpha\beta\gamma$ и индуцированием апоптоза в неоваскулярных клетках, несущих $\alpha\beta\gamma$. Таким образом, настоящее, изобретение также охватывает способы ингибирования апоптоза в неоваскулярной ткани. На практике осуществлен способ изобретения, включающий ингибирование ангиогенеза во всех тканях и при условиях описанных в тексте. Заметным различием оказалось лишь начало эффекта, который в случае апоптоза проявляется быстро, обычно через 48 часов после контактирования с антагонистом, тогда как ингибирование ангиогенеза и регрессия опухоли проявляются более медленно, как это было указано выше. Такое отличие оказывает эффект на терапевтический режим в плане времени применения и желаемого эффекта. Обычно, применение в случае апоптоза неоваскуляратора может проводиться в течение времени от 24 часов до 4 недель, хотя период от 48 часов до 7 дней является предпочтительным.

Д Терапевтические композиции

Настоящее изобретение охватывает терапевтические композиции, используемые для практической реализации описанных терапевтических способов. Терапевтические композиции настоящего изобретения содержат физиологически переносимый носитель совместно с $\alpha\beta\gamma$ -антагонистом, растворенный или диспергированный в нем в качестве активного ингредиента. Согласно предпочтительному воплощению, композиция $\alpha\beta\gamma$ -антагониста не является иммуногенной при применении на млекопитающих или людях в терапевтических целях.

Используемые в тексте термины "фармацевтически применимый", "физиологически переносимый" и их грамматические варианты, в той мере, в которой они относятся к композициям, носителям, разбавителям и реагентам, являются взаимозаменяемыми и означают, что такие материалы способны применяться на млекопитающих без нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, желудочные расстройства и т.п.

Приготовление фармакологической композиции, содержащей активные ингредиенты растворенные или диспергированные в ней, хорошо известно из литературы и не ограничивает типы рецептур. Обычно, такие композиции готовят в виде растворов для инъекций или жидких растворов, либо суспензий, однако могут также готовиться твердые формы пригодные для раствора или суспензии непосредственно в жидкости перед применением. Такие препараты могут также представлять собой эмульсии.

Активный ингредиент может смешиваться с эксципиентами, являющимися фармацевтически приемлемыми и совместимыми с активным ингредиентом, в количествах, подходящих для использования в описанных терапевтических методах. Подходящими эксципиентами могут служить, например, вода, физиологический раствор, декстроза, глицерин, этанол и т.п. или их комбинации. Кроме этого, если желательно, композиция может содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие агенты, изменяющие pH буферные агенты и т.п., которые повышают эффективность активного ингредиента.

Терапевтическая композиция настоящего изобретения может включать фармацевтически приемлемые соли компонентов. Фармацевтически приемлемые соли включают соли присоединения кислот /образованные с участием свободных аминокислот полипептида/, которые готовят с помощью таких неорганических солей, как, например, хлористоводородная или фосфорная кислоты, или таких органических кислот, как уксусная, винная, миндальная и т.п. Соли приготовленные с участием свободных карбоксильных групп также могут быть производными таких неорганических оснований, как гидроксиды натрия, калия, аммония, кальция или железа, или таких органических оснований, как изопропиламин, триметиламин, 2-этиламиноэтанол, гистидин, прокаин и т.п.

Особенно предпочтительными при получении циклических полипептидных $\alpha\beta\gamma$ -антагонистов

являются соли TFA и HCl. Представители солей пептидов описаны в Примерах

Физиологически переносимые носители хорошо известны в данной области. Примерами жидких носителей являются стерильные водные растворы, не содержащие никаких материалов, кроме активных ингредиентов и воды, или содержащие такой буфер, как натрий фосфатный при физиологическом значении pH, физиологический раствор или то и другое, т.е. фосфатно-буферный физиологический раствор. Кроме этого, водные носители могут содержать более одной буферной соли или такие соли, как смешанные хлориды натрия и калия, декстрозу, полиэтиленгликоль и другие растворенные вещества.

Жидкие композиции также могут содержать жидкие фазы в присутствии или в отсутствии воды. Примерами таких дополнительных жидких фаз являются глицерин, такие растительные масла, как хлопковое масло и эмульсии типа вода в масле.

Терапевтическая композиция содержит ангиогенез-ингибирующее количество $\alpha_v\beta_3$ антагониста настоящего изобретения, причем она обычно формируется так, что содержит, по крайней мере, 0,1% вес антагониста в расчете на общий вес терапевтической композиции. Весовой процент представляет собой весовое соотношение ингибитора к общему весу композиции. Так например, 0,1% вес представляет собой 0,1г ингибитора на 100г всей композиции.

Е Антагонисты Интегрина $\alpha_v\beta_3$

$\alpha_v\beta_3$ -антагонисты используются в настоящих методах для ингибирования ангиогенеза в тканях и можно упомянуть большое число форм, включающих соединения, взаимодействующие с $\alpha_v\beta_3$ таким образом, что они препятствуют функциональному взаимодействию с природными $\alpha_v\beta_3$ лигандами. Примерами антагонистов могут служить $\alpha_v\beta_3$ аналоги $\alpha_v\beta_3$, являющиеся производными сайта связывания лиганда на $\alpha_v\beta_3$, миметики $\alpha_v\beta_3$ или природного лиганда $\alpha_v\beta_3$, который имитирует структурную область, принимающую участие во взаимодействиях связывания $\alpha_v\beta_3$ -лиганда, полипептиды имеющие последовательность, соответствующую домену функционального связывания природного лиганда, специфичного к $\alpha_v\beta_3$, особенно, соответствующую RGD-содержащему домену природного лиганда $\alpha_v\beta_3$, а также антитела, которые иммунореагируют с $\alpha_v\beta_3$ или с природным лигандом, причем все эти вещества проявляют антагонистическую активность.

1 Полипептиды

В соответствии с одним из технических решений настоящее изобретение охватывает $\alpha_v\beta_3$ -антагонисты в виде полипептидов. Полипептидный /пептидный/ $\alpha_v\beta_3$ антагонист может иметь характеристики последовательности природного лиганда $\alpha_v\beta_3$ или самого $\alpha_v\beta_3$ на участке, принимающем участие во взаимодействии $\alpha_v\beta_3$ -лиганда и проявляет активность $\alpha_v\beta_3$ -антагониста. Предпочтительный $\alpha_v\beta_3$ антагонист-пептид содержит RGD трипептид и соответствует по последовательности природному лиганду в RGD-содержащей области.

Предпочтительные RGD-содержащие поли-

пептиды имеют последовательность, соответствующую последовательности аминокислотных остатков RGD-содержащей области природного лиганда $\alpha_v\beta_3$, такого как фибриноген, витронектин, фактор фон Виллебранда, ламинин, тромбоспондин и подобные лиганды. Последовательность таких $\alpha_v\beta_3$ лигандов хорошо известна.

Так например, $\alpha_v\beta_3$ -антагонист-пептид может быть производным любого из природных лигандов, хотя предпочтительными являются фибриноген и витронектин.

Особенно предпочтительные $\alpha_v\beta_3$ -антагонисты-пептиды преимущественно ингибируют $\alpha_v\beta_3$ связывание с их природными лигандами по сравнению с другими интегринами, описанными выше. Эти $\alpha_v\beta_3$ -специфичные пептиды особенно предпочтительны, по крайней мере, по причине того, что специфичность на $\alpha_v\beta_3$ уменьшает возможность нежелательных побочных эффектов, таких как ингибирование других интегринов. Идентификация предпочтительных $\alpha_v\beta_3$ антагонистов-пептидов, обладающих селективностью на $\alpha_v\beta_3$ может быть легко осуществлена типичным анализом на ингибирование связывания, например, с помощью анализа ELISA, описанного в Примерах.

Согласно одному из воплощений, полипептид настоящего изобретения содержит не более 100 аминокислотных остатков, предпочтительно, не более 60 остатков, более предпочтительно, не более 30 остатков. Пептиды могут быть линейными или циклическими, хотя особенно предпочтительными являются циклические пептиды.

Предпочтительные циклические и линейные пептиды и их обозначения приведены в Таблице 1 и в Примерах.

Целевой полипептид включает аналог, фрагмент или химическое производное полипептида, чья последовательность остатков аминокислот, представленная в описании свидетельствует о том, что такой полипептид представляет собой $\alpha_v\beta_3$ антагонист. Поэтому, полипептид изобретения может быть объектом различных изменений, замещений, вставок и делеций, если такие изменения обеспечивают некоторые улучшения его применения. В этом отношении следует отметить, что $\alpha_v\beta_3$ антагонист-полипептид изобретения соответствует, а не идентичен последовательности описанного пептида, в котором произведено одно или более изменений и он сохраняет способность функционировать как $\alpha_v\beta_3$ антагонист в одном или более анализах, как это показано в тексте.

Таким образом, полипептид может присутствовать в любой из большого числа форм пептидных производных, включающих амиды, конъюгаты с белками, циклические пептиды, полимеризованные пептиды, аналоги, фрагменты, химически модифицированные пептиды, и аналогичные производные.

Термин "аналог" включает любой полипептид, имеющий последовательность аминокислотных остатков идентичную последовательности специально показанной там, где один или более остатков консервативно заменены на функционально аналогичный остаток и где проявляется $\alpha_v\beta_3$ антагонистическая активность. Примеры консервативных замен включают замену одного /не-полярного/

гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин на другой, замену одного полярного /гидрофильного/ остатка на другой, как это имеет место при замене аргинина на лизин, глутамин на аспарагин, глицина на серин, замену одного основного остатка такого, как лизин, аргинин или гистидин на другой, или замену одного кислотного остатка, такого как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота на другой.

Фраза "консервативное замещение" также подразумевает использование химически дериватизированных остатков вместо не-дериватизированного остатка при условии, что такой полипептид обладает достаточной ингибирующей активностью.

Термин "химическое производное" относится к целевому полипептиду содержащему один или более остатков, химически дериватизированных по реакции функциональных боковых групп. Такие дериватизированные молекулы включают, например, те молекулы, в которых свободные аминокислотные группы были преобразованы с образованием амингидрохлоридов, *p*-толуол сульфонильных групп, карбобензоксильных групп, трет-бутилоксикарбонильных групп, хлорацетильных групп или формильных групп. Свободные карбоксильные группы могут быть преобразованы с образованием солей, метиловых или этиловых эфиров, эфиров других типов или гидразидов. Свободные гидроксильные группы могут быть преобразованы с образованием *O*-ацил или *O*-алкильных производных. Имидазольный азот гистидина может быть дериватизирован с образованием *N*-имбензилгистидина. Термином "химические производные" охватываются те пептиды, которые содержат одно или более встречающихся в природе аминокислотных производных двадцати стандартных аминокислот. Так, например, пролин может быть заменен на 4-гидроксипролин, лизин - на 5-гидроксилизин, гистидин может быть заменен на 3-метилгистидин, серин может быть заменен на гомосерин, а лизин может быть заменен на орнитин.

Полипептиды настоящего изобретения также включают любой полипептид, имеющий одну или более вставок и/или делеций или остатков с родственной полипептиду последовательностью, показанной в тексте при условии, что сохраняется необходимая активность.

Термин "фрагмент" относится к любому целевому полипептиду, имеющему последовательность аминокислотных остатков более короткую, чем у полипептида, аминокислотная последовательность которого показана в тексте.

В том случае, когда полипептид настоящего изобретения имеет последовательность, не идентичную последовательности $\alpha\beta\gamma$ природного лиганда, это означает, что были произведены одна или более консервативных или неконсервативных замещений, обычно в этом случае заменяют не более 30% и, предпочтительно, не более 10% аминокислотных остатков. Дополнительные остатки также могут добавляться к любому окончанию полипептида в целях обеспечения "линкера", с помощью которого полипептиды изобретения могли бы соответствующим образом прикрепляться к

метке твердой матрицы или носителя.

Метки, твердые матрицы и носители, которые могут использоваться с полипептидами настоящего изобретения описаны ниже.

Линкеры аминокислотных остатков обычно представляют собой, по крайней мере, один остаток и могут содержать 40 или более остатков, чаще 1-10 остатков, но они не образуют эпитопов $\alpha\beta\gamma$ лиганда. Типичными аминокислотными остатками, используемыми для связывания являются тирозин, цистеин, лизин, глутаминовая и аспарагиновая кислоты или другие остатки. Кроме этого, целевой полипептид может отличаться, если не указано особо, от природной последовательности $\alpha\beta\gamma$ лиганда последовательностью, которая модифицирована ацилированием терминальной NH_2 -группы, например, путем ацетилирования или амидированием тиогликолевой кислоты в результате терминального карбоксиамидирования, например, с помощью аммиака, метиламина, и аналогичными терминальными модификациями. Терминальные модификации, как хорошо известно, используются для снижения восприимчивости к протеиназному перевариванию и поэтому они служат для пролонгирования периода полураспада полипептидов в растворе, особенно в биологических жидкостях, где могут присутствовать протеазы. В этом отношении циклизация полипептида также является ценным методом терминальной модификации и она особенно предпочтительна из-за устойчивости структур, полученных в результате циклизации, и из-за биологических активностей, наблюдаемых для таких циклических пептидов, как это отмечается в описании.

Любой пептид настоящего изобретения может использоваться в виде фармацевтически приемлемой соли. Подходящие кислоты, способные образовывать соли пептидов настоящего изобретения, включают такие неорганические кислоты, как трифторуксусную кислоту /TFA/ хлористоводородную кислоту /HCl/, бромистоводородную кислоту, перхлорную кислоту, азотную кислоту, тиоциановую кислоту, серную кислоту, фосфоруксусную кислоту, пропионовую кислоту, гликолевую кислоту, молочную кислоту, пировиноградную кислоту, оксалиновую кислоту, малоновую кислоту, янтарную кислоту, малеиновую кислоту, фумаровую кислоту, антралиловую кислоту, коричную кислоту, нафталинсульфокислоту, сульфанилиловую кислоту и т.п. Особенно предпочтительными являются соли HCl и TFA.

Подходящие основания, способные образовывать соли с пептидами настоящего изобретения, включают такие неорганические основания, как гидроксид натрия, гидроксид аммония, гидроксид калия и т.п., и такие органические основания, как моно-, ди- и три-алкил и ариламины /например, триэтиламин, диизопропиламин, метиламин, диметиламин и т.п./ и, необязательно, замещенные этаноламины /например, этаноламин, диэтанолламин и т.п./.

Пептид настоящего изобретения, на который также ссылаются, как на целевой пептид может быть синтезирован любым методом, известным специалисту в области полипептидов, например, методами рекомбинантной ДНК. Синтетические

химические методы, например, твердофазные синтезы типа Меррифилда являются предпочтительными по причинам чистоты продукты, антигенной специфичности, отсутствия нежелательных побочных продуктов, простоты выполнения и т.п. Отличное резюме большинства доступных способов содержится в книге Steward с сотр "Твердофазные пептидные синтезы", W H Freeman, Сан-Франциско, 1969, работе Bodansky с сотр, "Пептидные синтезы" Джон Вилей энд соне, второе изд., 1976, J Meienhofer "Гормональные протеины и пептиды", т. 2, стр. 46, Академик Пресс /Нью-Йорк/, 1983, в статье Merrifield Adv Enzymol, 32 221-96, 1969, Fiesl с сотр, Int J Peptide Protein Res 35 161-214, 1990 и патенте США №4 244 946, в том, что касается твердофазных пептидных синтезов, и в книге Schroder с сотр, "Пептиды", т. 1, Академик Пресс /Нью-Йорк, 1965, в том что касается классических синтезов в растворе, причем на все эти работы ссылаются в данном описании. Подходящие защитные группы, используемые в таких синтезах, описаны в приведенных выше работах и в работе J F M McOmie "Защитные группы в органической химии", Пленум Пресс, Нью-Йорк, 1973, причем на эти работы также ссылаются в настоящем описании.

Как правило, используемые методы твердофазного синтеза включают последовательное добавление одного или более аминокислотных остатков или подходящим образом защищенных аминокислотных остатков к растущей пептидной цепи. Обычно, каждая амино или карбоксильная группа первого аминокислотного остатка защищена подходящей, селективно удаляемой защитной группой.

Различные, селективно удаляемые защитные группы используются для аминокислот, содержащих реакционноспособную боковую группу, например для лизина.

С использованием твердофазного синтеза в качестве примера, защищенная или дериватизированная аминокислота присоединяется к инертному твердому носителю через незащищенные карбоксильную или аминогруппу. Защитную группу амино- или карбоксильной группы затем селективно удаляют и следующую аминокислоту в последовательности с комплиментарной /амино или карбоксильной/ группой, соответствующим образом защищенной смешивают с системой и проводят реакцию в условиях подходящих для образования амидной связи с остатком уже присоединенным к твердой подложке. Затем защитную группу амино или карбоксильной группы удаляют из вновь добавленного аминокислотного остатка и следующую аминокислоту /соответствующим образом/ защищенную добавляют к системе и т.д. После того, как все желаемые аминокислоты связаны в надлежащей последовательности, любые оставшиеся терминальные и побочные группы, а также защитные группы /и твердый носитель/ последовательно или параллельно удаляют с образованием целевого линейного полипептида.

Полученные в результате линейные полипептиды получены, например, как описано выше могут реагировать с образованием соответствую-

щих циклических пептидов. Один из примеров методов циклизации пептидов описан Zimmer с сотр, Пептиды 1992, стр. 393-394, ES COM Сайенс Паблишерс, В У 1993. Обычно защищенный тетрабутоксикарбонил пептидный метиловый эфир растворяют в метаноле и добавляют раствор гидроксида натрия и смеси дают реагировать при 20°C с целью гидролитического удаления метилаэфирной защитной группы. После выпаривания растворителя, тетрабутоксикарбонил-защищенный пептид экстрагируют этилацетатом из кислого водного раствора. Затем тетрабутоксикарбонильную защитную группу удаляют в мягких кислых условиях в диоксановом растворителе. Полученный таким образом незащищенный линейный пептид со свободными амино- и карбокси-концами превращают в соответствующий циклический пептид в результате реакции разбавленного раствора линейного пептида в смеси дихлорметана и диметилформамида, с дициклогексилкарбодиимидом в присутствии 1-гидроксибензотриазола и N-метилморфолина. Полученный в результате циклический пептид затем очищают хроматографией.

Особенно предпочтительный способ синтеза циклического пептида описан Gurrath с сотр, Eur J Biochem, 210 911-921 /1992/ и упомянут в примерах. Особенно предпочтительными пептидами для способов изобретения являются с-/GICDFY/ /последовательность SEQ ID №4/, с-/RGDFY/ /последовательность SEQ ID №5/, с-/RADIV/ /последовательность SEQ ID №6/, с-/RGDFY/ /последовательность, SEQ ID №7 и линейный пептид УТАЕКРQYTRCДФ /последовательность SEQ ID №8/, где символ "с-" обозначает циклический пептид, заглавные буквы в скобках соответствуют однобуквенному коду для L-аминокислот, а строчные буквы в скобках соответствуют однобуквенному коду для D-аминокислот. Последовательности аминокислотных остатков таких пептидов также показаны последовательностями SEQ ID №№ 4,5,6,7 и 8, соответственно.

2. Моноклональные антитела

Согласно одному из воплощений, в настоящем изобретении описывается $\alpha\upsilon\beta_3$ антагонист в виде моноклональных антител, которые иммунореагируют с $\alpha\upsilon\beta_3$ и ингибируют $\alpha\upsilon\beta_3$ связывание с его природным лигандом, как это показано в тексте. В настоящем изобретении также описываются линии клеток, продуцирующие такие антитела, способы продуцирования клеточных линий и способы получения моноклональных антител.

