



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02815235.2

[43] 公开日 2005 年 7 月 6 日

[11] 公开号 CN 1636059A

[22] 申请日 2002.5.31 [21] 申请号 02815235.2

[30] 优先权

[32] 2001. 6. 1 [33] US [31] 09/872,165

[86] 国际申请 PCT/US2002/017009 2002.5.31

[87] 国际公布 WO2002/098351 英 2002.12.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.2.2

[71] 申请人 南加利福尼亚大学

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 彼得·C·布鲁克斯

多萝西·罗德里格斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

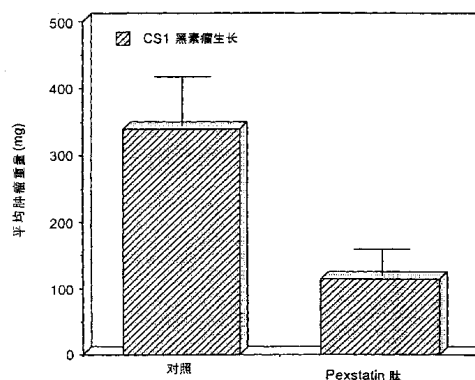
代理人 过晓东

权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 5 页

[54] 发明名称 利用基于 MMB2 中某序列的化合物抑制血管发生和肿瘤生长的新方法及其组合物

[57] 摘要

本发明涉及抑制肿瘤生长和组织中血管发生以及治疗疾病的方法和组合物,其中采用了基于基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 中特定序列的多肽。在一个实施方案中,本发明提供一种多肽,其氨基酸序列为 Ile - Phe - Ala - Gly - Asp - Lys - Phe - Trp - Arg, 优选地,在该序列的两侧氨基和羧基上包夹半胱氨酸。此外,本发明涉及抑制肿瘤生长和组织中血管发生以及治疗疾病组合物,其包含基于上述氨基酸序列的或其中包夹有这种 MMP-2 序列的优化氨基酸序列的有机或非肽类模拟物。本发明还涉及将本发明组合物和组织接触以检测血管生成、肿瘤组织、转移性病灶和肿瘤侵入组织的方法,以及筛选本方面组合物的方法。



1、一种多肽，其所包括的序列基本上等价于选自SEQ. ID. NO: 1和SEQ. ID. NO: 2中的序列。

2、如权利要求1所述的多肽，其中所述多肽抑制血管生成。

3、如权利要求1所述的多肽，其中所述多肽抑制肿瘤转移。

4、如权利要求1所述的多肽，其中所述多肽抑制疾病。

5、如权利要求1所述的多肽，其中所述疾病为牛皮癣、黄斑变性、神经性疾病和组织中的再狭窄。

6、一种抑制组织中血管生成的方法，其包括给药如权利要求1所述的多肽。

7、如权利要求6所述的方法，其中所述多肽通过静脉、经皮、滑膜内、肌肉、肿瘤内、眼内、鼻腔、鞘内、局部或口服途径进行给药。

8、如权利要求6所述的方法，其中对所述多肽的给药包括：
给药编码所述多肽的合成基因，其中当合成基因被表达后在体内生成所述多肽。

9、如权利要求6所述的方法，其中所述多肽与化疗联合使用。

10、如权利要求6所述的方法，其中所述多肽与放疗联合使用。

11、如权利要求6所述的方法，其中组织为发炎并且出现血管生成的组织。

12、如权利要求11所述的方法，其中所述组织存在于哺乳动物中。

13、如权利要求12所述的方法，其中所述组织为关节炎组织，眼部组织，视网膜或血管瘤。

14、一种抑制组织中肿瘤生长和转移的方法，其包括给药如权利要求1所述的多肽。

15、如权利要求14所述的方法，其中所述多肽通过静脉、经皮、滑膜内、肌肉、肿瘤内、眼内、鼻腔、鞘内、局部或口服途径进行给药。

16、如权利要求14所述的方法，其中对所述多肽的给药包括：
给药编码所述多肽的合成基因，其中当合成基因被表达后在体内生成所述多肽。

17、如权利要求14所述的方法，其中所述多肽与化疗联合使用。

18、如权利要求14所述的方法，其中所述多肽与放疗联合使用。

19、如权利要求14所述的方法，其中所述肿瘤为黑素瘤、恶性肿瘤、肉瘤、纤维肉瘤、神经胶质瘤或星细胞瘤。

20、一种抑制牛皮癣、黄斑变性或组织中再狭窄的方法，其包括给药如权利要求1所述的多肽。

21、如权利要求20所述的方法，其中所述多肽通过静脉、经皮、滑膜内、肌肉、肿瘤内、眼内、鼻腔、鞘内、局部或口服途径进行给药。

22、如权利要求20所述的方法，其中对所述多肽的给药包括：
给药编码所述多肽的合成基因，其中当合成基因被表达后在体内生成所述多肽。

23、如权利要求20所述的方法，其中所述多肽与化疗联合使用。

24、如权利要求20所述的方法，其中所述多肽与放疗联合使用。

25、一种检测组织中血管生成的方法，其包括使权利要求1中的多肽与所述组织接触。

26、如权利要求25所述的方法，其中所述组织为体外组织。

27、如权利要求25所述的方法，其中所述组织为体内组织，而所述多肽通过静脉、经皮、滑膜内、肌肉、肿瘤内、眼内、鼻腔、鞘内、局部或口服途径进行给药，使所述多肽与所述组织接触。

