



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 300** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 39/395, A 61P 11/00,
37/00**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ
УКРАИНЫ

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ УКРАИНЫ

(21), (22) Заявка: 2001117954, 21.04.2000

(24) Дата начала действия патента: 15.07.2005

(30) Приоритет: 22.04.1999 US 60/130,847
01.06.1999 US 60/137,214

(46) Дата публикации: 15.07.2005

(86) Заявка PCT:
PCT/US00/10781, 20000421

(72) Изобретатель:

Готвелс Филипп, US,
Лобб Рой Р., US

(73) Патентовладелец:

БАЙОДЖЕН, ИНК., US

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КОМПОЗИЦИИ, СОДЕРЖАЩЕЙ ГОМОЛОГ АНТИТЕЛА, ЯВЛЯЮЩЕГОСЯ АНТАГОНИСТОМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МЕЖДУ ИНТЕГРИНОМ, НЕСУЩИМ СУБЪЕДИНИЦУ АЛЬФА-4, И ЛИГАНДОМ ИНТЕГРИНА, ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ФИБРОЗА

(57) Реферат:

Применение антагонистов интегрин VLA-4 для лечения фиброза.

Официальный бюлетень "Промышленная

собственность". Книга 1 "Изобретения, полезные модели, топографии интегральных микросхем", 2005, N 7, 15.07.2005. Государственный департамент интеллектуальной собственности Министерства образования и науки Украины.

У
А
7
3
3
0
0
C
2

У
А
7
3
3
0
0
C
2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 300** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61K 39/395, A 61P 11/00,**
37/00

MINISTRY OF EDUCATION AND SCIENCE OF
UKRAINE

STATE DEPARTMENT OF INTELLECTUAL
PROPERTY

(12) **DESCRIPTION OF PATENT OF UKRAINE FOR INVENTION**

(21), (22) Application: 2001117954, 21.04.2000

(24) Effective date for property rights: 15.07.2005

(30) Priority: 22.04.1999 US 60/130,847
01.06.1999 US 60/137,214

(46) Publication date: 15.07.2005

(86) PCT application:
PCT/US00/10781, 20000421

(72) Inventor:
Gotwals Philip, US,
Lobb Roy R., US

(73) Proprietor:
BIOGEN, INC., US

(54) **USE OF COMPOSITION CONTAINING HOMOLOG OF ANTIBODY ANTAGONIZING INTERACTION
BETWEEN INTEGRIN WITH ALPHA-4 SUBUNIT AND ITS LIGAND FOR TREATING FIBROSIS**

(57) Abstract:

The use of integrin VLA-4 antagonists for
treating fibrosis.

1 "Inventions, utility models, topographies of
integrated circuits", 2005, N 7, 15.07.2005.
State Department of Intellectual Property of the
Ministry of Education and Science of Ukraine.

Official bulletin "Industrial property". Book

U A 7 3 3 0 0 C 2

U A 7 3 3 0 0 C 2



(19) **UA** ⁽¹¹⁾ **73 300** ⁽¹³⁾ **C2**
(51)МПК ⁷ **A 61K 39/395, A 61P 11/00,**
37/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

(12) ОПИС ВИНАХОДУ ДО ПАТЕНТУ УКРАЇНИ

(21), (22) Дані стосовно заявки:
2001117954, 21.04.2000

(24) Дата набуття чинності: 15.07.2005

(30) Дані стосовно пріоритету відповідно до Паризької
конвенції : 22.04.1999 US 60/130,847
01.06.1999 US 60/137,214

(46) Публікація відомостей про видачу патенту
(деклараційного патенту): 15.07.2005

(86) Номер та дата подання міжнародної заявки
відповідно до договору РСТ:
PCT/US00/10781, 20000421

(72) Винахідник(и):
Готвелс Філіп , US,
Лобб Рой Р. , US

(73) Власник(и):
БАЙОДЖЕН, ІНК., US

(54) ЗАСТОСУВАННЯ КОМПОЗИЦІЇ, ЩО МІСТИТЬ ГОМОЛОГ АНТИТІЛА, ЯКИЙ Є АНТАГОНІСТОМ
ВЗАЄМОДІЇ МІЖ ІНТЕГРИНОМ, ЩО НЕСЕ АЛЬФА-4-СУБОДИНИЦЮ, ТА ЛІГАНДОМ ІНТЕГРИНУ, ЩО НЕСЕ
АЛЬФА-4-СУБОДИНИЦЮ, ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ФІБРОЗУ

(57) Реферат:
Застосування антагоністів інтегрину VLA-4 для

лікування фіброзу.

U A 7 3 3 0 0 C 2

U A 7 3 3 0 0 C 2

Опис винаходу

У даній заявці вимагається пріоритет більш ранньої попередньої заявки США з серійним номером 60/130,847, поданої 22 квітня 1999, і попередньої тимчасової заявки США з серійним номером 60/137,214, поданої 1 червня 1999.

Фібронектин і колаген є білками, які відіграють важливу роль у підтримці цілісності позаклітинного матриксу, що виявляється у з'єднувальних тканинах. Продукція вказаних білків є процесом, що суворо контролюється, і його порушення може привести до розвитку тканинного фіброзу. Хоча утворення фіброзної тканини є частиною нормального доброякісного процесу загоєння тканини після пошкодження, за деяких обставин відбувається аномальне накопичення фіброзного матеріалу, так що зрештою це може призвести до недостатності органу [Border et al. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:1286-1292]. Пошкодження будь-якого органу спричиняє стереотипну відповідь: гемостаз, що викликається тромбоцитами, і подальший приплив запальних клітин і активованих фібробластів.

Під контролем виникаючих з вказаних типів клітин цитокінів відбувається формування нового позаклітинного матриксу і кровоносних судин (грануляційна тканина). Утворення грануляційної тканини є запрограмованим процесом, що суворо контролюється, в якому експресія протеїназних інгібіторів і білків позаклітинного матриксу регулюється за типом негативного зворотного зв'язку, причому експресія протеїназ зменшується, що призводить до накопичення позаклітинного матриксу.

Головною подією, що призводить до розвитку умов фіброзу, будь те індукований або спонтанний фіброз, є стимуляція активності фібробластів. Приплив запальних клітин і активованих фібробластів до пошкодженого органу залежить від здатності таких клітин до взаємодії з проміжним (інтерстиціальним) матриксом, до складу якого передусім входять фібронектин і колаген. Такі взаємодії клітин одна з одною і клітин з позаклітинним матриксом опосередковані декількома сімействами молекул міжклітинної адгезії, з яких одне з таких сімейств включає в себе інтегрини. Інтегрини являють собою структурно і функціонально пов'язані глікопротеїни, що складаються з різних альфа-(альфа-1 альфа-2, в наш час аж до альфа-11) і бета- (бета-1 і бета-7) гетеродимерних трансмембранних рецепторних доменів, що виявляються у різних комбінаціях фактично на всіх типах клітин ссавців [як огляд див. E. C. Butcher, *Cell*, 67, 1033 (1991); I. Cox et al., "The Pharmacology of the Integrins." *Medicinal Research Rev.* Vol. 195 (1994) and V. W. Engleman et al., "Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets" in *Ann. Revs. Medicinal Chemistry*, Vol. 31, J. A. Bristol, Ed.; AcadL Press, NY, 1996, p.191]. Були описані два інтегрини, що містять альфа-4-субодиниці; вони позначаються як альфа-4-бета-1 (VLA-4) і альфа-4-бета-7.

Інтерстиціальний легеневиий фіброз (IPF) є патологічним станом, до якого зрештою призводять багато які захворювання проміжної тканини легень, і внаслідок цього знижується міра еластичності легеневої тканини і послаблюється життєва функція газообміну легень. У залежності від етіології, IPF характеризується запальними і фібропроліферативними змінами легені і надмірним накопиченням колагену у проміжній тканині легені. У хворих з IPF у період активної фази легеневого фіброзу звичайно виявляється присутність циркулюючих імунних і запальних клітин, що вказує на те, що легеневиий фіброз є результатом аномального загоєння після первинного запального ураження. Циркулюючі запальні клітини, швидше усього, у багатьох випадках беруть участь у первинному ураженні. Крім того, ці клітини можуть грати комплексну роль у регуляції процесу загоєння. У будь-якому випадку циркуляція імунних і запальних клітин у легенях може відігравати важливу роль у реалізації фіброзної відповіді. Приплив запальних клітин і активованих фібробластів у пошкоджену легеню залежить від здатності вказаних типів клітин взаємодіяти з компонентами позаклітинного матриксу (ПКМ). Пересування і стан активації лейкоцитів модулюється різними інтегринами. Запобігання припливу запальних клітин у легені може виявитися критичним відносно подальшої фіброзної відповіді.

Багато захворювань, пов'язаних з проліферацією фіброзної тканини, є як хронічними, так і такими, що часто виснажують, включаючи, наприклад, такі захворювання як склеродермія. Деякі захворювання, включаючи легеневиий фіброз, можуть бути фатальними, частково у зв'язку з тим, що традиційні форми лікування цього захворювання мають істотні побічні ефекти і звичайно є неефективними відносно сповільнення або припинення прогресування фіброзу [Nagler et al. 1996, *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 154:1082-86]. Відповідно, існує постійна потреба у нових антифіброзних агентах.

Даний винахід забезпечує спосіб лікування фіброзу. Заявники вивчали можливу роль у патогенезі фіброзу шляхів введення антагоністів інтегринів, що містять альфа-1- і альфа-4-субодиниці, мишам з легеневиим фіброзом. Позитивний ефект, що надається вказаними антагоністами як на загальне накопичення колагену, так і на міру (вираженість) легеневиих уражень при фіброзі, як показано у даному повідомленні, передбачає, що інтегрини, що містять альфа-1 і/або альфа-4-субодиницю, можуть являти собою цілком резонні мішені антифіброзної терапії.

Одним з аспектів даного винаходу є спосіб, що включає в себе введення суб'єкту з явищами фіброзу ефективної кількості композиції, що включає в себе антагоніст взаємодії між інтегрином, який несе альфа-4-субодиницю, і лігандом, який несе альфа-4-субодиницю. Антагоністом є агент, що зв'язує альфа-4-інтегрин, або агент, що зв'язує ліганд альфа-4-інтегрину. Переважними альфа-4-зв'язуючими агентами є агенти, вибрані з групи, що складається з а) гомолога антитіла, який перешкоджає взаємодії як VLA-4, так і альфа-4-бета-7 з їх відповідними альфа-4-лігандами; б) гомолога антитіла, який перешкоджає взаємодії VLA-4 з його альфа-4-лігандом; і с) гомолога антитіла, який перешкоджає взаємодії альфа-4-бета-7 з його альфа-4-лігандом. У інших аспектах (пов'язаних з даним винаходом) гомолог антитіла вибраний з групи, що

складається з антитіла людини, химерного антитіла, гуманізованого антитіла і його фрагментів.

Іншим аспектом даного винаходу є спосіб зниження підвищеної під дією фіброзу кількості лейкоцитів у пробі (рідини) бронхоальвеолярного лаважу, що включає в себе стадії введення суб'єкту з фіброзом ефективною кількості антагоніста взаємодії між інтегрином, що несе альфа-4-субодиноцю, і лігандом інтегрину, що несе альфа-4-субодиноцю. У певних аспектах даного винаходу агент, що зв'язує альфа-4-інтегрин, кодується послідовністю нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту, яка гібридизується у деяких певних жорстких умовах з певними послідовностями нуклеїнової кислоти, вибраними з групи послідовностей, наведених у Таблиці 6 Патенту США 5,840,299, або послідовностей, комплементарних вказаним послідовностям нуклеїнової кислоти. У інших аспектах способу згідно з винаходом агент, що зв'язує ліганд альфа-4-інтегрину, кодується послідовністю нуклеїнової кислоти, що містить нуклеїнову кислоту, яка гібридизується у деяких певних жорстких умовах з послідовністю нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептидну послідовність, вибрану з групи, що складається з певних поліпептидів, які виявляються у Патенті США 5,932,214 або які продукуються лінією клітин ATCCCL11175.

Вся література, що цитується у попередньому розділі, також як і література, що цитується, і опубліковані патенти, які фігурують у подальшому описі, включені сюди у вигляді посилання.

I. Визначення

Щоб більш ясно і точно охарактеризувати предмет заявленого винаходу, приводяться наступні визначення специфічних термінів, що використовуються у нижченаведеному описі і прикладеній формулі винаходу.

Тепер даний винахід буде описаний відповідно до подальшого докладного викладу, в якому використані наступні визначення:

Дуже пізній антиген (VLA) суперсімейства інтегринів складається зі структурно і функціонально пов'язаних глікопротеїнів, що складаються з (альфа- і бета-) гетеродимерних молекул трансмембранного рецептора, що виявляються у різних комбінаціях майже на всіх типах клітин ссавців (як огляд див.: E. C. Butcher, Cell, 67, 1033 (1991); D. Cox et al, "The Pharmacology of the Integrins" Medicinal Research Rev, (1994) and V. W Engleman et al., 'Cell Adhesion Integrins as Pharmaceutical Targets.' in Ann. Report in Medicinal Chemistry Vol. 31, J. A. Bristol, Ed.; Acad. Press, NY.,1996, p. 191). Інтегрини сімейства VLA включають в себе (в наш час) VLA-1, -2, -3, -4, -5, -6, -9 і -11, в яких кожна з молекул містить β 1-ланцюг, нековалентно пов'язану з альфа-ланцюгом (α 1, α 2, α 3, α 4, α 5, α 6 і так далі), відповідно.

Інтегрин альфа-4-бета-1 (α 4 β 1) є рецептором клітинної поверхні для VCAM-1, фібронектину і, можливо, інших лігандів (вказані ліганди, взяті разом або індивідуально, позначаються тут як "альфа-4-ліганд(и)"). Термін α 4 β 1-інтегрин ("VLA-4" або " α 4 β 1", або "альфа-4-бета-1-інтегрин", взаємозамінні у використанні) відноситься тут до поліпептидів, які здатні зв'язуватися з VCAM-1 і білками, що входять до складу позаклітинного матриксу, більш конкретно - фібронектин або його гомологи або фрагменти, хоча фахівцям і рядовим співробітникам, працюючим у даній області, цілком очевидно, що можуть існувати й інші ліганди VLA-4, які можна вивчати за допомогою звичайних традиційних методів. Проте, відомо, що субодиноця альфа-4 буде асоціюватися і з іншими бета-субодиноцями, крім бета-1, так що можна визначити термін "альфа (α)-4-інтегрин" або "інтегрин, що містить альфа (α)-4-субодиноцю" як такі інтегрини, у яких альфа-4-субодиноця асоційована з тією або іншою з бета-субодиноць. Іншим прикладом "альфа-4"-інтегрину, крім VLA-4, є альфа-4-бета-7 (див. Lobb and Adams, вище). Схожим чином, "альфа (α)-1-інтегрини", або "інтегрини, що містять альфа(α)-1-субодиноцю", є такі інтегрини, у яких альфа-1-субодиноця асоційована з тією або іншою з бета-субодиноць.

"Антагоніст" інтегрину включає в себе будь-яку сполуку, яка інгібує скріплення інтегринів, що містять альфа-1- і/або альфа-4-субодиноцю, з інтегриновим лігандом і/або рецептором. Використовуються також антиінтегринове антитіло або білки, що містять гомолог антитіла (що обговорюються нижче), а також інші молекули, такі як розчинні форми інтегринових білкових лігандів. Розчинні форми білкових лігандів для інтегринів, що містять альфа-4-субодиноцю, включають в себе розчинний VCAM-1, білки, злиті з VCAM-1, або біфункціональні VCAM-1/Ig-злиті білки. Наприклад, для скріплення з інтегрином може бути введена розчинна форма інтегринового ліганду або його фрагменту, і переважно - компетентна відносно сайта скріплення інтегрину на клітинній поверхні, що приводить, таким чином, до ефектів, схожих з ефектами, що викликаються введенням антагоністів, таких як антиінтегринові (наприклад, VLA-1, VLA-4) антитіла. Зокрема, в об'єм даного винаходу входять також розчинні інтегринові мутанти, які зв'язують ліганд, але не викликають інтегрин-залежного сигналювання. Такі інтегринові мутанти можуть діяти як конкурентні інгібітори інтегринового білка дикого типу і вважаються "антагоністами". Іншими антагоністами, що використовуються у способах згідно з винаходом, є "малі молекули", як описано нижче.

У рамки даного винаходу входять також способи, в яких використовуються молекули, які є антагоністами дії інтегрину, що містить більше однієї альфа-4-субодиноці, такі як малі молекули або гомологи антитіл, які є антагоністами як VLA-4, так і альфа-4-бета-7 або інших комбінацій інтегринів, що містять альфа-4-субодиноцю. У рамки даного винаходу входять також способи, в яких використовуються молекули, які є антагоністами дії інтегрину, що містить більше однієї альфа-1-субодиноці. У рамки даного винаходу входять також способи, в яких використовується комбінація молекул, така, що ця комбінація є антагоністом дії більш ніж одного інтегрину, причому у вказаних способах використовується декілька малих молекул або гомологів антитіл, комбінація яких є антагоністичною по відношенню до дії як VLA-4, так і альфа-4-бета-7 або інших комбінацій інтегринів, що містять альфа-4-субодиноцю.

Як вже згадувалося вище, певні антагоністи інтегрину можуть бути злиті або -інакше - кон'юговані, наприклад, з гомологом антитіла, таким як імуноглобулін або його фрагмент, і не обмежені конкретним типом або

структурою інтегрину або ліганду або іншої молекули. Таким чином, для цілей даного винаходу будь-який агент, здібний до утворення химерного білка (як визначено нижче) і здатний зв'язуватися з інтегриновими лігандами, який ефективно блокує або покриває інтегрин, що містить альфа-4- і/або альфа-1-субодиницю, вважається еквівалентним антагоністам, що використовуються у приведених тут прикладах.

