



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 249 599** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **C 07 K 7/64, 17/08, A 61 K**
38/12, A 61 P 9/00

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2003112701/04, 02.10.2001**
(24) Дата начала действия патента: **02.10.2001**
(30) Приоритет: **04.10.2000 FR 0012654**
(43) Дата публикации заявки: **10.12.2004**
(45) Опубликовано: **10.04.2005 Бюл. № 10**
(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2129563 C1, 27.04.1999. EP 0844252 A2, 27.05.1998. WO 99/40947 A2, 19.08.1999. WO 00/53219 A2, 14.09.2000.**
(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: **05.05.2003**
(86) Заявка РСТ: **FR 01/03049 (02.10.2001)**
(87) Публикация РСТ: **WO 02/28895 (11.04.2002)**
Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО "Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):
БЕС Наташа (FR),
БИКФАЛЬВИ Андреа (FR),
ДЕЛЕРИ Жерар (FR)
(73) Патентообладатель(ли):
КОММИССАРИАТ А Л'ЭНЕРЖИ АТОМИК (FR),
ЮНИВЕРСИТЕ ВИКТОР СЕГАЛАН БОРДО 2 (FR),
ЮНИВЕРСИТЕ БОРДО 1 (FR)

(54) ЦИКЛОПЕПТИДЫ, СПОСОБ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ИЛИ АКТИВАТОРОВ АНТИОГЕНЕЗА

(57) Реферат:
Изобретение относится к получению новых циклопептидов общей формулы цикло(R₁-Arg-Ile-Lys-Pro-His-R₂), выбранных из следующих соединений: P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) (SEQ ID NO: 5), P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) (SEQ ID NO: 8), P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) (SEQ ID NO: 9), P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) (SEQ ID NO: 10), P20:

цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly) (SEQ ID NO: 11), P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln) (SEQ ID NO: 13), P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His) (SEQ ID NO: 25), а также соединений P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr. Циклопептиды применяют в системах для ингибирования ангиогенеза, включающих подложку, к которой присоединены циклопептиды посредством органической ножки, которая может содержать группировку, подверженную расщеплению какой-либо ферментативной системой. 8 н. и 15 з.п. ф-лы, 4 ил., 3 табл.

RUSSIAN FEDERATION



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 249 599** ⁽¹³⁾ **C2**

(51) Int. Cl.⁷ **C 07 K 7/64, 17/08, A 61 K
38/12, A 61 P 9/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2003112701/04, 02.10.2001**

(24) Effective date for property rights: **02.10.2001**

(30) Priority: **04.10.2000 FR 0012654**

(43) Application published: **10.12.2004**

(45) Date of publication: **10.04.2005 Bull. 10**

(85) Commencement of national phase: **05.05.2003**

(86) PCT application:
FR 01/03049 (02.10.2001)

(87) PCT publication:
WO 02/28895 (11.04.2002)

Mail address:
**103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu**

(72) Inventor(s):

**BES Natasha (FR),
BIKFAL'VI Andrea (FR),
DELERI Zherar (FR)**

(73) Proprietor(s):

**KOMMISSARIAT A L'EhNERZhi ATOMIK (FR),
JuNIVERSITE VIKTOR SEGALAN BORDO 2 (FR),
JuNIVERSITE BORDO 1 (FR)**

(54) **CYCLOPEPTIDES, METHOD FOR PRODUCTION THEREOF AND USES AS ANGIOGENESIS
INHIBITORS OR ACTIVATORS**

(57) Abstract:

FIELD: biochemistry.

SUBSTANCE: method relates to new cyclopeptides of general formula $\text{cyclo}(R_1\text{-Arg-Ile-Lys-Pro-His-R}_2\text{)}$ selected from group containing: P11: $\text{cyclo}(\text{DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu})$ (SEQ ID NO:5), P16: $\text{cyclo}(\text{Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly})$ (SEQ ID NO:8), P17: $\text{cyclo}(\text{Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly})$ (SEQ ID NO:9), P19: $\text{cyclo}(\text{Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu})$ (SEQ ID NO:10), P20:

$\text{cyclo}(\text{Dphe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly})$ (SEQ ID NO:11), P23: $\text{cyclo}(\text{DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln})$ (SEQ ID NO:13), P24: $\text{cyclo}(\text{Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His})$ (SEQ ID NO:25), as well as P11, P20 and P23 with DPhe substituted by DTyr. Cyclopeptides are useful in systems for angiogenesis inhibition. System includes substrate with cyclopeptides attached by organic spacer arm optionally containing group cleavable by any fermentation system.

EFFECT: angiogenesis inhibiting cyclopeptides.
23 cl, 4 dwg, 2 tbl, 2 ex

RU 2 2 4 9 9 9 C 2

RU 2 2 4 9 9 9 C 2

Область техники, к которой относится изобретение

Предметом настоящего изобретения являются новые циклопептиды и содержащие их системы, позволяющие контролировать ангиогенез.

Ангиогенез является механизмом образования новых кровеносных сосудов (неоваскуляризации), возникающих из предсуществующей капиллярной сети. Он особенно важен и необходим в ходе многих физиологических процессов, таких как эмбриональное развитие, имплантация плаценты, а также при различных патологиях, в частности росте опухолей, развитии метастазов, ишемии, сосудистых заболеваниях глаз и хронических воспалительных заболеваниях (см. Ferrara et al., *Nature Medicine*, Vol.5, № 12, December 1999, pp.1361-1364 [1] и Hagedorn and Bikfalvi [2]). Ангиогенез также необходим при регенерации тканей и долговременной колонизации имплантатов из биоматериалов, например, при замещении костной ткани.

Ангиогенез является многостадийным процессом, который сначала запускает миграцию, прикрепление и адгезию эндотелиальных клеток и затем их пролиферацию и организацию в сосуды для формирования сосудистой сети, необходимой для развития тканей.

Среди факторов, регулирующих ангиогенез, по-видимому, наиболее важен фактор роста эндотелия сосудов (VEGF).

VEGF существует в виде четыре изоформ: А, В, С и D, из которых изоформа А, состоящая из 165 аминокислот, является мощным регулятором опухолевого ангиогенеза и, по-видимому, участвует и в других патологиях, таких как диабетическая ретинопатия или хронические воспалительные заболевания.

VEGF-A вырабатывается нормальными или трансформированными клетками. Его экспрессия может индуцироваться при гипоксии, активации онкогенов или активации факторами роста, такими как фактор роста фибробластов PGF-2.

VEGF-A связывается с различными рецепторами, особенно с несущим киназный домен рецептором KDR (VEGFR-2), который, по-видимому, является очень важным эффектором при патологическом ангиогенезе. К тому же ингибирование ангиогенеза через рецептор KDR может представлять интересный терапевтический подход.

Структура VEGF-A, состоящего из 165 аминокислот, была описана в конце 1997 и доступна с конца июня 1998 г., как раскрыто в документе (см. Muller Y.A. in *Structure*, 1997, 5, pp.1325-1338 [3]).

Уровень техники

Разработан целый ряд подходов с целью подавления функции KDR-рецептора VEGF. Они включают ингибирование VEGF:

- гуманизированными антителами, как описано Presta et al. в *Cancer Research*, 57, 1997, pp.4593-4599 [4];

- антиидиотипическими антителами, как описано Ortega et al. в *Am. J. Pathol.*, Nov. 1997, 151 (5), pp.1215-1224 [5];

- ингибиторами тирозинкиназного домена рецептора KDR, как описано Piossek et al. в *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, N.9, 1999, pp.5612-5619 [6];

- пептидными ингибиторами, выделенными методом фагового дисплея, как описано Fairbrother et al. в *Biochemistry* 37, 1998, pp.17754-17764 [7].

Были описаны и другие молекулы, активные в отношении ангиогенеза, и некоторые из них вошли в клиническую фазу онкологических испытаний, как описано Hagedorn and Bikfalvi в *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 34, 2000, pp.89-110 [2].

В патенте US-A-5 939 383 [8] раскрыто применение различных циклопептидов, прикрепленных или конъюгированных с твердой или иной подложкой, для применения в биотехнологии. Из различных вариантов в нем предлагается следующий циклопептид для KDR-рецептора VEGF:

цикло(Glu-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln) SEQ ID NO: 24.

Однако в нем не представлено никаких результатов о возможном ингибировании KDR-рецептора этим циклопептидом и, как будет показано ниже, он не приводит к ингибированию связывания VEGF с этим рецептором.

Сущность изобретения

Предметом настоящего изобретения конкретно являются новые циклопептиды, обладающие более высоким сродством к связыванию с KDR-рецептором VEGF, чем указанные выше препараты, что дает возможность использовать их в системах, активирующих или ингибирующих ангиогенез.

Следующим предметом изобретения является циклопептид, включающий пептидную последовательность:

-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly- (SEQ ID NO: 1).

В этой пептидной последовательности обязательно присутствие трех аминокислот Arg, Lys и His для достижения требуемого взаимодействия с KDR-рецептором VEGF.

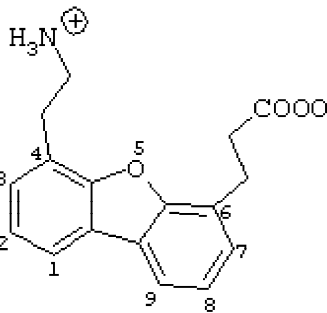
В изобретении остатки Arg и Gly циклопептида связаны цепочкой, которая может включать одну или множество органических молекул, выбранных из группы, состоящей из природных и синтетических аминокислот, или соединений, содержащих группу COOH и группу NH₂, которые необязательно могут быть замещенными. Аминокислоты могут находиться в L- или D-форме.

Синтетические аминокислоты могут представлять собой, к примеру, ароматические и/или гетероциклические соединения, содержащие группу COOH и группу NH₂ в составе структуры, допускающей пространственную конформацию, близкую к конформации VEGF в данной пептидной последовательности (SEQ ID NO: 1).

Ароматическая часть может быть представлена производными бензола, нафталина, дибензофурана.

Гетероатомы могут представлять собой атомы кислорода, азота, кремния, германия, олова или фосфора.

В качестве примера аминокислот такого типа можно привести 4-(2'-аминоэтил)-6-дибензофуранпропановую кислоту, имеющую следующую формулу:



(I)

Синтез этой кислоты описан Векеле et al., J. Org. Chem. 63, 1997, pp.2259-2262 [9].