28、如权利要求25所述的方法，其中将所述多肽和所述组织接触包括：
对所述组织给药编码所述多肽的合成基因，其中当合成基因被表达后在所述组织中生成了所述多肽。

29、如权利要求25所述的方法，其中所述多肽与荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属、诊断染料或酶连接。

30、一种检测组织中肿瘤和肿瘤侵入的方法，其包括给药如权利要求

1所述的多肽。

31、如权利要求30所述的方法，其中所述组织为体外组织。

32、如权利要求30所述的方法，其中所述组织为体内组织，而所述多肽通过静脉、经皮、滑膜内、肌肉、肿瘤内、眼内、鼻腔、鞘内、局部或口服途径进行给药，使所述多肽与所述组织接触。

33、如权利要求30所述的方法，其中所述多肽与荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属、诊断染料或酶连接。

34、一种检测样品中如权利要求1所述的多肽的方法，其包括：
将样品和可与所述多肽结合或形成复合物的化合物接触足够长的时间，以生成复合物，以及
检测该复合物，如果检测到复合物就说明检测到了如权利要求1所述的多肽。

35、如权利要求34所述的方法，其中所述化合物是抗体。

利用基于MMB2中某序列的化合物 抑制血管发生和肿瘤生长的新方法及组合物

政府资助

本发明是在政府资助下完成的，合同号为国立癌症研究所的R29CA74132-01。

技术领域

本发明概括地涉及医药领域。更具体而言，本发明涉及抑制肿瘤生长和组织中血管发生或检测血管发生和肿瘤生长的方法和组合物，在这些方法和组合物中利用了基于MMP-2中特定序列的化合物。

背景技术

血管发生是一种新血管得以形成的基础生理过程，对于多种正常的生理活动（如生殖、发育和伤口修复）至关重要。虽然对于这一过程的机理尚不十分清楚，但一般认为它涉及到促进和抑制内皮细胞（毛细血管的初级细胞）生长的分子间复杂的相互作用。在正常情况下，这些分子在相当长的时间内将微脉管系统维持在休眠状态（即毛细血管不生长的状态之一），时间可达数周，在某些情况下甚至长达数十年。但是当需要时（如伤口修复期间），这些细胞可快速增殖并且在5天内得以更新（Folkman, J. 和 Shing, Y., The Journal of Biological Chemistry, 267(16): 10931-10934; 以及 Folkman J. 和 Klagsbrun, M., Science, 235:442-447(1987)）。

虽然在正常情况下血管发生是一个高度受控的过程，但是很多疾病（按其定义为“血管发生性疾病”）却是因为长期不受控的血管发生所造成的。换言之，不受控的血管发生可以直接造成一些特殊的疾病或

者使已有的病情恶化。例如，有证据暗示眼部新血管形成是导致失明的最主要的原因，同时也是近20种眼部疾病的主要病因。在某些已有的疾病如关节炎中，新形成的毛细血管侵入关节并且破坏软骨。在糖尿病中，视网膜内新形成的毛细血管侵入玻璃体中，造成出血并导致失明。实体瘤的生长和转移也是血管发生依赖性的（Folkman, J., *Cancer Research*, 46: 467-473 (1986), Folkman, J., *Journal of the National Cancer Institute*, 82: 44(1989)）。例如，现已证明，大于2mm的肿瘤自身必须具备血液供应，这种血液供应的获得是通过诱导新毛细血管生成而获得的。一旦这些新毛细血管在肿瘤上着床，这些血管就为肿瘤细胞进入循环系统并转移至远处，如肝脏、肺或骨骼提供了渠道（Weidner, N.等人, *The New England Journal of Medicine*, 324(1): 1-8(1991)）。

肿瘤的生长和转移每年都对很多人的生活造成了冲击（据估计仅在美国每年新诊断出的癌症患者就超过600,000人，Varner J. A., Brooks, P. C. 和Cheresh, D. A. (1995) *Cell Adh. Commun.* 3, 367-374），治疗这类疾病的组合物及方法具有广阔的用途。从以往的经验来看，显而易见，阻断血管发生对于减慢肿瘤生长以及治疗其他疾病有可能是有效的。事实上，已有充分的证据支持这样一种观点，即，在多种动物模型中阻断肿瘤新血管发生可以抑制肿瘤的生长，而且人体临床试验数据也开始支持这种观点（Varner, J. A., Brooks, P. C. 和Cheresh, D. A. (1995) *Cell Adh. Commun.* 3, 367-474）。