"Гомолог антитіла" включає в себе інтактні антитіла, що складаються з легких і важких ланцюгів імуноглобуліну, пов'язаних дисульфідними містками. Під терміном "гомолог антитіла" мається на увазі також білок, що містить один або більше поліпептидів, виділених з легких ланцюгів імуноглобуліну, важких ланцюгів імуноглобуліну і їх антиген-зв'язуючих фрагментів, який здатний зв'язуватися з одним або більше антигенами (тобто інтегрином або інтегриновим лігандом). Поліпептиди-компоненти гомолога антитіла, що складаються більш ніж з одного поліпептиду, можуть необов'язково бути пов'язаними дисульфідним зв'язком або - інакше - пов'язаними поперечними ковалентними зв'язками. Отже, "гомологи антитіла", відповідно, включають в себе інтактні імуноглобуліни класів IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (також як і їх субкласів), в яких легкі ланцюги імуноглобулінів можуть бути легкими ланцюгами каппа- або лямбда-типів. "Гомологи антитіла" також включають в себе частини інтактних антитіл, які зберігають специфічність скріплення антигена, наприклад, Fab-фрагменти, Fab'-фрагменти, P(ab')₂-фрагменти, P(v)-фрагменти, мономери або димери важкого або легкого ланцюгів або їх суміші.

"Гомологом гуманізованого антитіла" є гомолог антитіла, що продукується за допомогою технології рекомбінантної ДНК, в якому деякі або ж усі амінокислоти людини, які не є необхідними для скріплення антигена, замінені відповідними амінокислотами з легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну ссавців, які не є людиною. "Гомологом антитіла людини" є гомолог антитіла, в якому усі амінокислоти легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну (незалежно від того, чи є вони необхідними для скріплення антигена) одержані з матеріалу людської природи.

У даному тексті "гомологом антитіла людини" є гомолог антитіла, що продукується за допомогою технології рекомбінантної ДНК, в якому усі амінокислоти легкого або важкого ланцюга імуноглобуліну одержані з матеріалу людської природи.

"Агоніст" інтегрину включає в себе будь-яку сполуку, яка активує ліганд інтегрину. "Амінокислота" є мономерною одиницею пептиду, поліпептиду або протеїну. Існує двадцять амінокислот, що виявляються в природних пептидах, поліпептидах і протеїнах, і усі вони є L-ізомерами. Цей термін включає в себе також аналоги амінокислот і D-ізомери білкових амінокислот і їх аналоги.

"Ковалентно пов'язаний" означає, що спеціальні (особливі) фрагменти даного винаходу (наприклад, PEG-ільований антагоніст альфа-4- і/або альфа-1-інтегрину, імуноглобуліновий фрагмент/ антагоніст альфа-4- або альфа-1-інтегрину) або є ковалентно пов'язаними один з одним безпосередньо, або ковалентно пов'язані один з одним через вбудований фрагмент або фрагменти, такі як спейсерний фрагмент або фрагменти. Такий вбудований фрагмент або фрагменти називається "зв'язуючою групою". Термін "кон'югований" використовується нарівні з терміном "ковалентно пов'язаний", і ці терміни є взаємозамінними. У зв'язку з цим "спейсер" відноситься до фрагменту, який може бути вставлений між амінокислотою або іншим компонентом антагоніста інтегрину або фрагменту і іншою молекулою. Спейсер може забезпечувати розділення між амінокислотою або іншим компонентом і іншою молекулою, таким чином, щоб захистити модифікацію від можливості порушення білкової функції і/або полегшити скріплення амінокислоти або іншого компонента з іншим фрагментом.

"Послідовність, контролююча експресію" - це послідовність полінуклеотидів, яка контролює і регулює експресію генів, коли вона оперативно пов'язана з цими генами.

"Експресуючий вектор", або "вектор експресії" - це полінуклеотид, такий як ДНК плазмиди або фага (нарівні з іншими загальними прикладами), який забезпечує експресію щонайменше одного гена при внесенні вказаного вектора експресії у клітину живителя. При цьому вказаний вектор може або не може бути здатний експресуватися у клітині.

"Ефективна кількість" агента згідно з винаходом - це така кількість, яка виявляється результативною або впливає на конкретний стан, який зазнає лікування.

"Функціональним еквівалентом" амінокислотного залишку є (i) амінокислотний залишок, що має реактивні властивості, схожі з властивостями амінокислотного залишку, який був замінений функціональним еквівалентом; (ii) амінокислотний залишок антагоніста згідно з винаходом, причому вказаний амінокислотний залишок має реактивні властивості, схожі з властивостями амінокислотного залишку, який був замінений функціональним еквівалентом; (iii) неамінокислотна молекула, що має властивості, схожі з властивостями амінокислотного залишку, який був замінений функціональним еквівалентом.

Перший полінуклеотид, що кодує протеїнізований антагоніст згідно з винаходом, є "функціональним еквівалентом", порівняним з другим полінуклеотидом, що кодує протеїн-антагоніст, якщо виконується щонайменше одна з наступних умов:

(а) "функціональний еквівалент" є першим полінуклеотидом, який гібридується з другим полінуклеотидом у стандартних умовах гібридизації і/або є вродженим по відношенню до послідовності першого полінуклеотиду. У найбільш переважному випадку він кодує мутантний протеїн, що має активність протеїну антагоніста інтегрину,

(б) "функціональний еквівалент" є першим полінуклеотидом, який кодує експресію амінокислотної послідовності, що кодується другим полінуклеотидом.

Антагоністи інтегрину, що використовуються у даному винаході, включають в себе, не обмежуючись ними, перераховані тут агенти, а також їх функціональні еквіваленти. У рамках даного опису термін "функціональний еквівалент" відноситься, таким чином, до антагоніста інтегрину або до полінуклеотиду, що кодує антагоніст інтегрину, який чинить на реципієнта такий же або ж поліпшений сприятливий вплив, що і антагоніст інтегрину,

функціональним еквівалентом якого він є. Рядовому фахівцеві в даній області очевидно, що функціонально еквівалентний протеїн може бути одержаний за допомогою рекомбінантної технології, наприклад, шляхом експресії "функціонально еквівалентної ДНК", Відповідно, даний винахід охоплює інтегринові протеїни, що кодуються природними ДНК, також як і неприродними ДНК, які кодують той же протеїн, який кодується природною ДНК. Внаслідок виродженості полінуклеотидних кодуючих послідовностей для кодування інтегринового протеїну можуть бути використані і інші полінуклеотиди. Останні включаються в себе - цілком або частково - перераховані вище послідовності, які змінені шляхом заміни різних кодонів, які кодують один і той же амінокислотний залишок всередині послідовності, продукуючи, таким чином, заміну "що мовчить" (або "нульову"). Такі змінені послідовності розглядаються як еквівалентні початковим послідовностям. Наприклад, Phe (F) кодується двома кодонами, TTC або TTT, Tyr (Y) кодується кодонами TAC або TAT, а His (H) кодується кодонами CAC або CAT. З іншого боку, Trp (W) кодується єдиним кодоном TGG. Відповідно, переважно, щоб для даної послідовності ДНК, що кодує конкретний інтегрин, існувало багато вироджених послідовностей, що кодують вказаний інтегрин. Вироджені послідовності ДНК, про яких йде мова, вважаються такими, що входять в рамки даного винаходу.

Термін "химерний", коли він відноситься до антагоніста згідно з винаходом, означає, що вказаний антагоніст складається з пов'язаних (хімічними поперечними або ковалентними зв'язками або ж іншими зв'язками) двох або більше протеїнів, що мають непорівнянні структури і/або що мають різну непорівнянну природу або джерела, з яких вони одержані. Таким чином, химерний антагоніст альфа-4-інтегріну може включати в себе один фрагмент, який є антагоністом альфа-4-інтегріну або його фрагменту, і інший фрагмент, який не є антагоністом альфа-4-інтегріну. Химерний антагоніст альфа-1-інтегріну може включати в себе один фрагмент, який є антагоністом альфа-1-інтегріну або його фрагменту, і інший фрагмент, який не є антагоністом альфа-1-інтегріну.

Різновидом "химерного" білка (протеїну) є "злитий білок", який відноситься до колінеарних, що складається з двох або більше, білків або їх фрагментів, ковалентно пов'язаних через їх індивідуальний пептидний каркас, найбільш переважно - шляхом генетичної експресії полінуклеотидної молекули, що кодує вказані білки. Таким чином, переважними злитими білками є химерні білки, які включають в себе антагоніст альфа-4-(або альфа-1-) інтегріну або фрагмент, ковалентно пов'язаний з другим фрагментом, який не є антагоністом альфа-4-(або альфа-1-) інтегріну. Переважні злиті білки згідно з винаходом можуть включати в себе частини інтактних антитіл, які зберегли специфічні антиген-зв'язуючі властивості, наприклад, Fab-фрагменти, Fab'-фрагменти, F(ab')₂-фрагменти, P(v)-фрагменти, мономери або димери важкого ланцюга, мономери або димери легкого ланцюга, димери, що складаються з одного важкого і одного легкого ланцюга, і тому подібне.

Найбільш переважними злитими білками є химерні білки, і вони включають в себе фрагмент антагоніста інтегріну, злитий або пов'язаний іншим способом з легким ланцюгом імуноглобуліну, що містить повністю або частково шарнірну і константну області легкого ланцюга, з важким ланцюгом імуноглобуліну, що містить повністю або частково шарнірну і константну області важкого ланцюга, або з ними обома. Таким чином, даний винахід пов'язаний з молекулою, яка включає в себе (1) фрагмент антагоніста інтегріну, (2) другий пептид, наприклад, такий, який підвищує розчинність або збільшує час життя *in vivo* фрагменту антагоніста інтегріну, або ж, наприклад, член суперсімейства імуноглобулінів або його фрагмент або частину його, або, наприклад, частину або фрагмент IgG, наприклад, константна область важкого ланцюга IgG1 людини, наприклад, CH₂, CH₃ і шарнірна області. Зокрема, "злиття антагоніста інтегріну з Ig" дає білок, що містить біологічно активну молекулу антагоніста інтегріну згідно з винаходом (наприклад, розчинний ліганд VLA-4 або VLA-1 або його біологічно активний фрагмент, пов'язаний з N-кінцем імуноглобуліну, причому частина N-кінця імуноглобуліну замінена антагоністом інтегріну). Різновидом злитого білка антагоніст інтегріну/Ig є злитий білок "інтегрин/Fc", який являє собою білок, що містить антагоніст інтегріну згідно з винаходом, пов'язаний щонайменше з частиною константного домену імуноглобуліну. Переважне Fc-злиття включає в себе антагоніст інтегріну згідно з винаходом, пов'язаний з фрагментом антитіла, що містить C-кінцевий домен важких ланцюгів імуноглобуліну.

Термін "злитий білок" означає також антагоніст інтегріну, хімічно пов'язаний за допомогою моно- або гетерофункціональної молекули з другим фрагментом, який не є антагоністом інтегріну (з утворенням "химерної" молекули), і створений *de novo* з очищеного білка, як описано нижче. Таким чином, один, з прикладів хімічно пов'язаної, на відміну від рекомбінантно пов'язаної, химерної молекули, яка є злитим білком, може включати в себе (1) фрагмент, таргетуючий субоддиницю альфа-4-інтегріну, наприклад, фрагмент VCAM-1, здатний зв'язуватися з VLA-4 на поверхні клітин, що несуть VLA-4; (2) другу молекулу, яка підвищує розчинність або збільшує час життя *in vivo* таргетуючого фрагменту, наприклад, полімер поліалкіленгліколю, такий як поліетиленгліколь (PEG). Фрагмент, таргетуючий альфа-4, може являти собою будь-який альфа-4-ліганд або його фрагмент, наприклад, пептид VCAM-1 або схожа з ним послідовність, що містить консервативні заміни.

Під "гетерологічним промотором" тут мається на увазі промотор, який в природі не є асоційованим з геном або з очищеною нуклеїновою кислотою.

Під "гомологією" тут мається на увазі синонім терміну "ідентичність", і відноситься вказаний термін до схожості між двома послідовностями поліпептидів, молекул або між двома нуклеїновими кислотами. Коли яке-небудь положення в обох з двох послідовностей, що порівнюються, зайняте однією і тією ж мономерною субоддиницею основи або амінокислоти (наприклад, якщо якесь положення в кожній з двох молекул ДНК зайняте аденином або якесь положення в кожному з двох поліпептидів зайняте лізином), в такому випадку відповідні молекули є гомологічними за даним положенням. Процент гомології між двома послідовностями є функцією від числа збігів або гомологічних положень, що є у вказаних двох послідовностях, що порівнюються, поділеного на

число положень, що порівнюються, $\times 100$. Наприклад, якщо 6 з 10 положень у двох послідовностях співпадають або є гомологічними, тоді вказані послідовності є на 60% гомологічними. У порядку прикладу, послідовності ДНК CTGACT і CAGGTT мають 50% гомологію (3 з 6 положень співпадають). Звичайно порівняння проводять у тих випадках, коли дві послідовності при порівняльному аналізі первинної структури мають максимальну гомологію. Такий порівняльний аналіз первинної структури може бути забезпечений, наприклад, методом Karlin і Altschul, що більш детально описується нижче.

Гомологічні послідовності мають ідентичні або схожі амінокислотні залишки, причому схожі залишки являють собою консервативні заміни на відповідні амінокислотні залишки в послідовності, з якою проведений порівняльний аналіз первинної структури, або "дозволені точкові мутації" вказаної послідовності, з якою проведений порівняльний аналіз первинної структури. У зв'язку з цим "консервативною заміною" залишку в згаданій послідовності є такі заміни, які фізично або функціонально схожі з відповідними вказаними залишками, наприклад, такими, які мають схожий розмір, форму, електричний заряд, хімічні властивості, включаючи здатність утворювати ковалентні або водневі зв'язки, або тому подібне. Зокрема, переважними консервативними замінами є такі, які задовольняють критеріям, що визначаються для "прийнятної точкової мутації" у Dayhoff et al, 5: Atlas of Protein Sequence and Structure, 5: Suppl. 3, chapter 22: 354-352, Nat. Biomed. Res. Foundation, Washington, D.C. (1978).

"Гомологія" і "ідентичність" є тут взаємозамінними, і кожний з термінів відноситься до схожості послідовностей двох поліпептидів. Гомологія і ідентичність можуть бути визначені шляхом порівняння положення в кожній з послідовностей, які, з урахуванням результатів порівняльного аналізу первинної структури, придатні для порівняння. Коли яке-небудь положення в послідовностях, що порівнюються, зайняте одним і тим самим амінокислотним залишком, в такому випадку поліпептиди, що порівнюються, вважаються гомологічними за даним положенням; коли еквівалентний сайт зайнятий однією і тією ж амінокислотою (наприклад, ідентичною) або схожою амінокислотою (наприклад, схожою за стеричною або електронною природою), в такому випадку відповідні молекули є гомологічними за даним положенням. Процент гомології або ідентичності між послідовностями є функцією від числа збігів або гомологічних положень, що є в послідовностях, які порівнюються. "Неспоріднена", або "негомологічна", послідовність має менше 40% ідентичності, хоча і переважно, щоб мала менше 25% ідентичності, з послідовністю згідно з винаходом.

"Процент гомології" двох амінокислотних послідовностей або двох послідовностей нуклеїнових кислот визначається за допомогою алгоритму порівняльного аналізу первинної структури Karlin і Altschul (Proc. Nat. Acad. Sei, USA 87: 2264 (1990), модифікованого Karlin і Altschul (Proc. Nat. Acad. Sei, USA 90: 5873 (1993). Такий алгоритм включений у програми NBLAST або XBLAST Altschul et al., J. Mol. Biol. 215: 403 (1990). BLAST-аналізи зроблені з використанням програми NBLAST, схема (підррахунку) =100, довжина слова =12, для одержання нуклеотидних послідовностей, гомологічних нуклеотидним послідовностям згідно з винаходом. BLAST-аналізи білків зроблені з використанням програми XBLAST, схема (підррахунку) =50, довжина слова =3, для одержання амінокислотних послідовностей, гомологічних згаданому поліпептиду. Для одержання порівняльного gapped-аналізу первинних структур використали програму gapped-BLAST, як описано у Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25: 3389 (1997). При виконанні аналізів BLAST і Gapped-BLAST використали параметри відповідних програм (XBLAST і NBLAST). Див. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Термін "виділений" (використовується взаємозамінно з терміном "істотно чистий"), коли він застосовується відносно нуклеїнової кислоти, тобто полінуклеотидних послідовностей, які кодують антагоністи інтегрину, означає полінуклеотид РНК або ДНК. частину геномного полінуклеотиду, кДНК або синтетичний полінуклеотид, який за своєю природою або внаслідок маніпуляцій (i) є неасоційованим з усіма з полінуклеотидів, з якими він асоційований в природі (наприклад, присутній у клітині живителя у вигляді експресуючого вектора або його частини); або (ii) пов'язаний з нуклеїновою кислотою або з іншим хімічним фрагментом, який відрізняється від того, з яким він пов'язаний в природі; або (iii) не зустрічається в природі. Далі, під "виділеною" мається на увазі полінуклеотидна послідовність, яка (i) ампліфікована *in vitro* шляхом, наприклад, полімеразної ланцюгової реакції (PCR); (ii) хімічно синтезована; (iii) одержана рекомбінантним шляхом за допомогою клонування; або (iv) очищена, наприклад, шляхом розщеплення і розділення у гелі. Таким чином, "істотно чистою нуклеїновою кислотою" є нуклеїнова кислота, яка безпосередньо не прилягає (стикається) дооднієї або більше кодуючих послідовностей, до яких вона прилягає (стикається) в природному геномі в організмі, з якого дана нуклеїнова кислота одержана. Істотно чиста ДНК включає в себе також і рекомбінантну ДНК, яка є частиною гібридного гена, що кодує додаткові послідовності інтегрину.

Термін "виділений" (використовується взаємозамінно з терміном "істотно чистий"), коли він застосовується у відношенні поліпептидів, означає поліпептид або частину його, який за своєю природою або внаслідок маніпуляцій (i) присутній у клітині живителя у вигляді продукту експресії або частини експресуючого вектора; або (ii) пов'язаний з білком або з іншим хімічним фрагментом, який відрізняється від того, з яким він пов'язаний в природі, або (iii) не зустрічається в природі, наприклад, білок, який хімічно модифікований шляхом додавання до нього хоча б одного гідрофобного фрагменту, так, що білок набуває форми білка, що не зустрічається в природі. Далі, під "виділеним" мається на увазі білок, який (i) синтезований хімічним шляхом; або (ii) експресований у клітині живителя і очищений від асоційованих з ним і супутніх йому білків. Вказаний термін звичайно означає поліпептид, який відділений від інших білків і нуклеїнових кислот, з якими він звичайно асоційований в природі. Переважно, щоб поліпептид був відділений також і від таких речовин як антитіла і гелевий матрикс (поліакриламід), які використовуються для його очищення.