Моноклональное антитело настоящего изобретения включает молекулы антитела, которые 1/ иммунореагируют с выделенным $\alpha\upsilon\beta_3$ и 2/ ингибируют связывание фибриногена с $\alpha\upsilon\beta_3$. Предпочтительные моноклональные антитела, которые преимущественно связываются с $\alpha\upsilon\beta_3$ включают моноклональное антитело, обладающее иммунореакционноспособными характеристиками mAB LM609, секретированные гибридной клеточной линией ATCC HB 9537. Гибридная клеточная линия ATCC HB 9537 депонирована в соответствии с требованиями Будапештского договора в Американской коллегии типовых культур /ATCC/, 1301 Парклайн Драйв, Роквилл, МД, США, 15

сентября 1987г

Термин "антитело" или "молекула антитела" в различных грамматических формах используется в тексте в качестве коллективного значения, относящегося к популяции иммуноглобулиновых молекул, и/или иммунологических активных частей иммуноглобулиновых молекул, т.е. молекул, содержащих сайт, объединяющий антитело или паратоп

Под термином "сайт объединяющий антитело" подразумевается, что структурная часть молекулы антитела, состоит из вариабельных или гипервариабельных участков тяжелых и легких цепей специфически связывающих антиген

Примерами антител, используемых в настоящем изобретении, могут служить интактные молекулы иммуноглобулина, частично интактные молекулы иммуноглобулина и те части молекулы иммуноглобулина, которые содержат паратоп, включая части известные в литературе, как Fab, Fab', F(ab')₂ и F₁/2 и также относящиеся к фрагментам антитела

Согласно другому предпочтительному воплощению, настоящее изобретение охватывает укороченную молекулу иммуноглобулина, включающую Fab фрагмент, являющийся производным моноклонального антитела изобретения Fab фрагмент, в котором отсутствует Fc рецептор, является растворимым и обладает терапевтическими преимуществами в отношении полураспада сыворотки и диагностическими преимуществами в отношении способа применения растворимого Fab фрагмента. Приготовление растворимого Fab фрагмента обычно известно в области иммунологии и может осуществляться большим числом методов

Так например, Fab и F(ab')₂ части (фрагменты) антител получают протеолитической реакцией папаина и пепсина, соответственно, на существенно интактных антителах с помощью способов хорошо известных из литературы. См. например, патент США №4342566, выданный на имя Theofilopolus и Dixon. Части Fab' антитела также хорошо известны и могут быть получены из фрагментов F(ab')₂ с последующим восстановлением дисульфидных связей, связывающих участки тяжелых цепей, меркаптоэтанолом, после чего проводят алкилирование полученного в результате протеин-меркаптана таким реагентом, как иодоацетамид. Антитела, содержащие целые иммуноглобулиновые молекулы являются предпочтительными и их используют, как проиллюстрировано в тексте

Фраза "моноклональное антитело" в различных грамматических формах относится к популяции молекул антител, которые содержат только одну разновидность сайта, объединяющего антитело, способную иммунореагировать с конкретным эпитопом

Таким образом, моноклональное антитело обычно проявляет единое связывающее сродство к любому эпитопу, с которым оно иммунореагирует. Поэтому моноклональное антитело может содержать молекулу антитела, имеющую множество антительных комбинирующих сайтов, каждый из которых иммуноспецифичен в отношении различ-

ного эпитопа, например биспецифичное моноклональное антитело

Моноклональное антитело обычно состоит из антител, продуцированных клономы одной клетки, называемой гибридомой, которая секретирует /производит/ лишь один вид молекулы антитела. Гибридная клетка формируется слиянием антитело-продуцирующей клетки и миеломы или другой бессмертной клеточной линии. Получение таких антител вначале было описано Kohler и Milsten, Nature 256 495-497 /1975/, причем на эту работу ссылаются в описании. Дополнительные способы описаны Zola моноклональные антитела справочник по методам, CRC Пресс, Инк. /1987/. Гибридный супернатант, полученный таким образом, может быть подвергнут отбору на присутствие молекул антител, иммунореагирующих с α_vβ₃ и на ингибирование α_vβ₃ связывания с природными лигандами

Короче говоря, для получения гибридомы, из которой продуцируют композицию моноклонального антитела, миелому или другую бессмертную клеточную линию сливают с лимфоцитами, полученными из селезенки млекопитающего, гипериммунизированного источника α_vβ₃, например, α_vβ₃ выделенным из M21 человеческих меланомных клеток, как это описано Cheresch с сотр., J Biol Chem 262 17703-17711 /1987/

Предпочтительно, чтобы миеломная клеточная линия, используемая для получения гибридомы, была той же разновидности, что лимфоциты. Обычно предпочтительным млекопитающим являются мыши штамма 129 GIX. Подходящие для целей изобретения мышинные миеломы включают гипоксантин-аминоптерин-тимидин-чувствительные /HAT/ клеточные линии P3X63-Ag8 653 и Sp2 /O-Ag14, которые получены из Американской коллекции типовых культур, Роквилл, МД под обозначениями CRL 1580 и CRL 1581, соответственно

Спленоциты обычно сливают с миеломными клетками с использованием полиэтиленгликоля /ПЭГ/1500. Слитые гибриды подвергают селекции на их чувствительность к HAT. Гибридомы, производящие моноклональное антитело изобретения, идентифицируют с использованием энзим-связанного иммуносорбентного анализа /ELISA/, описанного в примерах изобретения

Моноклональное антитело настоящего изобретения также может быть получено иницированием моноклональной гибридомной культуры, включающей питательную среду, содержащую гибридому, секретирующую молекулы антитела соответствующей специфичности. Культуру выдерживают в таких условиях и в течение такого периода времени, которые достаточны для того, чтобы гибридома секретировала молекулы антитела в среду. Затем собирают антитело-содержащую среду. Далее, молекулы антитела могут быть дополнительно выделены хорошо известными способами

Среды, используемые для получения таких композиций, хорошо известны из литературы, выпускаются промышленностью и включают синтетические культурные среды, инбредных мышей и т.п. Примерами синтетических сред являются ми-

нимально необходимая среда Дулбекко /DMEM, Dulbecco с сотр, Virol 8 396, 1959/ дополненная 4,5гм/л глюкозы, 20мМ глутамина, и 20% сыворотки телячьего плода. Примером инбредного мышинного штамма может служить Balb/c

Другие способы продуцирования моноклонального антитела, гибридной клетки или гибридной клеточной культуры также хорошо известны. См., например, способ выделения моноклональных антител из иммунологического репертуара, описанный Sastry с сотр, Proc Natl Acad Sci USA 86, 5728-5732 /1989/, и Huse с сотр Science 246 1275-1281 /1989/

Настоящее изобретение также охватывает гибридную клетку, и культуры, содержащие гибридную клетку, вырабатывающую моноклональное тело настоящего изобретения. Особенно предпочтительной является гибридная клеточная линия, секретирующая моноклональное антитело mAb LM609, обозначенное как ATCC HB 9537 mAb LM609 было получено как описано Cheresf с сотр, J Biol Chem, 262 17703-17711/1987/ и это получение также отражено в Примерах изобретения

Согласно одному из воплощений, настоящее изобретение охватывает моноклональное антитело, имеющее иммунореакционные характеристики mAb LM609

Можно также определить без ненужного экспериментирования обладает ли моноклональное антитело такой же /т е эквивалентной/ специфичностью /иммунореакционными характеристиками/, как моноклональное антитело изобретения путем выяснения того факта, имеет ли место предотвращение первым объектом последнего объекта от связывания с предварительно выбранной молекулой-мишенью. Если испытываемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом изобретения, о чем может свидетельствовать уменьшение степени связывания моноклональным антителом изобретения в стандартных условиях сравнительного анализа на связывание с мишенью-молекулой при реализации твердофазного варианта, то существует вероятность того, что два этих моноклональных антитела связаны с одним, или близко родственным ему, эпитопом

Еще один путь определения того, обладает ли моноклональное антитело, специфичностью моноклонального антитела изобретения, состоит в предварительной инкубации моноклонального антитела изобретения с молекулой-мишенью, с которой оно реагирует в обычных условиях с последующим добавлением испытываемого моноклонального антитела для определения факта ингибирования способности испытываемого антитела связывания молекулы-мишени. Если такое ингибирование имеет место, то по всей вероятности оно идентично, или функционально эквивалентно эпитопной специфичности моноклонального антитела изобретения

Еще одним путем определения одинаковой специфичности моноклонального антитела и моноклонального антитела изобретения является определение последовательности аминокислотных остатков CDR-участков сравниваемых анти-

тел. Молекулы антитела, обладающие идентичной функционально-эквивалентной последовательностью аминокислотных остатков в их CDR областях, обладают одинаковой связывающей специфичностью. Способы установления последовательностей полипептидов хорошо известны из литературы

Иммуноспецифичность антитела, его связывающая емкость в отношении молекулы-мишени, аффинность антитела в отношении эпитопа, определяются эпитопом с которым иммунореагирует антитело. Эпитопная специфичность определяется, по крайней мере, частично последовательностью аминокислотных остатков варибельного участка тяжелой цепи иммуноглобулинового антитела и частично варибельным участком легкой цепи последовательности аминокислотных остатков

Использование термина "обладающий специфичностью связывания" указывает на то, что эквивалентные моноклональные антитела обладают одинаковыми или похожими иммунореакционными /связывающими/ характеристиками и конкурируют за связывание с предварительно отобранной молекулой мишенью

Гуманизированные моноклональные антитела предполагают особые преимущества над мышинными моноклональными антителами особенно в том плане, что они могут терапевтически применяться на людях. Говоря конкретно, человеческие антитела не так быстро подвергаются циркуляции, как "инородные" антигены и не активируют иммунную систему тем же образом, что инородные антигены и инородные антитела. Способы получения "гуманизированных" антител обычно хорошо известны из литературы и могут быть легко применимы к антителам настоящему изобретению

Таким образом, изобретение предусматривает, согласно одному из воплощений, моноклональное антитело, которое гуманизируется трансплантацией с целью введения компонентов человеческой иммунной системы без существенных препятствий в отношении способности антитела связывать антиген

3 $\alpha\beta_3$ -Специфичные миметики

Настоящее изобретение демонстрирует тот факт, что $\alpha\beta_3$ -антагонисты обычно могут использоваться в изобретении, причем такие антагонисты могут включать полипептиды, антитела и другие молекулы обозначенные, как "миметики", которые обладают способностью препятствовать $\alpha\beta_3$ функции. Особенно предпочтительными являются антагонисты, которые специфически препятствуют $\alpha\beta_3$ функционированию и не являются помехой функции других интегринов

В этом контексте следует отметить, что большое количество реагентов может подходить для использования в способах изобретения при условии, что такие реагенты обладают требуемой биологической активностью. На такие реагенты ссылаются, как на миметики, поскольку они обладают способностью "подражать" связыванию домена на $\alpha\beta_3$ или $\alpha\beta_3$ лиганде, принимающем участие в функциональном взаимодействии рецептора и лиганда и вследствие этого препятствовать /например, ингибировать/ нормальное функциони-

рование

$\alpha\upsilon\beta_3$ миметик представляет собой любую молекулу, отличную от антитела или пептида-производного пептида, которая обладает описанными выше свойствами. Это может быть синтетический аналог пептида, соединение, имеющее форму связывающего кармана, указанного выше домена, или другая молекула.

Создание $\alpha\upsilon\beta_3$ миметиков может осуществляться любым из большого числа структурно-аналитических методов создания лекарственных препаратов, известных из литературы, включающих молекулярное моделирование, двумерный ядерный магнитный резонанс /2-Д ЯМР/, рентгеновскую кристаллографию, случайный скрининг пептида, пептидного аналога или других химических полимерных библиотек и другие методы создания лекарств.

На основании широких структурных данных, представленных в настоящем описании, которое показывает, что $\alpha\upsilon\beta_3$ -антагонист может быть небольшим полипептидом или моноклональным антителом, был сделан вывод о наличии двух взаимно различных химических структурах, которые разделяют функциональные свойства селективного ингибирования $\alpha\upsilon\beta_3$, причем структура $\alpha\upsilon\beta_3$ -антагониста, используемого в настоящем способе, не требует такого ограничения, а включает любой $\alpha\upsilon\beta_3$ миметик, упомянутый в описании.

F Способы идентификации антагонистов $\alpha\upsilon\beta_3$

В изобретении также описываются аналитические способы идентификации кандидатов в $\alpha\upsilon\beta_3$ антагонисты, предназначенные для использования в методах изобретения. В таких способах анализа молекулы-кандидаты оцениваются на их мощность в ингибировании $\alpha\upsilon\beta_3$ связывания с нейтральными лигандами и, кроме этого, оцениваются на мощность в ингибировании ангиогенеза в тканях.

В первом анализе измеряется ингибирование прямого связывания природного лиганда с $\alpha\upsilon\beta_3$, а предпочтительное техническое решение подробно описана в Примерах.

В анализе обычно измеряется степень ингибирования связывания природного лиганда, например, фибриногена с изолированным $\alpha\upsilon\beta_3$ в твердой фазе методом ELISA.

Такой анализ может также использоваться для идентификации соединений, обладающих специфичностью на $\alpha\upsilon\beta_3$ и не ингибирующих природные лиганды от связывания с другими интегринами. Специфичность анализа проверяется параллельным проведением анализов ELISA, когда оба $\alpha\upsilon\beta_3$ и другие интегрины отбираются конкурентно в отдельные аналитические камеры с целью определения соответствующих способностей к связыванию с природным лигандом, а соединение-кандидат оценивается на способность ингибировать соответствующие способности интегринов к соединению с предварительно отобранным лигандом. Предпочтительные форматы скринирующего анализа описаны в Примерах.

Согласно второму методу анализа измеряется ангиогенез в куриной хориоаллантоисной мембране /CAM/ и на этот анализ ссылаются как на анализ CAM. CAM анализ был описан подробно в

других источниках и позже этот анализ был использован для измерения ангиогенеза и неоваскуляризации опухолевых тканей. См. Ausprunk с сотр., Am. J. Pathol., 79:597-618/1975/ и Ossowski с сотр., Cancer Res. 40:2300-2309/1980/.

Анализ CAM является хорошо известным методом анализа для *in vivo* ангиогенеза, поскольку неоваскуляризация ткани имеет место в этом случае и действительные кровеносные сосуды куриного эмбриона прорастают в CAM либо в ткань, растущую на CAM.

Как продемонстрировано в описании, CAM - анализ иллюстрирует ингибирование неоваскуляризации, основанной на количестве и степени роста новых сосудов. Кроме этого, легко следить за ростом любой ткани, трансплантированной на CAM, например, опухолевой ткани. Наконец, такой анализ особенно ценен поскольку осуществляется внутренним контролем токсичности анализируемой системы. Куриный эмбрион подвергается воздействию любого испытуемого реагента и поэтому состояние здоровья эмбриона является указанием токсичности.

Третий анализ измерения ангиогенеза представляет собой *in vivo* модель на глазах кроликов и на него ссылаются, как на анализ на глазах кроликов. Такой анализ на глазах кролика подробно описан в других источниках и он дополнительно используется для измерения как ангиогенеза, так и неоваскуляризации в присутствии таких ангиогенных ингибиторов, как талидомид. См. D'Amato с сотр., Proc. Natl. Acad. Sci. 91:4082-4085/1994/.

Кроличьи-глазной анализ представляет собой хорошо известную аналитическую модель *in vivo* ангиогенеза, поскольку процесс неоваскуляризации, примером которого является рост кровеносных сосудов кролика от края роговой оболочки глаза в роговую оболочку, легко визуализируется через обычно прозрачную роговую оболочку глаза.

Кроме этого, степень и количество стимуляции или ингибирования неоваскуляризации или регрессии неоваскуляризации легко может регистрироваться во времени.

Кроме этого, кролик может быть подвержен действию любого испытуемого реагента, и поэтому состояние здоровья кролика является свидетельством токсичности испытуемого реагента.

В четвертом анализе измеряется ангиогенез в химерной модели мышь-человек и на этот анализ ссылаются, как на химерный мышинный анализ. Этот анализ подробно описан в других источниках и этот анализ дополнительно описывается в тексте, как средство для измерения ангиогенеза, неоваскуляризации и регрессии опухолевой ткани. См. Jan с сотр., J. Clin. Invest. 91:986-996/1993/. Химерный мышинный анализ является ценной аналитической моделью для *in vivo* ангиогенеза, поскольку трансплантированная кожа плотно привита в ходе операции напоминает нормальную человеческую кожу в гистологическом отношении и неоваскуляризация ткани, происходящая в системе, включает прорастание действительных человеческих кровеносных сосудов от привитой человеческой кожи в человеческую опухолевую ткань на поверхности привитой человеческой ко-

жи Происхождение неоваскуляризации в человеческую прививку может быть продемонстрировано иммуногистохимическим окрашиванием неоваскулятуры человека-специфичными эндотелиальными клеточными маркерами

Как продемонстрировано в тексте, химерный мышинный анализ демонстрирует регрессию неоваскуляризации на основе количества и степени регрессии роста новых сосудов Кроме этого, легко осуществлять наблюдение за эффектами в ходе роста любой ткани, трансплантированной на привитую кожу, например опухолевой ткани Наконец, такой анализ является ценным средством поскольку позволяет осуществлять внешний контроль токсичности аналитической системы Химерная мышь подвергается любому испытываемому реагенту и поэтому состояние ее здоровья является индикатором токсичности

Примеры

Следующие ниже примеры, относящиеся к изобретению носят иллюстративный характер и, разумеется, не ограничивают изобретение Кроме этого, варианты изобретения, известные в настоящее время или те, что будут разработаны позже в рамках компетенции специалиста в данной области, рассматриваются, как входящие в сферу настоящего изобретения

1 Получение синтетических пептидов

Линейные и циклические полипептиды, перечисленные в Таблице 1 синтезировали с использованием стандартных методов твердофазного синтеза, как это, например, описано Merrifield Adv Enzymol, 32 221-96, /1969/ и Fields G B и Noble R Z Int J Peptide Protein Res, 35 161-214 /1990/

Два грамма /г/ BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe /последовательность SEQ ID №1/ вначале растворяли в 60 миллилитрах /мл/ метанола, к которому добавляли 1,5мл 2N раствор гидроксид натрия с образованием смеси Такую смесь затем перемешивали в течение 3 часов при 20°C После выпаривания остаток переносили в воду, подкисляли до pH 3 разбавленной HCl и экстрагировали

этилацетатом Экстракт сушили над Na₂SO₄, снова выпаривали и полученную в результате последовательность BOC-Gly-D-Afg-Gly-Asp-Phe-Val-OH /SEQ ID №2/ перемешивали при 20°C в течение 2 часов в присутствии 20мл 2N HCl в диоксане Полученную смесь выпаривали с получением последовательности E-Gly-D-Afg-Gly-Asp-Phe-Val-OH /SEQ ID №3/, которую далее растворяли в смеси 1800мл дихлорметана и 200мл диметилформамида /DMF/ с последующим охлаждением до 0°C После этого, последовательно при перемешивании добавляли 0,5г дициклогексилкарбодиимида /DCCI/, 0,3г 1-гидроксибензотриазола /HOBt/ и 0,23мл N-метилморфолина Полученную в результате смесь перемешивали в течение 24 часов при 0°C и затем при 20°C в течение еще 48 часов Раствор концентрировали и обрабатывали смешанным слоем ионообменника для освобождения от солей После удаления полученной в результате смолы фиптрацией, осветленный раствор выпаривали и остаток очищали методом хроматографии, получая цикло/Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val /последовательность SEQ ID №4/ Следующие пептиды, перечисленные в Таблице 1 с использованием однобуквенного кода сокращений аминокислотных остатков и идентифицированные обозначениями номера пептида, получали аналогичным образом цикло/Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val/ /SEQ ID №5/, цикло/Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val/ /SEQ ID №6/, цикло/Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val/ /SEQ ID №9/, цикло/Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val/ /SEQ ID №7/ Пептид, обозначенный как 66203, имеющий последовательность идентичную последовательности пептида 62184, отличается от последнего лишь тем, что содержит соль HCl, а не соль TFA, присутствующую в 62184 В анализе по ингибированию ангиогенеза в соответствии с примером 7, в котором использовали синтетические пептиды, 66203 пептид, содержащий HCl, оказался несколько более эффективным в ингибировании ангиогенеза, чем идентичный пептид в TFA

Таблица 1

№ пептида	Аминокислотная последовательность	SEQ ID №
62181	цикло /GrGDFV/	4
62184	цикло/RGDfV/	5
62185	цикло/RADfV/	6
62187	цикло/RGDfV/	7
62880	yTAECKPQVTRGDVF	8
62186	цикло/RaDFV/	9
62175	цикло/ARGDfL/	10
62179	цикло/CRGDfL/	11
62411	TRQVVCDLGNPM	12
62503	GWRNNEALARLS	13
62502	TDVNGDGRHDL	14