尽管目前已有几种血管发生抑制剂处于开发阶段，用于治疗血管发生性疾病（Gasparini, G. 和 Harris A. L., *J Clin Oncol* 13(3): 765-782, (1995)），但是这些化合物自身存在一些缺点。例如，苏拉明是一种强效血管发生抑制剂，但是对人体而言会带来严重的全身性毒性（在具有抗肿瘤活性所需的剂量下）。其他化合物，如类视色素，干扰素和抗雌激素对人体是安全的，但仅有微弱的抗血管发生作用。此外，还有一些化合物制备起来困难或成本过高。类似地，虽然很多研究者将目标定在引起血管发生的生长因

子和细胞因子上 (Varner等人, 1995; Blood和Zetter 1990; Weidner等人, 1992; Weidner等人, 1991; Brooks等人, 1995; Brooks等人, 1994; Brooks等人, 1997), 但是能够刺激血管发生的生长因子和细胞因子的数目庞大, 由于这种冗余性的存在, 阻断一种细胞因子所产生的治疗效果可能有限。

因此, 需要发明其他的用于抑制血管发生的抗血管发生的靶点和方法。短肽的制备相对简单, 因此, 在与血管发生有关的疾病的治疗以及血管发生靶向抑制剂的设计中, 采用短肽是一种经济的方法。

发明内容

本发明提供抑制血管发生和肿瘤生长的方法和组合物, 其中采用了在胞外基质 (ECM) 的蛋白水解重组中起作用的基质金属蛋白酶 (MMP)。具体而言, 本发明提供一种基于MMP-2片断并用于抑制血管发生的新型组合物和方法。

本发明中一个特别的方面提供包含一种多肽的抑制血管发生的组合物, 所述多肽含有MMP-2中某一特定的氨基酸序列。在本发明主要的实施方案中, 本发明提供一种包含以下氨基酸序列的肽:

SEQ. ID. NO.: 1 — Ile-Phe-Ala-Gly-Asp-Lys-Phe-Trp-Arg。

此外, 在上述序列的两侧可以包夹其他氨基酸。例如, 如下所示可以在这个9个氨基酸序列的N-端和C-端包夹半胱氨酸残基:

SEQ. ID. NO.: 2 — Cys-Ile-Phe-Ala-Gly-Asp-Lys-Phe-Trp-Arg-Cys。

此外, 本发明还提供用于抑制血管发生和肿瘤生长的组合物, 其包含基于上述氨基酸序列或其中包夹有这种MMP-2序列的优化氨基酸序列的有机或非肽类模拟物。

本发明的另一个方面提供抑制血管发生的组合物, 其包含由MMP-2中特定氨基酸序列定义的位点的激动剂。此外, 本发明提供用于抑制血管发生的拮抗剂, 这种拮抗剂特异性地指向MMP-2中的特定位点。这种拮

抗剂也包含该抗原决定簇的有机、肽类或非肽类模拟物。

在本发明的另一实施方案中,本发明提供一种包含上述多肽和药学可接受载体的组合物,用于治疗选自癌症、关节炎、牛皮癣、因感染或手术导致的眼部血管生成、黄斑变性以及糖尿病性视网膜病等疾病。

本发明的另一方面包括一种将组织与上述组合物接触抑制血管生成的方法。被治疗的组织可以是任何需要抑制血管生成的组织,如出现新血管生成的病变组织。示例性的组织包括感染的组织、实体瘤、转移性病灶、发生再狭窄的组织等。本发明还提供治疗选自癌症、关节炎、黄斑变性以及糖尿病性视网膜病等疾病的方法,其包括对病人给药治疗有效量的上述多肽。

本发明还提供检测血管生成、肿瘤组织、转移性病灶以及癌症侵入组织的方法,其包括使本发明的组合物与组织接触的步骤。

本发明还提供筛选本发明组合物的方法。

在本发明的说明书中,

1、SEQ. ID. NO: 1代表以下序列:

Ile-Phe-Ala-Gly-Asp-Lys-Phe-Trp-Arg。

2、SEQ. ID. NO: 2代表以下序列:

Cys-Ile-Phe-Ala-Gly-Asp-Lys-Phe-Trp-Arg-Cys。

附图简述

图1显示全身性给药Pexstatin对于鸡胚胎中黑素瘤生长的影响作用。

图2显示全身性给药Pexstatin对于裸鼠体内黑素瘤生长的影响作用。

图3显示全身性给药Pexstatin对于体内血管生成的影响作用。

图4是一个棒图,显示了检查全身性给药Pexstatin对于体内血管生成影响作用的试验中的血管生成指数。

图5显示Pexstatin对于体内B16黑素瘤转移性病灶的影响作用。

具体实施方式

在生理条件下，结缔组织的合成与胞外基质的降解处于动态平衡。这种降解作用部分是由于基质金属蛋白酶（一类蛋白酶）参与了结缔组织的降解和重组。这种肽链内切酶被结缔组织中的或与结缔组织有关的多种类型的细胞如成纤维细胞、单核细胞、巨噬细胞、内皮细胞以及侵入的或转移的肿瘤细胞以酶原形式分泌出来。在局部的组织环境中，MMP的表达被生长因子和细胞因子所促进，此时这些酶的作用是特异性降解胞外基质中的蛋白成份，如胶原蛋白、蛋白多糖（蛋白内核）、粘连蛋白和层粘连蛋白。这些普遍存在的胞外基质成份存在于关节的衬里、间质结缔组织、基底膜和软骨中。MMP具有多种性质，包括是锌和钙依赖性的，以酶原形式分泌，40—50%的氨基酸序列同源性。