"Мультивалентний білковий комплекс" відноситься до множини антагоністів інтегрину (тобто доодного або більше). Гомолог антиінтегринового антитіла або його фрагмент може бути поперечно пов'язаним або

пов'язаним з іншим гомологом антитіла або його фрагментом. Кожний з білків може бути одним і тим же або різним, і кожний з гомологів антитіла або його фрагментів може бути одним і тим же або різним.

"Мутант" - будь-яка зміна у генетичному матеріалі організму, зокрема, будь-яка зміна (тобто делеція, заміна, добавка або відхилення) у полінуклеотидній послідовності дикого типу або будь-яка зміна у білці дикого типу. Термін "мутеїн" і термін "мутант" використовуються як взаємозамінні.

"Оперативно пов'язаний" - полінуклеотидна послідовність (ДНК, РНК) є оперативно пов'язаною з послідовністю, контролюючою експресію, коли контролююча експресію послідовність контролює і регулює транскрипцію і трансляцію вказаної полінуклеотидної послідовності. Термін "оперативно пов'язаний" включає в себе наявність відповідного стартового сигналу (наприклад, АТГ) перед полінуклеотидною послідовністю, яка підлягає експресії, і збереження правильної рамки зчитування, щоб експресія полінуклеотидної послідовності відбувалася під контролем експресії контрольної послідовності, і продукція необхідного поліпептиду кодувалася поліпептидною послідовністю.

"Фармакологічний агент" визначається як одна або більше сполуки або молекули або інші хімічні речовини, що вводяться суб'єкту (додатково до антагоністів згідно з винаходом), які посилюють дію антагоніста. Термін "фармакологічний агент", що використовується тут, відноситься до такого агента(ів), який вводять в процесі "комбінованої терапії", коли антагоніст згідно з винаходом вводиться або до, або після, або одночасно з введенням одного або більше фармакологічних агентів.

"Протеїн", або "білок", - це будь-який полімер, який головним чином складається з будь-якої з 20 амінокислот. Хоча термін "поліпептид" часто використовується при вказівці на відносно великі поліпептиди, а термін "пептид" часто використовується у відношенні малих поліпептидів, використання вказаних термінів в даній області перекривається і є варіабельним. Термін "протеїн" використовується тут, якщо не вказано інакше, відносно пептидів, білків і поліпептидів.

Терміни "пептид(и)", "білок(ки)" і "поліпептид(и)" використовуються тут як взаємозамінні. Терміни "полінуклеотидна послідовність" і "нуклеотидна послідовність" також використовуються тут як взаємозамінні.

Термін "рекомбінантний", що використовується тут, означає, що білок одержаний з рекомбінантних експресуючих систем ссавців. Оскільки інтегрин не є ні глікозилізованим, ні таким, що містить дисульфідні зв'язки, він може бути експресований у більшості прокаріотичних і еукаріотичних експресуючих систем.

"Мала молекула" має те ж визначення, яке наведене у розділі А2. Вираз "поверхнева" означає будь-яку амінокислоту, яка експонована у розчиннику, коли упаковка білка відповідає його нативній формі.

"Умови гібридизації" звичайно мають на увазі сольові і температурні умови, еквівалентні 0,5 X SSC приблизно до 5XSSC і 65°C як для гібридизації, так і для промивання. Таким чином, термін "стандартні умови гібридизації", що використовується тут, є оперативним визначенням і охоплює інтервал умов гібридизації. Проте термін "жорсткі" умови включає в себе гібридизацію з використанням буфера "plaque screen" (0,2% полівінілпіролідону, 0,2% Фікол-400; 0,2% бичачого сироваткового альбуміну, 50mM Tris-HCl (pH 7,5); 1M NaCl; 0,1% пірофосфату натрію; 1% SDS); 10% декстрансульфату і 100мкг/мл денатурованої, обробленої ультразвуком ДНК сперми лосося, при 65°C протягом 12-20 годин, і промивання 75мм NaCl/7,5mM цитратом натрію (0,5xSSC)/1% SDS при 65°C. "Гібридизація в умовах зниженої жорсткості" включає в себе гібридизацію з використанням буфера "plaque screen", 10% декстрансульфату і 110мкг/мл денатурованої, обробленої ультразвуком ДНК сперми лосося, при 55°C протягом 12-20 годин, і промивання 300mM NaCl/30mM цитратом натрію (2,0XSSC)/1% SDS при 55°C. Див. також Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc. New York, Sections 6.3.1-6.3.6, (1989).

Термін "терапевтична композиція", що використовується тут, включає в себе антагоністи згідно з винаходом і інші біологічно сумісні інгредієнти. Терапевтична композиція може містити такі ексципієнти як вода, мінерали, і такі носії як білок.

Термін "суб'єкт зі станом фіброзу" відноситься, не обмежуючись цим, до суб'єктів, страждаючих від фіброзу внутрішнього органу, до суб'єктів, страждаючих від фіброзного захворювання шкіри, і до суб'єктів, страждаючих від фіброзних станів ока. Фіброз внутрішніх органів (наприклад, печінки, легені, нирки, серця, кровоносних судин, шлунково-кишкового тракту) виникає при таких патологічних станах як легеневий фіброз, мієлофіброз, цироз печінки, мезангіальний проліферативний гломерулонефрит, серпастий гломерулонефрит, діабетична нефропатія, ниркоподібний інтерстиціальний фіброз, ниркоподібний фіброз у хворих, що приймають циклоспорин, і нефропатія, асоційована з НТВ. Фіброзні захворювання шкіри включають в себе, не обмежуючись ними, склеродермію, кільцевидну склеродермію, келоїди, гіпертрофовані рубці, сімейну шкірну колагеному і невис сполучної тканини колагенового типу фіброзні стани ока включають в себе такі стани як діабетична ретинопатія, постхірургічне утворення рубця (наприклад, після операції з видалення глаукоми і після попереочно-очної хірургії), і проліферативну вітроретинопатію. Додаткові фіброзні стани, які можна лікувати способами згідно з даним винаходом, включають в себе ревматоїдний артрит, хвороби, пов'язані з тривалим болем в суглобах і деградацією суглобів; прогресивний системний склероз, поліміозити, дерматоміозити, еозинофільний фасцит, кільцевидну склеродермію, синдром Рейно і назальний поліпоз. Крім того, фіброзні стани, які можна лікувати, використовуючи способи згідно з даним винаходом, також включають в себе інгібування посиленої продукції рубцової тканини у хворих, для яких властиве утворення келоїдів або гіпертрофованих рубців, інгібування або запобігання процесу утворення рубців або посиленої продукції рубцової тканини в процесі загоєння різних типів ран, включаючи і хірургічні розрізи, хірургічні абдомінальні рани і травматичні рани, запобігання або інгібування процесу утворення рубців і повторного закриття артерії в результаті коронарної ангіопластики, запобігання або інгібування процесу утворення надмірної рубцової або фіброзної тканини, асоційованої з фіброзом тканини серця після інфаркту, і при гіпервразливій васкулопатії.

Термін "ефективна кількість" має на увазі таку кількість, якої досить для надання сприятливого впливу або одержання необхідних результатів. Ефективна кількість може бути введена у вигляді одноразового або багаторазового введення. У термінології лікувальної практики "ефективна кількість" антагоніста для застосування у даному винаході означає кількість, достатню для паліативного впливу, для поліпшення, стабілізації, зворотного розвитку, сповільнення або відкладеного прогресування фіброзного стану, відповідно до загальноприйнятих стандартів, розроблених для лікування захворювань. Визначення і вимірювання індикаторів ефективності можуть бути зроблені за допомогою цілого ряду доступних діагностичних підходів, включаючи, наприклад, фізичні аналізи, такі як аналізи крові, перевірку функції легень і рентген грудної клітини; комп'ютерну томографію; бронхоскопію; бронхоальвеолярний лаваж; біопсію легень і комп'ютерну томографію.

Практично в даному винаході будуть використані, якщо не обумовлено особливо, традиційні методи клітинної біології, культивування клітин, молекулярної біології, мікробіології, рекомбінантної ДНК, білкової хімії, фармакології і імунології, які знаходяться в межах компетенції фахівців в даній області. Всі ці методи описані у літературі. Якщо не обумовлено особливо, всі посилання, що наводяться у розділі "Докладний опис винаходу", включені у даний опис у вигляді посилань.

II. Опис переважних аспектів

Даний опис пов'язаний з відкриттям можливості використання антагоністів інтегринів, що містять альфа-1-і/або альфа-4-субодиницю, і їх фрагментів для лікування легеневих фіброзів.

A. Антагоністи інтегрину

Для цілей даного винаходу антагоністом інтегрину може бути антагоніст, перешкоджаючий будь-якій взаємодії між інтегрином і лігандом, який упізнає його, або рецептором, так, що нормальна функція, що індукується взаємодіями ліганд-рецептор, стає зміненою (тобто вона запобігається, сповільнюється або стає яким-небудь іншим чином модифікованою). У одному з переважних аспектів антагоніст інтегрину є антагоністом взаємодій альфа-4-інтегринів з їх лігандами, таких як взаємодія VCAM-1/VLA-4. Це - агент, наприклад, поліпептид або інша молекула, який може інгібувати або блокувати скріплення, опосередковане VCAM-1 і/або VLA-4, або який іншим способом модулює функцію VCAM-1 і/або VLA-4, наприклад, шляхом інгібування або блокування опосередкованої VLA-4-лігандом передачі сигналу VLA-4 або опосередкованої VCAM-1-лігандом передачі сигналу VCAM-1, і який є ефективним при лікуванні гострого ураження мозку, переважно таким же чином, що і анти-VLA-4-антитіла.

Антагоністом взаємодії VCAM-1/VLA-4 є агент, який володіє однією або більше з наступних властивостей: (1) він покритий або пов'язаний з VLA-4 на поверхні клітини, що несе VLA-4, (наприклад, лімфоциту), володіє достатньою специфічністю відносно інгібування взаємодії VLA-4-ліганд/VLA-4, наприклад, взаємодії VCAM-1/VLA-4; (2) він покритий або пов'язаний з VLA-4 на поверхні клітини, що несе VLA-4, (наприклад, ендотеліальної клітини), володіє достатньою специфічністю відносно модифікування, і переважно інгібування передачі VLA-4-опосередкованого сигналу, наприклад, VLA-4/VCAM-1-опосередкованого сигналювання; (3) він покритий або пов'язаний з VLA-4-лігандом наприклад, VCAM-1) на ендотеліальних клітинах, володіє достатньою специфічністю відносно інгібування взаємодії VLA-4/VCAM-1; (4) він покритий або пов'язаний з VLA-4-лігандом, (наприклад, VCAM-1), володіє достатньою специфічністю відносно модифікування, і переважно інгібування передачі опосередкованого VLA-4-лігандом VLA-4-сигналювання, наприклад, VCAM-1-опосередкованого VLA-4-сигналювання. У переважних аспектах антагоніст володіє однією або більше з властивостей 1 і 2. У інших переважних аспектах антагоніст володіє однією або більше з властивостей 3 і 4. Більш того, можна використати більше одного антагоніста, наприклад, агент, який зв'язується з VLA-4, можна комбінувати з агентом, який зв'язується з VCAM-1.

У іншому аспекті антагоніст інтегрину є антагоністом взаємодій альфа-1-інтегринів з їх лігандами, таких як взаємодія колаген/VLA-1. Це - агент, наприклад, поліпептид або інша молекула, який може інгібувати або блокувати скріплення, опосередковане колагеном і/або VLA-1, або який іншим способом може модулювати функцію колагену і/або VLA-1, наприклад, шляхом інгібування або блокування опосередкованої VLA-1-лігандом передачі сигналу VLA-1 або опосередкованої колагеном передачі сигналу. Антагоніст взаємодії колаген, VLA-1 є агентом, який володіє однією або більше з наступних властивостей: (1) він покритий або пов'язаний з VLA-1 на поверхні VLA-4-несучої клітини (наприклад, колаген), володіє достатньою специфічністю відносно інгібування взаємодії VLA-1-ліганд/VLA-1, наприклад, взаємодії колаген/VLA-1; (2) він покритий або пов'язаний з VLA-1 на поверхні клітини, що несе VLA-4, володіє достатньою специфічністю відносно модифікування, і переважно інгібування передачі VLA-1 - опосередкованого сигналу, наприклад, VLA-1/колагенопосередкованого сигналювання; (3) він покритий або пов'язаний з VLA-1-лігандом, (наприклад, колагеном), володіє достатньою специфічністю відносно інгібування взаємодії VLA-1/колаген; (4) він покритий або пов'язаний з VLA-1-лігандом, володіє достатньою специфічністю відносно модифікування, і переважно інгібування передачі опосередкованого VLA-1-лігандом VLA-1-сигналювання, наприклад, опосередкованого колагеном VLA-1-сигналювання. У переважних аспектах альфа-1-антагоніст володіє однією або більше з властивостей 1 і 2. У інших переважних аспектах антагоніст володіє однією або більше з властивостей 3 і 4. Більш того, хворому можна вводити більше одного антагоніста, наприклад, агент, який зв'язується з VLA-1, можна комбінувати з агентом, який зв'язується з колагеном.

Як вже обговорювалося, антагоністи, що використовуються в способах згідно з винаходом, не обмежені особливим типом або структурою молекули, так що для цілей даного винаходу і тільки в порядку прикладу, будь-який агент, здатний зв'язуватися з альфа-4-інтегринами (наприклад, VLA-4) на поверхні клітин або з альфа-4-лігандом, таким як VCAM-1, на поверхні клітин, що несуть альфа-4-ліганд) і який ефективно блокує або

покриває альфа-4-інтегрин (наприклад, VLA-4) або альфа-4-ліганд (наприклад, VCAM-1). який називається "агент, зв'язуючий альфа-4-інтегрин" і "агент, зв'язуючий ліганд альфа-4-інтегрину", відповідно), вважається еквівалентом антагоністів, що використовуються тут в прикладах.

Наприклад, застосовними є антитіла або гомологи антитіл (що обговорюються нижче), також як і розчинні форми білків, що природно зв'язуються з VLA-4 і VCAM-1. Розчинні форми білків, що природно зв'язуються з VLA-4, включають в себе розчинні пептиди VCAM-1, VCAM-1-злиті білки, біфункціональні злиті білки VCAM-1/Ig (наприклад, "химерні" молекули, що обговорюються вище), фібронектин, фібронектин, який міститьодержаний в результаті альтернативного сплайсингу не-тип-III з'єднуючий сегмент, і пептиди фібронектину, що містять амінокислотну послідовність EILDV або схожу консервативно замінену амінокислотну послідовність. Розчинні форми білків, що природно зв'язуються з VCAM-1, включають в себе розчинні пептиди VLA-4, VLA-4-злиті білки, біфункціональні злиті білки VLA-4/Ig і тому подібне. Тут під "розчинним VLA-4-пептидом" або "розчинним VCAM-1-пептидом" мається на увазі поліпептид VLA-4 або VCAM-1, не здатний самостійно заякорюватись на мембрані. Такі розчинні поліпептиди включають в себе, наприклад, поліпептиди VLA-4 і VCAM, які позбавлені частини мембрано-зв'язуючого домену, необхідної для заякорювання цих поліпептидів, або ж вони модифіковані таким чином, що їх мембрано-зв'язуючий домен стає нефункціональним. Вказані зв'язуючі агенти можуть конкурувати з білками клітинної поверхні за скріплення VLA-4 або ж іншим способом видозмінювати функцію VLA-4. Наприклад, розчинна форма VCAM-1 (див., наприклад, Osborn et al. 1989, Cell, 59: 1203-1211) або її фрагмент можуть бути введені для скріплення VLA-4, і переважно - конкурентного у відношенні сайту скріплення VLA-4 на VCAM-1-несучих клітинах, призводячи, таким чином, до ефектів, що нагадують такі при введенні антагоністів, таких як малі молекули або анти-VLA-4-антитіла.

1. Гомологи антиінтегринового антитіла

У інших переважних аспектах антагоністи, що використовуються в способах згідно з винаходом для скріплення, включаючи блокування або покриття, з альфа-1- і/або альфа-4-інтегрином клітинної поверхні (таким як VLA-1, VLA-4 або альфа-4-бета-7) і/або з лігандом альфа-1- і/або альфа-4-інтегрину клітинної поверхні (такими як колаген або VCAM-1, відповідно) являють собою, як було визначено вище, моноклональне антитіло або гомолог моноклонального антитіла проти VLA-1 або проти VLA-4 і/або проти колагену і/або проти VCAM-1. Переважні для лікування антитіла і гомологи, зокрема, для лікування людини, включають в себе гомологи антитіла людини, гомологи гуманізованого антитіла, гомологи химерного антитіла, Fab-, Fab'-, F(ab')₂- і F(v)-фрагментів антитіла, і мономери або димери важких або легких ланцюгів антитіла або їх суміші. Моноклональні антитіла проти VLA-4 є переважним зв'язуючим агентом у способі згідно з винаходом.

2. Малі молекули-антагоністи інтегрину

Термін "мала молекула"- антагоніст інтегрину відноситься до хімічних агентів (тобто органічних молекул), здатних порушити взаємодію інтегрин/ліганд інтегрину шляхом, наприклад, блокування взаємодії VLA-4/VCAM внаслідок скріплення VLA-4 на поверхні клітин або скріплення VCAM-1 на поверхні клітин. Такі малі молекули можуть також зв'язувати, відповідно, рецептори VLA-4 і VCAM-1. Малими молекулами-інгібіторами VLA-4 і VCAM-1 можуть бути самі пептиди як такі, напівпептидні сполуки або непептидні сполуки, такі як малі органічні молекули, які є антагоністами взаємодії VCAM-1/VLA-4. Тут термін "мала молекула" не покликаний охопити антитіло або гомолог антитіла. Молекулярна вага малих молекул звичайно нижче 1000.

Наприклад, можуть бути використані малі молекули, такі як олігосахариди, які імітують зв'язуючий домен ліганду VLA-4 і займають рецепторний домен VLA-4. [Див. J.J. Devlin et al., 1990, Science 249: 400-406 (1990), J.K. Scott and G.P. Smith, 1990, Science 249: 386-390, and U.S. Patent 4,833,092 (Geysen), всі з яких включені в даний опис у вигляді посилань]. І навпаки, можуть бути використані також малі молекули, які імітують зв'язуючий домен ліганду VCAM-1 і займають рецепторний домен VCAM-1.