В качестве примера органических соединений, которые можно использовать, можно привести силасантены, 4-(2'-аминоэтил)-6-(дибензофуран)пропановую кислоту и 5-(2'-аминоэтил)-9,9-диметилсиласантен-4-пропановую кислоту.

В случае, когда соединение содержит замещенную группу NH₂, она может быть группой типа NHR, где R - углеводородная группа, которая может включать функциональные группы типа карбокси-, сложноэфирных, эфирных, гидрокси- и силоксигрупп.

Предпочтительно цепочка, соединяющая концы пептидной последовательности SEQ ID NO: 1, описанной выше, включает аминокислоту в D-конфигурации, предпочтительно D-Phe или D-Tyr.

В качестве примера циклопептидов согласно изобретению можно привести следующие пептиды:

P7: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-DPro-His-Gln-Gly-Gln-His)	SEQ ID NO: 2
P8: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-His)	SEQ ID NO: 3
P9: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His)	SEQ ID NO: 4
P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 5

P12: цикло(Gly-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 6
P13: цикло(Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 7
P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 8
P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 9
P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 10
P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)	SEQ ID NO: 11
P21: цикло(DPhe-Pro-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile)	SEQ ID NO: 12
P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)	SEQ ID NO: 13
P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)	SEQ ID NO: 25.

5

10

Циклопептиды изобретения могут применяться для контролирования ангиогенеза и лечения разнообразных патологий, связанных с ангиогенезом. Их можно применять для этих целей в виде раствора в системах или биоматериалах.

15

В том случае, когда циклопептиды применяются в виде раствора, их обычно вводят в виде водного раствора для приема внутрь (перорально) или для инъекций. Циклопептиды могут применяться либо для ингибирования ангиогенеза при связывании их с рецептором VEGF, либо для активации ангиогенеза путем конъюгирования двух циклопептидов с органическим соединением, способным придать им эффективную пространственную конфигурацию, приводящую к димеризации рецепторов VEGF.

20

В обоих случаях циклопептиды при необходимости можно присоединять к биологически активным соединениям.

Следующим предметом изобретения является композиция, включающая циклопептид, выбранный из числа следующих циклопептидов:

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 5
P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 8
P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 9
P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 10
P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)	SEQ ID NO: 11
P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)	SEQ ID NO: 13
P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)	SEQ ID NO: 25.

25

30

35

Кроме того, предметом изобретения также является фармацевтическая композиция для активации ангиогенеза, включающий два одинаковых или разных циклопептида, конъюгированных с фармацевтически приемлемым органическим соединением, причем циклопептиды выбирают из числа следующих циклопептидов:

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 5
P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 8
P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 9
P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 10
P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)	SEQ ID NO: 11
P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)	SEQ ID NO: 13
P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)	SEQ ID NO: 25.

40

45

Фармацевтически приемлемое органическое соединение может включать чередующиеся гидрофильные-гидрофобные последовательности и реакционно-способные группы, способные реагировать с функциональными группами боковых цепей аминокислот циклопептида.

Когда циклопептиды применяются в виде систем или биоматериалов, последние тоже можно приготовить таким образом, чтобы они вызывали либо ингибирование, либо активацию ангиогенеза.

50

Согласно первому воплощению этих систем они включают один или несколько циклопептидов, каждый из которых ковалентно связан с одной органической "ножкой", которая сама может быть ковалентно связана с подложкой.

В первом воплощении, когда система приходит в контакт с рецепторами VEGF, то лишь

один циклопептид связывается с рецептором VEGF и предотвращает димеризацию рецептора и активацию ангиогенеза.

Согласно второму воплощению этих систем, в частности, предназначенных для активации ангиогенеза, они могут включать два циклопептида, ковалентно связанных с органическим соединением так, чтобы придать этим циклопептидам эффективную пространственную конфигурацию, приводящую к активации ангиогенеза.

Эти органические соединения должны быть фармацевтически приемлемыми соединениями. Они могут состоять из чередующихся гидрофильных-гидрофобных последовательностей, таких, например, как полиэтиленгликоль/алкан или фторалкан, и включать группы, способные реагировать с аминогруппами, гидроксилами, карбоксилатами или иными функциональными группами боковых цепей циклопептида, чтобы обеспечить его фиксацию на этом соединении; также они могут включать акрильные группы.

В качестве примера соединения такого типа можно привести соединение следующей формулы:

$\text{HOOCCH}_2\text{CH}_2(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5(\text{CH}_2)_3\text{-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O})_5\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$,

которое содержит две карбоксильные функциональные группы, способные к реакции с гидроксилами или аминогруппами боковых цепей аминокислот циклопептида.

Органические соединения, которые могут применяться, также могут включать ароматическую часть и/или гетероатомы с тем, чтобы, с одной стороны, поддерживать эти два циклопептида в эффективной конфигурации, а с другой - чтобы обеспечить их фиксацию в этой конфигурации на различных подложках.

Ароматическая часть может быть представлена производными бензола, нафталина, дибензофурана.

Гетероатомы могут представлять собой атомы кислорода, азота, кремния, германия, олова или фосфора.

Для обеспечения активации ангиогенеза расстояние между двумя циклопептидами, фиксированными на органическом соединении, должно быть таким, чтобы при контакте системы с клетками, экспрессирующими рецепторы фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), оно позволяло димеризацию этих рецепторов.

В этом втором воплощении органическое соединение, удерживающее эти два циклопептида, обычно соединяется с подложкой посредством органической "ножки".

В этих двух воплощениях систем согласно изобретению "ножка" может включать, к примеру, цепь углеводорода, фторуглерода, простого полиэфира, полиэтиленгликоля, полиамина, полиамида, сложного полиэфира, полисилоксана или их комбинацию, имеющую функциональные группы на каждом конце для образования ковалентной связи, с одной стороны, с циклопептидом, а с другой - с подложкой.

Предпочтительно, органическая ножка дополнительно включает компонент или пептидную последовательность, подверженную расщеплению какой-либо ферментативной системой.

Расщепление ножки, таким образом, делает возможным высвобождение активного циклопептида в намеченном месте. Ферментативная система может состоять из металлопротеаз внеклеточного матрикса или других ферментов.

В таком случае молекула представлена пептидной последовательностью, которая является субстратом этих металлопротеаз внеклеточного матрикса, к примеру, следующей пептидной последовательностью:

$\text{HOOC-Ala-Gly-Leu-Leu-Gly-Gln-Pro-Gly-NH}_2$.

Согласно предпочтительному варианту изобретения ножка может дополнительно включать биологически активные соединения, которые тоже будут высвобождаться в нужном месте в момент расщепления ножки.

Такие биологически активные соединения могут быть представлены цитотоксическими средствами, противораковыми средствами или любым другим действующим началом, которое, к примеру, желательнее применить на уровне KDR-рецепторов.

Согласно изобретению подложка, на которую наносится циклопептид, может

представлять собой органическое или неорганическое вещество. В частности, в качестве подложки может служить органический полимер в твердом виде или в виде геля.

Предпочтительно, используют биосовместимые полимеры, которые могут быть как биodeградируемыми, так и небиodeградируемыми.

5 В качестве примера используемых полимеров можно привести полиэтилентерефталат, сополимеры винилиденфторида и гексафторпропилена, поливиниловые спирты, полигидроксиэтилметакрилат, полисахариды и сополимеры, полученные из мономеров, входящих в состав вышеуказанных полимеров.

10 Циклопептиды изобретения можно получить способами, включающими стадию автоматического синтеза линейного пептида на твердой фазе стандартным методом с последующим замыканием концов линейного пептида, либо после отделения его от твердой фазы, либо отделяя его от твердой фазы после этого.

Так, согласно первому воплощению способ включает:

- а) получение линейного пептида путем химического синтеза на твердой фазе;
- 15 б) отделение линейного пептида от твердой фазы;
- с) замыкание концов линейного пептида с образованием циклопептида.

Согласно второму воплощению способ включает:

- а) получение линейного пептида путем химического синтеза на твердой фазе;
- б) соединение свободного конца линейного пептида с концевой функциональной группой
- 20 аминокислотного остатка линейного пептида;
- с) отделение циклопептида от твердой фазы.

Кроме того, предметом изобретения является способ получения системы, включающей подложку с закрепленным(и) на ней циклопептидом/циклопептидами, который включает облучение подложки из органического полимера ионизирующим излучением, плазмой или

25 пучком фотонов в определенных участках подложки, а затем прививку к этим участкам органических "ножек", к которым будет присоединен циклопептид.

В общем случае облучение проводится с использованием масок, чтобы ограничить участки, предназначенные для модификации на подложке. В качестве ионизирующего излучения могут быть пучки электронов или пучки ускоренных тяжелых ионов.

30 В этом способе циклопептиды могут быть присоединены к органическим ножкам перед прививкой к подложке. Присоединение их также может осуществляться после прививки, и в этом случае способ дополнительно включает стадию присоединения циклопептида к органической ножке после прививки последней к подложке.

Другие особенности и преимущества изобретения станут более понятными при чтении

35 нижеследующего описания. Приведенные примеры воплощений должны пониматься как служащие для иллюстрации, но не для ограничения изобретения, с привлечением прилагаемых чертежей.

Перечень чертежей

На фигуре 1 представлено первое воплощение синтеза циклопептида по изобретению.

40 На фигуре 2 представлено второе воплощение синтеза циклопептида по изобретению.

На фигуре 3 представлено присоединение циклопептида по изобретению к подложке при помощи органической ножки.

На фигуре 4 представлена фиксация органического соединения, несущего два циклопептида, на подложке при помощи ножки.

45 Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

В дальнейшем изложении химический синтез пептидов P1-P22 приведен в табл. 1, где представлены последовательности, соответствующие сегментам β_5 - β_6 фактора роста эндотелия сосудов (VEGF-A).

50 Пептиды P1-P6, P10, P14 и P15 являются линейными пептидами, а пептиды P7-P9, P11, P12, P13 и P16-P24 являются циклическими пептидами.

Циклопептиды P7-P9, P11, P12, P13, P16-P18 и P23 получают способом синтеза А, то есть согласно первому воплощению процесса синтеза циклопептидов изобретения.

Циклопептиды P12, P13 и P19-P22 получают способом синтеза В, то есть согласно

второму воплощению процесса синтеза циклопептидов изобретения.