多种慢性和急性疾病的发病原因与MMP使胞外基质过度降解有关，例如，多项研究已经证明（综述见 *Exp. Opin. Invest. Drugs*, 5, 323-335, (1996)）MMP的表达和活化对于肿瘤的生长、侵入和转移是至关重要的。此外，已经发现MMP的活性是血管生成所必需的，而血管生成又是肿瘤生长以及其他病变如黄斑变性所需的。

这一类酶包括但不限于胶原酶（MMP-1）、明胶酶或IV型胶原酶（MMP-2, MMP-9）、matrilysin（MMP-7, PUMP-1）和溶基质素（MMP-3）。

本发明中特别重要的酶是明胶酶MMP-2。

定义

术语“烷基”指直链或支链的饱和烃除去一个氢原子衍生出的单价基团。烷基的实例有甲基、乙基、正丙基或异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基或叔丁基等。

此处术语“N-保护基”指本领域的合成中用于保护氨基，避免出现不必要反应，同时易于脱去并可选择性脱去的基团。在本领域中采用N-保护基避免基团发生不必要的反应是众所周知的，很多的这种保护基也是

已知的,例如, T. H. Greene and P. G. M. Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第2版, John Wiley & Sons, New York (1991)中所描述的保护基。N-保护基的实例包括但不限于酰基,如乙酰基、三氟乙酰基、酰基异硫氰酸酯、氨基己酰基、苯甲酰基等,以及酰氧基,包括叔丁氧羰基(BOC)和苄氧羰基等。

术语“药学可接受的盐”指这样一些盐,根据合理的医学判断,这些盐适用于和人类以及更低级动物的组织接触而不产生明显的毒性,刺激性和过敏反应等,同时具有合理的安全比。在本领域中药学可接受的盐是众所周知的,例如S. M. Berge等人在*J. Pharmaceutical Sciences*, 1977, 66: 1-19中描述的药学可接受的盐。可以在本发明化合物最终分离和纯化期间原位生成这些盐,或采用适当的有机酸与碱性基团反应制备这些盐。代表性的酸加成盐有乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、camphorate、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊基丙酸盐、二葡萄糖酸盐(digluconate)、十二烷基磺酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐(hemisulfate)、庚酸盐、己酸盐、氢溴酸盐、盐酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、十二烷基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一烷酸盐、戊酸盐等。代表性的碱金属或碱土金属盐包括钠盐、锂盐、钾盐、钙盐、镁盐等,以及无毒性的铵盐,季铵盐,以及胺的阳离子盐,包括但不限于铵盐、四甲基铵盐、四乙基铵盐、甲胺盐、二甲胺盐、三甲胺盐、三乙胺盐、乙胺盐等。

此处采用术语“药学可接受的酯”指在体内水解的酯,包括易于在体内断裂生成母体化合物及其盐的酯。例如,适用的酯基包括由药学可接受的脂肪酸,特别是烷酸、链烯酸、环烷酸和烷基二酸衍生的酯,其中烷基

和链烯基最好不要超过6个碳。酯的具体实例包括甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯以及丁二酸乙酯。

除采用前缀“D”指示外，发明公开书以及所附权利要求中多肽中氨基酸以及氨基酸残基中的I-碳的构型为天然的或“L”构型。采用Cahn-Ingold-Prelog的R和S标识具体描述本发明多肽的N一端某些酰基取代基中手性中心的立体构型。符号“R, S”指两个对映异构物构成的外消旋体。命名遵从R. S. Calm等人, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 5, 385-415(1966)中的规定。

在大多数情况下，对于天然或非天然氨基酸残基的命名遵从IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry 和 IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature在“Nomenclature of I-Amino Acids (Recommendations, 1974)” *Biochemistry*, 14 (2), (1975)中的规定。当本发明的说明书以及所附权利要求书中氨基酸以及氨基酸残基的命名和缩写与上述规定不同时，按以下方式使读者可以看明白。

众所周知，可以对多肽进行结构修饰和改变而基本不影响多肽的生物学功能。例如，对于指定的多肽而言，可以采用其他氨基酸替代某些氨基酸而不明显损失其功能。在作这些改变时，以氨基酸侧链的性质，如大小、电荷、疏水性、亲水性等为基本相同为原则进行氨基酸的替代。