Приклади інших малих молекул, застосовних в даному винаході, можна знайти у публікації Komoriya et al. ["The Minimal Essential Sequence for a Major Cell Type-Specific Adhesion Site (CS1) Within the Alternatively Spliced Type III Connecting Segment Domain of Fibronectin Is Leucine-Aspartic Acid-Valine", J. Biol. Chem, 266 (23), pp.15075-79 (1991)]. У вказаній публікації ідентифікована мінімальна амінокислотна послідовність, необхідна для скріплення VLA-4 і синтезовані різні пептиди, що перекриваються на основі амінокислотної послідовності CS-1-області (VLA-4-зв'язуючий домен) особливих різновидів фібронектину. Авторами ідентифікований пептид, що містить 8 амінокислот, Glu-Ile-Leu-Asp-Val-Pro-Ser-Thr, а також два більш коротких пентапептиди, що перекриваються, Glu-Ile-Leu-Asp-Val і Leu-Asp-Val-Pro-Ser, які володіли інгібіторною активністю проти фібронектин-залежної клітинної адгезії. Згодом було показано, що певні більш довгі пептиди, що містять послідовність LDV, володіють активністю in vivo [T. A. Ferguson et al., "Two Integrin Binding Peptides Abrogate T-cell-Mediated Immune Responses In Vivo", Proc. Natl. Acad. Sei. USA, 88, pp. 8072-76 (1991); і S. M. Wahl et al., "Synthetic Fibronectin Peptides Suppress Arthritis in Rats by Interrupting Leukocyte Adhesion and Recruitment", J. Clin. Invest, 94, pp. 655-62 (1994)]. Був описаний також циклічний пентапептид, Arg-Cys-Asp-TPro-Cys (в якому TPro означає 4-тіопролін), який може інгібувати адгезію до фібронектину як VLA-4, так і VLA-5. [Див., наприклад, D.M. Nowlin et al. "A Novel Cyclic Pentapeptide Inhibits Alpha4Beta1 Integrin-mediated Cell Adhesion", J. Biol. Chem, 268(27), pp.20352-59 (1993); і публікацію PCT PCT/US91/04862]. Вказаний пентапептид був заснований на послідовності трипептиду Arg-Gly-Asp з фібронектину, ця послідовність була відома як загальний мотив у сайті пізнавання для декількох білків позаклітинного матриксу. Були опубліковані приклади інших інгібіторів VLA-4, наприклад, у Adams et al. "Cell Adhesion Inhibitors", PCT/US97/13013, що описують лінійні пептиди сполуки, що містять бета-амінокислоти, які володіють активністю, що інгібує клітинну адгезію. У міжнародних патентних заявках WO 94/15958 і WO 92/00995 описаний циклічний пептид і нелігандоміметичні сполуки, які володіють активністю, що

інгібує клітинну адгезію. У міжнародних патентних заявках WO 93/08823 і WO 92/08464 описані сполуки, які містять гуанідиніл, сечовину і тіосечовину, і які інгібують клітинну адгезію. У патенті США No. 5.260,277 описані сполуки, що містять гуанідил, які модулюють клітинну адгезію. У публікаціях D. Y. Jackson et al., "Potent $\alpha 4\beta 1$ peptide antagonists as potential anti-inflammatory agents", J. Med. Chem, 40:3359 (1997); H. Shroff et al., "Small peptide inhibitors of $\alpha 4\beta 7$ mediated MadCAM-1 adhesion to lymphocytes", Bio. Med. Chem. Lett, 1 2495 (1996); U.S Patent 5,510,332, публікаціях PCT WO 98/53814, W097/03094, W097/02289, W096/40781, W096/22966, W096/20216, W096/01644, W096106108, і W095/15973, і інших були описані також і інші пептидолові антагоністи VLA-4.

Вказані малі молекули-агенти можуть бути, одержані шляхом синтезу множини пептидів (наприклад, довжиною від 5 до 20 амінокислот), напівпептидних або непептидних сполук, органічних сполук, а потім скринінгу цих сполук з метою з'ясування їх здатності інгібувати відповідну взаємодію VLA-1/колаген або VLA-4/VCAM-1. Див. загалом патент США No, 4,833/092, Scott and Smith, "Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library", Science, 249, pp.386-90 (1990), і Devlin et al., "Random Peptide Libraries: A Source of Specific Protein Binding Molecules", Science, 249, pp.40407 (1990). В. Способи виготовлення гомологів антиінтегринових антитіл Технологія одержання моноклональних антитіл, включаючи, наприклад, антиінтегринові антитіла, добре відомі. Див., наприклад, Mendrick et al. 1995, Lab. Invest. 72:367-375 (моноклональні антитіла (mAbs) проти мишачих анти- $\alpha 4\beta 1$ і анти- $\alpha 2\beta 1$); Sonnenberg et al. 1987 J. Biol. Chem. 252:10376-10383 (mAbs проти мишачих анти- $\alpha 6\beta 1$); Yao et al. 1996, J Cell. Sei 1996 109:3139-50 (mAbs проти мишачих анти- $\alpha 7\beta 1$); Hemieret al. 1984, J. Immunol 132:3011-8 (mAbs проти $\alpha 1\beta 1$ людини); Pischel et al. 1987 J Immunol 138:226-33 (mAbs проти $\alpha 2\beta 1$ людини); Wayner et al. 1988, J Cell Biol 107:1881-91 (mAbs проти $\alpha 3\beta 1$ людини); Heroler et al. 1987 J Biol Chem 262:11478-85 (mAbs проти $\alpha 4\beta 1$ людини); Wayner et al. 1988 J Cell Biol 107:1881-91 (mAbs проти $\alpha 5\beta 1$ людини); Sonnenberg et al. 1987, J. Biol. Chem. 262:10376-10383 (mAbs проти $\alpha 6\beta 1$ людини); A Wang et al. 1996 Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 15:664-672 (mAbs проти $\alpha 9\beta 1$ людини); Davies et al. 1989 J Cell Biol 109:1817-26 (mAbs проти $\alpha V\beta 1$ людини); Sanchez-Madrid et al. 1982, Proc Nati Acad Sei USA 79:7489-93 (mAbs проти $\alpha L\beta 2$ людини); Diamond et al. 1993, J Cell Biol 120:1031-43 (mAbs проти $\alpha M\beta 2$ людини); Stacker et al. 1991 J.Immunol. 146:648-55 (mAbs проти $\alpha X\beta 2$ людини); Van der Vieren et al 1995 Immunity 3:683-90 (mAbs проти $\alpha D\beta 12$ людини); Bennett et al. 1983 Proc Nati Acad Sei USA 80:2417-21 (mAbs проти $\alpha I\beta 3$ людини); Hessel et al. 1984, Differentiation 26:49-54 (mAbs проти $\alpha 6\beta 4$ людини); Weinacker et al. 1994 J Biol Chem 269:6940-8 (mAbs проти $\alpha V\beta 5$ людини); Weinacker et al. 1994 J Bio2 Chem 269:6940-8 (mAbs проти $\alpha V\beta 6$ людини); Cerf-Bensussan et al 1992 Eur J Immunol 22:273-7 (mAbs проти $\alpha E\beta 7$ людини); Nishimura et al. 1994 J Biol Chem 269:28708-15 (mAbs проти $\alpha V\beta 8$ людини); Bossy et al. 1991 EMBO J 10:2375-85 (поліклональна антисироватка проти $\alpha 8\beta 1$ людини); Camper et al. 1998 J. Bio 2 Chem. 273:20383-20389 (поліклональна антисироватка проти $\alpha 10\beta 1$ людини).

Представлені тут переважні антагоністи інтегрину можуть бути експрееровані з інтактною або усіченою внаслідок процесінгу геномною або кДНК або ж з синтетичних кДНК у прокаріотичних або еукаріотичних клітинах-живителів. Димерні протеїни можуть бути виділені з культурального середовища і/або можуть заново набути просторової упаковки і пройти процес димеризації *in vitro* з утворенням біологічно активних композицій. Гетеро димери можуть бути сформовані *in vitro* шляхом комбінування окремих, різних поліпептидних ланцюгів. Альтернативно гетеродимери можуть бути утворені в окремій клітині шляхом коекспресії нуклеїнових кислот, що кодують окремі, різні поліпептидні ланцюги. Див., наприклад, WO 93/09229 або патент США No. 5,411,941, де представлені методи одержання ряду прикладів рекомбінантних гетеродимерних білків. Звичайно клітини-живителі, яким віддається перевага, включають в себе, не обмежуючись ними, прокаріоти, включаючи *E. coli*, або еукаріоти, включаючи дріжджі, *Saccharomycetes*, клітини комах або клітини ссавців, такі як CHO, COS або BSC-клітини. Будь-якому рядовому фахівцеві в даній області очевидно, що, в залежності від задачі, можна використати і інші клітини-живителі.

Наприклад, анти-VLA-4-антитіла можуть бути ідентифіковані шляхом імунопреципітації ¹²⁵I-мічених клітинних лізатів, одержаних з клітин, експресуючих VLA-4. [Див. Sanchez-Madrid et al. 1986, Eur. J. Immunol, 16: 1343-1349 and Hemler et al. 1987, J. Biol. Chem, 262, 11478-11485]. Анти-VLA-4-антитіла можуть бути також ідентифіковані шляхом проточної цитометрії, наприклад, шляхом вимірювання флуоресцентного фарбування клітин Ramos, інкубованих з антитілом, здатним розпізнавати VLA-4 [див. Elices et al., 1990 Cell, 60: 577-584]. Лімфоцити, що використовуються для одержання клітин гібридами, звичайно виділяють з імунізованих ссавців, сироватка яких позитивна, як заздалегідь з'ясовується методами скринінгу, відносно наявності анти-VLA-4-антитіл.

Звичайно з тих же видів ссавців, з яких одержані лімфоцити, одержують також і іморталізовану лінію клітин (наприклад, міеломну лінію клітин). Переважними іморталізованими лініями клітин є мишачі міеломні лінії клітин, які вразливі до культурального середовища, що містить гіпоксантин, арніноптерин і тимідин ("середовище HAT"). Звичайно HAT-вразливі клітини міеломи миші зливають зі спленоцитами миші, використовуючи поліетиленгліколь з молекулярною вагою 1500 ("PEG 1500"). Потім гібридомні клітини, щоодержуються внаслідок злиття, піддають селекції з використанням середовища HAT, яке вбиває незліті і непродуктивні зліті міеломні клітини (незліті спленоцити гинуть через декілька днів, оскільки вони не трансформовані). Гібридами, що продукують необхідне антитіло, визначаються шляхом скринінгу супернатантів гібридомних культур. Наприклад, гібридами, одержані для продукції анти-VLA-4-антитіл, можуть бути піддані скринінгу шляхом тестування супернатантів гібридомних культур на наявність секретуємих антитіл, що володіють

здатністю зв'язуватися з лінією рекомбінантних клітин, експресуючих альфа-4-субодиницю [див. Elices et al., вище].

Для продукції гомологів аити-VLA-4-антитіл, які є інтактними імуноглобулінами, клітини гібридами, які внаслідок вказаних скринінгових аналізів були визначені як позитивні, культивували у живильному середовищі у відповідних умовах і протягом часу, достатнього для того, щоб дати можливість клітинам гібридами секретувати моноклональні антитіла у культуральне середовище. Методи культури тканин і культуральні середовища, відповідні для культивування клітин гібридами, добре відомі. Далі супернатанти клітин гібридами, що культивуються, і одержані анти-VLA-4-антитіла можуть бути, але не обов'язково, піддані подальшому очищенню з використанням добре відомих методів.

Альтернативно, необхідне антитіло може бути одержане шляхом ін'єкції клітин гібридами у черевну порожнину імунізованої миші. У черевній порожнині клітини гібридами проліферують, секретуючи антитіло, яке нагромаджується у вигляді асцитної рідини. Утворене антитіло може бути вилучене з черевної порожнини миші за допомогою шприца.

Декілька мишачих моноклональних антитіл проти VLA-4 було описано раніше. Див., наприклад, Sanchez-Madrid et al., 1986, вище; Hemler et al., 1987, вище; Pulido et al., 1991, J Biol. Chem, 266 (16), 10241-10245; Issekutz and Wykretowicz, 1991, J. Immunol, 147-109 (TA-2 mab). Ці моноклональні антитіла проти VLA-4 і інші моноклональні антитіла проти VLA-4 (наприклад, патент США 5,888,507 - Biogen, Inc, а також посилання, що приводяться в описі цього патенту), здатні упізнавати альфа-і/або бета-ланцюг VLA-4, будуть використані в способах лікування згідно з даним винаходом. Ahth-VLA-4-антитіла, які будуть упізнавати епітопи альфа-4-ланцюга VLA-4, беруть участь у скріпленні лігандів VCAM-1 і фібронектину (тобто антитіла, які можуть зв'язуватися з сайтом VLA-4, залученим до пізнання ліганду, і блокувати скріплення VCAM-1 і фібронектину), є переважними. Такі антитіла визначаються як В-епітоп-специфічні антитіла (B1 або B2) (Pulido et al., 1991, вище) і є також aHTH-VLA-4-антитілами згідно з даним винаходом.

У способах згідно з винаходом іншим переважним зв'язуючим агентом, який може блокувати або покривати ліганди VLA-4, є гомологи повного моноклонального антитіла проти VLA-4. Вони можуть бути одержані у інтактній формі за допомогою примованих *in vitro* спленоцитів людини, як описане Boerner et al., 1991, J. Immunol, 147, 86-95. Альтернативно вони можуть бути одержані шляхом клонування, як описане Persson et al., 1991, Proc. Nat. Acad. Sei. USA, 88: 2432-2436 або Huang and Stollar, 1991, J. Immunol. Methods 141, 227-236. У патенті США 5,798,230 [Aug. 25, 1998, "Process for the preparation of human monoclonal antibodies and their use"] описаний спосіб одержання моноклональних антитіл людини з В-клітин людини. Відповідно до цього способу, продукуючи антитіло В-клітини людини, стають іморталізованими внаслідок інфікування їх вірусом Епштейна-Барр, або їх похідні, які експресують ядерний антиген 2 віруси Епштейна-Барр (EBNA2). Згодом функція EBNA2, яка необхідна для іморталізації, вимикається, що призводить до збільшення продукції антитіл

Ще у одному способі одержання повних антитіл людини, патент США 5,789,650 [Aug. 4, 1998, "Transgenic non-human animals for producing heterologous antibodies"], описані трансгенні тварини, що не є людиною, здатні продукувати гетерологічні антитіла, і трансгенні тварини, що не є людиною, що мають інактивовані ендогенні імуноглобулінові гени. Ендогенні імуноглобулінові гени придушені антисмисловими полінуклеотидами і/або антисироваткою проти ендогенних імуноглобулінів. Гетерологічні антитіла кодуються імуноглобуліновими генами, що звичайно не виявляються у геномі видів, що не є людиною, один або більше трансгенів, що містять послідовності переаранжованих гетерологічних важких ланцюгів імуноглобуліну людини, вводяться у тварину, що не є людиною, щоб одержати трансгенну тварину, здатну до функціонального реаранжування трансгенних імуноглобулінових послідовностей і продукування репертуару антитіл різних ізотипів, що кодуються імуноглобуліновими генами людини. Такі гетерологічні антитіла людини одержані у В-клітинах людини, які потім іморталізують, наприклад, шляхом злиття з іморталізованою лінією клітин, такою як мієломна, або за допомогою інших маніпуляцій з В-клітинами, які сприяють іморталізації лінії клітин, здатних продукувати гомолог моноклонального гетерологічного повнорозмірного антитіла людини.

Для виділення високо афінних антитіл, які можна використати в терапії людини із застосуванням стандартної фагової технології, можна використати також величезні бібліотеки розподілу фагів у неімунізованій людини (Vaughan et al., 1996).

Ще одним переважним зв'язуючим агентом, який може блокувати або покривати ліганди інтегрину у способі згідно з винаходом, є гомолог гуманізованого рекомбінантного антитіла, що має антиінтегринову специфічність. Услід за ранніми способами одержання істинно "химерних антитіл" (де повна константна і повна варіабельна області одержані з різних джерел), був винайдений новий підхід, описаний у EP 0239400 (Winter et al.), де антитіла змінені шляхом заміни (всередині даної варіабельної області) областей, що визначають їх комплементарність (CDR), у одного виду такими з іншого виду. Цей спосіб може бути використаний, наприклад, для заміни CDR з доменів варіабельної області важкого і легкого ланцюга імуноглобуліну людини на альтернативні CDR з доменів варіабельної області миші. Ці змінені варіабельні області імуноглобуліну можуть згодом бути скомбіновані з константними областями імуноглобуліну людини, щоб одержати антитіла, які за складом є повністю людськими, за винятком заміни CDR на мишачі. Передбачалося, що такі антитіла з CDR-заміщенням будуть зі значно меншою імовірністю викликати імунну відповідь у людини у порівнянні з істинно химерними антитілами, оскільки такі антитіла з CDR-заміщенням містять значно менше компонентів надлюдської природи. Процес гуманізування моноклональних антитіл шляхом "щеплення" CDR був названий "решейпінгом". [Riechmann et al., 1988, Nature 332, 323-327; Verhoeyen et al., 1988, Science 239, 1534-1536].

Звичайно області, що визначають комплементарність мишачого антитіла, (CDR), трансплантували у відповідні області антитіла людини, оскільки саме CDR (три - у важких ланцюгах антитіла, три - в легких

ланцюгах) є областями мишачого антитіла, які зв'язуються зі специфічним антигеном. Трансплантація CDR виконується за допомогою методів генної інженерії, причому CDR-последовності ДНК визначаються шляхом клонування сегментів генів варіабельної (V) області мишачих важких і легких ланцюгів, а потім переносяться у відповідні V-області людини сайт-направленим мутагенезом. На кінцевому етапі цього процесу додаються сегменти генів константної області людини необхідного ізо типу (звичайно гамма I у випадку СН і каппа у випадку CL), і гуманізовані гени важкого і легкого ланцюга спільно експресують у клітинах ссавців для одержання розчинного гуманізованого антитіла.

Перенесення цих CDR у антитіло людини додає цьому антитілу антиген-зв'язуючі властивості первинного мишачого антитіла. Шість CDR у мишачому антитілі виявляються структурно вбудованими у область "рамки зчитування" V-області. Причина успішної трансплантації CDR пов'язана з тим, що області рамки зчитування антитілу миші і людини мають дуже велику схожість просторових структур з дуже схожими сайтами прикріплення CDR, так що CDR можуть бути взаємозамінними. Такі гуманізовані гомологи антитіла можуть бути одержані, як описано у Jones et al., 1986, Nature 321, 522-525; Riechmann, 1988, Nature 332, 323-327; Queen et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sei. USA 86, 10029; and Orlandi et al., 1989, Proc. Nat. Acad. Sei. USA 86, 3833.