* Строчные буквы обозначают D-аминокислоту,
Заглавные буквы обозначают L-аминокислоту

Пептид, обозначенный номером 69601, имеющий идентичную последовательность последовательности пептида 62185, отличается от последнего тем, что содержит соль HCl, а не соль TFA, присутствующую в 62184

Циклический пептид c-RADIV /69601/, как было показано, ингибирует связывание фибриногена с интегрином $\alpha_v\beta_3$ и не ингибирует связывание фибриногена с интегринными $\alpha_{11b}\beta_3$ или $\alpha_5\beta_1$ /Pfaff с сотр J Biol Chem 269 20233-20238 /1994/ Таким образом, пептид c-RADIV специфичен на $\alpha_v\beta_3$

2 Моноклональные антитела

Моноклональное антитело LM609, секретируемое гибридомой ATCC HB 9537, было получено с использованием стандартных гибридомных методов, в результате иммунизации выделенной $\alpha_v\beta_3$ адсорбированного на Сефароза-лентиллектиновых шариках $\alpha_v\beta_3$ выделяли из человеческих меланомных клеток, обозначены, как M21, и антитело получали в соответствии со способом Cheresch с сотр J Biol Chem, 262 17703-17711/1987/ M21 клетки были получены д-ром D L Morton /Калифорнийский университет Лос-Анжелеса, Ка / и выращены в суспензионной культуре в RPMI 1640 культуральной среде, содержащей 2 mM L-глутамин, 50мг/мл гентаминосulfата и 10% фетальной телячьей сыворотки

Было показано, что моноклональное антитело LM609 специфически иммунореагирует с $\alpha_v\beta_3$ комплексом и не иммунореагирует с α_v субъединицей, с β_3 субъединицей или с другими интегринными

3 Характеристика тканевого распределения $\alpha_v\beta_3$ экспрессии

А Иммунофлуоресценция с анти-интегрин рецепторными антителами

В ходе заживления ран основные мембраны кровеносных сосудов экспрессируют несколько адгезивных протеинов, включающих фактор фон Виллебранда, фибронектин и фибрин Кроме этого, некоторые члены интегринового семейства адгезионных рецепторов экспрессируются на поверхности культивированных гладких мышц и эндотелиальных клеток См Cheresch Proc Natl Acad Sci USA 84 8471 /1987/, Janat с сотр, J Cell Physiol 151 588 /1992/, а также Chend J Cell Physiol, 139 275 /1989/

Среди этих интегринов присутствуют $\alpha_v\beta_3$ эндотелиальный клеточный рецептор фактора фон Виллебранда, фибриноген /фибрин/ и фибронектин согласно Cheresch Proc Natl Acad Sci USA 84 8471/1987/ Эти интегрины иницируют кальций-зависимый сигнальный путь, ведущий к миграции эндотелиальных клеток, и, поэтому, по-видимому они играют фундаментальную роль в биологии сосудистых клеток в соответствии с Zeavelsey с сотр, J Cell Biol, 121 163/1993/

Для исследования экспрессии $\alpha_v\beta_3$ в ходе ангиогенеза, человеческую раневую грануляционную ткань или соседнюю нормальную кожу получали от пациентов-добровольцев, промывали 1мл фосфатного буферного раствора и вводили в ОТС среду /Ткань Тек/ Внедренные ткани замораживали в жидком азоте на 30-45 секунд Секции толщиной шесть микрон вырезали из замороженных блоков на криостатном микротоме для последующего иммунопе-

роксидазного окрашивания с антителами, специфичными к β_3 интегринам / $\alpha_v\beta_3$ или $\alpha_{11b}\beta_3$ / или β_1 подсемейству интегринов

Результаты окрашивания нормальной человеческой кожи и раневой грануляционной ткани представлены на фиг 1А - 1Д Моноклональные антитела AP3 и LM534, направленные к β_3 и β_1 интегринам, соответственно, использовали для иммуногистохимического анализа замороженных секций Эксперименты с тканью от четырех различных человеческих доноров дали идентичные результаты Фотомикрографии приведены при увеличении в 300раз

$\alpha_v\beta_3$ интегрин обильно экспрессировался на кровеносных сосудах в грануляционной ткани /фиг 1В/, но не детектировался в дермисе и эпителии нормальной кожи того же донора /фиг 1А/ В отличие от этого, $\alpha_v\beta_3$ интегрины обильно экспрессируются на кровеносных сосудах и стромальных клетках как на нормальной коже /фиг 1С/, так и на грануляционной ткани /фиг 1Д/ и, как предварительно показано и описано Adams с сотр, Cell, 63 425/1991/, на базальных клетках внутри эпителия

В Иммунофлуоресценция в присутствии антилигандных антител

Дополнительные участки человеческой нормальной кожи и грануляционных тканей, полученных выше подвергали также исследованию на присутствие лигандов β_3 и β_1 интегринов, фактора фон Виллебранда и ламинина, соответственно Фактор фон Виллебранда оказался локализованным на кровеносных сосудах нормальной кожи /фиг 2А/ и грануляционной кожи, /фиг 2В/, тогда как ламинин был локализован на всех кровеносных сосудах, а также эпителиальной основной мембраны в обоих препаратах ткани /фиг 2С и 2Д/

С Распределение анти $\alpha_v\beta_3$ антител на раковых тканях

Помимо проведенных выше анализов, биопсии раковой ткани человека также исследовали на присутствие и распределение $\alpha_v\beta_3$ Ткани получали, как описано в Примере 1А за исключением того, что их окрашивали моноклональным телом LM609, полученным в Примере 2, специфичным на интегринный рецепторный комплекс $\alpha_v\beta_3$ Кроме этого, также, получали опухоли для микроскопического гистологического анализа путем фиксации представителей опухолей в Bulins Fixative в течение 8 часов и серийные секции вырезали и окрашивали H & E

Результаты иммунопероксидазного окрашивания пузырьков, а также раковых тканей толстой кишки, грудной железы и легких представлены на фиг 3А - 3Д, соответственно $\alpha_v\beta_3$ обильно экспрессировались лишь на кровеносных сосудах, присутствующих в четырех раковых биопсиях, подвергнутых анализу, и ни на каких-либо других клетках присутствующих в ткани

Таким образом, описанные результаты показывают, что $\alpha_v\beta_3$ интегринный рецептор селективно экспрессируется на тканях специфических типов, а именно, грануляционных, метастатических тканях и других тканях, в которых имеет место ангиогенез и в нормальных тканях, в которых образование новых кровеносных сосудов прекращено Поэтому такие ткани представляют собой

идеальную мишень для терапевтических аспектов изобретения

4 Идентификация $\alpha_v\beta_3$ —специфических синтетических пептидов, детектируемых лиганд-рецепторным связыванием

Синтетические пептиды, полученные в Примере 1, подвергали скринингу, измеряя их способность антагонизировать $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_{11b}\beta_3$ рецепторную связывающую активность в анализах на связывание между очищенным лигандом и рецептором. Метод такого изучения связывания описан Barbas с сотр., в Proc Natl Acad Sci, USA 90 10003-10007 /1993/, Smith с сотр. J Biol Chem, 265 11008-11013 /1990/ и Pfaff с сотр., J Biol Chem, 269 20233-20238 /1994/, причем на содержание этих работ ссылаются в настоящем изобретении.

В настоящем описании описывается способ идентификации антагонистов в анализе лиганд-рецепторного связывания, в котором рецептор иммобилизован на твердой подложке, а лиганд и антагонист находятся в растворенном состоянии. Описывается также анализ на лиганд-рецепторное связывание, в котором лиганд иммобилизован на твердой подложке, а рецептор и антагонисты находятся в растворенном состоянии.

Вкратце, отобранные очищенные интегрин по отдельности иммобилизуют в лунках для микротитрования Titertek, при концентрации покрытия 50 нанोगраммов / η / на ампулу. Метод очистки рецепторов, используемых в анализах на лиганд-рецепторное связывание, хорошо известен из литературы и может быть легко осуществлен специалистами в данной области. После инкубирования в течение 18 часов при 4°C, неспецифические

связывающие сайты на пластине блокируются 10мг/мл альбумина бычьей сыворотки /BSA/ в Трис-буферном растворе. Для изучения ингибирования различные концентрации пептидов, указанных в Таблице 1, испытывали на способность блокировать связывание 125I-витронектина или 125I-фибриногена с интегринами рецепторами $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_{11b}\beta_3$. Хотя такие лиганды демонстрируют оптимальное связывание с конкретным интегрином, витронектином в случае $\alpha_v\beta_3$ и фибриногеном в случае $\alpha_{11b}\beta_3$ исследования ингибирования связывания с использованием пептидов с целью блокировки связывания фибриногена с любым рецептором позволяют точно определить количество микромолей пептида, необходимое для половинного ингибирования связывания рецептора с лигандом. Радиомеченные лиганды использовали в концентрациях порядка 1нМ и связывание вызывалось отдельно немеченными синтетическими пептидами.

Через три часа инкубации свободный лиганд удаляли промывкой, а связанный лиганд детектировали гамма подсчетом. Данные анализов, в которых отобранные циклические пептиды перечисленные в Таблице 1, использовали для ингибирования связывания рецепторов и радиомеченного фибриногена с отдельно иммобилизованными $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_{11b}\beta_3$ рецепторами были высоко воспроизводимыми при ошибке между полученными значениями обычно ниже 11%. Данные IC₅₀ в микромолях /IC₅₀мкМ/ выражали, как среднее значение из двух измерений \pm стандартное отклонение, как это показано в Таблице 2.

Таблица 2

№ пептида	$\alpha_v\beta_3$ /IC ₅₀ мкМ/	$\alpha_{11b}\beta_3$ /IC ₅₀ мкМ/
62181	1.96 \pm 0,62	14.95 \pm 7.84
62184	0.05 \pm 0,001	0,525 \pm 0,10
62185	0,885 \pm 0,16	100 \pm 0,001
62187	0.05 \pm 0,001	0,26 \pm 0,056
62186	57,45 \pm 7.84	100 \pm 0,001
62175	1,05 \pm 0,07	0,63 \pm 0,18
62179	0,395 \pm 0.21	0.055 \pm 0,007

Таким образом, RGD-содержащие или RGD-дериватизированные циклические пептиды 62181, 62184, 62185 и 62187, каждый из которых содержит один D-аминокислотный остаток, демонстрируют преимущественное ингибирование фибриногенного связывания с $\alpha_v\beta_3$ рецептором, как измерено низкой концентрацией пептида, требуемой для полумаксимального ингибирования, по сравнению с этой величиной для $\alpha_{11b}\beta_3$ рецептора. В отличие от этого RGD-содержащие или RGD-дериватизированные пептиды 62186, 62175 и 62179 либо не столь эффективны в блокировании фибриногенного связывания с $\alpha_v\beta_3$ или демонстрируют преимущественное ингибирование фибриногенного связывания с $\alpha_{11b}\beta_3$ по сравнению с $\alpha_v\beta_3$. Эти результаты находятся в соответствии с

недавно опубликованными Pfaff с сотр. J/ Biol Chem, 269 20233-20238 /1994/, в которых циклический пептид RGDEV / где E обозначает D — аминокислотный остаток/ специфически ингибировали связывание фибриногена с интегрином $\alpha_v\beta_3$, а не с $\alpha_{11b}\beta_3$ или $\alpha_5\beta_1$ интегринными. Аналогичные анализы по ингибированию связывания проводились с линеаризованными пептидами, имеющими или не имеющими RGD мотив, последовательности которых являются производными α_v рецепторной субъединицы, α_{11b} рецепторной субъединицы или последовательностей аминокислотных остатков витронектинового лиганда. Последовательности линейных пептидов, 62880 /V N-производные аминокислотные остатки 35-49/, 62411 / α_v -производные аминокислотные ос-

татки 676-687/, 62503 / α_V -производные аминокислотные остатки 655-667/ и 62502 / α_V -производные аминокислотные остатки 298-306/ перечислены в Таблице 1. Каждый из таких пептидов использовали в отдельных анализах для ингибирования

связывания либо витронектина /V N/, или фибриногена /FG/ с $\alpha_{11b}\beta_3$ или $\alpha_V\beta_3$. Значения IC_{50} , выраженные в микромолях / IC_{50} мкМ/ индивидуального анализа каждого эксперимента представлены в Таблице 3.

Таблица 3

№ пептида	$\alpha_{11b}\beta_3$ / IC_{50} мкМ/		$\alpha_V\beta_3$ / IC_{50} мкМ/	
	FG	V N	FG	V N
62880	4,2	0,98	0,1	0,5
62411	100	100	100	100
62503	100	100	100	100
62502	90	5	100	100

Результаты анализов по ингибированию лигандного связывания выбранных интегринавых рецепторов с линейаризованными пептидами показывают, что лишь пептид 62880 эффективен при ингибировании полу-максимального связывания FG или V N с $\alpha_V\beta_3$, что измерено низкой концентрацией пептида, требуемого для полу-максимального ингибирования по сравнению с $\alpha_{11b}\beta_3$ рецептором. Никакой другой из линейаризованных пептидов не был эффективен в блокировке лигандного связывания с $\alpha_V\beta_3$, хотя пептид 62502 оказался эффективным в блокировке V N связывания с $\alpha_{11b}\beta_3$.

Таким образом, описанный в тексте лиганд-рецепторный анализ может использоваться для скрининга как кольцевых, так и линейаризованных синтетических пептидов, проявляющих селективную специфичность в отношении конкретного интегринавого рецептора, особенно $\alpha_V\beta_3$ при их использовании в качестве витронектиновых рецепторных / $\alpha_V\beta_3$ / антагонистов при практической реализации изобретения.

5 Характеристики необработанной хориоаллантационной мембраны цыпленка /CAM/

А. Получение CAM

Ангиогенез может индуцироваться на хориоаллантационной мембране цыпленка /CAM/ после нормального эмбрионального ангиогенеза, приводящего к образованию зрелых кровеносных сосудов. Было показано, что ангиогенез индуцируется в ответ на специфический цитокинез фрагментов опухоли, как описано Zeibovich с сотр., Nature, 329 630 /1987/ и Ausprung с сотр. Am J Pathol, 79 597/1975/. CAM получали из цыплячьих эмбрионов с целью последующего индуцирования ангиогенеза и его ингибирования, как описано в примерах 6 и 7. Десятидневные куриные эмбрионы получали с птицеводческой фермы Мак-Интайр /Лэйксайд, КА/ и инкубировали при 37°C при 60% влажности. Небольшое отверстие проделывали в оболочке на конце яйца непосредственно над воздушным мешочком с использованием небольшой дрели /Дремел, Отделение Эмерсон электрик Ко., Расайн WI/. Второе отверстие просверливали на широкой стороне яйца в области, лишенной эмбрионных кровеносных сосудов, что было установлено предварительной проверкой яйца на свет. К исходному отверстию прилагали

отрицательное давление, что приводило к вытягиванию CAM /хориоаллантационная мембрана/ из мембраны оболочки и созданию ложного воздушного мешочка над CAM. Квадратное окно размером 1,0 x 1,0 см вырезали в оболочке над CAM с использованием размалывающего колеса небольшой модели /Дремел/. Небольшое окошко позволяло осуществлять непосредственный доступ к находящемуся внизу CAM.

Полученный в результате препарат CAM использовали либо через 6 дней эмбриогенеза, стадии отличающейся активной неоваскуляризацией без дополнительной обработки с образованием CAM отражающей модель используемую для оценки эффектов эмбрионной неоваскуляризации, или использовали через 10 дней эмбриогенеза, когда ангиогенез начинал убывать. Последний препарат таким образом использовали в изобретении для индуцирования нового ангиогенеза в ответ на цитокиновую обработку или контакт с опухолью, как это описано в Примере 6.

В. Гистология CAM

Для анализа микроскопической структуры CAM куриных эмбрионов и/или человеческих опухолей, которые подвергали резекции из куриного эмбриона, как описано в примере 8, CAM и опухоли получали для изготовления срезов в замороженном состоянии, как описано в Примере 3А. Шестимикронные срезы /по толщине/ вырезали из замороженных блоков на криостатном микротоме для иммунофлуоресцентного анализа.

На фиг 4 представлена типичная фотомикрография площади, лишенной кровеносных сосудов в необработанном CAM через 10 дней. Ангиогенез в CAM-системе уменьшался на этой стадии эмбриогенеза, систему использовали в изобретении для стимуляции продуцирования новой сосудистой системы из существующих сосудов от соседних участков в участки, где CAM лишен каких-либо сосудов.

С. Профили интегринов в CAM, детектируемой методом иммунофлуоресценции.

Для определения распределения ткани интегринавых рецепторов присутствующих в CAM тканях, 6-микронные замороженные срезы опухолевой ткани и тканей CAM куриного эмбриона фиксировали в течение 30 секунд в ацетоне и окрашивали методом иммунофлуоресценции 10

микрограмм/миллилитр /мкг/мл/ mAB CSAT, моноклональным антителом специфичным к β_1 интегринавой субъединице в соответствии с описанным Buck с сотр., J Cell Biol., 107 2351/1988/ и таким образом использовали для контрольных образцов или LM609 в соответствии с методикой примера 2. Первичное окрашивание сопровождалось окрашиванием 1:250 разбавлением меченного вторичного антитела козьего анти-мышинного родамина /Tago/ с целью детекции первичного иммунореактивного продукта. Затем такие срезы анализировали на микроскопе Цейса в присутствии иммуофлуоресцирующего соединения.

Результаты иммуофлуоресцентного анализа показывают, что зрелые кровеносные сосуды присутствуют в необработанном 10-дневном курином эмбрионе, экспрессирующем субъединицу интегрин β_1 /фиг 5A/. В отличие от этого, в серийном срезе ткани, показанном на фиг 5A не обнаружено иммунореактивности в присутствии LM609 /фиг 5B/. Таким образом, интегрин $\alpha_v\beta_3$ детектируемый LM609 антителом активно не экспрессируется зрелыми кровеносными сосудами, присутствующими в 10-дневном необработанном курином эмбрионе. Как показано в модели CAM и следующих примерах, хотя кровеносные сосуды подвергаются новому росту в ходе нормального эмбриогенеза или индуцируются цитокинами или опухолью, кровеносные сосуды экспрессируют $\alpha_v\beta_3$. Однако, после активного процесса неоваскуляризации, развитие сосудов прекращается и экспрессия $\alpha_v\beta_3$ уменьшается до уровней, не детектируемых иммуофлуоресцентным анализом. Такая регуляция $\alpha_v\beta_3$ экспрессии в кровеносных сосудах, подвергаемых ангиогенезу, контрастирующая с отсутствием экспрессии в зрелых сосудах, обеспечивает уникальную способность настоящего изобретения контролировать и ингибировать ангиогенез, как это показано в следующих ниже примерах в качестве модели использующей систему анализа CAM-ангиогенеза.

6. Анализ CAM ангиогенеза

А. Ангиогенез, индуцированный факторами роста

Было показано, что ангиогенез может индуцироваться цитокинами или факторами роста на что ссылаются в Примере 5A. В описанных экспериментах ангиогенез в препарате CAM, описанном в Примере 5 индуцировали факторами роста, которые применяли местно на кровеносных сосудах CAM.

Ангиогенез индуцировали путем помещения фильтровального диска Ватмана /размером 5 x 5см/ Ватман, фильтровальная бумага №1/, насыщенного сбалансированным солевым раствором Ханкса /HBSS GIBCO Гранд айлэнд, Нью-Йорк/ или HBSS, содержащим 150 нанограммов миллилитр /нг/мл/ рекомбинантного основного фибробластного фактора роста / β FGF/ /Гензим, Кембридж, МА/ на CAM 10-дневного куриного эмбриона в области, лишенной кровеносных сосудов, и окошко далее закрывали лентой. В других анализах 125нг/мл β FGF также оказались эффективными в индуцировании роста кровеносных сосудов. За развитием ангиогенеза следили через 72 часа с помощью фотомикроскопии. CAM резко

замораживали и бикм криостатные срезы фиксировали ацетоном и окрашивали методом иммуофлуоресценции, как описано в примере 5C, 10мкг/мл анти- β_1 моноклонального антитела CSAT или LM609.