如美国专利4,554,101中所述（此处引用作为参考），以下为各氨基酸残基的亲水性：Arg(+3.0); Lys(+3.0); Asp(+3.0); Glu(+3.0); Ser(+3.0); Asn(+2.0); Gln(+2.0); Gly(0); Pro(-0.5); Thr(-0.4); Ala(-0.5); His(-0.5); Cys(-1.0); Met(-1.3); Val(-1.5); Leu(-1.8); Ile(-1.8); Tyr(-2.3); Phe(-2.5)和Trp(-3.4)。应当认识道氨基酸残基可以具有类似亲水性（如，亲水性在+2.0至-2.0之间）的氨基酸残基取代，得到生物学等价的多肽。

类似地，可以按亲水性指数类似的原则进行氨基酸的取代。根据氨基酸残基的疏水性和电性特征各氨基酸残基的亲水性指数已经得到了确定，各氨基酸残基的亲水性指数如下：Ile(+4.5); Val(+4.2); Leu(+3.8);

Phe(+2.8); Cys(+2.5); Met(+1.9); Ala(+1.8); Gly(-0.4); Thr(-0.7); Ser(-0.8); Trp(-0.9); Tyr(-1.3); Pro(-1.6); His(-3.2); Glu(-3.5); Gln(-3.5); Asp(-3.5); Asn(-3.5); Lys(-3.9); 和Arg(-4.5)。对于基于亲水性指数的替代, 优选亲水性指数在+2.0至-2.0之间。

本发明的化合物: 多肽

根据本发明, 已经发现基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 中由氨基酸582-590界定的特定区域强烈抑制血管生成和肿瘤生长。

基于以上发现, 本发明提供用于抑制血管生成和肿瘤生长的, 序列为 SEQ. ID. NO: 1 的新多肽以及一种新的十一肽, 命名为Pexstatin, 序列为 SEQ. ID. NO: 2。以下实施例表明, 这些肽在体内强烈抑制血管生成和肿瘤生长。因此, 本发明的化合物, 包括但不限于实施例中所述的化合物, 具有抗血管生成活性。

可以采用本领域技术人员知道的任何方法合成本发明的多肽。对于固相多肽合成而言, 其方法综述可参见J. M. Stewart和J. D. Young, *Solid Phase Peptide Synthesis*, W. H. Freeman Co, (San Francisco), 1963, 以及J. Meienhofer, *Hormonal Proteins and Peptides*, vol. 2, p46, Academic Press (New York), 1973。对于经典的溶液合成法而言, 可参见G. Schroder和K. Lupke, *The Peptides*, vol.1, Academic Press (New York), 1965。

概括而言, 这些方法包括逐步添加一种或多种氨基酸或恰当保护的氨基酸增长肽链。通常第一个氨基酸的氨基或羧基均被适当的保护基所保护。然后将保护的或衍生化的氨基酸连接到惰性的固体载体上, 或者添加到溶液中, 在适合形成酰胺键的条件下添加序列中的下一个氨基酸(该氨基酸具有一个被适当保护的互补基团(氨基或羧基))。然后将新形成的氨基酸残基中的保护基脱除, 再加入下一个(被适当保护的)氨基酸, 以此类推。当所有氨基酸按正确序列被连接起来以后, 分步或同时将剩余的保护基脱除以得到最终的多肽。对这一通用程序进行简单的改变就有可能

同时连接一个以上的氨基酸，以增长肽链，例如，对保护的三肽和适当保护的二肽进行偶联（在手性中心不发生外消旋化的条件下），脱保护后可以得到五肽。

制备本发明化合物的一个方法涉及固相肽合成法。在这种方法中，采用酸或碱敏感的基团保护 α -氨基。这种保护基在形成肽键的条件下应该是稳定的，同时又是容易脱除的，脱保护的反应条件不会破坏肽链或使肽链中所包含的手性中心外消旋化。适用的保护基为9-芴甲氧羰基（Fmoc）、叔丁氧羰基（Boc）、苄氧羰基（Cbz）、联苯异丙氧羰基、特戊氧羰基、异冰片氧羰基、（1,1）二甲基-3,5-二甲氧基苄氧羰基、邻硝基苯基亚磺酰基、2-氰基-叔丁氧羰基等。优选为9-芴甲氧羰基（Fmoc）。

特别优选的侧链保护基有，赖氨酸和精氨酸的侧链氨基：2,2,5,7,8-五甲基苯并二氢吡喃-6-磺酰基（pmc）、硝基、对苯甲磺酰基、4-甲氧基苯甲磺酰基、Cbz、Boc、以及金刚烷氧羰基；酪氨酸：苄基、邻溴苄氧羰基、2,6-二氯苄基、异丙基、叔丁基（t-Bu）、环己基、环戊基以及乙酰基；丝氨酸：叔丁基、苄基和四氢吡喃基；组氨酸：三苯甲基、苄基、Cbz、对苯甲磺酰基和2,4-二硝基苯基；色氨酸：甲酰基。