При описании этих синтезов в дальнейшем применяются следующие сокращения:

- Fmoc: 9-фторенилметоксикарбонил
- tBu: t-бутоксикарбонил
- 5 - Trt: тритил, то есть трифенилметил
- 2-Cl-Trt: 2-хлортритил
- HMPB: 4-гидроксиметил-3-метоксифеноксимасляная кислота
- BHA: бензгидриламин
- HOBT: N-гидроксибензотриазол
- 10 - DCC: N,N'-дициклогексилкарбодиимид
- DCM: дихлорметан
- TFA: трифторуксусная кислота
- DIEA: N,N-диизопропилэтиламин
- NMM: N-метилморфолин
- 15 - PyBOP: триазол-1-илокси-трис-пирролидинфосфония гексафторфосфат
- NMP: N-метилпирролидон
- DIPCDI: N,N'-диизопропилкарбодиимид
- DMAP: 4-диметиламинопиридин
- FCS: фетальная телячья сыворотка
- 20 - PBS: физраствор с фосфатным буфером
- DMEM: модифицированная Дульбекко минимальная среда
- HEPES: N-(2-гидроксиэтил)пиперазин-N'-2-этансульфоновая кислота

Способ синтеза А представлен на фиг.1, где показан синтез циклопептида P7.

- Согласно этому методу в самом начале синтезируют линейный пептид на твердой фазе
- 25 Р за один прием, применяя метод защиты Fmoc/tBu на автоматическом синтезаторе 430А фирмы Applied Biosystems. Для получения блокированных пептидных фрагментов используют предварительно заряженные кислотолабильные 2-хлортритиловые смолы, к примеру, смолы H-His(Trt)-2-ClTrt или H-Ile-2-ClTrt, либо смолы HMPB-BHA на основе BHA-полистирола, активированного с помощью линкера, которым по Rinker служит
- 30 4-гидроксиметил-3-метоксифеноксибутановая кислота, например Fmoc-Gly-HMPB-BHA.

Аминокислоты, блокированные 9-фторенилметоксикарбонильной группой (Fmoc), присоединяют с помощью N,N'-дициклогексилкарбодиимида, используя 4-кратный избыток активированной аминокислоты по отношению к эфиру N-гидроксибензотриазола (HOBT).

- На фиг.1 первая строка представляет линейный пептид, боковые цепи которого
- 35 блокированы либо тритильной группой (Trt) в случае аминокислот His и Gln, группой Boc (t-бутилоксикарбонил) в случае Lys или 2,2,5,7,8-пентаметилхроман-6-сульфонил (Pmc) в случае Arg.

После этого приступают к отделению линейного пептида от твердой фазы Р путем обработки 1% раствором трифторуксусной кислоты (TFA) в дихлорметане (DCM).

- 40 Таким образом получают блокированный пептидный фрагмент с высоким выходом и высокой степенью чистоты при незначительной потере групп, блокирующих боковые цепи аминокислот.

- Наилучшие результаты дает многократная обработка смолы с пептидом свежим раствором TFA при минимальном времени реакции (10 раз в течение 2 минут). Затем смолу
- 45 промывают несколько раз DCM и метанолом. После отщепления проводят тонкослойную хроматографию. Фильтраты объединяют и упаривают при пониженном давлении, а к остатку добавляют ледяную воду для осаждения пептидного материала. Выпавший материал отфильтровывают, промывают свежей водой и высушивают в эксикаторе под глубоким вакуумом над NaOH. Блокированные линейные пептиды анализируют методом
- 50 обращеннофазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) (колонка RP-18 LiChrosorb фирмы Merck, 7 мкм, 0,4×25 см) при помощи линейного градиента от 70 до 100% В в А, где А означает 0,1% водный раствор TFA и В означает водный раствор 0,1% TFA и 70% ацетонитрила.

Блокированный линейный пептид, соответствующий P7, представлен на фиг.1.

После этого приступают к циклизации блокированного линейного пептида. С этой целью его растворяют в DCM до конечной концентрации 1 мг/мл. В раствор добавляют 6 эквивалентов N,N-диизопропилэтиламина (DIEA) или N-метилморфолина (NMM) и осуществляют циклизацию с помощью смеси триазол-1-илокси-трис-пирролидинфосфония гексафторфосфата (PyboP)/ N-гидроксibenзотриазола (HOBT), используя по 3 эквивалента каждого из конденсирующих реагентов. Реакционную среду выдерживают при 25°C в атмосфере азота при мягком перемешивании в течение 24-48 часов до полной циклизации, что проверяется методом ВЭЖХ.

Растворитель удаляют выпариванием при пониженном давлении, а к остатку добавляют ледяную воду. Выпавший осадок отфильтровывают, промывают свежей водой, высушивают в эксикаторе под глубоким вакуумом над NaOH и используют для полного деблокирования боковых цепей без дальнейшей очистки.

Блокированный циклопептид, соответствующий P7, представлен на фиг.1.

Деблокирование боковых цепей циклопептида проводят при помощи 95% раствора TFA в присутствии реагентов (фенола, тиоанизола, триизопропилсилана, воды) в течение 2-3 часов. После этого выпаривают большую часть TFA, чтобы добиться удовлетворительного выпадения в осадок деблокированного циклопептида, и добавляют 10-кратный объем охлажденного на льду эфира. После фильтрования и промывки свежим эфиром осадок высушивают над NaOH и лиофилизируют. Затем проводят полупрепаративную очистку на системе ВЭЖХ фирмы Applied Biosystems, используя обращеннофазовую колонку LiChrosorb C18 (250×10). Используют буферы А и В, описанные выше. Используют линейные градиенты от 10 до 50% В в А на протяжении 30 минут при скорости потока 4 мл/мин. Полученные при ВЭЖХ гомогенные фракции объединяют и лиофилизируют, получая требуемый циклопептид с удовлетворительной степенью чистоты более 95% по данным аналитической ВЭЖХ.

На фиг.1 представлен блокированный циклопептид, после чего идет стадия деблокирования, ведущая к получению циклопептида P7 из табл. 1.

Такой же рабочей методики придерживаются при получении пептидов P8, P9, P11, P12, P13, P16-P18 и P23, используя для синтеза L- и D-аминокислоты, блокированные группой Fmoc, смолу Fmoc-L-Gly-NMPE/BHA (0,53 ммоль/г), смолу H-His(Trt)-2-CITrt (0,42 ммоль/г), смолу H-Ile-2-CITrt (0,53 ммоль/г) и смолу NovaSyn TGA (90 μм), а также PyBOP от фирмы Novabiochem.

Также используют реагенты HOBT, DCC, TFA, DIEA, NMM и пиперидин фирмы Aldrich.

ВЭЖХ проводится на колонках LiChrosorb RP-18 (7 μм, 0,4×25 см) фирмы Merck и LiChrosorb C-18 (5 μм, 0,4×25 см) фирмы Interchim, осуществляя элюцию линейным градиентом растворителя В в растворителе А. Растворитель А содержит 0,1% TFA в H₂O. Растворитель В содержит 0,1% TFA, 70% ацетонитрила и 30% воды. Скорость потока составляет 1 мл/мин на протяжении 30 минут. УФ-детектирование проводится при 214 нм и 280 нм. Очищенные пептиды характеризуют методом аминокислотного анализа, проводя гидролиз в 6 М HCl и 2% феноле при 110°C в течение 20-24 часов, и методом масс-спектрологии FAB-MS.

Далее следует описание способа синтеза В, то есть второго воплощения процесса синтеза циклопептидов согласно изобретению.

Способ синтеза В представлен на фиг.2 на примере пептида P19.

Для этого синтеза используют те же реагенты, что применялись для синтеза А, с добавлением смолы Fmoc-L-Glu (PEG-PS)-OAllyl (0,18 ммоль/г) фирмы Perkin Elmer.

Сначала синтезируют линейный пептид P10 твердофазным методом, используя автоматический синтезатор 430А фирмы Applied Biosystems, как описано в способе синтеза А.

Как показано на фиг.2, первая С-концевая аминокислота Fmoc-Glu-OAllyl присоединяется к смоле NovaSyn TGA 90 μм (твердой фазе Р) своей боковой цепью по методу симметричных ангидридов. Смоле дают набухать в N-метилпирролидоне (NMP) в

течение 30 минут. В раствор из 10 эквивалентов аминокислоты в безводном DMC при 0°C добавляют раствор из 5 эквивалентов N,N'-диизопропилкарбодиимида (DIPCDI). После перемешивания в течение 30 мин растворитель удаляют при пониженном давлении, а остаток растворяют в NMP и переносят в отмоченную смолу. Присоединение карбоновой кислоты проводят путем этерификации, катализируемой 4-диметиламинопиридином (DMAP), со скоростью 0,1 эквивалент за 2 часа до получения конечной степени замещения в 0,25 ммоль/г. "Заряженность" смолы определяют по УФ-поглощению аддукта пиперидин-Fmoc при 290 нм. Также используется и коммерческая смола Fmoc-L-Glu (PEG-PS)-OAllyl (0,18 ммоль/г) фирмы Perkin Elmer.

Полученные аминокислоты, заблокированные группой Fm, присоединяют с помощью DCC, используя 4-кратный избыток активированной аминокислоты по отношению к эфиру HOBT.

Таким образом получают линейный пептид с заблокированными боковыми цепями, как показано в первой строке на фиг.2.

После этого проводится деблокирование по аллильной группе концевой аминокислоты Glu, соединенной с твердой фазой, путем обработки смолы с заблокированным пептидом 3 эквивалентами $[Pd(PPh_3)_4]$ в смеси DCM:AcOH:NMM (17:2:1) в токе аргона при 25°C в течение 2,5 часов, периодически мягко перемешивая. Катализатор удаляют промыванием смолы 0,5% DIEA в NMP в течение 2 минут, 3 раза NMP, а затем 0,5% (вес/вес) диэтилдитиокарбаматом натрия в NMP и DCM в течение 2 минут, повторяя 3 раза.

Затем проводят циклизацию пептида на твердой фазе следующим образом. Смолу обрабатывают 20% пиперидином в NMP для освобождения N-концевой аминогруппы пептида, после чего промывают 1 N HOBT в NMP, а затем NMP и DCM. Циклизацию проводят на твердой фазе, используя 6 эквивалентов PyBOP, 6 эквивалентов HOBT и 12 эквивалентов DIEA в NMP на протяжении 4-6 часов. Полноту циклизации проверяют пробой с нингидрином. Смолу промывают несколько раз NMP и DCM, а затем сушат под глубоким вакуумом в течение ночи. Блокированный циклопептид представлен на фиг.2.

После этого приступают к отделению циклопептида от твердой фазы и деблокированию боковых цепей аминокислот. Это осуществляют при помощи 95% TFA, а продукт ацидолиза очищают полупрепаративным методом ВЭЖХ, как описано выше.