Иммуофлуоресцентная фотомикрография на фиг 5C показывает усиленную экспрессию $\alpha_v\beta_3$ в ходе β FGF-индуцированного ангиогенеза на куриной CAM в контрасте с отсутствием $\alpha_v\beta_3$ экспрессии в необработанных куриных CAM, как это показано на фиг 5B. $\alpha_v\beta_3$ легко детектируется на большинстве /75 - 80%/ сосудов β FGF-обработанных CAM. Кроме этого, экспрессия интегрин β_1 не изменяется относительно экспрессии, наблюдаемой в необработанных CAM, поскольку β_1 также легко детектируется на стимулированных кровеносных сосудах.

Относительную экспрессию $\alpha_v\beta_3$ и β_1 интегрин β_1 далее определяли количественно в ходе β FGF-индуцированного ангиогенеза с помощью анализа лазерного конфокального изображения CAM криостатных срезов. Затем окрашенные срезы анализировали на лазерном конфокальном микроскопе Цейса. Двадцать пять сосудов, окрашенных LM609, и 15, окрашенных CSAT, /средний размер - 1200мм², интервал размеров - 350 - 3500мм²/ выбирали из случайной партии и среднюю родаминовую флуоресценцию для каждого сосуда в расчете на единицу площади измеряли в произвольных единицах методом анализа лазерного конфокального изображения. Полученные данные выражали, как среднюю интенсивность флуоресценции в произвольных единицах сосудов \pm стандартная ошибка /SE/.

Результаты, представленные на фиг 6 показывают, что окрашивание $\alpha_v\beta_3$, существенно усилено /примерно в 4 раза/ на CAM, обработанных β FGF в соответствии с определением методом Wilcoxon Rank Sum test /P < 0.0001/, тогда как β_1 окрашивание существенно не менялось при обработке β FGF.

Далее CAM-анализ использовали для изучения эффекта другого мощного индуктора ангиогенеза, альфа-фактора некроза опухоли /TNF α /, на экспрессию β_1 и β_3 интегрин. Фильтровальные диски, пропитанные либо β FGF, или TNF α и помещенные на CAM 10-дневных эмбрионов, как было обнаружено, промотируют локальный ангиогенез через 72 часа.

Полученные результаты представлены на фотомикрографиях CAM в необработанном состоянии /фиг 7A/, обработанных β FGF /фиг 7B/ или обработанных TNF α /фиг 7C/. Кровеносные сосуды легко различимы на препаратах, обработанных как β FGF, так и TNF α , но они отсутствуют на необработанном CAM. Таким образом, местное применение системы фактор роста/цитокин приводит в результате к индуцированию ангиогенеза от зрелых сосудов на площади соседней с участком, на котором первоначально отсутствовали кровеносные сосуды. На основании β FGF-индуцированных кровеносных сосудов и сопутствующей экспрессии как показано на фиг 5C, можно сделать вывод, что обработка TNF α обеспечивает сравнимую активность.

Эти результаты указывают на то, что как у че-

ловека, так и у курицы кровеносные сосуды, принимающие участие в ангиогенезе, демонстрируют повышенную экспрессию $\alpha_v\beta_3$

Аналогичным образом, экспрессия $\alpha_v\beta_3$ на культивированных эндотелиальных клетках может вызываться различными цитокинами *in vitro* как это описано Janat с сопр., в *J Cell Physiol*, 151 588/1992/, Enenstein с сопр., *Exp Cell Res*, 203 499 /1992/ и Swerlick с сопр., в *J Invest Derm*, 99 715/1993/

Влияние на ангиогенез, индуцированный фактором роста, антитела и пептидного ингибитора продемонстрировано в Примерах 7А и 7В

В Эмбриональный ангиогенез

Получение CAM для оценки эффекта ингибиторов ангиогенеза на естественное образование эмбрионной сосудистой системы осуществлялось с использованием 6-дневных эмбрионных куриных эмбрионов, как было описано ранее. На этой стадии развития, кровеносные сосуды подвергаются де novo росту и таким образом обеспечивают полезную систему для определения вероятности участия $\alpha_v\beta_3$ в эмбрионном ангиогенезе. CAM-систему готовили как описано выше, за исключением того, что анализ проводили на 6-дневных эмбрионах, а не на 10-й день. Влияние на эмбрионный ангиогенез с помощью обработки антителами и пептидами настоящего изобретения продемонстрировано в примере 7С

С Ангиогенез индуцированный опухолями

С целью исследования роли $\alpha_v\beta_3$ в ангиогенезе, индуцированном опухолью, различные $\alpha_v\beta_3$ - отрицательные человеческие меланомные и карциномные фрагменты использовали в CAM-анализе, при этом их предварительно выращивали и выделяли из CAM 17-дневного куриного эмбриона, как это описано Brooks с сопр., в *J Cell Biol*, 122 1351 /1993/ и в настоящем тексте. Такие фрагменты вызвали обширную неоваскуляризацию в присутствии лишь буфера

Ангиогенез индуцировали в CAM-аналитической системе непосредственным присоединением фрагмента опухоли к CAM. Приготовление CAM куриного эмбриона идентично методике, описанной выше. Вместо фильтровального бумажного диска, 50мг - 55мг фрагмент меланомной опухоли человека M211, человеческой опухоли легочной карциномы UCLAP-3, клеточной линии FG карциномы поджелудочной железы человека /Cheresh с сопр., *Cell*, 58 945-953, 1989/, или человеческой ларингеальной карциномной клеточной линии Her3, все из которых являются $\alpha_v\beta_3$ отрицательными опухолями, помещали на CAM на площади, которая первоначально была лишена кровеносных сосудов

M21L человеческая меланомная клеточная линия, UCLAP-3 человеческая легочная карциномная клеточная линия, FG клеточная линия карциномы поджелудочной железы или Her3 человеческая ларингеальная карциномная клеточная линия, все $\alpha_v\beta_3$ отрицательные, использовали для выращивания твердых человеческих опухолей на CAM куриного эмбриона. Суспензию в виде отдельных клеток 8×10^6 M21-1 UCLAP-3 и FB или 5×10^5 Her3 клеток вначале применяли на CAM в общем объеме 30 микролитров стерильной

HBSS. Окошки закрывали лентой и эмбрионы инкубировали в течение 7 дней для обеспечения роста человеческих опухолевых повреждений. По истечении 7 дней, теперь уже 17-дневные эмбрионные опухоли подвергали резекции из CAM и проводили операцию очистки от окружающей CAM ткани. Опухоли нарезали на фрагменты весом 50 - 55мг для использования в анализе на рост опухоли или ангиогенез. Фрагменты опухоли помещали на новый ряд 10-дневных куриных эмбрионных CAM в соответствии с описанным в примере 6А на площади, лишенной кровеносных сосудов

Опухоли растущие *in vivo* на куриных эмбрионных CAM окрашивали для определения $\alpha_v\beta_3$ экспрессии mAB LM609, как это описано в примере 3А. Специфического окрашивания опухолевых клеток не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии $\alpha_v\beta_3$ экспрессии

Такие CAM опухолевые препараты далее обрабатывали в соответствии с 7Д и 7Е с целью измерения эффектов антител и пептидов на ангиогенез, индуцированный опухолью. CAM опухолевые препараты также обрабатывали, как описано в Примерах 8, 9 и 12 для измерения влияния антител и пептидов на регрессию опухоли и апоптоза ангиогенных кровеносных сосудов и сосудистых клеток

7 Ингибирование ангиогенеза, измеренное в CAM анализе

А Ингибирование ангиогенеза, индуцированного фактором роста путем местного применения ингибиторов

1/ Обработка моноклональными антителами

Для определения того, играет ли $\alpha_v\beta_3$ активную роль в ангиогенезе, фильтровальные диски, насыщенные bFGF или TRFa помещали на CAM, затем моноклональные антитела /обозначаемые также, как mAb/, LM609 /специфичные к $\alpha_v\beta_3$ /, CSAT /специфичные к β_1 /, или P3G2 /специфичные к $\alpha_v\beta_3$ / добавляли к препарату

Ангиогенез индуцировали на CAM 10-дневных куриных эмбрионах с помощью фильтровальных дисков, насыщенных bFGF. Затем такие диски обрабатывали 50мг HBSS, содержащего 25мг mAb в общем объеме 25мкл стерильного HBSS через 0,24 и 48 часов. Через 72 часа CAM собирали и помещали в 35мм чаши Петри и однократно промывали 1мл фосфатного буферного физиологического раствора. Донную сторону фильтровальной бумаги и CAM ткань далее анализировали с помощью стереомикроскопа Олимпус с использованием двух наблюдателей работающих двойным слепым /double-blind/ методом. Ингибирование ангиогенеза считалось значительным, когда CAM проявляла > 50% уменьшение инфильтрации кровеносных сосудов CAM непосредственно под диском. Эксперименты повторяли четыре раза в расчете на антитело в присутствии 6 - 7 эмбрионов в зависимости от условий

Результаты влияния mAb обрабатывали на /bFGF-индуцированный ангиогенез представлены на фиг 8А - 8В. Необработанный CAM-препарат, лишенный кровеносных сосудов, показан на фиг 8А с целью сравнения с bFGF-кровеносно-сосудистой индукцией, показанной на фиг 8В, а на фиг 8С - 8Е показано влияние действия mAb. Око-

по 75% таких CAM обработанных мАб LM609 проявляли > 50% ингибирование ангиогенеза, как это показано на фиг 8Е, и во многих образцах не наблюдалась инфильтрация сосудов. В отличие от этого, буферный контроль /фиг 8А/ и диски, обработанные мАб CSAT /фиг 8С/ и P3G2 /фиг 8Д/ показали обширную васкуляризацию.

Идентичные результаты были получены при индуцировании ангиогенеза с помощью TNF α . Для изучения эффектов тех же антител на предварительно существующие зрелые кровеносные сосуды, присутствующие в результате нормального их развития по соседству с участками, лишенными сосудов, фильтровальные диски, насыщенные мАб, помещали на сосудистые участки CAM 10-дневных эмбрионов, на которых не проводили местное применение цитокина. Ни один из трех мАб не воздействовал на преварительно существующие сосуды о чем свидетельствовало визуальное наблюдение с помощью стереомикроскопа. Так мАб LM609 селективно ингибирует только рост новых кровеносных сосудов и не влияет на зрелые кровеносные сосуды присутствующие на соседних площадях. Тот же эффект наблюдался при применении синтетических пептидов локально или внутривенно, как это описано в примерах 7А2/ и 7Е2/, соответственно.

2/ Обработка синтетическими пептидами

CAM-анализы также осуществлялись с помощью синтетических пептидов изобретения с целью определения влияния циклических и линейаризованных пептидов на ангиогенез, индуцированный фактором роста. Такие пептиды готовили как описано в Примере 1 и 80мкг пептида помещали в общий объем в 25мкл стерильного HBSS. Пептидный раствор применяли на CAM-препарате немедленно и затем снова через 24 и 48 часов. Через 72 часа фильтровальную бумагу и окружающую CAM ткань отсекали и наблюдали, как описано выше.

Результаты такого анализа были аналогичны тем, что показаны на фиг 9А - 9С, как описано в Примере 7Е2/ где синтетические пептиды внутривенно вводили в кровеносные сосуды, индуцированные опухолью. В присутствии контрольного пептида 62186, β FGF-индуцированные кровеносные сосуды оставались незатронутыми, как показано на фиг 9А. В отличие от этого, при применении на фильтре циклического RGD пептида, 62814, образование кровеносных сосудов ингибировалось, оставляя площадь, лишенную новой сосудистой системы. Этот эффект по внешним признакам аналогичен эффекту, показанному на фиг 9В, как это описано в примере 7Е2/, ниже. Кроме этого, также, как показано на фиг 9С, для случая внутривенно инъекции пептидов, на площадях, где зрелые кровеносные сосуды находились достаточно далеко от расположения фильтра, насыщенного фактором роста, эффект от местного применения синтетических пептидов не наблюдался на таких основных сосудах. Таким образом, ингибиторная активность пептидов в отношении ангиогенеза ограничена участками ангиогенеза, индуцированными факторами роста, и при этом не затрагиваются соседние предварительно существующие зрелые сосуды и не на-

блюдается вредной цитотоксичности в отношении окружающей площади.

Аналогичные анализы были осуществлены с использованием других синтетических пептидов, полученных в Примере 1 и перечисленных в Таблице 1.

В Ингибирование ангиогенеза, индуцированного фактором роста в результате внутривенного применения ингибиторов.

1/ Обработка моноклональными антителами

Эффект на ангиогенез, индуцированный фактором роста, моноклональных антител, внутривенно инъектированных в CAM препараты, также оценивался в отношении использования в настоящем изобретении.

Получение куриных эмбрионных CAM для внутривенных инъекций проводилось практически аналогично методике Примера 7А при некоторых модификациях. В ходе проверки яиц на свет репые кровеносные сосуды подвергали отбору и на оболочке яйца ставили метки для указания их положения. В скорлупе просверливали отверстия и в них загружали CAM, а β FGF-насыщенные фильтровальные бумаги помещали на CAM, как описано выше. Окна закрывали стерильной лентой и эмбрионы помещали в инкубатор. Через 24 часа второе небольшое окошко тщательно вырезали в боковой стороне яичной скорлупы непосредственно над выступающими кровеносными сосудами, отобранными ранее. Тщательно удаляли внешнюю яичную скорлупу, оставляя незатронутыми эмбрионные мембраны. Мембранную оболочку делали прозрачной с помощью небольшой капли минерального масла /Перкин-Элмер Корп., Норвотк, СТ/, что позволяет легко визуализировать кровеносные сосуды. Очищенные стерильные мАб, или синтетические пептиды, последние из которых описаны ниже, инокулировали непосредственно в кровеносные сосуды с помощью иглы 30 калибра при дозе 200мкг IgG- на эмбрион в общем объеме в 100мкл стерильной PBS. Окна заклеивали лентой и эмбрионам давали инкубироваться в течение 72 часов. Фильтровальные диски и окружающие CAM ткани анализировали, как описано выше.

Для определения локализации LM609 в CAM тканях или в опухолевых тканях, как показано в тексте и следующих примерах, которые предварительно инокулировали внутривенно LM609, фиксированные срезы блокировали 2,5% BSA в HBSS в течение 1 часа при комнатной температуре с последующим окрашиванием 1:250 разбавлением козьего анти-мышинного родамин-меченого вторичного антитела /Tago/. Затем срезы анализировали с помощью иммуофлуоресцентного микроскопа Цейса.

Результаты внутривенной обработки антителом индуцированных β FGF кровеносных сосудов CAM препаратов представлены на фиг 10А - 10С. На фиг 10А показан ангиогенез, индуцированный в результате обработки β FGF. Как видно из фиг 10В не наблюдается изменений относительно присутствия β FGF индуцированной сосудистой системы при внутривенном воздействии на мАб P3G2, анти- $\alpha\beta_3$ -антитело. В отличие от этого, обработка CAM препарата ангиогенезиндуцированного β FGF

с помощью LM609, анти- $\alpha_v\beta_3$ антителом, приводит в результате к полному ингибированию роста новых сосудов в фильтровальную область, как это показано на фиг 10C. Ингибирующее влияние на ангиогенез, таким образом, является результатом ингибирования $\alpha_v\beta_3$ рецепторной активности под воздействием LM609 анти- $\alpha_v\beta_3$ -специфичного антитела. Поскольку блокировка $\alpha_v\beta_3$ не ингибирует образование сосудистой системы в CAM фильтрующем сайте, $\alpha_v\beta_3$ не является существенным компонентом по сравнению с $\alpha_v\beta_3$ в отношении роста новых сосудов.

2/ Обработка синтетическими пептидами

Синтетические пептиды, полученные в Примере 1, по отдельности внутривенно инъецировали в кровеносные сосуды, индуцированные фактором роста в CAM препаратах, как описано выше. Влияние пептидов на жизнеспособность сосудов оценивали аналогичным образом.

С Ингибирование эмбрионного ангиогенеза путем местного применения

1/ Обработка моноклональными антителами

Для определения факта участия $\alpha_v\beta_3$ в эмбрионном ангиогенезе влияния LM609 на *de novo* рост кровеносных сосудов на CAM изучали на 6-дневных эмбрионах, т.е. на стадии, отмеченной активной неоваскуляризацией, в соответствии с описанным в Примере 5A. CAM анализ проводили в соответствии с методикой примера 6C с последующим местным применением дисков, насыщенных МАБ, помещенных на CAM 6-дневных эмбрионов в отсутствие цитокинов. Через 3 дня CAM подвергали резекции и фотографировали. Каждый эксперимент включал 6 эмбрионов на группу и повторяли 2 раза.

В таких условиях антитело LM609 /фиг 11C/, но не CSAT /фиг 11A/ или P3G2 /фиг 11B/, предотвращали сосудистый рост, это указывает на то, что $\alpha_v\beta_3$ играет существенную роль в эмбрионной неоваскуляризации, которая не зависит от добавленного фактора роста для индукции ангиогенеза.

2/ Обработка синтетическими пептидами

Синтетические пептиды, полученные в примере 1, по отдельности добавляли в эмбрионный CAM препарат, полученный выше, в соответствии с описанным в Примере 5A2/, путем местного применения на CAM или внутривенного применения на кровеносных сосудах.

Влияние пептидов на жизнеспособность сосудов оценивали аналогичным образом.

Д Ингибирование ангиогенеза индуцированного опухолью в результате местного применения

1/ Обработка моноклональными антителами

Помимо описанного выше анализа на ангиогенез, в котором оценивали влияние анти- $\alpha_v\beta_3$ -антагонистов, LM609 и пептидов 62181, 62184, 62185, 62187 и 62880 на эмбрионный ангиогенез, исследовали также роль $\alpha_v\beta_3$ в ангиогенезе, индуцированном опухолью. В качестве индуктора использовали $\alpha_v\beta_3$ негативные человеческие M21-L меланомные фрагменты, предварительно выращенные и выделенные из CAM 17-дневного куриного эмбриона. Эти фрагменты получали в соответствии с методикой примера 6C.

Как описано выше в Примере 7A1, МАБ раздельно локально применяли на опухолевых фраг-

ментах при концентрациях 25мкг в 25мкл HBSS и затем окна заклеивали лентой. Снова добавляли МАБ тем же способом через 24 и 48 часов. Через 72 часа опухоли и окружающие CAM ткани анализировали в соответствии с методикой примера 7A1.

Как описано в примере 6C, опухоли начально получали трансплантацией культивированных M21-L клеток, которые не экспрессировали интегрин $\alpha_v\beta_3$ как это описано Felding-Habermann с сотр., J Clin Invest, 89 2018 /1992/ на CAM 10-дневного куриного эмбриона. Такие $\alpha_v\beta_3$ негативные фрагменты индуцировали обширную неоваскуляризацию в присутствии только буфера, или МАБ CSAT /анти- β_1 /, либо P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / В отличие от этого МАБ LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / снимали инфильтрацию большинства сосудов в опухолевой массе и окружающей CAM.

С целью количественного определения влияния МАБ на ангиогенез, индуцированный опухолью, кровеносные сосуды, входящие в опухоль в рамках фокусной плоскости CAM подсчитывали с помощью стереомикроскопа двумя наблюдателями двойным слепым /double-blind/ методом. Каждая полоса данных на фиг 12 представляют собой среднее число сосудов \pm SE от 12 CAM в каждой группе дублированных экспериментов.

Такой количественный анализ обнаруживает трех-кратное понижение числа сосудов, входящих в опухоль, обработанную МАБ LM609 по сравнению с опухолями, обработанными буфером или другими МАБ, P3G2 или CSAT /P < 0,0001/ в соответствии с разрядным суммарным тестом Вилкоксона. Тот факт, что M21-1 опухоли не экспрессируют $\alpha_v\beta_3$ указывает на то, что МАБ LM609 ингибирует ангиогенез - непосредственным воздействием на кровеносные сосуды, а не на опухолевые клетки. Эти результаты согласуются с гистологическим распределением $\alpha_v\beta_3$ в раковой тканевой биопсии, представленной на фиг 3A - 3D, где распределение $\alpha_v\beta_3$ ограничено кровеносными сосудами в опухоли, а не самими клетками опухоли.