Проте передбачається, що певні амінокислоти всередині області рамки зчитування взаємодіють з CDR і загалом впливають на афінність скріплення антитіла. Пряме перенесення CDR з мишачого антитіла для одержання рекомбінантного гуманізованого антитіла без яких-небудь модифікацій рамок зчитування V-області людини часто призводить до часткової або повної втрати афінності скріплення. У ряді випадків зміна залишків у областях рамки зчитування антитіла-акцептора виявляється критичним відносно активності скріплення.

У публікаціях Queen et al., 1989 (вище) і WO 90/07861 (Protein Design Labs) описане одержання гуманізованого антитіла, яке містить модифіковані залишки у областях рамки зчитування антитіла-акцептора шляхом комбінації CDR мишачого MAб (анти-Тас) з рамкою зчитування імуноглобуліну людини і константними областями. Цими дослідниками було продемонстроване одне з розв'язань проблеми втрати зв'язуючої активності, яка часто виникає при прямому перенесенні CDR без яких-небудь модифікацій залишків рамки зчитування V-області людини; їх розв'язання даної проблеми включає в себе два ключових моменти. По-перше, рамки зчитування V-області людини вибираються шляхом комп'ютерного аналізу оптимальної білкової последовності, гомологічної рамки зчитування V-області первинного мишачого антитіла, в цьому випадку анти-Тас-MAб. Другим моментом є те, що третинна структура мишачої V-області моделюється за допомогою комп'ютера, з тим, щоб візуалізувати амінокислотні залишки рамки зчитування, які з найбільшою імовірністю будуть взаємодіяти з мишачими CDR, і потім ці мишачі амінокислотні залишки накладаються на гомологічну рамку зчитування людини Див. також патенти США 5,693,762; 5,693,761; 5,585,089; and 5,530,101 (Protein Design Labs).

Можна використати інший підхід (Tempest et al., 1991, Biotechnology 9, 266-271), застосовуючи як стандарт рамки зчитування V-області, одержані, відповідно, для важкого і легкого ланцюгів NEWM і REI при трансплантації CDR без радикального введення мишачих залишків. Перевагою використання підходу Tempest et al. для конструювання гуманізованих антитіл на основі NEWM і REI є те, що просторові структури варіабельних областей NEWM і REI відомі з рентгенівської кристалографії, і таким чином, специфічні взаємодії між CDR і залишками рамки зчитування V-області можуть моделюватися.

Незважаючи на вибраний підхід, приклади гомологів початково гуманізованого антитіла, одержаних на сьогоднішній день, показали, що це не простий процес, однак навіть знаючи, що такі зміни рамки зчитування можуть бути необхідні, неможливо передбачити на основі знань попереднього рівня техніки, які саме із залишків рамки зчитування (якщо такі є взагалі) треба буде замінити, щоб одержати функціональні гуманізовані рекомбінантні антитіла потрібної специфічності. Таким чином, результати показують, що зміни, необхідні для збереження специфічності і/або афінності, є в більшій мірі унікальними для даного антитіла і не можуть бути передбачені на основі досвіду гуманізування різних антитіл.

Певні антагоністи інтегрину, що містить альфа-4-субодиницю, що використовуються у даному винаході, включають в себе гомологи химерного і гуманізованого рекомбінантного антитіла (тобто інтактні імуноглобуліни і їх частини) зі специфічністю В-епітопу, яка була одержана і описана у патенті США 5,932,214 (mab HP1/2). Стартовим матеріалом для одержання гомологів химерного (з варіабельною мишачою і константною людською частинами) і гуманізованого антиінтегринового антитіла може служити, як описувалося раніше, мишаче антиінтегринове моноклональне антитіло, антиінтегринове моноклональне антитіло (наприклад, HP2/1, Amac International, Inc, Westbrook, Maine), що є в продажу, або антиінтегринове моноклональне антитіло, одержане відповідно до описаної тут методики. Інші переважні гомологи гуманізованого анти-VLA4-антитіла описані у публікаціях Athena Neurosciences, Inc. in PCTVUS95/01219 (27 липня 1995) і патенті США 5,840,299 (який включений в даний опис у вигляді посилання).

Ці гуманізовані анти-VLA4-антитіла містять гуманізований легкий ланцюг і гуманізований важкий ланцюг. Гуманізований легкий ланцюг містить три області, що визначають її комплементарність (CDR1, CDR2 і CDR3), які містять амінокислотні последовності з відповідних областей легкого ланцюга імуноглобуліну миші 21-6, що визначають комплементарність, і рамки зчитування варіабельної області з последовності рамки зчитування варіабельної області легкого каппа-ланцюга людини, за винятком принаймні одного положення амінокислоти, зайнятого тією ж самою амінокислотою, яка знаходиться у еквівалентному положенні рамки зчитування варіабельної області леї кого ланцюга імуноглобуліну миші 21-6. Гуманізований важкий ланцюг містить три області, що визначають її комплементарність (CDR1, CDR2 і CDR3), які містять амінокислотні последовності з відповідних областей важкого ланцюга імуноглобуліну миші 21-6, що визначають комплементарність, і рамки зчитування варіабельної області з последовності рамки зчитування варіабельної області важкого ланцюга

людини, за винятком принаймні одного положення амінокислоти, зайнятого тією ж самою амінокислотою, яка знаходиться у еквівалентному положенні рамки зчитування варіабельної області важкого ланцюга імуноглобуліну миші 21-6.

У способах даного винаходу можуть бути використані антагоністи, що кодується послідовностями нуклеїнової кислоти, яка в жорстких умовах гібридизується з послідовностями нуклеїнової кислоти, що кодує антитіла проти інтегринів, що містять альфа-4-субодиницю. Наприклад, антагоніст згідно з винаходом може являти собою білок, нуклеїнова кислота якого в жорстких умовах гібридизується з однією або більше послідовностями нуклеїнових кислот, представлених у таблиці 6 патенту США 5,840,299, або з комплементарними ним однією або більше послідовностями. Як антагоністи може служити також білок, нуклеїнова кислота якого в жорстких умовах гібридизується з нуклеїновою кислотою, що кодує SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4, опублікованих у патенті США 5,932,214. Далі, як антагоністи може служити також білок, нуклеїнова кислота якого в жорстких умовах гібридизується з нуклеїновою кислотою, що кодує варіабельний домен антитіла, яке продукується лінією клітин ATCC CRL 11175.

Альтернативно, антагоністом згідно з винаходом може бути білок, нуклеїнова кислота якого в умовах зниженої жорсткості гібридизується з однією або більше з послідовностей нуклеїнових кислот, представлених у таблиці 6 патенту США 5,840,299, або з комплементарними ним однією або більше послідовностями. Як антагоністи може служити також білок, нуклеїнова кислота якого в умовах зниженої жорсткості гібридизується з нуклеїновою кислотою, що кодує SEQ ID NO:2 або SEQ ID NO:4, опублікованих у патенті США 5,932,214. Далі, як антагоністи може служити також білок, нуклеїнова кислота якого в умовах зниженої жорсткості гібридизується з нуклеїновою кислотою, що кодує варіабельний домен антитіла, яке продукується лінією клітин ATCC CRL 11175.

С. Продукування фрагментів і аналогів

Фрагменти антагоністів виділеного альфа-4-інтегрину (наприклад, описані тут фрагменти гомологів антитіл) можуть бути також успішно одержані з використанням рекомбінантних методів, шляхом протеолітичного переварювання або шляхом хімічного синтезу з використанням методів, відомих фахівцям в даній області. Рекомбінантними методами внутрішні або кінцеві фрагменти можуть бути одержані шляхом видалення одного або більше нуклеотидів з одного кінця (у разі кінцевого фрагменту) або з обох кінців (у разі внутрішнього фрагменту) послідовності ДНК, яка кодує виділений поліпептид hedgehog. Експресія підданої мутагенезу ДНК продукує поліпептидні фрагменти. Переварювання під дією "нуклеаз end nibbling" також може призводити до утворення ДНК, яка кодує ряд фрагментів. ДНК, які кодує фрагменти білка, можуть бути одержані також шляхом випадкової фрагментації, переварювання рестриктазами або ж комбінацією того і іншого. Білкові фрагменти можуть вироблятися безпосередньо з інтактних білків. Пептиди можуть специфічно розщеплюватися протеолітичними ферментами, включаючи, але не обмежуючись ними, плазмін, тромбін, трипсин, хімотрипсин або пепсин. Кожний з цих ферментів специфічний відносно певного типу пептидного зв'язку, який він атакує. Трипсин каталізує гідроліз пептидних зв'язків, в яких карбонільна група належить основній амінокислоті, звичайно аргініну або лізину. Пепсин і хімотрипсин каталізує гідроліз пептидних зв'язків ароматичних амінокислот, такого як триптофан, тирозин і фенілаланін. Альтернативні групи розщеплених білкових фрагментів виробляються шляхом превентивного розщеплення у сайті, який схильний до дії протеолітичного ферменту. Наприклад, реакція ϵ -аміногрупи лізину з етилтрифтороацетатом у слабкому лужному розчині призводить до блокування амінокислотних залишків, при якому прилеглий до них сусідній пептидний зв'язок не піддається більше гідролізу під дією трипсину. Протеїни можуть бути модифіковані таким чином, що в результаті утворюються зв'язки, які піддаються протеолітичному впливу. Наприклад, алкілування цистеїнових залишків β -галогенетиламинами призводить до утворення пептидних зв'язків, які піддаються гідролізу під дією трипсину [Lindley, (1956) Nature 178, 647]. Крім того, можуть бути використані хімічні реагенти, які розщеплюють пептидні ланцюги поблизу специфічних залишків. Наприклад, ціаногенбромід розщеплює пептиди за метіоніновими залишками [Gross and Witkop, (1961) J. Am. Chem. Soc. 83, 1510]. Таким чином, шляхом обробки білків різними комбінаціями модифікаторів, протеолітичних ферментів і/або хімічних реагентів ці білки можна розділити на фрагменти необхідної довжини, що перекриваються, або розділити на фрагменти необхідної довжини, що не перекриваються.

Фрагменти можуть бути також синтезовані хімічно з використанням методів, відомих в даній області, таких як твердофазна F-мос- або t-Вос-хімія Мерфілда. [Merrifield, Recent Progress in Hormone Research 23: 451 1967].

Приклади способів, які дозволяють одержувати і тестувати фрагменти і аналоги, обговорюються нижче. Ці ж або аналогічні способи можуть бути використані для одержання і скринінгу фрагментів і аналогів антагоніста виділеного альфа-4-інтегрину, біологічна активність яких може бути продемонстрована. Приклад такого способу перевірки того, чи володіють фрагменти або аналоги антагоністів інтегрину, що містить альфа-4-субодиницю, біологічною активністю, можна виявити у розділі IV і у прикладах.

D. одержання змінених ДНК і пептидних послідовностей: рандомізовані (неспецифічні) методи

Варіанти амінокислотної послідовності білка можуть бути одержані шляхом рандомізованого мутагенезу ДНК, яка кодує цей білок або частину цього білка. Методи, що використовуються, включають в себе PCR-мутагенез і насичуючий мутагенез. Може бути одержана також бібліотека варіантів випадкових амінокислотних послідовностей шляхом синтезу ряду вироджених олігонуклеотидних послідовностей. Способи вироблення варіантів амінокислотних послідовностей даного білка за допомогою змінених ДНК і пептидів добре відомі у даній області. Слідуючі нижче приклади таких способів покликані не обмежити об'єм даного винаходу, а швидше послужити наочною ілюстрацією представлених методів. Будь-якому рядовому фахівцеві у даній області буде абсолютно очевидно, що для цілей даного винаходу можуть бути використані і інші методи.

PCR-мутагенез: Див., наприклад, Leung et al., (1989) Technique 1, 11-15.
Насичуючий мутагенез: У загальних рисах метод описаний Mayers et al., (1989) Science 229, 242.
Мутагенез вироджених олігонуклеотидів: Див., наприклад, Harang, S.A., (1983)
Tetrahedron 39, 3; Itakura et al., (1984) Ann. Rev. Biochem. 53, 323 i Itakura et al.,
Recombinant DNA, Proc. 3rd Cleveland Symposium on Macromolecules, pp. 273-289 (A.G. Walton, ed.),
Eisevier, Amsterdam, 1981.

Е. Одержання змінених ДНК і пептидних послідовностей: прямі методи

Не-неспецифічний, або прямий, мутагенез забезпечує специфічні послідовності або мутації у специфічних частинах полінуклеотидної послідовності, яка кодує виділений поліпептид, щоб забезпечити варіанти, які включають в себе делеції, вставки або заміни залишків відомої амінокислотної послідовності виділеного поліпептиду. Сайти мутації можуть бути модифіковані індивідуально або серійно, наприклад, шляхом (1) заміни спочатку консервативними амінокислотами, а потім більш радикальним відбором, в залежності від результатів, що одержуються; (2) делеції залишків-мішеней; або (3) вставки залишків того ж самого або іншого класу по сусідству з локалізованим сайтом, або комбінації можливостей 1-3.

Точніше, такі сайт-направлені методи є однією з можливостей, при яких N-кінцевий цистеїн (або функціональний еквівалент) можуть бути введені в дану поліпептидну послідовність для забезпечення сайту прикріплення гідрофобного фрагменту. Аланін скануючий мутагенез: Див. Cunningham and Wells, (1989) Science 244, 1081-1085). Направлений мутагенез за допомогою олігонуклеотидів: Див., наприклад, Adelman et al., (1983) DNA 2, 183.

Касетний мутагенез: Див. Wells et al., (1985) Gene 34, 315. Комбінативний мутагенез: Див., наприклад, Ladner et al., WO 88/06630 Стратегія фагового розподілу: Див., наприклад, огляд Marks et al., J. Biol. Chemistry: 267 16007-16010(1992).

Ф. Інші варіанти антагоністів інтегрину

Варіанти можуть відрізнитися від інших описаних тут антагоністів інтегрину амінокислотою послідовністю або іншим чином, що не включає в себе послідовність, або і тим, і іншим чином. Найбільш переважні поліпептиди згідно з винаходом мають модифікації, переважно не пов'язані з їх послідовністю, які включають в себе хімічну дериватизацію *in vivo* або *in vitro* (наприклад, за їх N-кінцем), а також можливі зміни у ацетилюванні, метилуванні, фосфорилуванні, амідуванні, карбоксуванні або глікозилюванні.

Інші аналоги включають в себе білок або його біологічно активні фрагменти, послідовності яких відрізняються від таких, відображених у патентах США 5,840,299 або 5,888,507; 5,932,214 (усі вони включені у даний опис у вигляді посилань) або РСТ US/94/00266, однієї або більше консервативних амінокислотних заміни або однієї або більше неконсервативних амінокислотних заміни, або делеціями або вставками, які не позбавляють виділений білок біологічної активності. Консервативні заміни звичайно включають в себе заміну амінокислоти іншою амінокислотою зі схожими властивостями, таку як заміни в межах наступних груп: валін, аланін і гліцин; лейцин і ізолейцин; аспарагінова кислота і глутамінова кислота; аспарагін і глутамін; серин і треонін; лізин і аргінін; і фенілаланін і тирозин. Неполарні гідрофобні амінокислоти включають в себе аланін, лейцин, ізолейцин, валін, пролін, фенілаланін, триптофан і метіонін. Поларні нейтральні амінокислоти включають в себе гліцин, серин, треонін, цистеїн, тирозин, аспарагін і глутамін. Позитивно заряджені (основні) амінокислоти включають в себе аргінін, лізин і гістидин. Негативно заряджені (кислі) амінокислоти включають в себе аспарагінову кислоту і глутамінову кислоту. Інші консервативні заміни можуть бути легко розпізнані рядовими фахівцями в даній області. Наприклад, для консервативної заміни амінокислоти аланіну може бути взята будь-яка одна з D-аланіну, гліцину, бета-аланіну, L-цистеїну і D-цистеїну. Для лізину заміною може служити будь-яка одна з групи D-лізину, аргініну, D-аргініну, гомо-аргініну, метіоніну, D-метіоніну, орнітину або D-орнітину.

Іншими аналогами, що використовуються в рамках даного винаходу, є аналоги з модифікаціями, які підвищують стабільність пептиду. Такі аналоги можуть містити, наприклад, один або більше непептидних зв'язків (які замінують пептидні зв'язки) у пептидній послідовності. Сюди включаються також аналоги, які включають в себе залишки, які відрізняються від природних L-амінокислот, такі як D-амінокислоти або неприродні або штучні амінокислоти, такі як бета- або гамма- амінокислоти, і циклічні аналоги. Включення D-амінокислот замість L-амінокислот у виділений поліпептид *hedghog* може підвищувати його резистентність до протеїназ. Див. вище патент США 5,219,990.

Переважні гомологи антитіла включають в себе амінокислотну послідовність, щонайменше на 60%, 80%, 90%, 95%, 98% або 99% гомологічну амінокислотній послідовності антитіла PS/2 (див. Приклад), або включають в себе амінокислотну послідовність, щонайменше на 60%, 80%, 90%, 95%, 98% або 99% гомологічну амінокислотним послідовностям, описаним у патенті США 5,840,299 (SEQ ID NO:15 варіабельної області легкого ланцюга або SEQ ID NO:17 варіабельної області важкого ланцюга) або патенті США 5,932,214 (SEQ ID NOS: 2 або 4); або у опублікованій патентній заявці W094/16094 (ці послідовності виявлені у послідовності анти-VLA4-антитіла депонованої лінії клітин ATCCCL11175).

Г. Види кон'югатів полімерів

У рамках обширного об'єму даного винаходу для кон'югації з антагоністом альфа-1 або альфа-4-інтегрину може бути використана тільки одна полімерна молекула, незважаючи на припущення, що може бути прикріплено також і більше одного полімеру. Композиції кон'югованого антагоніста альфа-1 або альфа-4-інтегрину згідно з винаходом можуть знайти застосування як *in vivo*, так і не-*in vivo*. Крім того, як з'ясовується, при кон'югації кон'югуючого полімеру можуть бути використані, відповідно до кінцевого результату його застосування, будь-які інші групи, фрагменти або інші види кон'югації. У порядку прикладу, в ряді застосувань може бути корисним

ковалентне прив'язування до полімеру функціонального фрагменту, що додає полімеру резистентність до деградації під дією ультрафіолету, або що додає йому антиоксидантні або інші властивості або характеристики. Як інший приклад, в деяких випадках може виявитися корисним функціоналізувати полімер, щоб відновити його реактивність і створити можливість його поперечного скріплення з молекулою лікарського засобу, щоб посилити різні властивості або характеристики всього кон'югованого продукту загалом. Відповідно, полімер може містити деяку функціональну групу, групи, що повторюються, зв'язки або інші структури, які не перешкоджають ефективності застосування композиції кон'югованого антагоніста альфа-4-інтегрину для наміченої цілі. Інші цілі і переваги даного винаходу стануть більш очевидними з подальшого опису і прикладеної формули винаходу.