Полученные при ВЭЖХ гомогенные фракции объединяют и лиофилизируют, получая требуемый циклопептид с удовлетворительной степенью чистоты (более 95% по данным аналитической ВЭЖХ).

Таким образом получают циклопептид P19, представленный на фиг.2.

Такой же рабочей методики придерживаются при получении циклопептидов P20-P22, приведенных в табл. 1.

Линейные пептиды P1-P6, P10, P14 и P15 из табл. 1 получают по стандартной методике синтеза пептидов.

В табл. 2 представлена структура и молекулярная масса пептидов P1-P22 по отношению к последовательности пептида VEGF-A, состоящего из 165 аминокислот.

Пептиды P1-P24 тестируют на предмет их способности ингибировать связывание VEGF с KDR-рецептором.

Для тестирования используют дефектные по гепаринсульфату клетки яичников китайского хомячка, трансфицированные экспрессионным вектором, содержащим кДНК VEGFR2 (клетки CHOm VEGFR2). Было показано, что рекомбинантaый KDR в клетках CHO имеет такие же характеристики, как и KDR клеток эндотелия (см. Binétruy-Troumaire et al., EMBO Journal, 19 (7), 2000, pp.1525-1533 [10]).

Клетки CHOm VEGFR2 получают трансфекцией клеток яичников китайского хомячка, дефектных по гепаринсульфату, с помощью кДНК VEGFR2 в векторе psV-7d, как описано Jonca et al. в J.Biol. Chem., 1997, 272, pp.24203 [11]. Клетки CHOm VEGFR2 обычно культивируют в модифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 50 Е/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 1 мг/мл глюкозы и 2 мМ L-глутаминa при 37°C в атмосфере 5% CO₂.

При тестировании используют радиоактивно меченный при помощи иодных бусин

(Iodogen) ^{125}I -Na VEGF.

Удельная активность ^{125}I -VEGF составляет от 150000 до 200000 cpm/нг. Клетки инокулируют в колбы диаметром 3,5 см, предварительно покрытые 0,15% желатином, при плотности 200000 клеток на 1 колбу, и культивируют в полной среде в течение 2 дней. Колбы с субконфлюэнтными культурами переносят на 4 °С. Клетки промывают дважды охлажденным во льду физраствором с фосфатным буфером (PBS) и инкубируют при различных концентрациях пептидов и 5 нг/мл ^{125}I -VEGF в присутствии и в отсутствие 50 нг/мл гепарина в буфере для связывания (DMEM, содержащий 20 мМ HEPES, pH 7,4, 0,15% желатин) в течение 2 часов при 4 °С. По окончании инкубации клетки промывают 3 раза ледяным PBS и солибилизируют в 1 мл буфера с 2% Тритона X100, 10% гликоля, 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA). Связавшуюся с клетками радиоактивность просчитывают на счетчике γ -частиц MR-250 Kontron. Неспецифическое связывание определяют, инкубируя клетки с ^{125}I -VEGF в присутствии 200-кратного избытка немеченого VEGF. Специфическое связывание рассчитывают, вычитая неспецифическое связывание из общего связывания.

Тестирование предпочтительно проводится при фиксированных концентрациях пептидов P1-P22: 20 мкМ, 200 мкМ и 400 мкМ. Все линейные пептиды и некоторые циклические пептиды не оказывают ингибирования на связывание VEGF с KDR при этих концентрациях. Тестирование продолжают с изучаемыми циклопептидами, используя 2 линейных пептида в качестве контроля при анализе ингибирования в зависимости от дозы.

Полученные результаты, выраженные в виде IC_{50} , то есть концентрации в мкМ, необходимой для 50%-го ингибирования связывания VEGF с KDR-рецептором, также представлены в табл. 2.

Все измерения повторяли по три раза и получали близкие результаты.

При этом следует отметить, что циклопептиды P11, P16, P17, P19, P20, P23 и P24 очень эффективно ингибировали связывание VEGF с KDR-рецептором.

С другой стороны, циклопептид P22, соответствующий циклопептиду, описанному в US-A-5 939 383 [8], ингибировал связывание не более эффективно, чем линейные пептиды P1-P6, P10, P14 и P15.

После этого пептиды, ингибирующие связывание ^{125}I -VEGF с рецептором VEGFR2, тестировали по их действию на ангиогенез *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* и на передачу сигналов клетками. Приведены результаты по действию активных пептидов на клеточную пролиферацию, клеточную миграцию и на активацию киназ p42 и p44 (MAP-киназы, то есть киназы, активируемые митогенами).

Клеточную пролиферацию измеряют путем подсчета клеток. В лунки 24-луночных планшетов (Costar) вносят по 7000 эндотелиальных клеток в среде DMEM, содержащей сыворотку новорожденного теленка. После прикрепления клеток их промывают средой DMEM без сыворотки и инкубируют в DMEM, содержащей 1% сыворотки новорожденного теленка и 10 нг/мл VEGF в присутствии и в отсутствие различных концентраций пептидов. Через 2 дня клетки снова подвергают стимуляции VEGF в присутствии и в отсутствие различных концентраций пептидов. На 5-й день клетки обрабатывают трипсином и подсчитывают на счетчике Коултера. Так, к примеру, циклический пептид P11 вызывает сильное ингибирование клеточной пролиферации. С другой стороны, линейный пептид неактивен (табл.3).

Клеточную миграцию измеряют по методу, описанному Sato and Rifkin (J. Cell Biol., Sept., 1988, 107 (3): 1199-1205) [17], с модификациями. В культуральные сосуды диаметром 35 мм вносят 100 000 эндотелиальных клеток в среде DMEM, содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки. По достижении конfluence среды заменяют средой DMEM без сыворотки и клетки инкубируют в течение ночи. На следующий день проводят искусственно денудацию монослоя с помощью стерильного наконечника пипетки. Делают серию цифровых фотографий и границу денудации отмечают линией с помощью программы Biocom VisionLab2000. Затем колбы промывают и инкубируют с 10 нг/мл VEGF в

присутствии или в отсутствие пептида. Через 18 часов делают новую серию фотографий и накладывают изображения до и после стимуляции. Подсчитывают клетки, находящиеся за пределами границы денудации. Так, к примеру, циклический пептид P11 при тестировании этим методом сильно ингибирует клеточную миграцию. С другой стороны, линейный пептид

5 не оказывает действия (табл. 3).

Фосфорилирование ERK1 (p44) и ERK2 (p42) измеряют методом Western-гибридизации с помощью антител к p42/p44 (New England Biolabs). Клетки капиллярного эндотелия культивируют в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки новорожденного теленка. Затем субконфлюэнтные культуры лишают сыворотки на 24 часа. После этого к клеткам на 10 минут добавляют пептиды в определенных концентрациях в присутствии или в отсутствие 10 нг/мл VEGF. Затем клетки извлекают из сосудов и лизируют в течение 30 минут на льду в буфере для лизиса, содержащем 50 мМ HEPES, pH 7,4, 75 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% Nonidet P-40 и 0,01% SDS. Нерастворимые вещества удаляют центрифугированием и порцию белкового экстракта (50 мкг/мл) разделяют методом электрофореза в полиакриламидном геле, содержащем додецилсульфат натрия (SDS), в денатурирующих условиях. Затем белки переносят из геля на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay) при помощи прибора для переноса (полусухой перенос, Bio-Rad, Irvy-sur-Seine, Франция). После этого мембрану инкубируют с первичными антителами к p42/p44, а затем со вторичными, конъюгированными с пероксидазой. Анализ проводят с помощью системы ECLplus (Amersham Pharmacia Biotech, Orsay). Результаты оценивают количественно с помощью программы Image Quant (Molecular Dynamics).

20 Так, к примеру, циклический пептид P11 сильно ингибирует фосфорилирование p42/p44. Линейный пептид не оказывает действия (табл. 3).

25

	Пролиферация (IC ₅₀)	Миграция (IC ₅₀)	Фосфорилирование p42 (ингибирование в %)	Фосфорилирование p44 (ингибирование в %)
P11	7 мкМ	30 мкМ	75%	90%
P11	>300 мкМ	>300 мкМ	0%	0%

30 В табл. 3 представлены эффекты пептида P11 на клеточную пролиферацию и миграцию и на фосфорилирование MAP-киназ (p42 и p44). Определения проводились как указано. Ингибирование пролиферации и миграции приведено в отношении ингибирования на 50% биологического эффекта (IC₅₀). При анализе фосфорилирования пептиды использовали в концентрации 50 мкМ. Степень фосфорилирования определяли путем количественной обработки сигналов, полученных при ауторадиографии, и выражали результаты как ингибирование в процентах от сигнала, полученного при 10 нг/мл одного VEGF.

35 Циклопептиды изобретения могут применяться для получения систем ингибиторов или активаторов ангиогенеза либо в растворимой форме, либо прикрепленных к подходящей подложке.

На фиг.3 представлено первое воплощение ингибиторной системы по изобретению.

40 На этом чертеже видно, что циклопептид прикрепляется к подходящей подложке 1 при помощи органической ножки 3, которая может включать группировку 4, подверженную расщеплению какой-либо ферментативной системой.

45 Органическая ножка может включать цепь углеводорода, фторуглерода, простого полиэфира, полиэтиленгликоля, полиамина, полиамида, сложного полиэфира, полисилоксана или их комбинацию, имеющую функциональные группы на каждом конце для образования ковалентной связи, с одной стороны, с циклопептидом, а с другой - с подложкой 1.

50 Группировка 4, подверженная расщеплению ферментной системой, находящаяся на ножке 3, в частности, может быть представлена пептидной последовательностью, являющейся субстратом таких ферментов, как металлопротеазы внеклеточного матрикса.

Наличие такой группировки делает возможным высвобождение циклопептида в нужном месте при контакте с соответствующими ферментами, что позволяет циклопептиду выполнять его функцию ингибирования связывания VEGF с KDR-рецептором и контроля

ангиогенеза.

На фиг.3 изображен одиночный циклопептид, связанный с подложкой. Конечно, могут применяться подложки, содержащие большое число циклопептидов, по отдельности связанных с подложкой через органическую ножку, имеющую или не имеющую группировку

5 4.

На фиг.4 представлено следующее воплощение систем изобретения, в которых применяются два циклопептида для достижения активации KDR-рецепторов.

В этом случае два циклопептида присоединяются к соединению 6, которое само связано с подложкой 1 через органическую ножку 3, причем ножка может включать группировку 4, подверженную расщеплению ферментной системой.