2/ Обработка синтетическими пептидами

Синтетические пептиды, полученные в примере 1, локально применяли на опухоль-индуцированной ангиогенной CAM аналитической системе в соответствии с описанным выше. Аналогичным образом оценивали влияние пептидов на жизнеспособность сосудов.

Е Ингибирование ангиогенеза, индуцированного опухолью с помощью внутривенного применения

1/ Обработка моноклональными антителами

Опухоль-индуцированные кровеносные сосуды, полученные согласно методике примера 7D1, также обрабатывали МАБ, применяемой путем внутривенной инъекции. Опухоли помещали на CAM, как описано в Примере 7D1, и окна заклеивали лентой и спустя 24 часа 200мкг очищенного МАБ инокулировали внутривенно в кровеносные сосуды куриного эмбриона, как это описано выше. Затем куриные эмбрионы инкубировали в течение 7 дней. Затем степень ангиогенеза наблюдали, как описано выше. Как описано в примере 8, ниже, после этого периода времени, опухоли подверга-

ли резекции и анализировали их вес для определения влияния воздействия антитела на рост или давление опухоли

2/ Обработка синтетическими пептидами

Оценивали также влияние воздействия пептида на сосудистую систему, индуцированную опухолью в САМ аналитической системе. Опухолево-САМ препарат использовали, как описано выше за исключением того, что вместо внутривенной инъекции МАБ синтетические пептиды, полученные в соответствии с методиками примера 1 и примера 7А2, по отдельности внутривенно инъецировали в видимые кровеносные сосуды

Результаты САМ анализа в присутствии циклического пептида 66203, содержащего HCl-соль, и контрольного пептида 62186 представлены на фиг 9А - 9С. Из фиг 9А видно, что обработка контрольным пептидом не оказывает влияния на обильное образование крупных кровеносных сосудов, которые индуцируются обработкой опухолью с ростом в области первоначально лишенной кровеносных сосудов САМ. В отличие от этого в том случае, когда циклический RGD пептид, 66203, антагонист на $\alpha_v\beta_3$ применяли на фильтре, образование кровеносных сосудов ингибировалось, оставляя площадь, лишенную новой сосудистой системы, как это показано на фиг 9В. Ингибирующий эффект RGD-содержащего пептида был специфичным и локализованным, о чем свидетельствует отсутствие каких-либо нежелательных эффектов, касающихся сосудов, расположенных по соседству с расположением опухоли. Так, согласно фиг 9С, в том случае, когда ингибиторные пептиды внутривенно инъецируются в САМ аналитическую систему, не наблюдается эффекта на ранее существовавшие зрелые сосуды, присутствующие в САМ на площадях дистанцированных от положения опухоли. Предварительно существующие сосуды при таком расположении не подвергают влиянию ингибирующего пептида, который протекает внутри таких сосудов, хотя генерация новых сосудов из предварительно существующих сосудов в опухолевую массу подвергается ингибированию. Так, синтетические пептиды, включающие пептиды 66203 и 62184, предварительно описанные в лиганд-рецепторном анализе в Примере 4, являющиеся антагонистами, как было продемонстрировано в настоящее время, ингибируют ангиогенез, который ограничен сосудами подверженными развитию, а не зрелыми и предварительно существующими сосудами. Кроме этого, внутривенное вливание пептидов не приводит в результате к какому-либо вредному цитотоксическому воздействию на окружающую область, о чем свидетельствует интактная сосудистая система, показанная на фиг 9С.

Аналогичные анализы осуществляли с другими синтетическими пептидами, полученными в примере 1 и перечисленными в Таблице 1

8 Ингибирование роста опухолевой ткани с помощью $\alpha_v\beta_3$ -антагонистов, измеренное в САМ анализе

Как показано в примере 7Д1, помимо визуальной оценки влияния анти- $\alpha_v\beta_3$ -антагонистов на

ангиогенез, индуцированный фактором роста или опухолью, эффект антагонистов также оценивали измерением любых изменений опухолевой массы после воздействия. Для такого анализа САМ аналитическая система ангиогенеза, индуцированного опухолью, была получена как описано в Примере 6С и 7Д. К концу 7-го дня инкубационного периода полученные в результате опухоли подвергали резекции от САМ и обрезали от любой оставшейся САМ ткани, промывали 1мл фосфатного буферного физиологического раствора и для каждой опухоли определяли вес во влажном состоянии

Кроме этого, получение опухоли для микроскопического гистологического анализа включает фиксацию представителей опухолей в Bulins Fixative в течение 8 часов и погружение в парафин. Серийные секции вырезали и окрашивали гематоксилином и эозином /H & E/ для микроскопического анализа. Гладсон с сотр., J Clin Invest, 88 1924 /1991/. Секции фотографировали с помощью микроскопа Олимпус при 250-кратном увеличении

А Местное применение

Результаты полученные при взвешивании типичной человеческой меланомной опухоли /M21L/ в результате местного применения контрольного буфера /HBSS/, P3C2 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / или LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / представлены в Таблице 4. Число эмбрионов оценивали для каждой обработки средним весом опухоли в миллиграммах /mg/, причем каждое значение рассчитывалось с учетом стандартного отклонения среднего значения, как это указано в конце таблицы

Таблица 4

№ эмбриона /mg/	МАБ обработка	Вес опухоли
1	HBSS	108
2		152
3		216
4		270
5		109
6		174
1	P3G2	134
2		144
3		408
4		157
5		198
6		102
7	LM609	124
8		99
1		24
2		135
3		17
4		27
5		35
6		68
7		48
8		59

Продолжение таблицы 4

Обработка мАб	Средний вес опухоли /мг/
HBSS контроль	172 ± 26
P3G2	171 ± 36
LM609	52 ± 13

Экспозиция $\alpha\beta_3$ негативной человеческой меланомной опухолевой массы в САМ аналитической системе к LM609 вызывает уменьшение среднего веса необработанной опухоли от значения 172мг ± 26 до 52мг ± 13

P3G2 антитело не оказывает влияния на массу опухоли. Так, блокировка $\alpha\beta_3$ рецептора местным применением $\alpha\beta_3$ -специфичного LM609 антитела приводит в результате к регрессии опухолевой массы, а также к ингибированию ангиогенеза, как это показано в предыдущих примерах. Измеренный диаметр опухолевой массы, полученной в результате воздействия P3G2, составлял в среднем величину от 8 миллиметров до 1 сантиметра. В отличие от этого, LM609-обработанные опухоли имели диаметр 2 - 3мм

Замороженные срезы таких опухолей обнаруживали незатронутую цитоархитектуру опухоли, подвергшейся воздействию P3G2 в отличие от потери организованной клеточной структуры в опухоли подвергшейся воздействию LM609. Поэтому $\alpha\beta_3$ рецепторная активность существенна для того, чтобы $\alpha\beta_3$ негативная опухоль сохраняла свое питание для поддержания массы в результате развития $\alpha\beta_3$ -экспрессирующей сосудистой системы. Блокировка $\alpha\beta_3$ с помощью $\alpha\beta_3$ антагонистов изобретения приводит в результате к ингибированию ангиогенеза в опухоль, что в конечном счете приводит к уменьшению массы опухоли

В. Внутривенное применение

Результаты взвешивания типичной карциномной опухоли /UCLAP-3/ в результате внутривенного применения контрольного буфера /PBS, фосфатный буферный физиологический раствор/, CSAT /анти- β_1 / или LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / представлены в таблице 5. Число эмбрионов оценивали для каждой обработки средним весом опухоли с учетом стандартного отклонения среднего значения, как это показано в конце таблицы

Таблица 5

№ эмбриона /мг/	мАб обработка	Вес опухоли
1	PBS	101
2		80
3		67
4		90
1	CSAT	151
2		92
3		168
4		61
5		70
1	LM609	16
2		54
3		30
4		20

Продолжение таблицы 5

5		37
6		39
7		12

Обработка мАб	Средний вес опухоли /мг/
PBS контроль	85 ± 7
CSAT	108 ± 22
LM609	30 ± 6

Экспозиция $\alpha\beta_3$ -негативной человеческой карциномной опухолевой массы в САМ аналитической системе к LM609 вызывало уменьшение среднего веса необработанной опухоли от значения 85мг ± 7 до 30мг ± 6. CSAT антитело не оказывает существенного влияния на вес опухолевой массы. Таким образом, блокировка $\alpha\beta_3$ рецептора в результате внутривенного применения $\alpha\beta_3$ -специфичного LM609 антитела приводит к регрессии карциномы, как это имеет место и в случае меланомной опухолевой массы описанной выше, а также к ингибированию ангиогенеза, как это продемонстрировано в предыдущих примерах. Кроме этого, рост человеческой меланомной опухоли аналогичным образом ингибируется внутривенной инъекцией LM609

9. Регрессия роста опухолевой ткани в присутствии $\alpha\beta_3$ антагонистов, измеренная в САМ анализе

Для оценки влияния $\alpha\beta_3$ антагонистов на рост опухоли и ее выживание, фрагменты человеческой меланомы и фрагменты карциномы легких, поджелудочной железы и гортани помещали на САМ 10-дневных эмбрионов в соответствии с описанным в примере 5А

А. Внутривенное применение

1/ Обработка моноклональными антителами

а. Обработка LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / и CSAT /анти- β_1 /

Через 24 часа после имплантации САМ фрагментами карциномы $\alpha\beta_3$ -негативной человеческой меланомы M21-L карциномы поджелудочной железы FG, человеческой легочной карциномы UCLAP-3, или человеческой ларингеальной карциномы HEP3, эмбрионы внутривенно инъецировали только PBS или однократной дозой /300мкг/100мкл/ мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / или CSAT /анти- β_1 / Опухолям давали возможность размножаться еще в течение 6 дней. К концу периода инкубации опухоли подвергали тщательной резекции и освобождали от окружающей САМ ткани. Резекцию опухоли проводили два независимых исследователя, удаляющих только легко определяемую твердую опухолевую массу. Опухоли имели хорошо обозначенные края и таким образом тонкая полу-прозрачная мембрана /САМ/, которая легко различима с твердой опухолевой массой удалялась без нарушения, самой опухолевой массы. Подвергнутые резекции опухоли взвешивали и подвергали морфологическому и гистологическому изучению

Как показано на фиг 13 веса влажных опухолей к концу 7-го дня определяли и сравнивали с исходным весом опухоли до обработки. Каждая полоса представляет собой среднее значение ± < SE для 5-10 опухолей на группу мАб LM609 зна-

чительно ингибирует рост опухоли / $p < 0,001$ / по сравнению с контрольными образцами для всех испытуемых опухолей. Во всех случаях имела место пролиферация опухолей обработанных PBS или CSAT. В отличие от этого, МАБ LM609 не только предотвращает рост таких опухолей, но индуцирует обширную регрессию в большинстве случаев. Важно отметить, что клетки таких опухолей не экспрессируют интегрин $\alpha_v\beta_3$ демонстрируя тот факт, что ингибирование роста обязано анти-ангиогенным эффектам такого анти-тела на сосудистую систему, а не на непосредственно опухолевые клетки.

5/ Обработка LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_5$ /

Человеческие M21-L меланомные опухолевые фрагменты /50мг/ имплантировали на CAM 10-дневных эмбрионах, как описано в примере 5А. Через 24 часа эмбрионы внутривенно инъецировали только PBS или однократной дозой /300мкг/100мкл / МАБ LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / или P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_5$ / Опухолям давали размножаться, как описано в примере 9А1/а, и подвергали морфологическому и гистологическому изучению.

Представители M21-L опухолей, обработанных МАБ P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_5$ / или LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / подвергались морфологическому исследованию. Обработанные P3G2 опухоли были крупными /8мм в диаметре/ и имели хорошо выраженную сосудистую систему, тогда как обработанные МАБ LM609 были значительно мельче /3мм в диаметре/ и не содержали детектируемых кровеносных сосудов.

Далее опухоли дополнительно исследовали приготвлением гистологических срезов и окрашиванием гематоксилином и эозином, как описано в примере 9А1/а. Как показано на фиг 14 /верхняя часть/, опухоли, обработанные МАБ P3G2 /анти- $\alpha_v\beta_5$ / демонстрировали многочисленные жизнеспособные и активно делящиеся опухолевые клетки, как показано митотическими значениями /острие стрелки/ и множеством кровеносных сосудов /стрелки/ по всей опухолевой строме. В отличие от этого, небольшое количество или отсутствие жизнеспособных опухолевых клеток или кровеносных сосудов детектировалось в опухолях, обработанных МАБ LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / /фиг 14, нижняя часть/. Эти результаты демонстрируют тот факт, что антагонисты интегрина $\alpha_v\beta_3$ ингибируют индуцированную опухолью ангиогенез, что приводит к остановке роста и регрессии большого числа человеческих опухолей *in vivo*. Важно отметить, что эмбрионы, изученные через 7 дней роста опухоли /эмбрионный 17-ый день/ оказались нормальными в ходе тщательного изучения в независимости от того были ли они обработаны $\alpha_v\beta_3$ антагонистом. Эти открытия указывают на то, что антагонисты такого интегрина нетоксичны в отношении развивающихся эмбрионов.

2/ Обработка синтетическими пептидами

Человеческие M21-L меланомные опухолевые фрагменты /50мг/ имплантировали на CAM 10-дневных эмбрионов, как описано в Примере 5А. Через 24 часа эмбрионам делали однократную внутривенную инъекцию 300мкг/100мкл цикло RADfV /69601/ или цикло RGDfV /66203/. Через 72 часа общего времени опухоли удаляли, подвергали

ли морфологическому изучению и фотографировали стереомикроскопом, как описано в примере 9А1/.

Увеличенные фотографии, показанные на фиг 15А - 15Е соответствуют следующему: на фиг 15А изображены дубликатные образцы, обработанные цикло-RADfV пептидом /69601/, на фиг 15В - дубликатные образцы обработанные цикло-RGDfV пептидом /66203/, на фиг 15С показана соседняя ткань, взятая с некоторых эмбрионов, обработанных цикло-RGDfV пептидом /66203/ на фиг 15Д и 15Е изображено сильное увеличение /13-кратное/ опухоли, обработанной пептидом. На фиг 15Д изображены нормальные кровеносные сосуды опухоли, обработанной контрольным пептидом /69601/. На фиг 15Е изображены примеры разрушенных кровеносных сосудов опухолей обработанных цикло-RGDfV пептидом /66203/ /стрелки/.

Полученные результаты иллюстрируют тот факт, что лишь пептид 66203 ингибирует образование сосудов, а также что сосуды в CAM ткани соседней с опухолью не затрагиваются.

10 Регрессия роста опухолевой ткани в присутствии $\alpha_v\beta_3$ антагонистов, измеренная *in vivo* модельным анализом на кроличьем глазу.

Влияние анти- $\alpha_v\beta_3$ антагонистов на ангиогенез, индуцированный фактором роста, может наблюдаться в природных прозрачных структурах примерами которых может служить роговая оболочка глаза. Новые кровеносные сосуды растут от края роговой оболочки глаза, который хорошо снабжается кровью, в направлении центра роговой оболочки, которая в нормальном состоянии не снабжается кровью. Такие стимуляторы ангиогенеза, как bFGF при применении на роговой оболочке глаза индуцируют рост новых кровеносных сосудов от края оболочки. Антагонисты ангиогенеза, применяемые на роговой оболочке глаза ингибируют рост новых кровеносных сосудов от края оболочки. Так, роговая оболочка подвергается ангиогенезу в результате инвазии эндотелиальных клеток от края роговой оболочки в жесткую коллаген-упакованную ткань роговой оболочки, что можно легко наблюдать визуально. Поэтому модельный анализ на кроличьем глазу обеспечивает *in vivo* модель для непосредственного наблюдения стимуляции и ингибирования ангиогенеза после имплантации соединений непосредственно в роговую оболочку глаза.

А *In vivo* модельный анализ на кроличьем глазу.

1/ Ангиогенез, индуцированный факторами роста

Ангиогенез индуцированный в *in vivo* модельном анализе на кроличьем глазу в присутствии фактора роста bFGF, причем подробности такого метода описаны ниже.

а Приготовление гидроновых гранул, содержащих фактор роста и моноклональные антитела.

Гидроновые полимерные гранулы, содержащие фактор роста и МАБ получали как описано D'Amato *et al*, в Proc Natl Acad Sci, 91 4082-4085 /1994/. Индивидуальные гранулы, содержащие 650нг фактора роста bFGF, связывали с сульфатом /Карфет, Марион Меррелл Доу кор-

порейшн/ с целью стабилизации β FGF и обеспечения его медленного выделения в окружающую ткань. Кроме этого, гидроновые гранулы готовили таким образом, чтобы они содержали 40мкг МАБ LM609 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / или МАБ P1F6 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / в PBS. Гранулы отливали в специально приготовленные Тefлоновые втулки, которые имели 2,5мм сердцевину, просверленную в их поверхностях.

Примерно 12 мкл отлитого материала помещали в каждую втулку и полимеризовали в течение ночи в стерильном колпаке. Затем гранулы стерилизовали облучением ультрафиолетовым светом.

ь Обработка моноклональными антителами

В каждом эксперименте использовали по три кролика, в один глаз которых помещали гранулу, содержащую β FGF и LM609, а в другой глаз загружали гранулу, содержащую β FGF и мышинный МАБ P1F6 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / . Использование спаренного глазного тестирования для сравнения LM609 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / с другими МАБ и PBS контрольными образцами обеспечивает средство точного тестирования для демонстрации значительных различий между испытанными МАБ.

P1F6 МАБ иммунореагирует с интегрином $\alpha\upsilon\beta_3$, который обнаружен на поверхности сосудистых эндотелиальных клеток но, по-видимому, не участвует в ангиогенезе. Для определения факта участия тАБ P1F6 в ангиогенезе готовили гранулы, содержащие только МАБ и анализировали их, как описано ниже, на факт того, что МАБ не индуцирует ангиогенез.

Все испытуемые МАБ очищали от асцитной жидкости с использованием Протеин-А Сефароза C1-4В аффинной колоночной хроматографии согласно хорошо известным способам. Элюированный иммуноглобулин затем диализовали против PBS и обрабатывали Детокси-гелем /Пьерсе Эммикалс/ с целью удаления эндотоксина. Как было показано, эндотоксин является мощным ангиогенным и противовоспалительным стимулянтom. Поэтому МАБ тестировали на присутствие эндотоксина с помощью Хромогенного лимулус амебоцитного лизатного анализа (Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate Assay) /Био-Виттакер/ и лишь те МАБ, которые не содержали детектируемых количеств эндотоксина использовали в модельном анализе на кроличьем глазу.

Гидроновую гранулу, содержащую β FGF и МАБ LM609 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ /или P1F6 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / вставляли в карман роговой оболочки глаза, образованный на глазах кролика. Гидроновая гранула также содержала сукралфат для стабилизации β FGF в ходе анализа. Индивидуальные гранулы имплантировали в созданные хирургическим путем "карманы", сформированные в мид-строме роговой оболочки глаз кролика. Хирургические операции проводили в стерильных условиях с использованием операционного микроскопа Вилд модели M691, снабженного пучковым дробителем, с которым была смонтирована камера для фотографической регистрации индивидуальных роговых оболочек глаза. "Карман" размером 3 x 5мм создавали в строме роговой оболочки делая 3мм разрез на половину толщины роговой оболочки лезвием 69 Биавер. Строму рассекали перифери-

чески с использованием шпателя для радужной оболочки глаза и гранулу имплантировали по ее периферическим краям на 2мм от лимбуса.

В течение последующих 14 дней / β FGF и МАБ диффундировали из имплантированной гранулы в окружающую ткань и в результате этого оказывали влияние на ангиогенез от края роговой оболочки глаза.