Ілюстративні полімери, які можуть бути успішно використані для досягнення вказаних необхідних властивостей, описані нижче у зразкових реакційних схемах. У кон'югатах ковалентно пов'язаного з полімером антагоніста полімер може бути функціоналізований, а потім пов'язаний з вільною амінокислотою(амінокислотами) антагоніста з утворенням лабільних зв'язків.

Найбільш переважно, щоб антагоністи інтегринів, що містять альфа-4- або альфа-1-субодиницю, були кон'юговані через кінцеву реактивну групу на полімері, хоча кон'югати можуть відгалужуватися і від некінцевих реактивних груп. Полімер з реактивною групою(групами) позначається тут як "активований полімер". Реактивна група селективно реагує з вільними аміногрупами або іншими реактивними групами на молекулі антагоніста. Реактивність активованого полімеру(ів) передбачає, що прикріплення може відбуватися до будь-якої доступної аміногрупи антагоніста альфа-4-інтегрину, такої як альфа-аміногрупи або епсилон-аміногрупи лізину. Вільні карбоксильні групи, відповідним чином активовані карбонільні групи, гідроксильні, гуанідилові, окислені вуглеводні фрагменти і меркапто-групи антагоніста альфа-4-інтегрину (якщо вони доступні) також можуть бути використані як сайти прикріплення.

Незважаючи на те, що полімер може бути прикріплений до будь-якого сайту на молекулі антагоніста інтегрину, переважним сайтом скріплення полімеру з антагоністами інтегрину (особливо з такими, які є білками) є N-кінець антагоніста інтегрину. Другим переважним сайтом(ами) є сайт на або поблизу C-кінця і через фрагмент цукру (якщо такий є). Таким чином, у даному винаході розглядаються (i) пов'язані з N-кінцем полімеру кон'югати альфа-1- або альфа-4-інтегрину; (ii) пов'язані з C-кінцем полімеру кон'югати альфа-1- або альфа-4-інтегрину; (iii) цукор-пов'язані кон'югати; (iv) а також N-, C- і цукор-пов'язані кон'югати полімеру з антагоністами альфа-1- і альфа-4-інтегрину.

Звичайно використовують, в залежності від концентрації антагоніста, приблизно від 1,0 до 10 молей активованого полімеру на моль антагоніста. Кінцева кількість збалансована таким чином, щоб з одного боку за можливістю максималізувати вираженість реакції, при цьому мінімізуючи неспецифічні модифікації продукту, і з іншого боку, визначити хімізм, який допоможе зберегти оптимальну активність, в той же час оптимізуючи, якщо це можливе, час напівжиття антагоніста. Переважно, щоб збереглося щонайменше 50% біологічної активності антагоніста, і більш переважно, якщо збережеться 100%.

Реакції можуть проводитись яким-небудь штучно розпізнаваним способом, що використовується при реагуванні біологічно активних матеріалів з інертними полімерами. Звичайно такий спосіб включає в себе одержання активованого полімеру (який може мати щонайменше одну кінцеву гідроксильну групу), а потім реакцію антагоніста з активованим полімером з одержанням розчинного білка, придатного для композиції. Вказана вище реакція модифікації може бути зроблена декількома методами, які можуть включати в себе одну або декілька стадій.

Як вказувалося вище, в певних аспектах даного винаходу використовують для скріплення з полімером N-кінець антагоніста інтегрину. Є відповідні загальновідомі методи селективного одержання модифікованого за N-кінцем антагоніста альфа-1- або альфа-4-інтегрину. Прикладом може служити метод редутивного алкілювання, в якому використовується різна реактивність первинних аміногруп різного типу (епсилон-аміногрупи лізину проти аміногруп на N-кінці метіоніну), доступних для дериватизації, на відповідному антагоністі інтегрину. При певних селективних умовах може бути досягнута істотно селективна дериватизація відповідного антагоніста інтегрину на його N-кінці полімером, що містить карбонільну групу. Реакцію проводили при значеннях рН, які дозволяють використати перевагу відмінностей значень рK_a між епсилон-аміногрупами лізинових залишків і альфа-аміногрупою N-кінцевого залишку антагоніста інтегрину. Такого типу хімія добре відома будь-якому рядовому фахівцеві.

Стратегія таргетування поліалкіленгліколевого полімеру, такого як PEG, на C-кінець антагоніста альфа-1- або альфа-4-інтегрину (такого, наприклад, як протеїн), повинна бути направлена на те, щоб хімічно або за допомогою техніки генної інженерії прикріпити сайт, який може бути використаний для таргетування полімерного фрагменту. Наприклад, включення Cys у сайт, який знаходиться на C-кінці протеїну або поблизу нього, дозволило б зробити специфічну модифікацію з використанням відомої техніки малеїмід-, вінілсульфон- або галогенацетат-активованих похідних поліалкіленгліколю (наприклад, PEG). Особливо ці похідні можуть бути використані для модифікації генноінженерних цистеїнів завдяки високій селективності цих реагентів у відношенні Cys. Інші стратегії, такі як включення гістидину tag, який може бути таргетований [Fancy et al., (1996) Chem. & Biol. 3: 551], або додатковий сайт глікозилування на протеїні являють собою інші альтернативи для модифікації C-кінця антагоніста інтегрину згідно з винаходом.

Методи таргетування цукрів як сайтів хімічної модифікації також добре відомі, а отже, цілком ймовірно, що полімер поліалкіленгліколю може бути доданий безпосередньо і особливо до цукрів (якщо такі є) на антагоністі інтегрину, який активований шляхом окислення. Як приклад, можна одержати поліетиленглікольгідрозид, який утворює відносно стабільні гідразонні зв'язки, шляхом конденсації з альдегідами і кетонами. Ця властивість використана для модифікації через окислені олігосахаридні зв'язки. Див. Andresz, H. et al., (1978), Makromol.

Chem. 179: 301. Зокрема, обробка PEG-карбоксиметилгідразину нітритом продукує PEG-карбоксиметилазид, який є електрофільною активною групою, реактивною у відношенні аміногруп. Ця реакція також може бути використана для одержання поліалкіленгліколь-модифікованих білків. Див. патенти США 4,101,380 і 4,179,337.

Для одержання мультивалентних композицій антагоніста альфа-1- або альфа 4-інтегрину можна скористатися також опосередкованою тіоловим лінкером хімією, щоб ще більш полегшити поперечне скріплення. Зокрема, можна одержати реактивні альдегіди на вуглеводних фрагментах з періодатом натрію, з утворенням цистамінових кон'югатів через альдегіди і з індукуванням поперечного скріплення на цистаміні через тіолові групи. Див. Perinsky, B. et al., (1991), J. Biol. Chem, 266: 18244-18249 and Chen, L.L. et al., (1991) J. Biol. Chem, 266: 18237-18243. Отже, такий тип хімії також повинен бути прийнятний для модифікації поліалкіленгліколевими полімерами, в яких лінкер вбудований у цукор, і поліалкіленгліколевий полімер приєднаний до лінкера. Оскільки амінотіолові або лінкери, що містять гідрозин, допускають додавання одиночної полімерної групи, структуру лінкера можна варіювати таким чином, щоб можна було додавати множину полімерів, і/або таким чином, щоб змінювалася просторова орієнтація полімеру по відношенню до антагоніста інтегрину.

Практично у даному винаході поліалкіленгліколеві залишки C₁-C₄-алкіл-поліалкіленгліколей, переважно поліетиленгліколю (PEG), або полі(окси)алкіленгліколеві залишки гліколей успішно вбудовуються у потрібні полімерні системи. Таким чином, полімер, до якого прикріплений протеїн, може бути гомополімером або поліетиленгліколем (PEG) або є поліоксиетилованим поліолом, за тієї умови, що у всіх випадках полімер є розчинним у воді при кімнатній температурі. Необмежуючі приклади таких полімерів включають в себе гомополімери поліалкіленоксиду, такі як PEG або поліпропіленгліколі, поліоксиетиленовані гліколі, їх співполімери і їх блок-співполімери, за умови, що розчинність у воді блок-співполімерів збережена. Приклади поліоксиетиленованих поліолів включають в себе, наприклад, поліоксиетилований гліцерин, поліоксиетилований сорбіт, поліоксиетиловану глюкозу або їм подібне. Гліцериновий кістяк поліоксиетилованого гліцерину є тим же самим кістяком, який природно утворюється, наприклад, у тварин і людини у моно-, ді- і триглицеридах. Отже, немає необхідності розглядати таку розгалуженість як чужерідний агент у організмі.

Як альтернатива поліалкіленоксидам можуть бути використані декстран, полівінілпіролідони, поліакриламіді, полівінілові спирти, полімери на основі вуглеводів і тому подібне. Як буде очевидно будь-якому рядовому фахівцеві, нижченаведений список носить виключно ілюстративний характер, і маються на увазі усі полімерні матеріали, що мають описані тут властивості.

Не обов'язково, щоб полімер мав конкретну молекулярну вагу, але переважно, щоб його молекулярна вага була укладена приблизно від 300 до 100,000, більш переважно - від 10,000 до 40,000. Зокрема, розміри від 20,000 або вище є найбільш вдалим з точки зору запобігання втраті продукту внаслідок фільтрації у нирках.

Практично у даному винаході дериватизація поліалкіленгліколю має ряд переважних властивостей при утворенні кон'югатів полімеру з антагоністом інтегрину у зв'язку з наступними властивостями похідних поліалкіленгліколю: поліпшення розчинності у воді, при цьому відсутність породження антигенної або імуногенної реактивності; висока міра біосумісності; відсутність біодеградації похідних поліалкіленгліколю *in vivo*; і легкість екскреції живими організмами.

Більш того у іншому аспекті згідно з винаходом можна використовувати антагоніст альфа-1- або альфа-4-штегрину, ковалентно пов'язаний з полімерним компонентом, в якому природа кон'югування включає в себе розщеплення ковалентних хімічних зв'язків. Це дозволяє здійснювати контроль увесь той час, протягом якого полімер може бути відщеплений від антагоніста інтегрину. Цей ковалентний зв'язок між антагоністом інтегрину і полімером може бути розщеплений внаслідок хімічної або ферментативної реакції. Продукт кон'югації полімеру, що одержується, з антагоністом інтегрину зберігає прийнятний рівень активності. Крім того, при кон'югуванні полімеру присутня частка поліетиленгліколю для придання кон'югату полімеру з антагоністом інтегрину високу розчинність у воді і пролонговану здатність циркулювати в крові. Внаслідок таких поліпшених характеристик у даному винаході мається на увазі парентеральна, назальна і пероральна доставка активних видів кон'югатів полімеру з антагоністом альфа-4-інтегрину і подальше гідролітичне розщеплення, біодоступність антагоніста інтегрину як такого при застосуванні *in vivo*.

Зрозуміло, що описані тут схеми реакцій приведені тільки для ілюстрації і не є такими, що обмежують по відношенню до всіх можливих реакцій і структур, які можуть бути використані у модифікації антагоніста альфа-1- або альфа-4-інтегрину, наприклад, для придання розчинності, стабільності і афінності відносно клітинної мембрани для парентерального і перорального введення. Активність і стабільність цих кон'югатів інтегринальних антагоністів можна варіювати декількома способами, використовуючи полімер різного молекулярного розміру. Розчинність кон'югатів можна варіювати шляхом зміни співвідношення і розміру фрагменту поліетиленгліколю, що вбудовується в полімерну композицію.

III. Застосовність

Кількість активного інгредієнта, яку можна комбінувати з матеріалами носія для одержання одноразового дозування, буде варіювати, в залежності від конкретного суб'єкта, який зазнає лікування, і конкретного способу введення. При цьому мається на увазі, однак, що спеціальна доза і схема лікування будь-якого конкретного суб'єкта будуть залежати від різних факторів, включаючи активність специфічних сполук, що використовуються, вік, вагу тіла, загальний стан здоров'я, стать, дієту, час введення, швидкість виведення, комбінацію лікарських засобів і думку лікуючого лікаря, а також міру важкості конкретного захворювання, яке лікують. Кількість активного інгредієнта може залежати також від терапевтичного або профілактичного засобу (при наявності таких), спільно з яким даний інгредієнт вводиться.

Спосіб лікування згідно з даним винаходом включає в себе введення суб'єкту ефективної кількості

антагоністів згідно з даним винаходом. Дози, що використовуються в способі згідно з винаходом, диктуються наявністю ефективності і відсутністю токсичності. Фахівці в даній області, провідні традиційні клінічні аналізи, можуть визначити оптимальні дози для випадку кожного конкретного захворювання, яке лікують.

5 Фармацевтичні композиції

У способах даного винаходу антагоністи згідно з винаходом можуть бути введені парентерально. Під терміном "парентеральний", що використовується тут, мається на увазі підшкірне, внутрішньовенне, внутрішньом'язове, внутрішньосуглобне, внутрішньосиновіальне, внутрішньогрудинне, внутрішньотрахеальне, внутрішньопечінкове, внутрішньоосередкове або внутрішньочерепне введення у вигляді ін'єкції або інфузії. 10 Необхідна доза вводиться суб'єкту один або більше разів на день внутрішньовенно, перорально, ректально, парентерально, інтраназально, місцево або шляхом інгаляції. Необхідна доза може також вводиться шляхом безперервної внутрішньовенної інфузії.

Гомологи антитіла переважно вводяться у вигляді стерильної фармацевтичної композиції, що містить фармацевтично прийнятний носій, який може бути будь-яким з ряду добре відомих носіїв, таких як вода, 15 сольовий розчин, забуферений фосфатом фізіологічний розчин, декстроза, гліцерин, етанол і їм подібні або їх комбінації. Сполуки даного винаходу можуть бути використані у вигляді фармацевтично прийнятних солей, одержаних з неорганічних або органічних кислот і основ. Серед них можуть бути солі кислот, включаючи наступні: ацетат, адипат, альгінат, аспартат, бензоат, бензол-сульфонат, бісульфат, бутират, цитрат, камфорат, камфорсульфонат, циклопентанпропіонат, диглюконат, додецилсульфат, етан-сульфонат, фумарат, 20 глюкогептаноат, гліцерофосфат, гемісульфат, гептаноат, гексаноат, гідрохлорид, гідробромід, гідройодид, 2-гідроксиетансульфонат, лактат, малеат, метансульфонат, 2-нафталінсульфонат, нікотинат, оксалат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенілпропіонат, пікрат, півалат, пропіонат, сукцинат, тартрат, тиоціанат, тозилат і ундеканоат Солі основ включають в себе солі амонію, солі лужних металів, такі як солі натрію і калію, солі лужноземельних металів, такі як солі кальцію і магнію, солі органічних основ, такі як дициклогексиламінові солі, N-метил-D-глутамін, трис(гідрокси-метил)метиламін і солі амінокислот, такі як аргінін, лізин і так 25 далі. Також групи, що містять основний азот, можуть бути кватернізовані такими агентами як галогеніди нижчого алкілу, такими як метил, етил, пропіл і бутилхлорид, броміди і йодиди; діалкілсульфатами, такими як диметил, діетил, дибутил і діамілсульфати, галогеніди з довгими ланцюгами, такі як децил, паурил, міристил і стеарилхлориди, броміди і йодиди, аралкілові галогеніди, такі як бензил і фенетилброміди, і інші. Таким шляхом одержують продукти, розчинні або які диспергуються у воді або у маслі.

30 Фармацевтичні композиції згідно з винаходом містять будь-яку зі сполук згідно з винаходом або їх фармацевтично прийнятних солей, а також фармацевтично прийнятний носій. Термін "носій", що використовується тут, включає в себе прийнятні ад'юванти і наповнювачі. Фармацевтично прийнятні носії, які можуть бути використані у фармацевтичних композиціях згідно з винаходом, включають в себе, не обмежуючись ними, іонообмінники, глинозем (оксид алюмінію), стеарат алюмінію, лецитин, сироваткові білки, такі як сироватковий альбумін людини, буферні речовини, такі як фосфати, гліцин, сорбінова кислота, сорбат калію, часткові гліцеридні суміші насичених рослинних жирних кислот, вода, солі або електроліти, протамінсульфат, гідрофосфат натрію, іідрофосфат калію, хлорид натрію, солі цинку, колоїдний кремнезем, трисилікат магнію, полівінілпіролідон, речовини на основі целюлози, поліетиленгліколь, натрій-карбоксиметилцелюлоза, 40 полікрилати, віски, блок-полімери, поліетилен-погііоксипрошлен, поліетиленгшколь і ланолін

Згідно з винаходом, фармацевтичні композиції можуть бути у вигляді стерильних препаратів для ін'єкцій, наприклад, стерильних водних розчинів або масляних суспензій для ін'єкцій. Ці суспензії можуть бути складені відповідно до технологій, відомих у даній області, за допомогою відповідних диспергуючих або зволожуючих агентів і суспендуючих агентів. Стерильний препарат, який ін'єкується, може являти собою також стерильний розчин, який ін'єкується, або суспензію у нетоксичному парентерально прийнятному розріджувачі або розчині, 45 наприклад, такому як розчин у 1,3-бутандіолі. До прийнятних носіїв і розчинів, які можна використати, відносяться вода, розчин Рінгера і ізотонічний розчин хлористого натрію. Крім того, до тих, що звичайно використовуються як розчинник або суспендує середовище, відносяться стерильні зв'язуючі масла. Для цієї мети може бути використане будь-яке м'яке зв'язуюче масло, включаючи штучні моно- або дигліцериди. Жирні кислоти, такі як масляна кислота і її гліцеридні похідні, можуть бути використані при приготуванні препаратів, які ін'єкуються, такі як фармацевтично прийнятні масла, як, наприклад, оливкове масло або касторове масло, особливо у їх поліоксиетилваній формі.