Выбор органического соединения, к которому присоединяются два циклопептида, позволяет расположить их в такой конфигурации, которая позволяет димеризацию рецепторов фактора роста эндотелия сосудов.

Соответственно, расстояние между двумя прикрепленными циклопептидами должно быть таким, чтобы при контакте системы с клетками, экспрессирующими рецепторы VEGF, произошла димеризация этих рецепторов.

Органическая ножка 3 может быть такого же типа, как на фиг.3, и содержать группировку 4 такого же типа, как на фиг.3.

Органическое соединение 6 может состоять из чередующихся гидрофильных-гидрофобных последовательностей типа полиэтиленгликоль/алкан или фторалкан, чтобы обеспечить надлежащее расположение этих двух циклопептидов. В присоединении каждого из циклопептидов к данному соединению участвуют аминокислотные группы боковых цепей циклопептида или группы типа акрильных.

Подложка 1, используемая в различных воплощениях систем изобретения, может находиться в твердом виде или в виде геля. Она может быть представлена органическим или неорганическим твердым веществом.

Предпочтительно подложкой служит необязательно биосовместимый, биodeградируемый органический пептид. В этом случае присоединение органической ножки к указанному полимеру может осуществляться химическим или радиохимическим путем. В последнем случае подложку из органического полимера подвергают облучению при помощи ионизирующего излучения, плазмы или пучка фотонов в определенных участках подложки, предназначенных для присоединения органических ножек, а затем в этих участках прививают органические ножки, непосредственно или с помощью мономера, полимеризуемого по радикальному механизму (радиационная прививка), включающего, к примеру, амино- или карбоксильные функциональные группы.

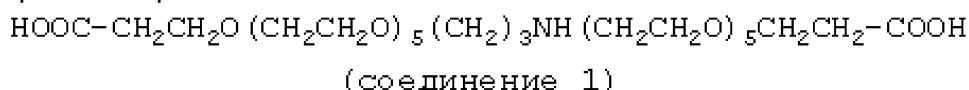
Конъюгирование полимера, радиационно привитого или нет, проводится, к примеру, путем образования амидных связей либо между карбоксильными группами и аминокислотными группами, введенными по концам ножек, либо между аминокислотными группами подложки и карбоксильными группами, введенными по концам ножек.

Следующие примеры иллюстрируют получение таких систем.

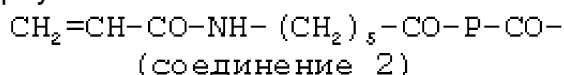
ПРИМЕР 1

Получение системы, включающей два циклопептида, ковалентно связанных с органическим соединением

Исходя из органического соединения, включающего 3 функциональные группы, одна из которых блокирована:



Ножку присоединяют к NH-группе этого соединения, причем ножка соответствует формуле:



где P означает пептид, являющийся субстратом металлопротеазы внеклеточного

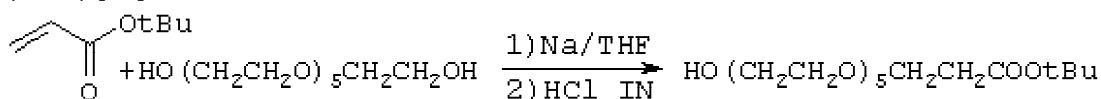
матрикса.

Органическое соединение 1 получают через следующие стадии.

Стадия 1

Конденсация гексаэтиленгликоля с t-бутилакрилатом

5 На этой стадии придерживаются методики, описанной O.Seitz, H.Kunz, J.Org. Chem., 62, 813 (1997) [12].



10

(соединение 3)

В трехгорлой колбе при перемешивании смешивают безводный THF с гексаэтиленгликолем в атмосфере азота. Затем добавляют Na и дают ему раствориться. Затем добавляют t-бутилакрилат. Смесь помешивают в течение 20 часов при комнатной температуре. Добавляют HCl для нейтрализации раствора. THF удаляют выпариванием при пониженном давлении, а затем раствор обрабатывают насыщенным раствором соли. После этого раствор экстрагируют 3 раза этилацетатом. Вся органическую фазу опять обрабатывают насыщенным раствором соли. Органическую фазу собирают и удаляют этилацетат выпариванием. Получают очищенный продукт (соединение 3) с выходом 96%.

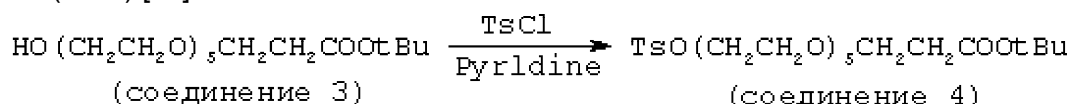
15

Стадия 2

Введение функциональной группы по другому концу соединения 3 путем азидирования

- а) тозилрование по рабочей методике, описанной D.S.Wilbur et al., Bioconjugate Chem., 9, 813 (1998) [13]:

20



25

(соединение 3)

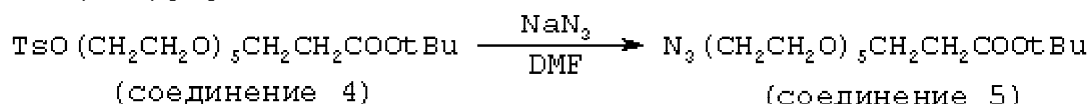
(соединение 4)

Пиридин и исходное соединение 3 вносят в двугорлую колбу. Все это оставляют при 0°C в атмосфере N₂. Затем добавляют TsCl. Через 15 часов прореагировавший раствор выливают в лед и экстрагируют 3 раза с помощью CH₂Cl₂. Органическую фазу промывают 2% раствором уксусной кислоты, а затем водой. После этого собирают органическую фазу, высушивают над MgSO₄ и упаривают при пониженном давлении. Продукт очищают пропусканием через колонку окиси кремния (70/230), используя в качестве элюента 100% этилацетат. Собирают продукт (соединение 4) с выходом 65%.

30

- б) азидирование по рабочей методике, описанной K.D.Reynolds, Bioconjugate Chem., 10, 1021-31 (1999) [14]:

35



(соединение 4)

(соединение 5)

Соединение 4 вместе с DMF вносят в двугорлую колбу в атмосфере N₂, а затем добавляют NaN₃. Помешивают в течение 20 часов, при этом раствор становится непрозрачным. Раствор пропускают через пористый фильтр, а затем удаляют DMF-выпариванием совместно с толуолом. Получают белый осадок, который обрабатывают эфиром. Раствор опять пропускают через пористый фильтр и удаляют эфир выпариванием.

40

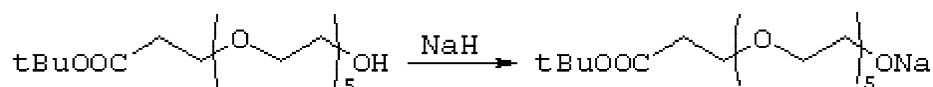
При этом получают соединение 5 с выходом 95%.

45

Стадия 3

Введение функциональной группы по другому концу соединения 3 путем аллилирования

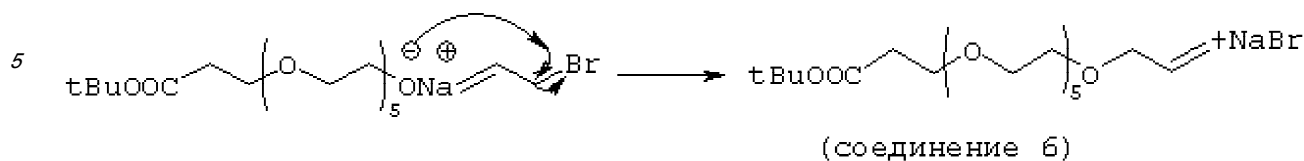
50



(соединение 3)

Аллилирование проводится путем нуклеофильного замещения коммерческого

аллилбромида натриевой солью гексаэтиленгликоля. Затем полученное производное выделяют хроматографией на колонке окиси кремния с выходом 50%.

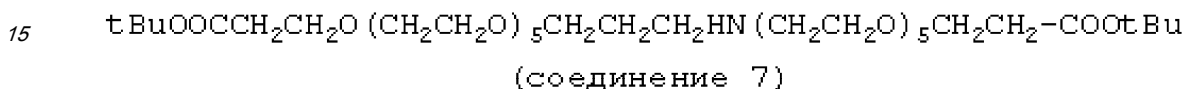


Синтез проводится в THF.

10 Стадия 4

Гидроборирование

Оно проводится по методу, описанному Carboni et al., J.Org. Chem., 1993, 58, 3736-3741 [15], путем реакции между соединением 5 и соединением 6 в присутствии дихлорборана. Получают соединение 7.

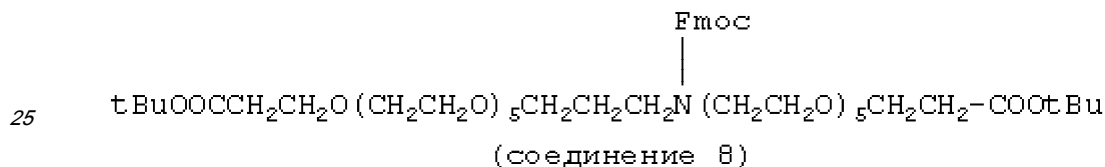


Стадия 5

Блокирование азота

20 Соединение 7 обрабатывают FmocOSu по методу, применявшемуся, к примеру, Chetyrkina et al. Tetrahedron Letters, 2000, 41, 1923-1926 [16].

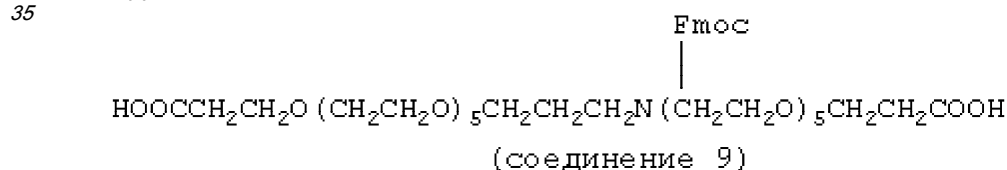
Получают соединение 8.



Стадия 6

Деблокирование t-бутилоксикарбонильных групп

30 Соединение 8, к которому был добавлен анизол, помещают в двугорлую колбу и добавляют TFA. Реакцию проводят в течение 1 часа 30 минут при 25 °С при перемешивании, после чего TFA удаляют выпариванием при пониженном давлении. Затем продукт пропускают через колонку окиси кремния (70/230), используя в качестве элюента смесь CH₂Cl₂/MeOH, сначала 95/5, а затем 90/10. Собирают очищенное соединение 9 с выходом 65%.