Представительные результаты каждой обработки изображены на фиг 16А - 16Е. Число присутствующих сосудов рассчитывали количественно и выражали в терминах часов, которые определяли следующим образом. Глаз делили на 12 равных секторов также, как это имеет место на циферблате часов. "Один циферблатный час сосудов" относится к такому количеству сосудов, которое заполняет площадь глаза эквивалентную одному часу на циферблате. Пять кроликов получивших лишь β FGF демонстрировали свежий ангиогенез, в котором новые кровеносные сосуды росли от края роговой оболочки в направлении ее центра, который в нормальном состоянии не имеет кровеносных сосудов. Один из таких кроликов имел лишь 1 циферблатный час сосудов в расчете на гранулу. Два кролика, получивших как β FGF, так и LM609 абсолютно не проявляли ангиогенеза вплоть до 14 дня после хирургического вмешательства. Один из таких кроликов имел 3 фокуса кровоизлияния и почечные сосуды к 14 дню. Два кролика, получивших β FGF и МАБ P3G2 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / и демонстрировали обширную васкуляризацию, в которой новые кровеносные сосуды росли от края роговой оболочки глаза в нее. Один из таких кроликов имел 1-2 часа сосудов в расчете на гранулу.

Как следует из модельного анализа на кроличьем глазу, ангиогенный эффект не наблюдается на нормальных паралимбальных сосудах в присутствии фактора роста β FGF у кроликов, получивших МАБ LM609 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / . В отличие от этого, ангиогенез наблюдался на паралимбальных сосудах в присутствии фактора роста β FGF у кроликов, получивших МАБ P3G2 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / . Полное ингибирование ангиогенеза роговой оболочки глаза при воздействии МАБ LM609 значительно выше, чем в присутствии анти-ангиогенных реагентов, о которых сообщалось ранее.

11 In vivo регрессия роста опухолевой ткани в присутствии антагонистов, измеренная химерным анализом мышь-человек.

In Vivo химерную модель человек-мышь генерировали заменой части кожи мыши линии SC1Д человеческой неонатальной крайней плотью /фиг 17/. После укоренения кожного трансплантата человеческую крайнюю плоть инокулировали клетками карциномы. После образования способной к изменению опухоли МАБ LM609 /анти- $\alpha\upsilon\beta_3$ / или PBS инъецировали в хвостовую вену мыши. Через 2-3 недели опухоль вырезали и анализировали путем взвешивания и гистологии.

А In vivo анализ химерной системы мышь человек.

In vivo химерную модель мышь-человек готовили в соответствии с описанным Yan с сотр., J Clin Invest, 91:986-996 /1993/. Если говорить вкратце, то 2см² квадратной площади кожи хирургически удаляли у мышей разновидности SC1Д /в

возрасте 6-8 недель/ и заменяли человеческой крайней плотью. Мышей анестезировали с площадью 5см^2 удаляли волосы с каждой стороны латерального абдоминального участка путем выбривания. Два круглых трансплантата площадью 2см^2 готовили путем удаления полной толщины кожи ниже фасции. Полную толщину человеческих кожных трансплантатов того же размера, производных человеческой неонатальной крайней плоти, помещали на раневые слои и зашивали на место. Трансплантант покрывали Band-Aid, который пришивали к коже. Для покрытия раны также применяли микропористую тканевую ленту.

M21L человеческую клеточную линию или MDA 23.1 клеточную линию карциномы грудной железы /ATCC HTB 26, $\alpha\beta_3$ негативная в соответствии с иммунореактивностью тканевых срезов в присутствии МАБ LM609/ использовали для образования твердых человеческих опухолей на трансплантатах человеческой кожи на мышцах линии SC1D. Одноклеточную суспензию 5×10^6 M21L или MDA 23.1 клеток инъецировали интрадермально в трансплантант человеческой кожи. Затем мышей наблюдали в течение 2-4 недель с целью оценки роста измеряемой человеческой опухоли.

В. Внутривенное применение

1/ Обработка моноклональными антителами

После роста измеряемых опухолей, мышей линии SC1D, которым делали инъекции M21L опухолевыми клетками, внутривенно инъецировали в хвостовую вену 250мкг МАБ LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / или PBS дважды в неделю в течение 2-3 недель. После этого, опухоли подвергали резекции с кожи и обрезали окружающую ткань. Несколько мышей оценивали на каждую из обработок, определяя средний вес опухоли при каждой обработке, причем результаты такого определения представлены в конце Таблицы 6.

Таблица 6

Номер опухоли M21L	Обработка	Вес опухоли /мг/
1	PBS	158
2		192
3		216
4		227
5	LM609	195
6		42
7		82
8		48
9		37
10		100
11		172

Обработка	Средний вес опухоли /мг/
PBS	198
LM609	113

Воздействие M21L $\alpha\beta_3$ -негативной человеческой карциномной опухолевой массы в химерной

аналитической системе мышь-человек на LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / вызывало уменьшение среднего веса опухоли, обработанной PBS от 198мг до 213мг.

Представители опухолей M21L, обработанных МАБ LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / и PBS были подвергнуты морфологическому исследованию. PBS-обработанные опухоли были крупными /с диаметром 8 - 10мм/ и хорошо васкуляризованными, тогда как опухоли, обработанные МАБ LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ были значительно более мелкими /с диаметром 3 - 4мм/ и не содержали детектируемых кровеносных сосудов.

Опухоли, полученные в кожных трансплантатах, которые инъецировали MDA 23.1 клетками были детектируемыми и измеряемыми. Морфологическое исследование полученных опухолей обнаружило, что имеет место неоваскуляризация от трансплантированных человеческих тканей в MDA 23.1 опухолевые клетки.

Таким образом, блокировка $\alpha\beta_3$ рецептора внутривенным введением $\alpha\beta_3$ специфичного LM609 антитела приводит в результате к регрессии карциномы в такой модельной системе тем же образом, что и в случае CAM и модельных систем на кроличьих глазах, как это описано в примерах 9 и 10, соответственно.

12. Стимуляция сосудистых клеток с целью вхождения в клеточный цикл и их вовлечения в апоптоз в присутствии антагонистов интегрин $\alpha\beta_3$ при измерении с помощью CAM-анализа.

Ангиогенный процесс явно зависит от способности цитокинов, таких как β FGF и VEGF стимулировать пролиферацию сосудистых клеток. Mignatti с сотр. J. Cell, Biochem, 47:1 201/1991/, Takeshita с сотр. J. Clin. Invest, 93:6 62/1994/, и Koyma с сотр. J. Cell, Physiol, 158:1 /1994/. Однако, также следует отметить, что передача сигнала может регулировать дифференциацию таких сосудистых клеток в зрелые кровеносные сосуды. Так, возможно, что интерференция с сигналами, относящимися к росту или дифференциации сосудистых клеток, подвергающихся новому росту или ангиогенезу, может в результате приводить к расстройству ангиогенеза.

Лигирование интегрин, как было показано, принимает участие как в пролиферации клеток, так и в апоптозе или программированной клеточной смерти in vitro. См. Schwartz, Cancer Res, 51:1503 /1993/, Meredith с сотр., Mol. Biol. Cell, 4:953 /1993/, Frisch с сотр., J. Cell Biol, 124:619 /1994/, и Ruoslahti с сотр., Cell, 77:477 /1994/. Аналогичное исследование влияния $\alpha\beta_3$ антагонистов на ангиогенез обнаружило присутствие прерванных и разрушенных связанных с опухолью кровеносных сосудов. Поэтому, возможно, что потеря непрерывности кровеносных сосудов может быть следствием селективного некроза или апоптоза сосудистых клеток.

Для исследования такой возможности CAM изучали после индуцирования ангиогенеза в присутствии фактора роста β FGF и обработки МАБ и циклическими пептидами настоящего изобретения.

А. Обработка моноклональными антителами

Апоптоз может детектироваться большим числом методов, которые включают непосред-

венное изучение ДНК, выделенной из ткани для определения фрагментации ДНК, и детекцию 3'ОН в интактной ткани с помощью антитела, которое специфически определяет свободную 3'ОН группу фрагментированной ДНК

1/ Анализ фрагментации ДНК

Ангиогенез индуцировали помещением фильтровальных дисков, насыщенных β FGF на CAM 10-дневных эмбрионов, как это описано в Примере 6А. Иммуногистологический анализ CAM в присутствии LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / позволил обнаружить пик экспрессии $\alpha\beta_3$ на кровеносных сосудах через 12-24 часа после инициирования ангиогенеза с помощью β FGF. Так, через 24 часа после стимуляции β FGF, эмбрионы инокулировали внутривенно 100мкл только PBS или PBS, содержащим 300мкг CSAT /анти- β_1 / или LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /.

Фрагментацию ДНК детектировали путем резекции CAM ткани непосредственно ниже $\alpha\beta_3$ насыщенных фильтровальных дисков через 24 или 48 часов после внутривенной инокуляции с помощью мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /, CSAT /анти- β_1 / или PBS. Подвергнутые резекции ткани CAM трижды промывали стерильной PBS и мелко крошили, ресуспендировали в 0,25% бактериальной коллагеназе /Ворсингтон Биохемикал, Фрихолд, Нью-Йорк/ и инкубировали 90 минут при 37°C при периодическом вихревом перемешивании. ДНК экстрагировали из равного числа CAM клеток из одноклеточной суспензии, как описано выше, см., Bissonette с сотр. Nature 359 552 /1992/. Вкратце, равное число клеток CAM лизировали в 10мМ трис-Cl, pH 8.0, 10мМ EDTA в 0,5% /об /об / Тритона X-100 /Сигма, Сент-Люис, MO/. Клеточный лизат центрифугировали со скоростью 16,000 xg в течение 15 минут при 4°C для отделения растворимых фрагментов ДНК от интактной хроматиновой гранулы. Фрагментированную ДНК промывали, осаждали и анализировали на 1,2% /вес об / агароза геле.

Растворимую Фрагментированную ДНК выделяли из равного числа клеток CAM при каждой обработке, разделяли с помощью электрофореза на агарозном геле и визуализировали путем окрашивания этидиум бромидом. Никаких отличий не наблюдалось в относительной степени ДНК фрагментации в результате трех различных обработок через 24 часа после обработки. Однако, через 48 часов после обработки мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /, наблюдалось значительное повышение фрагментации ДНК по сравнению с эмбрионами, обработанными либо мАб CSAT /анти- β_1 / или только PBS.

2/ Стимуляция сосудистых клеток для вхождения в клеточный цикл

С целью экспериментального изучения роли $\alpha\beta_3$ в этих процессах, клетки произведенные из CAM, обработанных или не обработанных β FGF, окрашивали йодистым пропидиумом и проводили иммунную реакцию с мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /.

CAM, изолированные из эмбрионов через 24 и 48 часов после обработки мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / CSAT /анти- β_1 / или PBS, диссоциировали в одноклеточную суспензию путем инкубации в присутствии бактериальной коллагеназы, как описано выше. Единичные клетки затем подвергались ус-

ловиям проницаемости и окрашивались с помощью детекционного набора Aror Tag in situ согласно инструкциям производителя /Онокор, Гайтерсбург, МД/. Aror Tag представляет собой антитело, которое специфически определяет 3'ОН группы фрагментированной ДНК. Детекция таких свободных 3'ОН групп представляет собой установленный способ определения апоптотических клеток. См. Gavriel с сотр., J Cell Biol, 119 493/1992/.

Окрашенные Aror Tag клетки затем промывали в 0,1% /об /об / Тритона X-100 в PBS и ресуспендировали в FACS буфере, содержащем 0,5% /вес /об / BSA, 0,02% /вес /об / азида натрия и 200мкг/мл RNазы А в PBS. Клетки инкубировали в течение 1,5 часа, промывали и анализировали флуоресцентной сортировкой активированных клеток. Флуоресценцию клеток измеряли с использованием FACScan проточного цитометра и полученные данные анализировали, как описано ниже.

Клеточную флуоресценцию измеряли с помощью FACScan /сканирующего клеточного сортера с возбуждением флуоресценции прим пер, /проточного цитометра/ /Бектон Дикинсон, Маунтэйн Вью Боковое рассеяние //SSC/ и переднее рассеяние /FSc/ определяли одновременно и все полученные данные собирали в компьютере Хьюлет-Пакард /HP9000, снабженным FACScan исследовательским программным обеспечением /Бектон Дикинсон, Маунтэйн Вью, КА/. Данные анализировали с помощью программы Р С Лизис, версия 1 /Бектон Дикинсон, Маунтэйн Вью, КА/. Негативные контрольные входы устанавливали с использованием клеточной суспензии без добавления первичных антител из набора Aror Tag. Аналогичное открытие мембранного канала применяли на обеих клеточных популяциях в результате анализа примерно 8 000 клеток в расчете на различные обработки клеток.

Процент одиночных клеток производных от CAM обработанных мАб и окрашенных Aror Tag в соответствии с определением методом FACS анализа изображен на фиг.18. Черная полоса представляет собой клетки из эмбрионов обработанных за 24 часа до анализа. Пунктирная полоса представляет собой клетки эмбрионов обработанные за 48 часов до анализа. Каждая полоса представляет собой среднее значение \pm SE при трех параллельных измерениях.

Как следует из фиг.18, CAM обработанные за 2 дня до воздействия мАб LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / демонстрируют 3-4-кратное увеличение окрашивания Aror Tag по сравнению с CAM обработанными только PBS или CSAT /анти- $\alpha\beta_3$ /.

В Обработка синтетическими пептидами

CAM-анализы с использованием ангиогенеза, индуцированного фактором роста, как это описано в примере 6А, проводили также с использованием синтетических пептидов изобретения с целью определения влияния циклических пептидов на апоптоз. Пептиды цикло-RGDfv /68203/ и цикло-RAQfv /69601/ получали как описано в примере 1.

Пептидные растворы или PBS инъецировали в CAM препарат с концентрацией 300мкг/мл. Через 24 и 48 часов фильтровальную бумагу и окру-

жающую CAM ткань вскрывали и окрашивали Арор Таг для детекции апоптоза, как описано выше в примере 12A2/

Как показано на фиг 18, CAM обработанные за два дня до взаимодействия с пептидом 69203 /цикло-RGDfv/ демонстрировали 3-4 кратное увеличение окрашивания Арор-Таг по сравнению с CAM обработанными или только PBS или контрольным циклическим пептидом 69601 /цикло-RAFfv/

С Влияние обработки моноклональными телами на апоптоз и клеточный цикл

Одноклеточные суспензии также изучали с целью определения числа копий хромосомных ДНК путем окрашивания йодистым пропидиумом с целью определения эффекта обработки моноклональными телами на клеточный цикл и на апоптоз путем окрашивания с помощью Арор Таг

Одноклеточные суспензии CAM обработанные за 24 или 48 часов до взаимодействия с МАБ LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / или CSAT /анти- β_1 / либо PBS готовили, как описано в примере 12A1/

Для окрашивания клеток с помощью Арор Таг, клеточные суспензии трижды промывали буфером, содержащим 2,5% /вес об / BSA и 0,25% /вес об / азида натрия в PBS. Затем клетки фиксировали в 1% /вес об / параформальдегиде в PBS в течение 15 минут с последующим тройным промыванием, как описано выше. Для предотвращения неспецифического связывания одноклеточные суспензии блокировали 5% /вес об / BSA в PBS в течение ночи при 4°C. Затем клетки промывали как описано выше, окрашивали с помощью Арор Таг и клеточную флуоресценцию измеряли с помощью FACScan, как описано выше в примере 12A. Клетки при каждом экспериментальном условии окрашивали йодистым пропидиумом /Сигма, Сент-Люис, МО/ при концентрации 10мкг/мл в PBS в течение 1 часа, дважды промывали PBS и анализировали на ядерные характеристики типичные для апоптоза, включая хроматиновую конденсацию и сегментацию. Процентное количество апоптотических клеток оценивали морфологическим анализом в произвольно выбранных микроскопических полях имеющих значения, по крайней мере 10-15.

Объединенные результаты исследования одноклеточной суспензии CAM из эмбрионов, обработанных либо CSAT /анти- β_1 / или LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /, окрашенных Арор Таг и йодистым пропидиумом и проанализированных методом FACS представлены на фиг 19. На оси Y отображено окрашивание с помощью Арор Таг /апоптоз/, на оси X отображено окрашивание йодистым пропидиумом /содержание ДНК/. Горизонтальная линия отображает негативный мембранный канал для окрашивания Арор Таг. Левые и правые панели указывают CAM клетки из CSAT и LM609-обработанных эмбрионов, соответственно. Анализ клеточного цикла осуществляли анализом примерно 8 000 событий в расчете на состояние и полученные данные представлены на контурном графике.

Образцы единичных клеток, окрашенных красителем ДНК, йодистым пропидиумом позволили установить, что 25 - 30% LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / обра-

ботанных CAM клеток через 48 часов после обработки демонстрируют ядерную конденсацию и/или сегментацию. Такие процессы характерны для клеток подвергаемых апоптозу. Этот факт отличается от CAM, обработанных CSAT /анти- β_1 /, когда 90 - 95% клеток демонстрируют нормальное клеточное окрашивание.

Как показано на фиг 19 в соответствии с индукцией апоптоза под действием LM609, наблюдается значительное число клеток в пике, содержащем менее одной копии ДНК /АО/. Этот пик был показан ранее для отражения фрагментированной ДНК на поздней стадии развития апоптотических клеток. См Telford с сотр., Cytometry, 13 137/1992/. Кроме этого, такие АО клетки легко окрашиваются с помощью Арор Таг, что подтверждает способность такого реагента детектировать апоптотические клетки. Однако, в дополнение к окрашиванию клеток в АО, значительное число клеток, содержащих более одной копии ДНК, также окрашивается с помощью Арор Таг /фиг 19/. Эти результаты демонстрируют тот факт, что LM609 обладает способностью промотировать апоптоз среди сосудистых клеток, которые уже вошли в клеточный цикл. В отличие от этого, клетки, производные от контрольных CAM, которые вошли в клеточный цикл демонстрируют минимальное окрашивание Арор Таг, что соответствует нескольким апоптотическим клеткам определяемым в контрольных обработанных CAM.

Среди тех клеток в CAM стимулированных β FGF, которые вошли в клеточный цикл /S и G2/M фаза/, 70% демонстрируют положительное окрашивание LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ / . Это значение можно сравнить с 10% LM609 окрашивания, наблюдаемого в циклических клетках из CAM необработанных β FGF. Эти открытия указывают на то, что после Bfgf стимуляции большая часть $\alpha\beta_3$ -несущих клеток демонстрируют активную пролиферацию.

Совместное рассмотрение этих фактов указывает на то, что внутривенное инъекционное введение МАБ LM609 или циклического пептида - антагониста $\alpha\beta_3$ промотирует апоптоз в курином CAM с последующей индукцией ангиогенеза.

CAM уже изучали гистологически на экспрессию $\alpha\beta_3$ путем исследования иммунореактивности с LM609 и на наличие клеток, подвергающихся апоптозу в результате иммунной реакции с Арор Таг. Срезы CAM, подвергнутые резекции из эмбрионов, обработанных за 48 часов LM609 /анти- $\alpha\beta_3$ /, CSAT /анти- β_1 / или PBS, полученными в примере 5A, промывали, погружали в ОТС //Бакстер/ и мгновенно замораживали в жидком азоте. Шести-микронные срезы CAM тканей вырезали, фиксировали в ацетоне в течение 30 секунд и хранили при -70°C до дальнейшего использования. Тканевые срезы готовили для окрашивания быстрым промыванием в 70% /об об / этаноле /EtOH/ с последующим тройным промыванием в PBS. Далее, срезы блокировали 5% /вес об / BSA в PBS в течение 2 часов, после чего проводили инкубацию в присутствии 10мкг/мл МАБ LM609 в течение 2 часов. Затем срезы промывали и инкубировали в присутствии 1:50 разбавления родаминового конъюгированного козьего анти-мышинного IgG- /Фишер Сайнтифик, Питсбург, PA/

в течение 2 часов. Наконец эти срезы промывали и окрашивали с помощью Арор Таг, как описано в Примере 12A2/. Окрашенные тканевые срезы превращали в препараты и анализировали методом конфокальной иммунофлуоресцентной микроскопии.

На фиг 20, панели A-C показывают САМ-ткань от эмбрионов, обработанных CSAT /анти- β_1 /, а панели D-F представляют САМ-ткань из LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ /, обработанных эмбрионов. Панели A и D показывают ткани, окрашенные Арор Таг и визуализированные флуоресценцией /FITC/, наложенной на DIC изображение. Панели B и E содержат изображение тех же тканей, окрашенных мАб LM609 /анти- $\alpha_v\beta_3$ / и визуализированных с помощью флуоресценции /родамин/. Панели C и F представляют собой слитые изображения тех же тканей, окрашенных Арор Таг и LM609, где желтое окрашивание относится к сококализации. Полосы имеют размеры 15 и 50мкм в левой и правой панелях, соответственно.