50 Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть бути у формі для перорального введення. При пероральному призначенні вони можуть вводиться у будь-якій перорально прийнятній дозованій формі, включаючи, але не обмежуючись цим, капсули, таблетки, водні суспензії або розчини. У разі таблеток для перорального застосування носії, що звичайно використовуються, включають в себе лактозу і кукурудзяний крохмаль. Звичайно додаються також і змащуючі агенти, такі як стеарат магнію. Для перорального введення у формі капсули використовуються розріджувачі, включаючи лактозу і сухий кукурудзяний крохмаль. У тих випадках, коли для перорального застосування потрібні водні суспензії, активний інгредієнт комбінує з емульгуючими і суспендуючими агентами. У випадку необхідності можуть бути додані певні підсолоджуючі, 60 смакові агенти або барвники.

Зокрема, композиціями для застосування у способі згідно з даним винаходом є такі, в яких антагоніст укладений у везикули, такі як композиції, що містять ліпосоми. Ліпосоми є везикулами, утвореними амфіфатичними молекулами, такими як полярні ліпіди, наприклад, фосфатидилхоліни, етаноламіни і серини, сфінгомієліни, кардіоліпіни, плазмалогени, фосфатидні кислоти і церебіозиди. Ліпосоми утворюються, коли відповідні амфіфатичні молекули мають можливість згрупуватися у воді або водних розчинах з утворенням

рідких кристалів, звичайно багат шарової структури, що складається з багатьох бішарів, відділених водним матеріалом (їх називають також грубими ліпосомами). Іншим типом ліпосом, відомих як такі, що складаються з єдиного бішару, що інкапсулює водний матеріал, є так звані уніламельярні везикули. Якщо водорозчинні речовини включені у водну фазу під час утворення ліпідами вказаних структур, вони виявляються у водному шарі, укладеному між бішарами ліпідів.

Особливо поширеним методом приготування укладених у ліпосоми форм даних антагоністів є метод, описаний у публікації EP-A-253,619, включеної в даний опис у вигляді посилання. У цьому методі ліпосоми, що складаються з єдиного бішару, що містять інкапсульовані активні інгредієнти, одержують шляхом розчинення ліпідного компонента у органічному середовищі, впорскуючи під тиском органічний розчин ліпідного компонента у водний компонент при одночасному перемішуванні органічного і водного компонентів високошвидкісним гомогенізатором або змішувачем пристроєм, під дією якого ліпосоми утворюються спонтанно. Ліпосоми, що складаються з єдиного бішару, що містять інкапсульований активний інгредієнт, можуть бути використані як такі, або ж їх можна використати у відповідному фармацевтично прийнятному носії для місцевого застосування. В'язкість ліпосом може бути збільшена шляхом додавання одного або більше відповідних загущувачів, таких, наприклад, як ксантановасмола, гідроксипропілцелюлоза, гідроксипропілметилцелюлоза і їх суміші. Водні компоненти можуть складатися тільки з води або ж вони можуть містити електроліти, буферуючі системи і інші інгредієнти, такі, наприклад, як консерванти. Відповідні електроліти, які можуть бути використані, включають в себе солі металів, таких як лужні метали, і солі лужноземельних металів. Переважними солями металів є хлорид кальцію, хлорид натрію і хлорид калію. Концентрація електроліту може варіювати від нуля до 260мМ, переважно від 5мМ до 160мМ. Водний компонент вміщують у відповідну судину, яка може бути адаптований для гомогенізації під дією високої турбулентності у процесі ін'єкування органічного компонента. Гомогенізація двох компонентів може бути зроблена всередині посудини або, альтернативно, водний і органічний компоненти можуть бути ін'єковані окремо у змішувачий пристрій, який знаходиться поза посудиною. У останньому випадку ліпосоми утворюються у змішувачому пристрої, а потім переносяться в іншу посудину для зберігання.

Органічний компонент складається з відповідного нетоксичного фармацевтично прийнятного розчинника, такого, наприклад, як етанол, гліцерин, пропіленгліколь і поліетиленгліколь, і відповідного фосфоліпиду, який розчинний у розчиннику. Відповідні фосфоліпіди, які можуть бути використані, включають в себе, наприклад, лецитин, фосфатидилхолін, фосфатидилсерин, фосфатидилетаноламін, фосфатидилінозит, лізофосфатидилхолін і фосфатидилгліцерин. Інші ліпофільні добавки можуть бути використані для селективної модифікації властивостей ліпосом. Приклади таких інших ліпофільних добавок включають в себе стеариламін, фосфатидну кислоту, токоферол, холестерин і екстракти ланоліну.

Крім того, до органічного компонента можуть бути додані і інші інгредієнти, які можуть запобігати окисленню фосфоліпідів. Приклади таких інших інгредієнтів включають в себе токоферол, бутилований гідроксіанізол, бутилований гідроксітолуол, аскорбілпальмітат і аскорбілолеат. Консерванти, такі як бензойна кислота, метилпарабен і пропілпарабен, можуть бути використані також.

Крім описаних вище композицій, можуть виявитися корисними покриття, наприклад, пластири, пов'язки, перев'язувальні матеріали, марлеві тампони і тому подібне, що містять відповідну кількість терапевтичного анти-VLA-антитіла. У деяких випадках можуть застосовуватися пластири, пов'язки, перев'язувальні матеріали, марлеві тампони і тому подібне, що повинне бути просочене композицією для місцевого нанесення, що містить терапевтичний склад.

Фармацевтичні композиції згідно з даним винаходом можуть вводитися також у вигляді назальних аерозолів або інгаляцій з використанням розпилювача, інгалятора сухого порошку або інгалятора метрованої дози. Такі композиції виготовляються у відповідності з добре відомими у фармацевтичній області способами і можуть бути одержані у вигляді розчинів у фізіологічному розчині, з використанням бензилового спирту або інших відповідних консервантів, промоторів абсорбції для підвищення біосумісності, флуорокарбонів і/або інших відповідних розчинювальних або диспергуючих агентів.

Відповідно до іншого аспекту, композиції, що містять сполуки даного винаходу, можуть включати в себе також і додатковий агент, вибраний з групи, що складається з кортикостероїдів, протизапальних агентів, імуносупресорів, антиметаболітів і імуномодуляторів. Специфічні сполуки всередині кожного з цих класів можуть бути вибрані з будь-якого з перерахованих у відповідній групі заголовків у "Comprehensive Medicinal Chemistry", Pergamon Press, Oxford, England, pp. 970-986 (1990), опис яких наведений у даному описі у вигляді посилання. Усі сполуки, що входять до цієї групи, є такими сполуками як теофілін, сульфазалазин і аміносаліцилати (протизапальні); циклоспорин, FK-506 і рапаміцин (імуносупресанти); циклофосфамід і метотрексат (антиметаболіти); стероїди (які інгалюються, пероральні або місцеві) і інтерферони (імуномодулятори).

Дозування і міра дозування сполук згідно з винаходом, ефективні для досягнення необхідних ефектів, будуть залежати від різноманітності факторів, таких як природа антагоніста, вага індивідуума, мета лікування, природа патології, у зв'язку з якою проводиться лікування, специфічної фармацевтичної композиції, що використовується, і рішення, що приймається лікуючим лікарем.

Використовуються рівні дозування приблизно між 0,001 і 100мг/кг маси тіла на день, переважно приблизно між 0,1 і 50мг/кг маси тіла на день активної сполуки-інгредієнта. Найбільш переважно, щоб VLA-4-зв'язуючий агент, будь те антитіло або похідне антитіла, був призначений у дозі приблизно між 0,1мг/кг маси тіла на день і 20мг/кг маси тіла на день, переважно приблизно між 0,1мг/кг маси тіла на день і 10мг/кг маси тіла на день, і інтервалами 1-14 днів. У разі неантитіла або ж агентів, зв'язуючих малі молекули, переважно, щоб межі дози варіювали між їх молярно еквівалентними кількостями і молярно еквівалентними кількостями антитіла.

Переважно, щоб антитільна композиція призначалася у кількості, що забезпечує рівень антитіла у плазмі щонайменше 1мг/мл. Оптимізація дозування може бути встановлена шляхом введення зв'язуючих агентів і подальшою оцінкою покриття інтегрин-позитивних клітин агентом через час після введення певної дози *in vivo*.

Присутність введеного агента може бути зареєстрована *in vitro* (або *ex vivo*) за нездатністю або зниженою здатністю клітин індивідуума зв'язувати цей же самий агент, який був міченим (наприклад, флуорохромом). Переважне дозування повинне продукувати покриття обширної більшості інтегрин-позитивних клітин, що реєструється. Переважно, щоб у разі гомолога антитіла покриття підтримувалося протягом 1-14-денного періоду.

Рядові фахівці в даній області зможуть з легкістю перевірити, чи викликає антагоніст згідно з винаходом передбачуваний ефект. Для визначення ефективності фахівцями будуть використані стандартні клінічні тести (наприклад, лаваж і FACS-сканування для скріплення антитіла; поліпшення життєвої функції гієгень). Наприклад, клітини, що містилися у зразку легеневої тканини індивідуума, тестуються на наявність агента *in vitro* (або *ex vivo*) за допомогою другого агента для реєстрації введеного агента. Це можливо, наприклад, мічене флуорохромом антитіло, специфічне відносно введеного агента, яке потім вимірюють за допомогою FACS-аналізу (флуоресцентно клітинний сортер, що активується). Альтернативно, присутність введеного агента реєструється *in vitro* (або *ex vivo*) за нездатністю або зниженою здатністю клітин індивідуума зв'язувати цей же самий агент, який був міченим (наприклад, флуорохромом). Переважне дозування повинне продукувати покриття обширної більшості інтегрин-позитивних клітин, що реєструється. Переважно, щоб покриття підтримувалося протягом 1-14-денного періоду.

Наступні далі приклади покликані проілюструвати даний винахід і не повинні тлумачитись як обмежувальні.

ПРИКЛАД 1. ТВАРИННІ МОДЕЛІ ЛЕГЕНЕВОГО ФІБРОЗУ

Багато доказів участі запальних клітин і медіаторів у легеневому фіброзі одержано на блеоміцинових (BL) моделях гризунів, які мають широке застосування. Ця модель приваблива у зв'язку з тим, що в ній відтворюється характерна картина фіброзу з багатьма ознаками цього захворювання у людини, а також тому, що BL-індукований легеневий фіброз є поширеним побічним явищем, виникаючим на фоні хіміотерапії у людини. Внутрішньотрахеальне (IT) введення BL гризунам широко використовується для вивчення механізмів фіброгенезу і для скріпінгу потенційно необхідних протифіброзних сполук. Хоча першопричину BL-індукованої легеневої токсичності пов'язують з виробленням видів реактивного кисню (ROS), який зв'язується із залізом і ДНК, процес, що приводить до кінцевих виявів легеневого фіброзу, включає в себе вивільнення різних медіаторів запалення (Giri and Wang, *Comments Toxicol*, 3: 145-176 (1989)). Патогенез BL-індукованого пошкодження легень зв'язували з набряком, геморагією і клітинними інфільтраціями, переважно нейтрофільними і макрофагальними. Надмірне накопичення запальних лейкоцитів у судинах, інтерстиції і у альвеолярному просторі легень могло призводити до пошкодження судин і паренхіми внаслідок вироблення ROS і протееолітичних ферментів. Нейтрофіли містять значну кількість міслопероксидази (MPO), яка може окислювати Cl⁻ з утворенням гіпохлорної кислоти (HOCl) у реакції з H₂O₂, і HOCl, що виробляється нейтрофілами, як відомо, є причиною клітинної токсичності. ROS, що виробляються макрофагами і нейтрофілами, можуть стимулювати продукцію прозапальних і фіброгенних цитокінів, якими опосередкована посилена фібропроліферативна відповідь (Phan and Kunkel, *Exp. Lung Res*, 18: 29-43 (1992)). Крім обширного запального клітинного інфільтрату, фіброзний процес характеризується ще і гіперпроліферативною відповіддю активованих фібробластів. Фібробласто-подібні клітини насамперед відповідають за збільшення абсолютного вмісту колагену у легенях, а також за аномальні вияви на рівні ультраструктури і просторового розподілу різних типів колагенів.

Приклад 2:

Інгібування фіброзу антагоністом інтегрину, що містить альфа-4-субодиницю

Матеріали і методи

Були використані неспецифічне контрольне антитіло (1E6) і антитіло проти інтегринів, що містять альфа-4-субодиницю (PS2). 1E6 являє собою мишаче моноклональне антитіло IgG1 проти людського LFA3 (домен 1). Див. Miller, Hochman, Meier, Iizard, Bixler, Rosa, and Wallner (1992) *J. Exp. Med.* 178: 211-222. PS2 був одержаний методом, описаним Miyake et al., *J Exp. Med*, 173: 599-607 (1991).

Миші C57BL/6 вагою 25-30г, не уражені хронічним респіраторним захворюванням, були одержані у Charles River Laboratory. Блеоміцинсульфат (торгова марка Bleomoxane) був одержаний у подарунок від Bristol Laboratories, (Syracuse, NY). L-[3,4-3H]пролін для мічення проколагенового субстрату пролілігидроксилази був придбаний у NEN Life Science Products (Boston, MA). Z-fix, водний забуферений цинк-формалін, був придбаний у Anatech, LTD (Battle Creek, MI). Усі інші використані хімічні реагенти були реагентами високої міри чистоти і були придбані зі стандартних комерційних джерел.

Обробка тварин

Миші були розсажені по 4 тварини у кожній клітці, і догляд за ними був забезпечений відповідно до розпоряджень Національного Інституту Здоров'я з догляду за тваринами. Перед початком експерименту мишей утримували протягом тижня для їх повної акліматизації і звикання до обстановки, що змінилася. їм встановлювали дванадцятигодинний цикл (12год/12год), що чергується, світла і темряви і забезпечували вільний доступ до води і їжі (корм Rodent Laboratory Chow). Тварин навантаження (випадковим чином) ділили на 4 експериментальні групи: 1) SA+SA; 2) BL+1E6; 3) BL+S/A; і 4) BL+PS2. Мишам робили внутрішньотрахеальну (IT) ін'єкцію однократної дози фізіологічного розчину або BL у концентрації 0,08одиниць/100мікролітрів/миша під ксиламіновою і кетаміновою анестезією. Після внутрішньотрахеальної ін'єкції мишам три рази на тиждень робили внутрішньоочеревинну ін'єкцію 1E6, SA або PS2 (100 мікрограмів в 0,2мл/миша). Через двадцять один день після введення BL мишей умертвляли під дією анестезії пентобарбіталом для одержання бронхоальвеолярного лаважу (BALF), біохімічних і гістопатологічних аналізів

Одержання BALF і легеневої тканини

Після анестезії розкривали черевну порожнину, і робили кровопускання шляхом розтину низхідної черевної аорти. Легені готували до лаважу шляхом канюлювання трахеї товстою голкою, приєднаною до шприца. Лаваж легень проводили 3мл охолодженого ізотонічного розчину, що вводиться у вигляді аліквот по 1мл. Аліквоту BALF відбирали для рахування загальної кількості клітин. Іншу кількість BALF центрифугували при 1500хд протягом 20 хвилин при 4 градусах С, одержаний в результаті супернатант розділяли на аліквоти, і потім заморожували і зберігали при температурі -70 градусів С. Після процедури одержання BALF легеневої частки швидко відсікали від непаренхіматозної тканини, негайно заморожували у рідкому азоті і зберігали при -70 градусах С.

Пізніше заморожені легені піддавали відтаванню і гомогенізації у 0,1М KCl, 0,02М Tris (pH 7,6) з використанням гомогенізатора Polytron (Brinkmann Instruments Inc., Westbury, NY). Гомогенат ретельно перемішували шляхом багаторазових переливань з посудини у посудину, і остаточний об'єм одержаного у результаті гомогенату (4-5мл) реєстрували. Гомогенат розділяли на декілька аліквот і зберігали при -70 градусах С для біохімічних аналізів.

Визначення еквівалента малонового діальдегіду і вмісту гідроксипроліну в легенях.

Еквівалент малонового діальдегіду легень встановлювали на основі загальної кількості продуктів у нефракціонованому гомогенаті, реагуючих з тіобарбітуровою кислотою, за допомогою методики Ohkawa et al., Anal. Biochem, 95: 351 (1979). Для визначення вмісту гідроксипроліну у легенях 1мл гомогенату осаджували додаванням 0,25мл охолодженої до температури льоду 50% (маса/об'єм) трихлороцтової кислоти, центрифугували і осад гідролізували у 2мл 6N HCl протягом 18 годин при 110 градусах С. Вміст гідроксипроліну вимірювали методом, описаним Woessner, J.F, Arch. Biochem. Biophys, 93:440(1961).

Визначення активності пролілгідролази (ЄС 1.14.11.2).

Спосіб одержання субстрату для пролілгідролази (проколагену) і метод аналізу пролілгідролази описані у публікації Giri, S.N. et al., Exp. Mol. Pathol. 39: 317 (1983). Коротко, свіжевидалену велику гомілкову кістку десятиденних курячих ембріонів мітили [3H]-проліном у культуральному середовищі, що не містить пролін, при 37 градусах С протягом 6 годин. Після видалення мітки, яка не зв'язалась, шляхом промивання тканину гомогенізували і центрифугували при 3000хд протягом 20 хвилин при 4 градусах С. одержаний в результаті супернатант екстенсивно промивали для звільнення від мітки, яка не зв'язалась. Мічений проколагеновий субстрат розділяли на аліквоти і зберігали при -70 градусах С. Інкубаційну суміш для ферментативного аналізу загальним об'ємом 2мл, що складається з сульфату залізистого амонію (0,1ммоль/л), альфа-кетоглутарової кислоти (0,1ммоль/л), [3H]-пролін-проколагену (200,000dpm), гомогенату легень (0,2мл), аскорбінової кислоти (0,5ммоль/л) і буфера TRIS-HCl (0,1моль/л, pH 7,8). Після 30-хвилинної інкубації у метаболічному шейкері Dubnoff при 37 градусах С до реакційної суміші додавали 0,2мл 50% трихлороцтової кислоти. У процесі реакції мічена тритієм вода виділялася у стехіометричному відношенні до гідроксилювання продукту, і це використовували як міру при визначенні ферментативної активності. Мічену за тритієм воду реакційної системи відділяли шляхом вакуумної дистиляції реакційної суміші у повному об'ємі, і в ній проводили рахування радіоактивності. Ферментативну активність виражали у dpm міченої води, що вивільняється з розрахунку на цілу легень, за 30 хвилин.

Визначення кількості клітин у BALF.