40 Циклопептиды P23 присоединяют к двум функциональным группам (COOH) соединения 9 следующим образом.

Соединение 9 растворяют в небольшом количестве THF и активируют при помощи N,N'-диметилпропилэтилкарбодиимида.

45 Затем добавляют каждый из циклопептидов в количестве, соответствующем молярному эквиваленту, и смесь оставляют на 12 часов при комнатной температуре, после чего лиофилизируют. Лيوфилизат растворяют в хлороформе, образовавшуюся мочевины удаляют фильтрованием, а фильтрат упаривают при пониженном давлении.

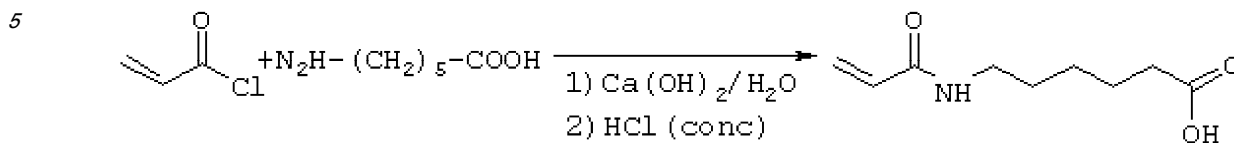
50 Полученный продукт идентифицируют методами инфракрасной спектроскопии с преобразованием Фурье, протонного ЯМР и масс-спектрометрии. Он соответствует ожидаемому продукту.

Для того, чтобы фиксировать этот продукт на подложке, в самом начале к NH-группе присоединяют ножку, содержащую функциональную группу, способную к полимеризации. Затем поступают следующим образом.

Деблокирование NH-группы

Сначала проводят деблокирование NH-группы соединения 9 путем обработки пиперидином.

Кроме того, получают ножку-спейсер путем проведения следующей реакции:



(соединение 10)

10

Соль и воду вносят в трехгорлую колбу, затем добавляют аминокислоту $\text{H}_2\text{N}-(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ и всю смесь охлаждают до 0°C . При быстром перемешивании добавляют акрилоилхлорид со скоростью около 3 мл в минуту.

15

Оставляют перемешиваться 10 минут при комнатной температуре, а затем раствор пропускают через пористый фильтр. Колбу опять охлаждают до 0°C при быстром перемешивании. После этого добавляют концентрированную HCl до pH 2. Это вызывает выпадение продукта в осадок. Затем смесь фильтруют и сушат очищенный продукт (соединение 10).

Выход составляет 75%.

20

Конденсация соединения 10

Соединение 10 конденсируют с пептидом P, который является субстратом для металлопротеаз внеклеточного матрикса, на последней стадии его синтеза на твердой фазе, а затем все это отделяют от смолы без деблокирования боковых цепей.

25

Полученную молекулу затем конденсируют при помощи дицилогексилкарбодиимида с деблокированным соединением 9. Затем боковые цепи пептидной ножки-спейсера деблокируют, после чего ножку присоединяют к полимерной подложке при помощи акрильной группы ножки.

30

В качестве подложки используют промышленную пленку из полиэтилентерефталата толщиной 25 мкм, которую предварительно экстрагируют, орашая толуолом в аппарате Сокслета при температуре 110°C в течение 12 часов, чтобы удалить любые следы органического мономера.

35

Затем на полимерную пленку наносят металлическую решетку из никеля или меди толщиной приблизительно 50 мкм, которая имеет круглые отверстия диаметром от 5 до 10 мкм, равномерно распределенные по всей поверхности с интервалом приблизительно 100 мкм. Решетка изготовлена методом гальванопластики, чтобы добиться отличной воспроизводимости и очень высокой точности порядка микрометра.

После этого полимерную пленку подвергают облучению пучком электронов так, чтобы облучению подвергались только участки, соответствующие отверстиям решетки. Пучок электронов имеет следующие характеристики:

40

- энергия $E_p=2,5$ МэВ
- максимальная интенсивность $I_{\text{max}}=1$ мкА
- максимальная доза=500 кГр.

Облучение проводится в атмосфере, содержащей кислород.

45

После облучения снимают решетку с полимерной пленки, а облученную полимерную пленку приводят в контакт с тем органическим соединением, к которому были присоединены два циклопептида, для прививки этого соединения с помощью ножки-спейсера на полимерную пленку. Такая фиксация осуществляется путем приведения пленки в контакт с 10^{-2}M раствором органического соединения, полученного ранее, при 40°C .

50

Таким образом, органическое соединение фиксируется через акрильные группы ножки на облученных участках полимерной пленки.

Конечный продукт характеризуют методами FT-IR-спектроскопии и XPS.

ПРИМЕР 2

Получение системы, содержащей два циклопептида

В данном примере придерживаются тех же рабочих методик, что и в предыдущем примере, для присоединения двух циклопептидов P23 по двум функциональным группам описанного органического соединения.

5 Для этого органическое соединение растворяют в небольшом количестве хлороформа и активируют при помощи дициклогексилкарбодиимида (ДСС), а затем добавляют каждый из циклопептидов в количестве, соответствующем 1 молярному эквиваленту, и реакционную смесь выдерживают при 4°C в течение 12 часов. Осадок дициклогексилмочевины удаляют

10 фильтрованием, а фильтрат упаривают при пониженном давлении.

Полученный продукт характеризуют методами инфракрасной спектроскопии с

преобразованием Фурье, протонного ЯМР и масс-спектрометрии, как и ранее.

15 Ножку-спейсер присоединяют к NH-группе органического соединения, как в Примере 1. Конструкцию затем присоединяют к подложке, представляющей собой промышленную пленку из поли(винилиденфторида/гексафторпропилена) PVDF/HFP толщиной 25 мкм.

20 Пленку предварительно экстрагируют, орошая дихлорметаном в аппарате Сокслета при температуре 40°C в течение 12 часов, чтобы удалить все следы органического мономера. Пленку затем подвергают облучению на воздухе пучком ускоренных тяжелых ионов. Для этого используют ионы кислорода, имеющие первичную энергию E_p около 10 МэВ/а.е.м. при интегральной плотности потока от 10^7 до 10^9 ионов/см² и интенсивности порядка от 10^2 до 5×10^2 нА. Работа при низкой интегральной плотности потока частиц была выбрана для того, чтобы не происходило восстановления латентных следов.

25 Эта операция прямо определяется параметрами облучения (атомное число иона, первичная энергия, интегральная плотность потока частиц). При этом случайное распределение активных центров в обработанном участке во время облучения (появление латентных следов) позволяет осуществлять радиационную прививку двух органических ножек, каждая из которых несет циклопептид на таком расстоянии между точками прикрепления, что расстояние d между двумя циклопептидами способствует димеризации рецепторов VEGF.

30 Участки облучения служат для прикрепления несущих циклопептиды органических ножек, полученных как описано выше, при реакции их акрильных функциональных групп с облученной подложкой за счет свободных радикалов, возникающих вдоль латентного следа иона, и возникновения последнего на поверхности полимерной пленки.

35 Это конъюгирование осуществляется нагреванием облученной пленки, помещенной в 10^{-3} М раствор органических ножек, несущих циклопептиды, до 40°C в тетрагидрофуране.

Конечное соединение характеризуют методами FT-IR -спектроскопии FT-IR и XPS.

ЦИТИРОВАННЫЕ ССЫЛКИ

- 40 [1]: Ferrara et al., Nature Medicine, vol. 5, п.12, December 1999, pages 1361-1364.
 [2]: Hagedorn et Bikfalvi, Critical Reviews in Oncology/Hematology, 34, 2000, pages 89-110.
 [3]: Muller Y.A., Structure, 1997, 5, п.10, pages 1325-1338.
 [4]: Presta et al., Cancer Research, 57, 1997, pages 4593-4599.
 [5]: Ortega et al., Am.J.Pathol, Nov. 1997, 151 (5), pages 1215-1224.
 [6]: Piossek et al., The Journal of Biological Chemistry, vol. 274, n. 9, 1999, pages 5612-5619.
 [7]: Fairbrother et al., Biochemistry 37, 1998, pages 17754-17764.
 45 [8]: US-A-5 939 383.
 [9]: Bekele et al., J.Org. Chem., 62, 1997, pages 2259-2262.
 [10]: Binétruy-Toumaire et al., EMBO Journal, 19 (7), 2000, pages 1525-1533.
 [II]: Jonca et al., J.Biol. Chem., 1997, 272, pages 24203.
 [12]: O.Seitz, H.Kunz, J.Org. Chem., 62, 813 (1997).
 50 [13]: Wilbur et al., Bioconjugate Chem., 9, 813 (1998).
 [14]: J.K.D. Reynolds, Bioconjugate Chem., 10, 1021-31 (1999).
 [15]: Carboni et al., J. Org. Chem., 1993, 58, pages 3736-3741.
 [16]: Chetyrkina et al., Tetrahedron Letters, 2000, 41, pages 1923-1926.