在固相肽合成方法中，C-端氨基酸被连接至适当的固相载体或树脂上。适用于上述合成的固相载体为对于这种分步缩合-脱保护反应的试剂和反应条件惰性，同时在使用反应介质中不溶的材料。用于合成C-端为羧基的肽的固体载体为4-羟甲基苯氧甲基共聚物（苯乙烯-1%二乙烯基苯）。优选地，用于合成C-端为酰胺基的肽的固体载体为4-（2',4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基甲基）苯氧乙酰胺基乙基树脂，该树脂可以从Applied Biosystem公司得到。

在采用或不采用N,N'-二环己基碳二亚胺（DCC）、N,N'-二异丙基碳二亚胺（DIC）或O-苯并三唑-1-基-N,N,N',N'-四甲基六氟磷酸尿（HBTU），在采用或不采用4-二甲氨基吡啶（DMAP），1-

羟基苯并三唑（HOBt），苯并三唑-1-基氧基-三（二甲基氨基）六氟磷酸磷（BOP）或二（2-氧代-3-噁唑烷基）氯化磷（BOPCl）的条件下，将C-端氨基酸偶联至树脂之上，反应温度在50至100℃之间，反应时间在1至24小时之间，溶剂为二氯甲烷或DMF。当固相载体为4-（2', 4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基）苯氧乙酰胺基乙基树脂时，在采用上述方法偶联C-端氨基酸之前，采用二级胺如哌啶脱除Fmoc基。偶联去保护的4-（2', 4'-二甲氧基苯基-Fmoc-氨基）苯氧乙酰胺基乙基树脂的优选方法是在DMF中采用O-苯并三唑-1-基-N, N, N', N'-四甲基六氟磷酸尿（HBTU, 1当量）和1-羟基苯并三唑（HOBt, 1当量）。

已知可以在自动多肽合成仪上进行经保护氨基酸的顺序偶联。在一个实施方案中，增长的肽链中的氨基酸的 α -氨基由Fmoc基保护。采用二级胺如哌啶处理除去肽链中N-端的Fmoc基。然后将各保护的氨基酸按摩尔比三倍过量的用量加入，偶联反应优选在DMF中进行。偶联试剂一般为O-苯并三唑-1-基-N, N, N', N'-四甲基六氟磷酸尿（HBTU, 1当量）和1-羟基苯并三唑（HOBt, 1当量）。

固相合成结束时，将多肽从树脂上除去并去保护，可以分步进行并一步完成。将连接有树脂的多肽用裂解试剂，如thianisole、水、乙二硫醇和三氟乙酸处理，可以一步脱下多肽并去保护。

对于多肽C-端为烷基酰胺的情况，采用烷基胺进行氨解裂解树脂。此外，如采用甲醇转移酯化，然后氨解或直接转移酰胺化脱除多肽。此时可以纯化经保护的多肽或直接用于下一步反应。可以采用上述的裂解组合试剂除去侧链的保护基。

利用系列色谱步骤纯化完全去保护的多肽，色谱方法可以是以下几种或全部：采用乙酸盐形式的弱碱性离子交换色谱；在未衍生化的聚苯乙烯-二乙烯基苯（如AMBERLITE® XAD）上进行的疏水性吸附色谱；硅胶吸附色谱；在羧甲基纤维素上进行的离子交换色谱；分配色谱，如在SEPHADEX® G-25, LH-20上进行的分配色谱；高效液相色谱（HPLC），

特别是采用辛基或十八烷基硅基一硅胶键和柱的反相HPLC。

血管生成试验

可以测试本发明化合物对于组织中血管生成的调控能力。可采用任何本领域技术人员所熟知的合适试验监测这一效应。以下描述几种方法。

例如，在一种试验中测量鸡绒毛尿囊膜（CAM）中的血管生成，称为CAM试验。CAM试验已被其他人详细描述，并且被进一步用于测量肿瘤组织中的血管生成和新血管形成。参见Ausprunk等人, *Am. J. Pathol.*, 79: 597-618 (1975)以及Ossonski等人, *Cancer Res.*, 40:2300-2309 (1980)。

由于整个组织发生新血管形成，并且真正的鸡胚胎血管长进了绒毛尿囊膜或生长在CAM之上的组织中，所以CAM试验作为测量体内血管生成的试验模型已得到了普遍的认同。

如本发明所述，就新血管生长的数目和程度而言，CAM试验表明出现了对新血管形成的抑制作用。而且也可以容易地监测移植到CAM上的组织如肿瘤组织的生长。最后，这种试验是特别有用的，因为试验体系中存在衡量毒性的内标。鸡胚胎暴露于所有的受试试剂中，因此胚胎的健康情况可以指示毒性。

测量血管生成的第二个试验是体内兔眼模型，称为兔眼试验。兔眼试验已被其他人详细描述，并且被进一步用于测量在血管生成抑制剂如沙利度胺存在下的血管生成和新血管形成。参见D' Amato等人, (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 4082-4085。