Загальну кількість клітин у BALF визначали, як описано у Wang, Q. et al., Lab. Invest, 67: 234-242 (1992). Загальну кількість лімфоцитів у BALF визначали за допомогою культурального лічильника (Model F, Coulter Electronics, Inc, Hialeah, FL), відповідно до інструкції для користувачів. Аналіз білка у BALF.

Вміст білка в супернатанті BALF визначали за допомогою білкового аналізу Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA), використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт.

Гістопатологічний і імуногістохімічний аналізи.

Трьох або чотирьох тварин з кожної групи рандомізовано вибирали для гістопатологічної і імуногістохімічної оцінки наприкінці експерименту. Черевну порожнину тварини розкривали, і робили кровопускання шляхом розтину низхідної черевної аорти. Відразу ж після цього тканину легень препарували для гістологічного аналізу, як описано у публікації Wang et al., вище. Після канюлювання трахеї товстою голкою розкривали порожнину груднини, і з неї витягували серце і легені як єдине ціле (не розділяючи їх). Легені фіксували Z-fix-розчином через трахею під тиском в 30см водного стовпа. Пізніше блокували праву краніальну і каудальну і ліву частки, занурювали у парафін, робили 7-мікронні зрізи і забарвлювали гематоксилінеозином. Для імуногістохімічного фарбування альфа-SMA зрізи легеневої тканини депарафінували, і блокували ендogenous пероксидазу. Потім зрізи, що підлягають фарбуванню, протягом 16 годин обробляли блокуючою козячою сироваткою, що містить первинне моноклональне антитіло проти альфа-SMA (Sigma Chemical Co, St Louis, MO).

Статистичний аналіз даних

Дані, одержані на тваринах, виражали з розрахунку на цілу легень у вигляді середнього±стандартна помилка (SE). Дані порівнювали всередині чотирьох груп за допомогою двопараметричного варіаційного аналізу (SIGMASTAT) і методу Student-Newman-Keuls. Величина $P \leq 10,05$ вважалася значущою.

РЕЗУЛЬТАТИ

Перекисне окислення ліпідів у легенях мишей

У різних групах мишей проводили визначення вмісту еквівалента малонового діальдегіду як показника перекисного окислення ліпідів. Введення BL значно підвищувало вміст еквівалента малонового діальдегіду у легенях мишей у групах BL+IE6 і BL+SA у порівнянні з групами SA+SA і BL+PS2 (дані не представлені) Обробка PS2 ефективно блокувала BL-індуковане перекисне окислення ліпідів у легенях, оскільки рівень еквівалента

маломовного діальдегіду у легенях у групі BL+PS2 не відрізнявся від такого в групі SA+SA.

Вміст пдроксипроліну у легенях мишей.

Гідроксипролін легень, ключовий показник рівня колагену у легенях, визначали у чотирьох групах мишей. Внутрішньотрахеальне ведення BL значно підвищувало рівень гідроксипроліну у легенях мишей у групах BL+IE6 і BL+SA, до 185% і 205%, відповідно, у порівнянні з контрольною групою SA+SA. BL-індуковане збільшення рівня гідроксипроліну у легенях мишей у групі BL+PS2 значно, на 35%, знижувалося при обробці PS2, у порівнянні з групою BL+SA. Рівень гідроксипроліну у легенях мишей у групі BL+TR був трохи вищим такого в контрольній групі SA+SA, у якій тваринним внутрішньотрахеально вводили фізіологічний розчин.

Активність пролілгідроксилази у легенях мишей

Вимірювання активності пролілгідроксилази у легенях різних груп мишей показало, що BL як такий значно підвищує активність пролілгідроксилази легень у групі BL+SA до 207% у порівнянні з контрольною групою SA+SA. PS2 значно знижував активність пролілгідроксилази, підвищену під дією обробки BL, у групі BL+SA.

Загальний рахунок клітин BALF у легенях мишей

Рахунок загальної кількості клітин в BALF у різних групах тварин на 21 день після внутрішньотрахеального введення фізіологічного розчину або BL показав, що обробка BL підвищувала загальну кількість клітин у BALF у групах BL+IE6 і BL+SA у порівнянні з контрольною групою (SA+SA), якій вводили фізіологічний розчин, хоча тільки у групі BL+IE6 ця кількість значно перевищувала таке у контрольній групі SA+SA. Кількість BALF клітин у групі BL+PS2 не відрізнялася від такого у групі SA+SA.

Вміст білка у BALF

Визначення вмісту білка у супернатанті BALF у 4 експериментальних групах виявило, що внутрішньотрахеальне введення BL значно підвищує вміст білка у BALF у всіх групах тварин, оброблених BL, у порівнянні з контрольною групою SA+SA. Однак обробка PS2 у групі BL+PS2 сприяла зниженню BL-індукованого збільшення вмісту білка у супернатанті BALF, хоча ці зміни були статистично недостовірними.

Гістопатологія легень мишей

Гістологічне дослідження легень мишей виявило, що тварини у контрольній групі SA+SA мали нормальну тканину паренхіми легень, однак легені тварин з груп BL+IE6 і BL+SA виявляли локальні вияви альвеоліту і мультифокального інтерстиціального фіброзу з накопиченнями позаклітинних волокон. Легені мишей у цих групах мали потовщену міжальвеолярну перегородку і скупчення запальних клітин у навколишньому просторі. У порівнянні з групами BL+IE6 і BL+SA, легені тварин з групи BL+PS2 мали значно менше фіброзних пошкоджень, хоча у деяких частках все ще виявлявся у слабкій мірі інтерстиціальний фіброз.

Імуногістохімічне фарбування на альфа-SMA легень мишей

Щоб виявити накопичення фіброblastів і фіброblastоподібних клітин у мишей після введення BL, вивчали експресію альфа-SMA у тканині легень з використанням моноклональних антитіл проти альфа-SMA. У контрольних легень імунопозитивними виявилися шари гладкої мускулатури судин і бронхів. У групах BL і контрольній групі оброблених антитілом або фізіологічним розчином тварин тканина легень виявилися обширно і інтенсивно імунофарбованою всередині фіброзних областей, як у інтерстиціальній, так і у плевральній областях, однак у легенях, оброблених BL і PS2, виявлялося істотно редуковане імунофарбування на альфа-SMA у порівнянні з групами BL+IE6 і BL+SA.

Обговорення

IPF являє собою захворювання, що калічить, яке слабо піддається традиційному лікуванню. У даному дослідженні показано, що інтегрин, що містить альфа-4-субодиницю, є ще однією можливою мішенню у лікуванні IPF. Звичайно вважають, що лейкоцити легень беруть участь у розвитку легеневого фіброзу внаслідок секреції ROS, фіброгенних цитокінів і факторів росту. Транспорт і стан активації лейкоцитів модулюються різними білками клітинної поверхні, такими як інтегрини. Очевидно, що міжклітинні взаємодії, також як і взаємодії клітин з позаклітинним матриксом, є критичними у патогенезі легеневого фіброзу. Незмінним виявом у хворих з активною формою легеневого фіброзу і у модельних тварин з фіброзними захворюваннями легень є накопичення надмірних кількостей імунних і запальних клітин на ділянках з фіброзними виявами.

VLA-4 експресується на всіх циркулюючих лейкоцитах, а на поверхні судинних клітин зв'язується з молекулою клітинної адгезії (VCAM-1), членом суперсімейства імуноглобулінових генів, який експресується на поверхні активованих цитокіном ендотеліальних клітин, і з білком матриксу фібронектином. Альфа-4-бета-7 експресується на субпопуляціях T- і B-клітин, природних кілерах і еозинофілах. Він зв'язується з молекулою клітинної адгезії слизової судин (MAdCAM-1), членом імуноглобулінового і муциноподібного сімейств адгезивних молекул, а також з VCAM-1 і фібронектином. Дослідження *in vitro* показали, що взаємодія VLA-4 з VCAM-1 бере участь у прикріпленні мононуклеарних лейкоцитів і еозинофілів до ендотелію і у трансендотеліальній міграції, а крім того, вважають, що альфа-4-бета-7 передусім бере участь в рекрутменті лейкоцитів асоційованої з кишечником лімфоїдної тканини.

У даному винаході обробка PS2 сприяла зниженню BL-індукованого підвищення загального числа лейкоцитів у BALF. Зниження кількості лейкоцитів у легенях мишей групи BL+PS2 може бути причиною менших пошкоджень при запаленні і фіброзі у легенях мишей, оброблених BL. BL-індуковане пошкодження легень значно зменшувалося під дією PS2, як показали шляхом вимірювання перекисного окислення ліпідів у легенях. Як такий підвищений вміст колагену був асоційований із збільшенням числа фіброblastів у інтерстиціальному і альвеолярному просторі. Багато з цих фіброblastоподібних клітин є міофіброblastами, які мають відмітний фенотип, включаючи експресію альфа-SMA, скорочувального білка, що звичайно виявляється у клітинах гладкої мускулатури і що грає, як вважають, важливу роль у фіброгенезі і процесі загоєння ран. Важливим відкриттям у даному дослідженні виявилось те, що обробка PS2 послаблювала індуковану BL проліферацію міофіброblastів.

5 Поза зв'язком з якою-небудь конкретною теорією, стверджується, що введення антитіла проти альфа-інтегрину може сприяти зменшенню у легенях рівня факторів росту, що вивільняються інфільтруючими лейкоцитами, або безпосередньо впливати на поведінку міофібробластів. У будь-якому випадку знижена проліферація міофібробластів може призводити до зниження накопичення колагену у легенях у BL-оброблених тварин у групі BL+PS2.

ПРИКЛАД 3:

Інгібування фіброзу антагоністом інтегрину, що містить альфа-1-субодиницю
Обробка тварин

10 Самців мишей C57/BL6 вагою 28-30г розміщували у пластикових клітках за групами з 4 тварин, і догляд за ними був забезпечений відповідно до встановленого американською Асоціацією з акредитації лабораторних тварин. Перед початком експерименту мишей утримували протягом одного тижня для їх повної акліматизації і звикання до лабораторних умов. їм встановлювали дванадцятигодинний цикл світла і темряви (12год/12год), що чергується, і забезпечували вільний доступ до води і їжі (корм Rodent Laboratory Chow 5001 (Purina Mills, Jnc, St. Louis, MO) і утримували у приміщенні з повітрям, що фільтрується. Мишей розділяли на 4 наступні групи:

ГРУПА	ОБРОБКА
A	Фізрозчин+Забуферений фосфатом
B	Фізрозчин+контрольне антитіло IgG
C	Блеоміцин+контрольне антитіло IgG
D	Блеоміцин+анти- $\alpha 1\beta 1$ -інтегринове

25 Блеоміцинсульфат розчиняли у апірогенному стерильному ізотонічному розчині безпосередньо перед внутрішньотрахеальною (ІТ) ін'єкцією. Під метоксифлурановою анестезією миші відповідних груп внутрішньотрахеальноодержували або 100мкл стерильного ізотонічного розчину, або 0,08одиниць розчину блеоміцину у 100мкл. Антитіла (4 мг/кг) вводили мишам відповідних груп три рази на тиждень шляхом внутрішньоочеревної ін'єкції протягом 21 дня після введення блеоміцину. Потім мишей кожної групи умертвляли шляхом введення великих доз пентобарбіталу натрію (100-125мг/кг внутрішньоочеревно), і їх легені піддавали бронхоальвеолярному лаважу, біохімічним і гістопатологічним дослідженням.

30 Визначення загального числа клітин і рівнів білка у бронхоальвеолярному лаважі Після канюлювання трахеї легені промивали 5мл фізіологічного розчину, розділеного на 5 частин по 1мл у кожній. Фізіологічний розчин вводили шприцом через канюлю, злегка масажуючи при цьому грудну клітину, і рідину збирали. Відібрану рідину центрифугували при 1500хд протягом 20 хвилин при 4 градусах С, і ресуспендували у ізотонічному сольовому розчині. Вміст білка у супернатанті зразків бронхоальвеолярного лаважу визначали методом Lowry et al., J Biol. Chem. 1193: 265-275 (1951), використовуючи бичачий сироватковий альбумін як стандарт. Загальну кількість лейкоцитів у суспензії визначали за допомогою культурального лічильника клітин (Coulter Electronics, Hialeah, FL)

35 Визначення гідроксипроліну

40 Легені тварин, що використовуються для біохімічних досліджень, перфузували in situ через правий шлуночок крижаним ізотонічним сольовим розчином для видалення крові з кровоносних судин легень шляхом відкриття лівого передсердя. Легеневі частки швидко відсікали від непаренхіматозної тканини, негайно заморожували у рідкому азоті і зберігали при -80 градусах С. Пізніше заморожені легені піддавали відтаванню і гомогенізації у 0,1М KCl, 0,02М Tris (pH 7,6) з використанням гомогенізатора Polytron. У легеневому гомогенаті визначали вміст гідроксипроліну як міру кількісного вмісту колагену згідно з методикою Woessner, Arch. Biochem. Biophys. 93: 440-447 (1961).

45 Гістопатологічне дослідження

50 Після легеневого лаважу розкривали порожнину груднини, і з неї витягували серце і легені як єдине ціле (не розділяючи їх). У легені вводили 1% фіксатор глутаральдегід-параформальдегід у 0,12М какодилатному буфері при 400m Osm під тиском у 30см водного стовпа. Легені фіксували під таким тиском протягом 2 годин, а потім зберігали у фіксаторі, із закупореною трахеєю. Перед залиттям легеню відділяли від серця, і всю нелегенову тканину видалляли. Блоки тканини відрізали щонайменше від двох сагітальних пластинок (товщиною 2-3мм) від правої краніальної, правої каудальної і лівої часткою кожної з легень. Кожний блок тканини нарізувався на шматочки площиною приблизно у 1см². Блоки дегідрували у градуйованій серії метанольної обробки і занурювали у парафін. Секції (товщиною 5мкм) відрізали від парафінових блоків і забарвлювали гематоксилінеозином для гістологічної оцінки.

55 Аналіз даних і їх інтерпретація

60 Дані аналізували за їх середніми значеннями з урахуванням стандартних відхилень і стандартних помилок. Для встановлення значущості відмінностей між контрольною групою і дослідними групами застосовували t-тест Стьюдента, хі-квадратні розподіли, коефіцієнт кореляції, аналіз варіанси (ANOVA) і множину порівняльних тестів, користуючись комп'ютерною базою статистичних програм (SAS/STAT Guide, 6th Ed. Cary, N.C. pp.183-260 (1985)).

Результати

65 У даному дослідженні перевіряли гіпотезу, що нейтралізуюче $\alpha 1\beta 1$ -інтегрин антитіло (анти- $\alpha 1\beta 1$) зменшує індукований блеоміцином (BL) легеневий фіброз in vivo. Самців мишей C57/BL6 внутрішньотрахеально (ІТ) ін'єкували сольовим розчином (SA) або BL, 0,08од. у 0,1мл, після чого внутрішньоочеревно (ІР) ін'єкували антитілом (100мг у 0,2мл) три рази на тиждень. Через 21 день після ІТ-введення блеоміцину мишей забивали,

проводили бронхоальвеолярний лаваж (BAL) і проводили біохімічні і гістопатологічні аналізи.

Гістопатологічне дослідження легень

У результаті виявляється, що у мишей, оброблених сольовим розчином і контрольним IgG, не виявляється помітних пошкоджень, і міжальвеолярна перегородка у цих тварин має нормальну товщину. І навпаки, миші, оброблені блеоміцином і контрольним IgG, мають пошкодження, що варіюють від мультифокальної локалізації у проксимальних ацинусах до дифузного розподілу, який випадковим чином включений у плевру. Стверджується, що легені мишей, оброблених блеоміцином і анти-альфа-1-інтегриновими антитілами, швидше нагадують такі у групі В (вище). У тварин групи D виявляється лише незначна кількість фіброзних пошкоджень з утворенням слабких мультифокальних потовщень перегородок і малих агрегатів мононуклеарних клітин.

Незважаючи на те, що представлений вище винахід описаний у деяких деталях з метою його ілюстрації, а приклади наведені для більшої ясності і кращого розуміння, фахівцям очевидно, що певні зміни і модифікації неминучі. Отже, опис і приклади не треба розглядати як такі, що обмежують об'єм даного винаходу, який визначається прикладеною формулою винаходу.

Формула винаходу

1. Застосування композиції, що містить гомолог антитіла, який є антагоністом взаємодії між інтегрином, що несе альфа-4-субодиницю, та лігандом інтегрину, що несе альфа-4-субодиницю, для одержання фармацевтичної композиції для лікування фіброзу у суб'єкта.

2. Застосування за пунктом 1, де фіброз являє собою фіброз внутрішнього органа.

3. Застосування за пунктом 2, де внутрішнім органом є печінка, легеня, нирка, кровеносні судини серця або шлунково-кишковий тракт.

4. Застосування за пунктом 1, де суб'єкт страждає на легеневий фіброз, мієлофіброз, цироз печінки, мезангіальний проліферативний гломерулонефрит, серпоподібний гломерулонефрит, діабетичну нефропатію, нирковий інтерстиціальний фіброз або нефропатію, асоційовану з ВІЛ.

5. Застосування за пунктом 1, де фіброз являє собою шкірний фіброз.

6. Застосування за пунктом 5, де суб'єкт страждає на склеродермію, кільцеподібну склеродермію, келоїди, гіпертрофовані рубці, сімейну шкірну колагеному та невус сполучної тканини колагенового типу.

7. Застосування за пунктом 1, де фіброз являє собою фіброз ока.

8. Застосування за пунктом 7, де суб'єкт страждає на діабетичну ретинопатію, постхірургічне утворення рубців або проліферативну вітроретинопатію.

9. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де композиція містить гомолог анти-альфа-4-антитіла.

10. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де гомолог антитіла є гомологом гуманізованого, людського або химерного антитіла.

11. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де фармацевтична композиція виготовлена для введення

а) у дозі приблизно від 0,1 мг/кг до 10 мг/кг на день;

б) протягом періоду від 1 до 14 діб; та

с) у кількості, достатній для забезпечення рівня гомолога антитіла у плазмі близько 1 мг/кг або вище.

12. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де гомолог антитіла є гуманізованим мишачим антитілом 21-6.

13. Застосування за будь-яким з попередніх пунктів, де суб'єкт є людиною.

Офіційний бюлетень "Промислова власність". Книга 1 "Винаходи, корисні моделі, топографії інтегральних мікросхем", 2005, N 7, 15.07.2005. Державний департамент інтелектуальної власності Міністерства освіти і науки України.