[17]: Sato et Rifkin, J. Cell Biol., Sept., 1988, 107 (3): 1199-1205.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50

SEQ ID NO: 14	P1	H-Arg-Ile-Lys-Pro-His-OH
SEQ ID NO: 15	P2	H-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-OH
SEQ ID NO: 16	P3	H-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-OH
SEQ ID NO: 17	P4	H-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu-OH
SEQ ID NO: 18	P5	H-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-OH
SEQ ID NO: 19	P6	H-Gly-Arg-Ile-Lys-DPro-His-Gln-Gly-Gln-His-OH
SEQ ID NO: 2	P7	цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-DPro-His-Gln-Gly-Gln-His)
SEQ ID NO: 3	P8	цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-His)
SEQ ID NO: 4	P9	цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His)
SEQ ID NO: 20	P10	H-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu-O-аллил
SEQ ID NO: 5	P11	цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)
SEQ ID NO: 6	P12	цикло(Gly-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)
SEQ ID NO: 7	P13	цикло(Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)
SEQ ID NO: 21	P14	H-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu-OH
SEQ ID NO: 22	P15	H-Gly-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu-OH
SEQ ID NO: 8	P16	цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)
SEQ ID NO: 9	P17	цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)
SEQ ID NO: 23	P18	цикло(DPhe-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)
SEQ ID NO: 10	P19	цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)
SEQ ID NO: 11	P20	цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)
SEQ ID NO: 12	P21	цикло(DPhe-Pro-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile)
SEQ ID NO: 24	P22	цикло(Glu-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)
SEQ ID NO: 13	P23	цикло(DTyr-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)
SEQ ID NO: 25	P24	цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)

Пептид	Аминокислотная последовательность согласно VEGF	Число аминокислот	Способ синтеза	Молекулярный вес		IC ₅₀ (мкМ)
				расчетный	найденный	
P1	82-86	5		649,8	650,3	>300,0
P2	79-86	8		1022,3	1022,1	>300,0
P3	82-88	7		835,0	836,6	>300,0
P4	79-93	15		1772,1	1773,3	>300,0
P5	79-92	14		1642,9	1644,1	>300,0
P6	Gly ⁸¹⁻⁸²⁻⁹⁰ -DPro ⁸⁵	10		1157,3	1158,4	>300,0
P7	(Gly ⁸¹⁻⁸²⁻⁹⁰)-DPro ⁸⁵	10	A	1139,3	1139,9	>300,0
P8	(Gly ⁸¹⁻⁸²⁻⁸⁸ -His ⁸⁹)	9	A	1011,2	1012,0	200,0
P9	(Pro ⁸¹⁻⁸²⁻⁹⁰)	10	A	1179,6	1180,6	300,0
P10	79-93-O-аллил	15		1821,1	1813,1	>300,0
P11	(DPhe ⁷⁷ -Pro ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹³)	17	A	1998,3	1998,7	2,0
P12	(Gly ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹³)	16	A, B	1811,1	1813,1	300,0
P13	(Pro ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹³)	16	A, B	1851,2	1851,4	>300,0
P14	Pro ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹³	16		1869,2	1869,0	>300,0
P15	Gly ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹³	16		1829,1	1828,5	>300,0
P16	(82-88)	7	A	817,0	817,9	32,0
P17	(Pro ⁸¹⁻⁸²⁻⁸⁸)	8	A	914,1	915,6	10,0
P18	(DPhe ⁸¹⁻⁸²⁻⁸⁷)	7	A	1004,2	1004,7	>300,0
P19	(79-93)	15	B	1754,0	1755,0	5,0
P20	(DPhe ⁷⁷ -Pro ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁹²)	16	B	1869,2	1869,7	10,0
P21	(DPhe ⁷⁸ -Pro ⁷⁹⁻⁸⁰⁻⁹¹)	14	B	1684,0	1685,4	200,0
P22	(Glu ⁷⁸⁻⁷⁹⁻⁸⁷)	10	в	1261,5	1262,7	>300,0
P23	(DTyr ⁸⁰ -Pro ⁸¹⁻⁸²⁻⁸⁷)	8	A	1020,2	1021,7	8,0
P24	(Gly ⁸¹⁻⁸²⁻⁸⁶)	6	A	688,8	689,9	8,0

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- 5 <110> Комиссариат по Атомной Энергии
 Université Victor Segalen - Commissariat à l' Energie Atomique
 Bordeaux 2
 Université Bordeaux 1
 BETZ Natacha
 BIKFALVI Andréas
 DELERIS Gérard
- 10 <120> Циклопептиды, способ их получения и применение в качестве
 ингибиторов или активаторов ангиогенеза
- <130> В 13445.3 ЕЕ
- 15 <140>
 <141>
- <150> FR no 0012654
 <151> 2000-10-04
- <160> 25
- 20 <170> PatentIn Ver. 2.1
- <210> 1
 <211> 7
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <400> 1
 Arg Ile Lys Pro His Gln Gly
 30 1 5
- <210> 2
 <211> 10
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>
 <223> циклический пептид
 <400> 2
 40 Gly Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His
 1 5 10
- 45 <210> 3
 <211> 9
 <212> Белок
 <213> Искусственная последовательность
 <220>
 <223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>
- 50

<223>циклический пептид
 <220>
 <221>Модиф_остаток
 <222> (5)
 <223> (D)Pro
 5 <400>3
 Gly Arg Ile Lys Pro His Gln Gly His
 1 5

<210>4
 10 <211>10
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>

15 <223>циклический пептид
 <400>4
 Pro Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His
 1 5 10

20 <210>5
 <211>17
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>

25 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>
 <223>циклический пептид
 <220>
 <221>Модиф_остаток
 <222> (1)
 <223> (D)Phe
 30 <400>5
 Phe Pro Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
 1 5 10 15

35 <210>6
 <211>16
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>

40 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>
 <223>циклический пептид
 <400>6
 Gly Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
 1 5 10 15

45 <210>7
 <211>16
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>

50

<223> (D) Phe

<400> 11

Phe Pro Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly
 1 5 10 15

5

<210> 12

<211> 14

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

10

<223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

<220>

<223> циклический пептид

<220>

<221> Модиф_остаток

<222> (1)

15

<223> (D) Phe

<400> 12

Phe Pro Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile
 1 5 10

20

<210> 13

<211> 8

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

25

<220>

<223> циклический пептид

<220>

<221> Модиф_остаток

<222> (1)

<223> (D) Tyr

30

<400> 13

Tyr Pro Arg Ile Lys Pro His Gln
 1 5

35

<210> 14

<211> 5

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

<400> 14

40

Arg Ile Lys Pro His

1 5

<210> 15

<211> 8

45

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

<400> 15

50

Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His
 1 5

5 <210>16
 <211>7
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <400>16

10 Arg Ile Lys Pro His Gln Gly
 1 5

<210>17
 <211>15
 15 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <400>17

20 Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu
 1 5 10 15

<210>18
 <211>14
 25 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <400>18

30 Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly
 1 5 10

<210>19
 <211>10
 35 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A
 <220>

<221>Модиф_остаток
 <222>(5)
 <223>(D)Pro
 40 <400>19
 Gly Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His
 1 5 10

<210>20
 45 <211>15
 <212>Белок
 <213>Искусственная последовательность
 <220>
 <223>Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

50

<210> 25

<211> 6

<212> Белок

<213> Искусственная последовательность

<220>

5 <223> Описание искусственной последовательности, происходящей из VEGF-A

<220>

<223> циклический пептид

<400> 25

Gly Arg Ile Lys Pro His

10

1

5

Формула изобретения

1. Циклопептид общей формулы цикло(R₁-Arg-Ile-Lys-Pro-His-R₂), причем указанный полипептид выбран из числа следующих соединений:

15

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 5

P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 8

P17: цикло (Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 9

P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 10

P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly) SEQ ID NO: 11

20

P23: цикло (DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln) SEQ ID NO: 13

P24: цикло (Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His) SEQ ID NO: 25,

а также соединений P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr.

2. Фармацевтическая композиция для ингибирования ангиогенеза, включающая циклопептид, выбранный из числа следующих циклопептидов:

25

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 5

P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 8

P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 9

P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 10

P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly) SEQ ID NO: 11

30

P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln) SEQ ID NO: 13

P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His) SEQ ID NO: 25,

а также циклопептидов P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr.

3. Фармацевтическая композиция для активации ангиогенеза, включающая два идентичных или различных циклопептида, конъюгированных с фармацевтически приемлемым органическим соединением, причем циклопептиды выбирают из числа следующих циклопептидов:

35

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 5

P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 8

P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly) SEQ ID NO: 9

P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu) SEQ ID NO: 10

P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly) SEQ ID NO: 11

P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln) SEQ ID NO: 13

P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His) SEQ ID NO: 25,

40

а также циклопептидов P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr.

4. Система, включающая циклопептид по любому из пп.1-3, ковалентно связанный с органической ножкой-спейсером.

5. Система по п.4, в которой органическая ножка-спейсер ковалентно связана с подложкой.

50

6. Система, включающая два циклопептида по любому из пп.1-3, ковалентно связанных с фармацевтически приемлемым органическим соединением.

7. Система по п.6, в которой расстояние между двумя циклопептидами таково, что при

приведении системы в контакт с клетками, экспрессирующими рецепторы фактора роста эпителия сосудов (VEGF), она позволяет димеризоваться указанным рецепторам.

8. Система по любому из пп.6 и 7, в которой органическое соединение ковалентно связано с подложкой при помощи органической ножки-спейсера.

5 9. Система, включающая твердую подложку, на которой циклопептиды по любому из пп.1-3 присоединены ковалентными связями, причем каждый из циклопептидов связан с подложкой при помощи органической ножки-спейсера.

10. Система по любому из пп.4-9, в которой ножка-спейсер включает цепь углеводорода, фторуглерода, простого полиэфира, полиэтиленгликоля, полиамина, полиамида, сложного
10 полиэфира, полисилоксана или их комбинацию, имеющую функциональные группы на каждом конце для образования ковалентной связи с одной стороны с циклопептидом, а с другой - с подложкой.

11. Система по любому из пп.4-10, в которой органическая ножка-спейсер дополнительно включает группировку, подверженную расщеплению какой-либо
15 ферментативной системой.

12. Система по п.11, в которой органическая ножка-спейсер дополнительно включает биологически активное соединение.

13. Система по любому из пп.5, 8 и 9, в которой подложка представляет собой органическое или неорганическое твердое вещество.

20 14. Система по любому из пп.5, 8 и 9, в которой подложка представляет собой органический полимер в твердом виде или в виде геля.

15. Система по п.14, в которой органический полимер является биосовместимым, биodeградируемым полимером или не является биосовместимым, биodeградируемым полимером.

25 16. Система по п.15, в которой органический полимер выбран из числа полиэтилентерефталата, сополимеров винилиденфторида и гексафторпропилена, поливиниловых спиртов, полигидроксиэтилметакрилатов, полисахаридов и их сополимеров.

30 17. Фармацевтическая композиция для ингибирования ангиогенеза по любому из пп.4 и 5, в которой циклопептид выбран из числа следующих циклопептидов:

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 5
P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 8
P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 9
P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 10
35 P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)	SEQ ID NO: 11
P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)	SEQ ID NO: 13
P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)	SEQ ID NO: 25,

а также циклопептидов P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr.

40 18. Система для активации ангиогенеза по любому из пп.6-8, в которой циклопептид выбран из числа следующих циклопептидов:

P11: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 5
P16: цикло(Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 8
P17: цикло(Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly)	SEQ ID NO: 9
45 P19: цикло(Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly-Glu)	SEQ ID NO: 10
P20: цикло(DPhe-Pro-Gln-Ile-Met-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln-Gly-Gln-His-Ile-Gly)	SEQ ID NO: 11
P23: цикло(DPhe-Pro-Arg-Ile-Lys-Pro-His-Gln)	SEQ ID NO: 13
P24: цикло(Gly-Arg-Ile-Lys-Pro-His)	SEQ ID NO: 25,

а также циклопептидов P11, P20 и P23, у которых DPhe заменен на DTyr.