Как показано на фиг 20/A-C/, после внутривенного инъектирования CSAT или PBS контрольных образцов, окрашивание Арор Таг было минимальным и случайным, что указывает на минимальный уровень апоптоза внутри ткани. В отличие от этого, САМ из эмбрионов, предварительно обработанных LM609 или циклическим пептидом 203, демонстрировали преимущественное количество сосудов, интенсивно окрашенных Арор Таг, тогда как минимальная реактивность наблюдалась у окружающих несосудистых клеток /фиг 20D-F/. Кроме этого, в том случае, когда Арор Таг и LM609 использовали для окрашивания таких тканей /19C и 19F/ значительная сококализация наблюдалась лишь между этими маркерами в САМ, являющихся производными эмбрионов, обработанных $\alpha_v\beta_3$ антагонистами /фиг 20F/. Эти открытия демонстрируют тот факт, что после индукции ангиогенеза *in vivo* ингибиторы интегрина $\alpha_v\beta_3$ селективно промотируют апоптоз $\alpha_v\beta_3$ -несущих кровеносных сосудов.

Хотя ангиогенез представляет собой сложный процесс, включающий большое число молекулярных и клеточных биологических событий, некоторые черты доказательств позволяют предположить, что сосудистые клеточные интегрин $\alpha_v\beta_3$ играют относительно позднюю роль в таком процессе. Во-первых, иммуногистологический анализ позволил обнаружить, что экспрессия $\alpha_v\beta_3$ на сосудах клеток достигает максимума через 12-24 часа после индукции ангиогенеза с помощью β FGF. Во-вторых, антагонисты $\alpha_v\beta_3$ -нарушают ангиогенез, индуцированный множеством активаторов, что позволяет предположить, что такой рецептор принимает участие в общем каскаде реакций, протекающих вниз от, возможно, всех первичных событий по передаче сигнала приводящих к ангиогенезу. В третьих, САМ обработанные мАб LM609 или циклическим пептидом не проявляют значительного усиления апоптозиса, как было измерено лестничным анализом ДНК через 48 часов после обработки такими антагонистами. Наконец, антагонисты промотируют апоптоз сосудах клеток уже подвергнутых индукции для вхождения в клеточный цикл.

Представленные в тексте результаты дают первое прямое доказательство того, что лигирование интегринов может регулировать выживание клетки *in vivo*. Поэтому можно высказать гипотезу, что после начала ангиогенеза индивидуальные сосудах клетки начинают делиться и двигаться в направлении источника ангиогенеза после чего $\alpha_v\beta_3$ лигирование обеспечивает сигнал непрерывному выживанию клетки, что приводит к дифференциации и образованию зрелых кровеносных сосудов. Однако, если $\alpha_v\beta_3$ лигирование предотвращается, то клетки не могут получить такой молекулярный сигнал и вовлекаются в апоптоз в недостаточном количестве. Такая гипотеза также предсказывает, что после дифференциации зрелые кровеносные сосуды больше не требуют $\alpha_v\beta_3$ передачи сигнала для выживания и они становятся устойчивыми в отношении антагонистов такого интегрин.

Наконец, представленные в тексте результаты дают доказательство того, что антагонисты интегрин $\alpha_v\beta_3$ могут обеспечивать мощный терапевтический подход к лечению неоплазии других заболеваний, характеризующихся ангиогенезом. Во-первых, антагонисты $\alpha_v\beta_3$ нарушают вновь образовавшиеся кровеносные сосуды, не оказывая влияния на уже существующую сосудистую систему. Во-вторых, такие антагонисты не оказывают значительного влияния на жизнеспособность куриных эмбрионов, что предполагает их нетоксичность. В третьих, ангиогенез в значительной мере блокируется в независимости от природных ангиогенных стимулов. Наконец, систематическое применение $\alpha_v\beta_3$ антагонистов вызывает драматическую регрессию различных гистологических отличающихся человеческих опухолей. Таким образом, приведенные выше Примеры демонстрируют тот факт, что интегрин $\alpha_v\beta_3$ играет ключевую роль в ангиогенезе, индуцируемом множеством стимулов, и такой $\alpha_v\beta_3$ представляет собой ценную терапевтическую мишень в присутствии $\alpha_v\beta_3$ антагонистов изобретения для заболеваний, характеризующихся неоваскуляризацией.

Приведенное выше описание можно считать достаточным для того, чтобы специалист в данной области мог реализовать изобретение на практике. Сфера настоящего изобретения не ограничивается депонированными клеточными линиями, поскольку депонированное воплощение рассматривается как одна из иллюстраций одного аспекта изобретения и любая клеточная линия, функционально эквивалентная описанной выше, входит в сферу изобретения. Депонирование материала не означает, что приведенное выше описание неадекватно для практической реализации любого аспекта изобретения, включая наилучшее его решение, также не имеется в виду, что этим ограничивается сфера формулы изобретения в отношении специфической иллюстрации того, что она представляет. Разумеется, что различные модификации изобретения помимо тех, что показаны и описаны в тексте станут ясными для специалистов в данной области из приведенного описания и они входят в сферу прилагаемой формулы изобретения.

SEQUENCE LISTING
Перечень последовательностей

(1) GENERAL INFORMATION: Общая информация:

(i) APPLICANT: Заявитель

(A) NAME: The Scripps Research Institute /д/ название: Исследовательский
(B) STREET: 10666 North Torrey Pines Road /с/ институт скриппса
(C) CITY: La Jolla ГОРОД: Ла-Холла улица: 10666 Норс Торрей Пайнс
(D) STATE: CA ИТАГ: Калифорния РОВД
(E) COUNTRY: USA СТРАНА: США
(F) POSTAL CODE (ZIP): 92037 ПОЧТОВЫЙ КОД/ZIP/: 92037
(G) TELEPHONE: 619-554-2937 ТЕЛЕФОН: 619-554-2937
(H) TELEFAX: 619-554-6312 ТЕЛЕФАКС: 619-554-6312

(ii) TITLE OF INVENTION: METHODS AND COMPOSITIONS USEFUL FOR
INHIBITION OF ANGIOGENESIS

название изобретения
способ и композиции
используемые для ин-
гибирования ангиогенеза.

(iii) NUMBER OF SEQUENCES: 14
число последовательностей: 14

(iv) COMPUTER READABLE FORM: компьютер читаемая форма:

(A) MEDIUM TYPE: Floppy disk ТИП среды: гибкий диск
(B) COMPUTER: IBM PC compatible КОМПЬЮТЕР: IBM PC совместимый
(C) OPERATING SYSTEM: PC-DOS/MS-DOS ОПЕРАЦИОННАЯ СИСТЕМА: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release 01.0, Version #1.25 (EPO)
программное обеспечение: Патентин Рилиз #1.0, версия #1.25/Е

(v) CURRENT APPLICATION DATA: текущие данные по заявке:

(A) APPLICATION NUMBER: PCT/US 95/ номер заявки: PCT/USA 95/
(B) FILING DATE: 09-MAR-1995 дата подачи: 09-MAR-1995

(vi) PRIOR APPLICATION DATA: предыдущие данные по заявке:

(A) APPLICATION NUMBER: US 08/210,713 номер заявки: US 08/210 713
(B) FILING DATE: 18-MAR-1994 дата подачи: 18-MAR-1994

(vii) PRIOR APPLICATION DATA: предыдущие данные по заявке:

(A) APPLICATION NUMBER: US 08/366,665 номер заявки: US 08/366 665
(B) FILING DATE: 30-DEC-1994 дата подачи: 30 декабря 1994

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:1: информация о последовательности SEQ ID NO:1:

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности

(A) LENGTH: 6 amino acids ДЛИНА: 6 аминокислот
(B) TYPE: amino acid ТИП: аминокислота
(C) STRANDEDNESS: single НЕТЕВЯДНОСТЬ: одинарная
(D) TOPOLOGY: linear ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO А-ТИ-СМЫСЛ: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal ТИП ФРАГМЕНТА: внутренний

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label= BOC-CRCDPV-OMe
/note= "BOC signifies the N-terminal protecting group butyloxycarbonyl; OMe signifies a C-terminal methyl ester; arginine in the second position"ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= BOC-CRCDPV-OMe
/примечания= BOC обозначает N-терминальную защитную группу бутилоксикарбонил; OMe- C-терминальный метиловый эфир; аргинин во втором положении

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label= OMe
/note= "OMe signifies the C-terminal protecting group methyl ester."ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= OMe/примечания= Ome обозначает C-терминальную защитную группу метилового эфира

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label= D-Arg
/note= "A prefix "D" in D-Arg signifies that the arginine in position 2 is a D-amino acid."ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= D-Arg /примечания= префикс "D" в D-Arg означает

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:1:

Описание последовательности: SEQ ID NO:1

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

что аргинин в положении 2 представляет собой D-амино-кислоту

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:2: ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:2

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS: ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) LENGTH: 5 amino acids

Длина: 5 аминокислот

(B) TYPE: amino acid

Тип: аминокислота

(C) STRANDEDNESS: single

Многовидность: одинарная

(D) TOPOLOGY: linear

Топология: линейная

(ii) MOLECULE TYPE: peptide

Молекулярный тип: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO

Гипотетичность: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO

Анти-смысл: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal

Тип фрагмента: внутренний

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label= BOC
/note= "BOC signifies the N-terminal blocking group tertbutoxycarbonyl."ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= BOC/примечания= BOC обозначает N-терминальную блокирующую группу трет-бутилоксикарбонил.

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЕ ПРИЗНАКИ

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label= OH

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= OH

/note- "OH signifies a free C-terminal carboxylic acid."

/примечания= OH об-
начает свободную С-
терминальную карбо-
новую кислоту

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label- D-Arg

/note- "A prefix "D" in D-Arg signifies that the arginine in position 2 is a D-amino acid."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /метка
= D-Arg /примечания=
префикс "D" в D-Arg
обозначает что аргинин
в положении 2
представляет собой
D-аминокислоту

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:2:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:3: ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID NO:

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) LENGTH: 6 amino acids ДЛИНА: 6 АМИНОКИСЛОТ

(B) TYPE: amino acid ТИП: АМИНОКИСЛОТА

(C) STRANDEDNESS: single НИТЕВИДНОСТЬ: ОДИНАРНАЯ

(D) TOPOLOGY: linear ТОПОЛОГИЯ: ЛИНЕЙНАЯ

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ПЕПТИД

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: НЕТ

(iv) ANTI-SENSE: NO АНТИ-СМЫСЛ: НЕТ

(v) FRAGMENT TYPE: internal Тип фрагмента: Внутренний

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label- H

/note- "H signifies a free N-terminal amine."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= H /примечания=
H обозначает свободный N-
терминальный амин

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label- OH

/note- "OH signifies a free C-terminal carboxylic acid."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= OH /примечания=
OH обозначает свобод-
ную терминальную кар-
боновую кислоту

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1....6

(D) OTHER INFORMATION: /label- D-Arg

/note- "A prefix "D" in D-Arg at position 2, signifies that the arginine is a D-amino acid."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ:
/метка= D-Arg /примечан.
= префикс "D" в D-Arg
обозначает, что аргинин
представляет собой D-
аминокислоту

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:3:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID NO:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:4: информация для последовательности SEQ ID №4

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности
 (A) LENGTH: 5 amino acids длина: 5 аминокислот
 (B) TYPE: amino acid тип: аминокислота
 (C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная
 (D) TOPOLOGY: circular топология: круговая
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide молекулярный тип: пептид
- (iii) HYPOTHETICAL: NO гипотетичность: нет
- (iv) ANTI-SENSE: NO анти-смысл: нет
- (v) FRAGMENT TYPE: internal тип фрагмента: внутренний
- (ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК
 (A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид
 (B) LOCATION: 1..5 местоположение: 1...5
 (D) OTHER INFORMATION: /label= cyclc другая информация: /метка= цикло/примечания=
 /note= "Cyclo signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid." OT- нижние буквы в от-
 делении: обозначают D-аминокислоту; прописные буквы обозначают L-аминокислоту
- (xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:4: описание последовательности: SEQ ID №4:
 Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:5: информация о последовательности SEQ ID №5

- (i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:
 (A) LENGTH: 5 amino acids длина: 5 аминокислот
 (B) TYPE: amino acid тип: аминокислота
 (C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная
 (D) TOPOLOGY: circular топология: круговая
- (ii) MOLECULE TYPE: peptide молекулярный тип: пептид
- (iii) HYPOTHETICAL: NO гипотетичность: нет
- (iv) ANTI-SENSE: NO анти-смысл: нет
- (v) FRAGMENT TYPE: internal тип фрагмента: внутренний
- (ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:
 (A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид
 (B) LOCATION: 1..5 местоположение: 1...5
 (D) OTHER INFORMATION: /label= cyclc другая информация: /метка= цикло/примечания=
 /note= "Cyclo signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid." OT- нижние буквы в от-
 делении: обозначают D-аминокислоту; прописные буквы обозначают L-аминокислоту

case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid "

нижние буквы в (от-
делении обозначают D-амино-
кислоту; прописные
буквы обозначают L-
аминокислоту".

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION, SEQ ID NO:5:
ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 253 14 №5

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:6: ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID №6

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) LENGTH: 5 amino acids ДЛИНА: 5 АМИНОКИСЛОТ
(B) TYPE: amino acid ТИП: АМИНОКИСЛОТА
(C) STRANDEDNESS: single НИТЕВИДНОСТЬ: ОДИНАРНАЯ
(D) TOPOLOGY: circular ТОПОЛОГИЯ: КРУГОВАЯ

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ПЕПТИД

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: НЕТ

(iv) ANTI-SENSE: NO АНТИ-СМЫСЛ: НЕТ

(v) FRAGMENT TYPE: internal ТИП ФРАГМЕНТА: ВНУТРЕННИЙ

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: ПЕПТИД

(B) LOCATION: 1..5 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1...5

(D) OTHER INFORMATION: /label= cyclic

/note= "Cyclic signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: ЦИ-
КЛИЧЕСКИЙ ПЕПТИД
ЦИКЛО ОБОЗНАЧАЕТ
НИЖНИЕ БУКВЫ В (ОТ-
ДЕЛЕНИИ ОБОЗНАЧАЮТ D-АМИНО-
КИСЛОТУ; ПРОПИСНЫЕ
БУКВЫ ОБОЗНАЧАЮТ L-
АМИНОКИСЛОТУ

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION, SEQ ID NO:6:
ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: 253 14 № 6

Arg Ala Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:7: ИНФОРМАЦИЯ О ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 7

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: ХАРАКТЕРИСТИКИ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ:

(A) LENGTH: 5 amino acids ДЛИНА: 5 АМИНОКИСЛОТ
(B) TYPE: amino acid ТИП: АМИНОКИСЛОТА
(C) STRANDEDNESS: single НИТЕВИДНОСТЬ: ОДИНАРНАЯ
(D) TOPOLOGY: circular ТОПОЛОГИЯ: КРУГОВАЯ

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: ПЕПТИД

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: НЕТ

(iv) ANTI-SENSE: NO АНТИ-СМЫСЛ: НЕТ

(v) FRAGMENT TYPE: internal ТИП ФРАГМЕНТА: ВНУТРЕННИЙ

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: ПЕПТИД

(B) LOCATION: 1..5 МЕСТОПОЛОЖЕНИЕ: 1...5

(D) OTHER INFORMATION: /label= cyclo

/note= "Cyclo signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid."

ДРУГАЯ ИНФОРМАЦИЯ: /метка= цикло/примечание= "ци обозначает циклическую пептид; буквы в нижнем отделении обозначают D-аминокислоту; прописные буквы обозначают L-аминокислоту"

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:7:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 7

Arg Gly Asp Phe Val

1

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:8: информация о последовательности SEQ ID № 8

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

(A) LENGTH: 15 amino acids ДЛИНА: 15 аминокислот

(B) TYPE: amino acid ТИП: аминокислота

(C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная

(D) TOPOLOGY: linear ТОПОЛОГИЯ: линейная

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO АНТИ-СМЫСЛ: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal ТИП ФРАГМЕНТА: внутренний

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:8:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ SEQ ID № 8:

Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe

1

5

10

15

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:9: информация о последовательности SEQ ID №

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности

(A) LENGTH: 5 amino acids ДЛИНА: 5 аминокислот

(B) TYPE: amino acid ТИП: аминокислота

(C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная

(D) TOPOLOGY: circular ТОПОЛОГИЯ: круговая

(ii) MOLECULE TYPE: peptide МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ТИП: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO ГИПОТЕТИЧНОСТЬ: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO АНТИ-СМЫСЛ: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal ТИП ФРАГМЕНТА: внутренний

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: ПЕПТИД

(B) LOCATION: 1..5 местоположение: 1...5

(D) OTHER INFORMATION: /label= cyclo

/note= "Cyclo signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid."

другая информация: /ярлык=

цикло/примечания= цикло обозначает циклический пептид; нижние буквы в отделении обозначают D-аминокислоту; прописные буквы обозначают L-аминокислоту".

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:9:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 9

Arg Ala Asp Phe Val

1

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:10: информация о последовательности SEQ ID № 10

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

(A) LENGTH: 6 amino acids длина: 6 аминокислот

(B) TYPE: amino acid тип: аминокислота

(C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная

(D) TOPOLOGY: circular топология: круговая

(ii) MOLECULE TYPE: peptide молекулярный тип: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO гипотетичность: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO анти-смысл: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal тип фрагмента: внутренний

(ix) FEATURE: ОТЛИЧИТЕЛЬНЫЙ ПРИЗНАК:

(A) NAME/KEY: Peptide ИМЯ/КЛЮЧ: пептид

(B) LOCATION: 1..6 местоположение: 1...6

(D) OTHER INFORMATION: /label= cyclo

/note= "Cyclo signifies a cyclic peptide; lower case letters indicate a D-amino acid; capital letters indicate a L-amino acid."

другая информация: /ярлык=

цикло/примечания= цикло обозначает циклический пептид; нижние буквы в отделении обозначают D-аминокислоту; прописные буквы обозначают L-аминокислоту".