兔眼试验也是一个被广泛认同的用于测量体内血管生成的试验模型，这是因为以兔血管为例，通过本身为透明的眼角膜可以容易地观察到从角膜边缘生长至角膜中的新血管形成过程。此外，也可以容易地监测到新血管形成促进作用或抑制作用随时间变化的程度和数量，或者可以检测到新血管形成的衰退随时间变化的程度和数量。

最后，兔眼暴露于所有的受试试剂中，因此兔眼的健康情况可以指示

毒性。

第四个测试血管生成的试验是嫁接杂种的小鼠：嫁接人组织的小鼠的试验模型，称为嫁接杂种的小鼠试验。该试验已被其他人详细描述，用于测量血管生成、新血管形成和肿瘤组织的衰退。参见Yan等人 (1993) *J. Clin. Invest.* 91: 986-996。

嫁接杂种的小鼠试验是一种在体内测量血管生成的有用试验模型，因为移植的皮肤在组织学上与人正常皮肤非常接近，而且整个组织均出现新血管形成，真正的人血管从人皮肤移植体中生长至处于移植的人皮肤之上的人肿瘤组织中。可以采用对人内皮细胞有特异性的标记进行免疫组织化学染色，证明在人组织移植体内出现了新血管形成。

就新血管生长的数量和程度两方面而言，嫁接杂种的小鼠试验证明出现了新血管形成的衰退。此外，这一试验也可以容易地监测植于皮肤移植体上的组织如肿瘤组织的生长情况。最后，由于在试验体系中有衡量毒性的内标，这种试验是有用的。因为嫁接杂种的小鼠暴露于受试试剂中，因此小鼠的健康情况可以指示毒性。

治疗用组合物

本发明的化合物可以与其他用于治疗疾病的组合物和方法联合使用。例如，可以联合使用常规的手术治疗、放疗或化疗以及本发明的多肽对肿瘤进行治疗，随后对病人给药本发明的多肽以延长微小转移的休眠期并且稳定和抑制任何残留的原发肿瘤的生长。此外，本发明的化合物可以和药学可接受的赋形剂、以及任选的缓释基材如可生物降解的聚合物复合，构成治疗用组合物。

如本发明所述，缓释基材是一种由原料，通常是在酶或酸水解或溶解的作用下可以降解的聚合物构成的基材。一旦进入体内，这种基材就被酶和体液所作用。理想的缓释基材选自生物相容性的材料，如脂质体；聚乳酸；聚乙醇酸（乙醇酸的聚合物）；聚乳酸-乙醇酸（乳酸和乙醇酸的共

聚物)；聚酸酐；聚(原酸)酯；多肽；透明质酸；胶原蛋白；硫酸软骨素；羧酸；脂肪酸；磷脂；多糖；核酸；聚氨基酸，氨基酸如苯丙氨酸、酪氨酸、异亮氨酸；多聚核苷酸；聚乙烯基丙烯；聚乙烯吡咯烷酮和硅橡胶。优选的可生物降解的基材选自聚乳酸、聚乙醇酸或聚乳酸-乙醇酸(乳酸和乙醇酸的共聚物)。

当用于以上或其他治疗方法中时，可以采用治疗有效量的本发明化合物，化合物可以采取纯品形式或药学可接受的盐的形式(如果存在这种形式的话)。术语本发明的化合物的“治疗有效量”指可用于医疗的，具有合理安全比的，有效治疗血管生成性疾病(如抑制肿瘤生长或减慢或阻断肿瘤的转移)的化合物的用量。但是，应该认识到本发明化合物和组合物每天的用量应由主治医师根据病情加以确定。众所周知，对于指定病人而言，具体的治疗有效剂量依多种因素的不同而变化，所述因素包括所治疗疾病的性质、疾病的严重程度、所采用化合物的活性、所采用的配方、患者的年龄、体重、体质、性别和饮食情况、给药时间、给药途径、所采用化合物的消除速度、治疗方案的时长、与所采用化合物联合使用的药物的情况。例如，开始治疗时化合物的剂量可以低于达到理想治疗效果所需的剂量，然后再逐步增加剂量，直至出现理想的治疗效果为止。

本发明的化合物可以采取由无机和有机酸衍生出的盐的形式。这些盐包括但不限于：乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、柠檬酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、camphorate、樟脑磺酸盐、二葡萄糖酸盐、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、富马酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐(isethionate)、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、烟酸盐、2-萘磺酸盐、草酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、磷酸盐、谷氨酸盐、碳酸氢盐、对甲苯磺酸盐和十一烷酸盐。由此可以制备水或油溶性的或水或油分散的产物。

可用于形成药学可接受的酸加成盐的酸的实例包括无机酸，如盐酸、

硫酸和磷酸，有机酸如马来酸、琥珀酸和柠檬酸。其他盐包括碱金属或碱土金属盐，如钠盐、钾盐、钙盐、镁盐或与有机碱构成的盐。本发明化合物优选的盐包括磷酸盐、tris和乙酸盐。