50 19. Способ получения системы по любому из пп.14-16, который заключается в облучении подложки, сделанной из органического полимера, ионизирующим излучением, плазмой или пучком фотонов по определенным участкам подложки, а затем в прививке органических ножек-спейсеров по этим участкам подложки.

20. Способ по п.19, в котором облучение проводится через маску.

21. Способ по п.19, в котором ионизирующее излучение представляет собой пучок электронов или быстрых тяжелых ионов.

22. Способ по п.19, в котором циклопептиды присоединяют к органическим ножкам-спейсерам до прививки к подложке.

23. Способ по п.19, дополнительно включающий стадию присоединения циклопептидов к органическим ножкам-спейсерам после их прививки к подложке.

10

15

20

25

30

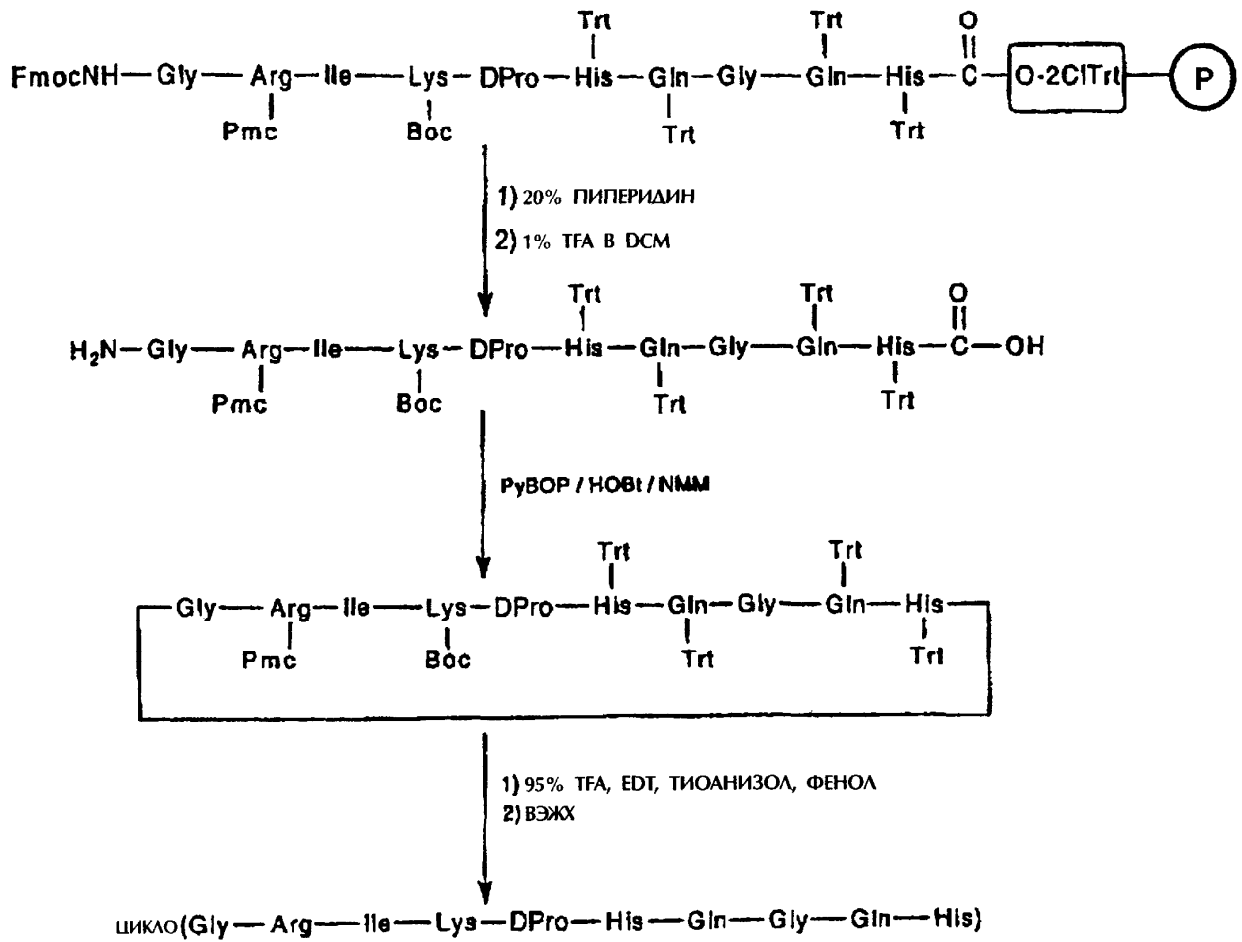
35

40

45

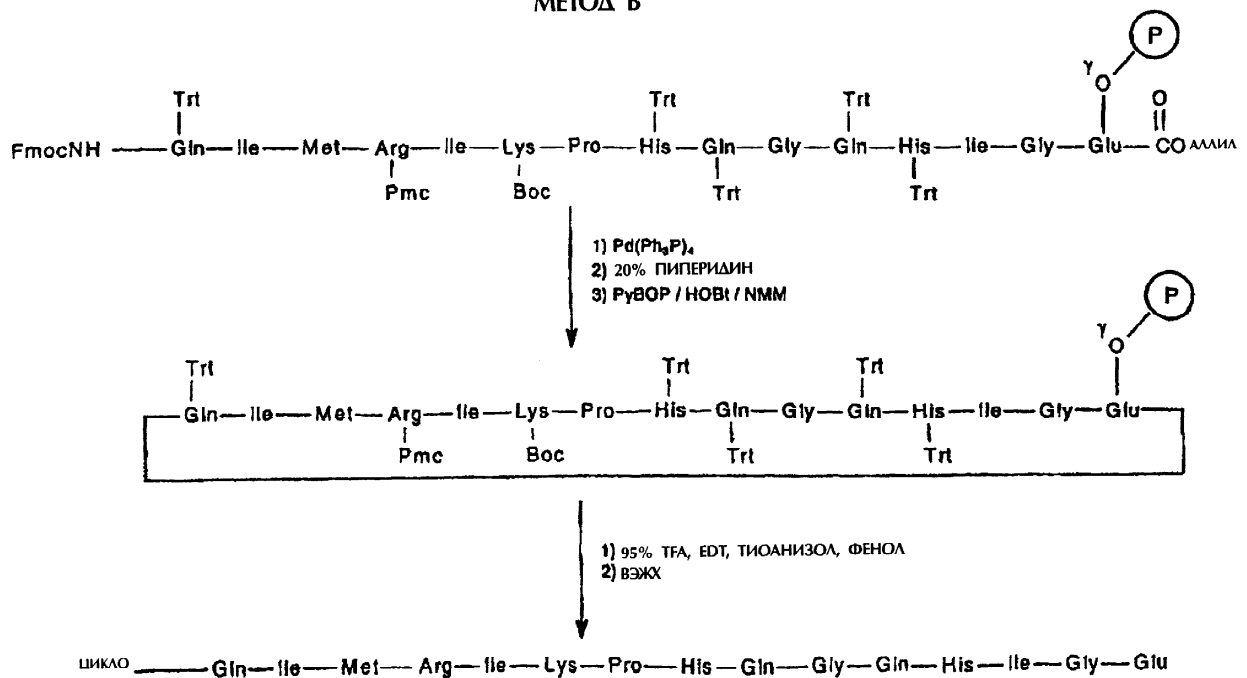
50

МЕТОД А

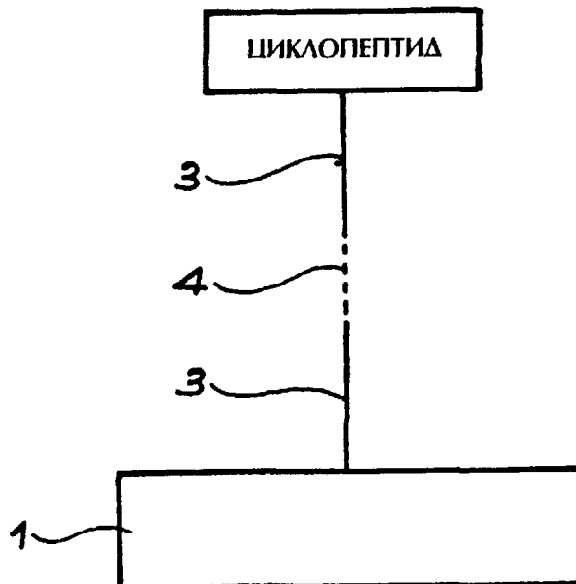


ФИГ. 1

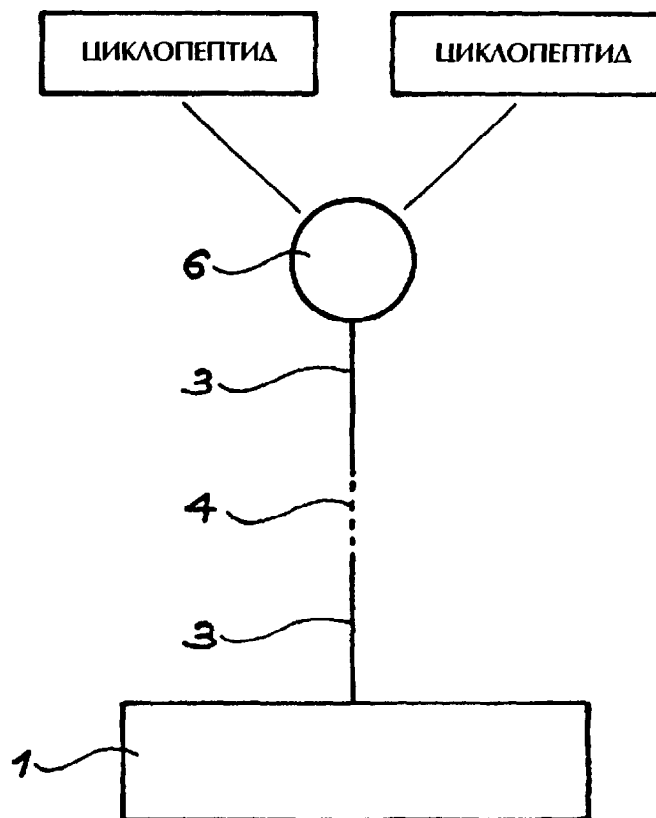
МЕТОД В



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4