(xi) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:10:

ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 10

Ala Arg Gly Asp Phe Leu

1

5

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:11: информация о последовательности SEQ ID № 11

(i) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

(A) LENGTH: 6 amino acids длина: 6 аминокислот

(B) TYPE: amino acid тип: аминокислота

(C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная

(D) TOPOLOGY: circular топология: круговая

(ii) MOLECULE TYPE: peptide молекулярный тип: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO гипотетичность: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO анти-смысл: нет

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:13:
ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ: SEQ ID № 13

Gly Val Val Arg Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser
1 5 10

(2) INFORMATION FOR SEQ ID NO:14: Информация о последовательности SEQ ID № 14

(1) SEQUENCE CHARACTERISTICS: характеристики последовательности:

(A) LENGTH: 11 amino acids длина: 11 аминокислот
(B) TYPE: amino acid тип: аминокислота
(C) STRANDEDNESS: single нитевидность: одинарная
(D) TOPOLOGY: linear топология: линейная

(ii) MOLECULE TYPE: peptide молекулярный тип: пептид

(iii) HYPOTHETICAL: NO гипотетичность: нет

(iv) ANTI-SENSE: NO анти-смысл: нет

(v) FRAGMENT TYPE: internal тип фрагмента : внутренний

(x1) SEQUENCE DESCRIPTION: SEQ ID NO:14:
ОПИСАНИЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ : SEQ ID № 14:

Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Arg His Asp Leu
1 5 10

Anti-β3
Анти-



Нормальная кожа

Фиг. 1А



Anti-β3
Анти-

Гранулировочная ткань

Фиг. 1Б

83

44729

84

Anti- $\beta 1$

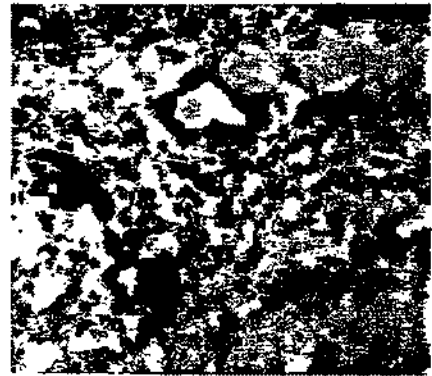
Анти-



Нормальная кожа

Anti-vWF

Анти-



Фиг. 1В

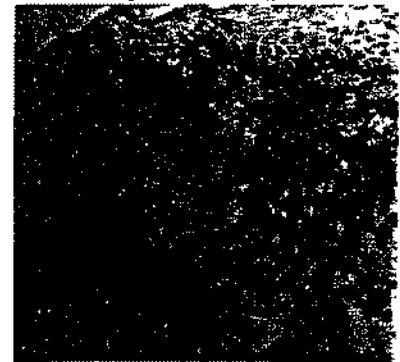


Anti- $\beta 1$

Анти-

Гранулированная ткань

Анти-ламинин

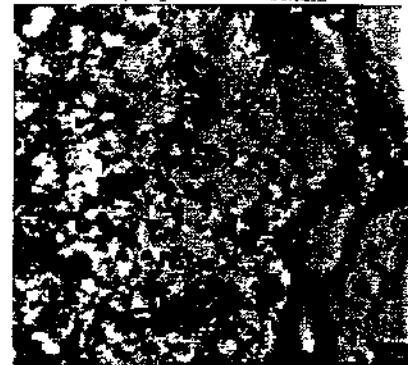


Фиг. 2Б

Нормальная кожа

Фиг. 2В

Гранулированная ткань



Анти-ламинин

Фиг. 1Г

Нормальная кожа

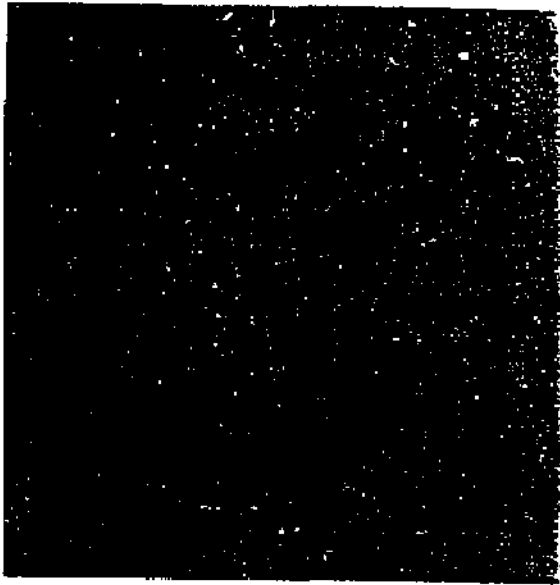
Anti-vWF

Анти-

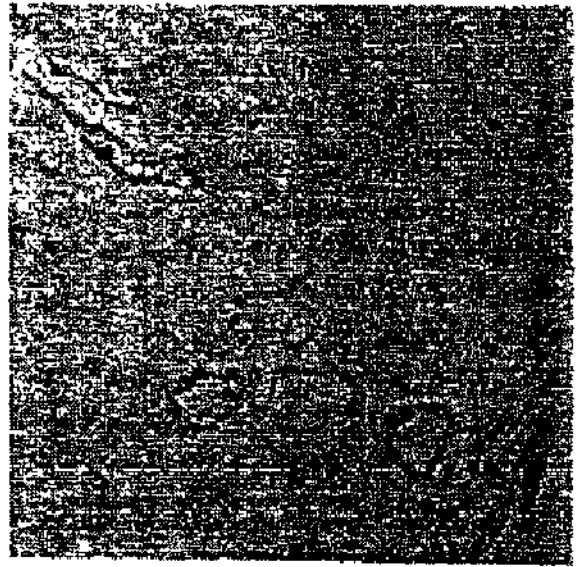


Фиг. 2Г

Фиг. 2А



Пузырьчатый рак



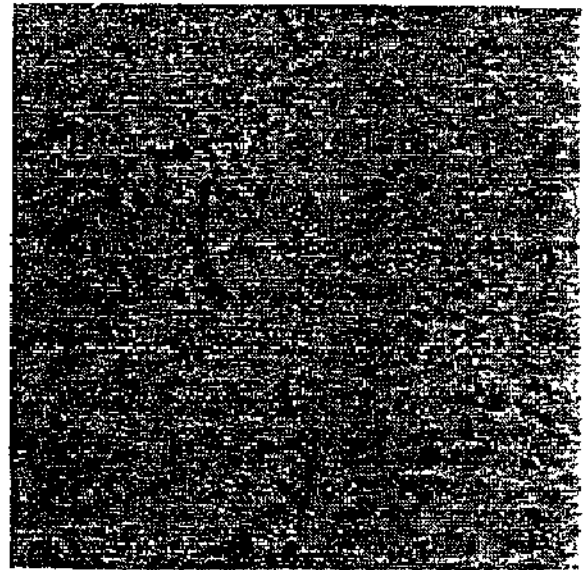
Рак грудной железы

Фиг. 3А

Фиг. 3В



Рак толстой кишки

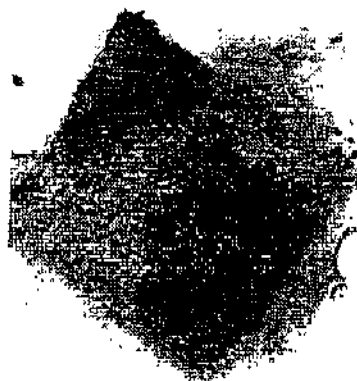


Фиг. 3Б

Рак легких

Фиг. 3Г

Контрольный образец

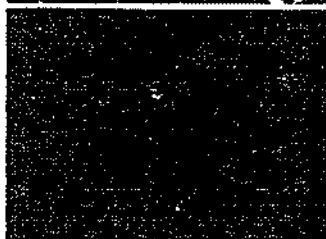


Фиг. 4

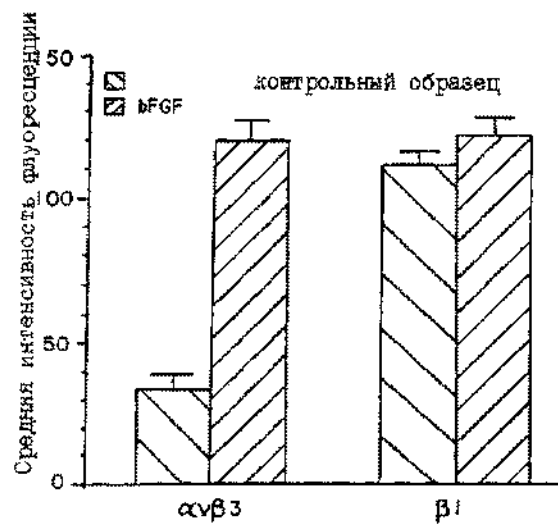
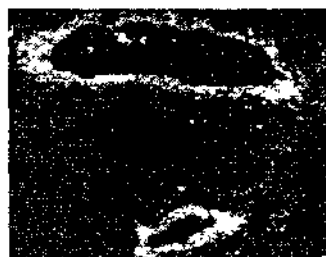
Фиг. 5A

Untreated
Anti- β_1 Необработанный
анти-

Фиг. 5B

Untreated
Anti- $\alpha\beta_3$ Необработанный
анти-

Фиг. 5B

bFGF Treated
Anti- $\alpha\beta_3$ bFGF-обработанный
анти-

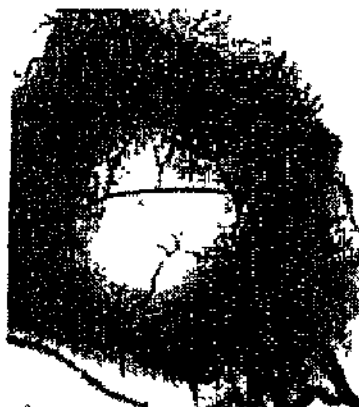
Фиг. 6

Контрольный образец



Фиг. 7A

bFGF



Фиг. 7Б
TNF α



Фиг. 7В

Фиг. 8А

контрольный
образец



bFGF



Фиг. 8Б



Фиг. 8В
Anti- β_1
анти-



Фиг. 8Г
Anti- $\alpha_v\beta_5$
анти-



Фиг. 8Д
Anti- $\alpha_v\beta_3$
анти-

91

Фиг. 9А



Контрольная пеп-
тидная опухоль
фиг. 9В



Циклическая RGD
опухоль

44729

92

Фиг. 9В



САМ соседствующая
с циклическим RGD

Фиг. 10А

Контрольный образец



Фиг. 10Б

Anti- $\alpha V\beta_5$ (P3G2)

Анти-



Фиг. 10В

Anti- $\alpha V\beta_3$ (LM609)

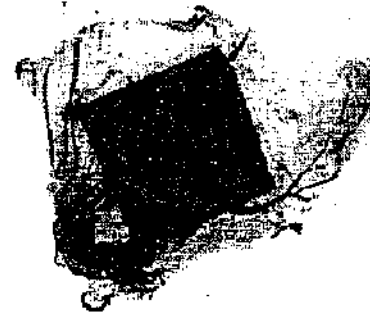
Анти-



Фиг. 11А

Anti- β_1

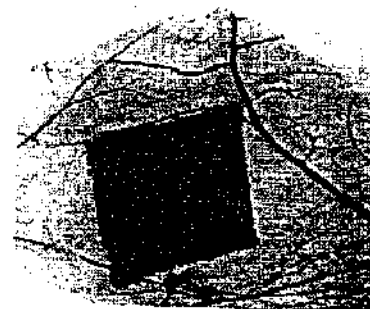
Анти-



Фиг. 11Б

Anti- $\alpha v\beta_5$

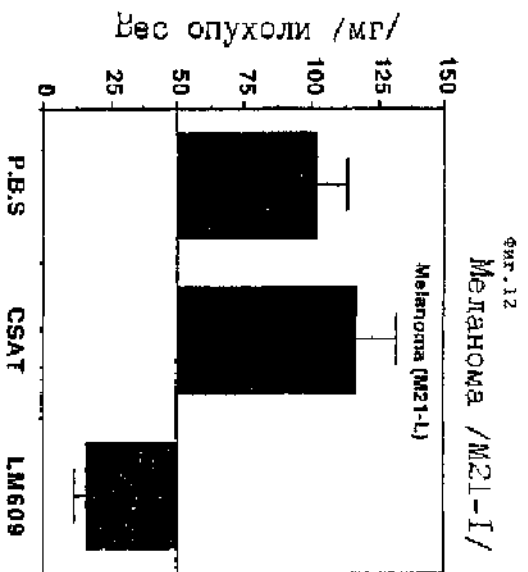
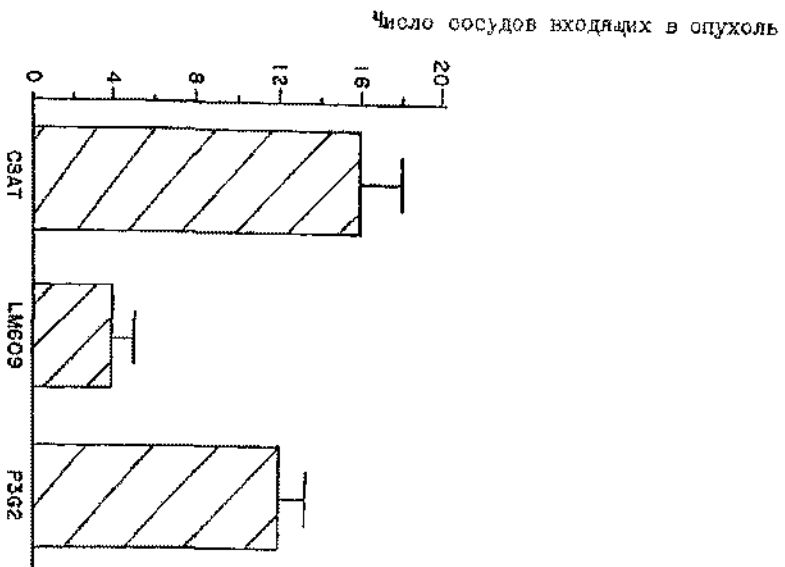
Анти-



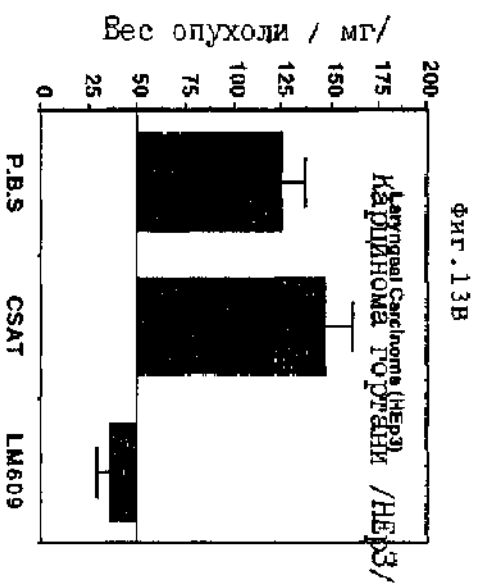
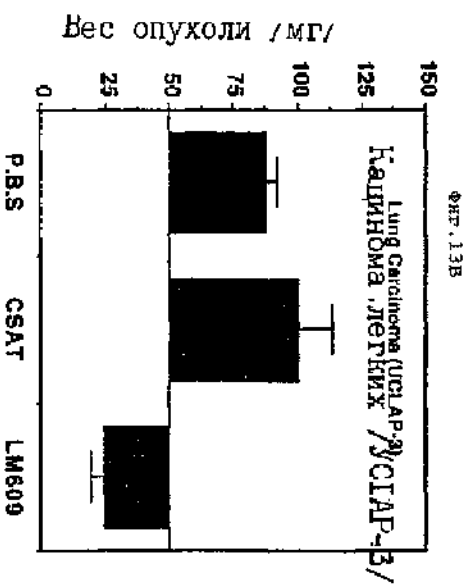
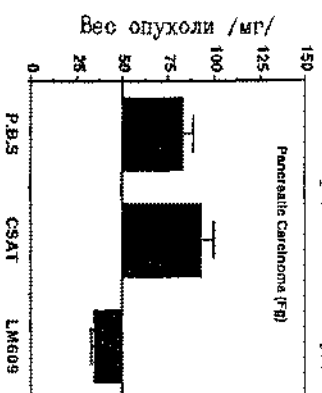
Фиг. 11В

Anti- $\alpha v\beta_3$

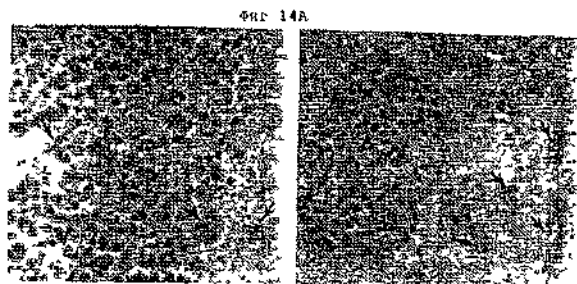
Анти-



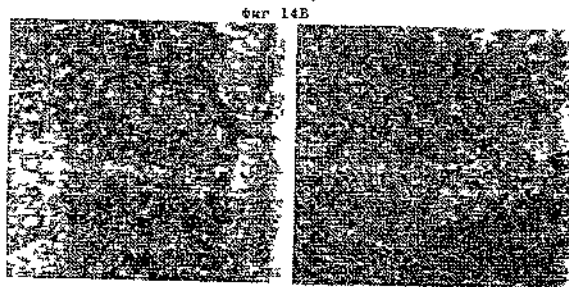
Фиг. 13A



Фиг. 13Г



Анти-
Anti- $\alpha V \beta_3$
(P3G2)



Анти-
Anti- $\alpha V \beta_3$
(LM609)



Control Peptide Tumor
Контрольный пептидный
опухоль

Cyclic RGD Tumor
Циклическая РСД
- опухоль

Cyclic RGD
Adjacent CAM

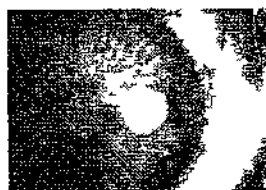
Сам соседствующий с
циклической РСД



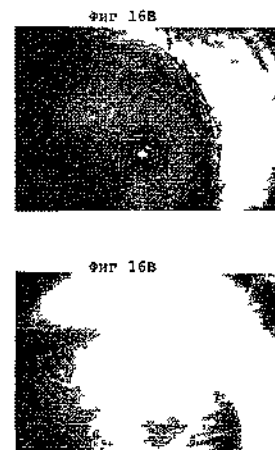
Фиг. 15Г
Control Peptide
Контрольный
тестуд

Фиг. 15Д
Cyclic RGD Peptide
Циклическая РСД
тестуд

P1F6
(Anti- $\alpha V \beta_3$)
Анти-

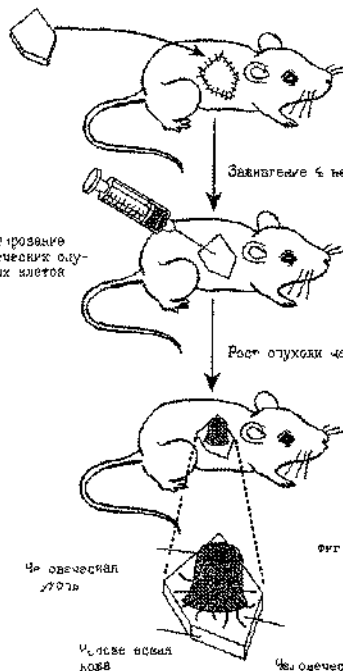


LM609
(Anti- $\alpha V \beta_3$)
Анти-

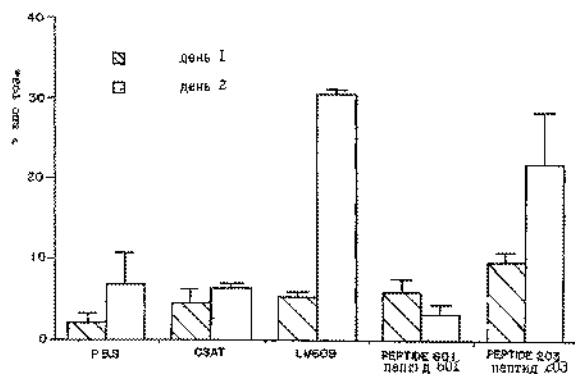


Фиг. 16

Фиг. 16Д
Трансплантат человеческой кожи

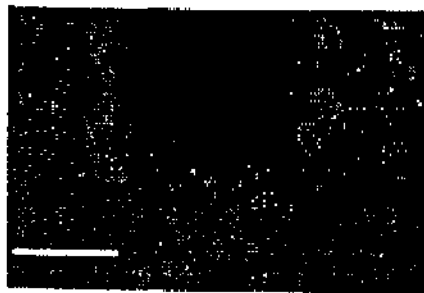


99

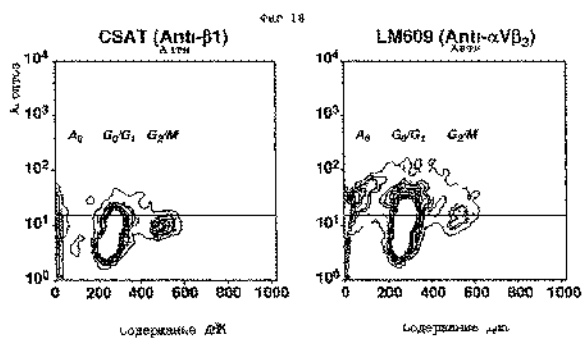


44729

100



Фиг. 20C



Фиг. 20D



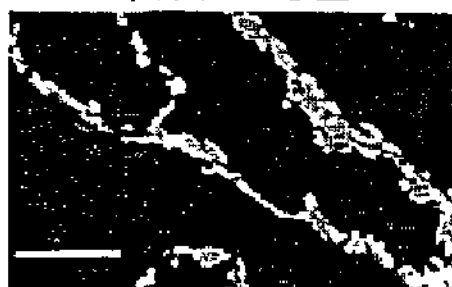
Фиг. 20A



Фиг. 20E



Фиг. 20B



Фиг. 20F