此外，本发明的化合物可以药物组合物的形式进行给药，该组合物中包含所采用的化合物以及一种和多种药学可接受的赋形剂。药学可接受的载体或赋形剂指无毒的固体、半固体或液体填料、稀释剂、封装材料或任何类型的制剂助剂。

非肠道注射用的药物组合物中包括药学可接受的灭菌水溶液或非水溶液、分散体系、混悬液或乳液，以及在使用前可被配制成灭菌的可注射溶液或分散体系的灭菌粉末。适用的水性或非水性载体、稀释剂、溶剂或媒介包括水、乙醇、多元醇（如甘油、乙二醇、聚乙二醇等）、羧甲基纤维素及其混合物、植物油（如橄榄油）、以及可注射用的有机酯，如油酸乙酯。为维持适当的流动性，例如，可以添加成膜材料，如卵磷脂；对于分散体系可以通过维持其所需的粒径达到此目的，或者使用表面活性剂达到此目的。

这些组合物还可包含辅料如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可以加入多种抗菌和抗真菌剂，如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、山梨酸等对抗微生物的作用。加入等渗试剂，如糖、氯化钠等也是需要的。可以加入延缓吸收的试剂如单硬脂酸铝或明胶使注射用的组合物具有缓释功能。

可以采用生物可降解的材料，如聚乳酸-乙醇酸、聚（原酸）酯和聚酸酐构成药物的微胶囊，制成可注射用的“储池式”的形式。根据药物/聚合物的比例以及所采用聚合物的性质可以控制药物的释放速度。也可以将药物载入具有组织相容性的脂质体或微乳中构成可注射用的“储池式”制剂。

为了对可注射用的制剂进行灭菌，例如，可以采用细菌不能通过的过滤器过滤，或者在灭菌的固体组合物中加入灭菌剂，其中固体组合物在使

用前可以溶于或分散于灭菌水或其他灭菌的可注射用的媒介中。

局部给药包括对皮肤或粘膜如肺和眼的表面进行给药。用于局部给药的组合物，包括用于吸入给药的组合物，可以被制成加压或不加压的干粉形式。在不加压的干粉组合物中，可以将活性成份的细粉和粒径较大的药学可接受的惰性载体混合，其中惰性载体的粒径可达100 μm 。适用的惰性载体包括糖，如乳糖。以重量计，理想的情况是95%的活性成份的粒径在0.01至10 μm 之间。

此外，组合物可以被加压，从而含有供抛射用的压缩气体，如氮气或液化气体。优选地，在液化的抛射介质和整个组合物中活性成分不明显溶解。加压的组合物中也可包含表面活性剂，如液体或固体非离子表面活性剂或者固体阴离子表面活性剂。优选地，采用钠盐形式的固体阴离子表面活性剂。

局部给药的另一种形式是经眼给药。将本发明的化合物加到药学可接受的眼用载体中进行给药，使得化合物能够与眼睛表面接触足够长的时间，使药物渗入眼睛的角膜和内部区域，如前房、后房、玻璃体、房水、玻璃体液、角膜、虹膜/眼睑、脉络膜/视网膜和巩膜中。例如，药学可接受的眼用载体可以是软膏、植物油或包胶材料。此外，本发明的化合物也可以直接注射进房水和玻璃体液中。

用于直肠或阴道的组合物优选为栓剂，可以将本发明的化合物和适用的无刺激性的赋形剂或载体如可可脂、聚乙二醇或栓剂用蜡混合进行制备，这些赋形剂或载体在室温下为固体，但在体内温度下为液体，从而在直肠或阴道中熔融而释放出活性化合物。

本发明的化合物也可以脂质体的形式进行给药。众所周知，一般采用磷脂或其他脂类物质构成脂质体。将单层或多层水合液晶分散在水性介质中形成脂质体。可以使用任何无毒的、生理可接受的、可形成脂质体的可代谢脂质。除本发明化合物外，本发明的脂质体组合物可包含稳定剂、防腐剂、赋形剂等，优选的脂质为天然或合成的磷脂和磷脂酰胆碱(卵磷脂)。

构成脂质体的方法是已知的，例如可参见Prescott编辑, *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, New York, N.Y. (1976), p. 33等。

虽然本发明的化合物可按单一用药的方式进行给药，它们也可以和一种或多种常规用于治疗血管生成性疾病的药物联合使用。例如，本发明的化合物可以在短时间内使肿瘤对于传统的细胞毒性疗法如化疗或放疗更为敏感。本发明的化合物也可以提高细胞毒性佐剂抗癌的治疗效果。本发明的化合物也可以和其他的抗血管生成药物联合使用以提高其疗效，或者与其他的抗血管生成药物以及其他细胞毒性药物联合使用。特别地，用于实体瘤的治疗时，本发明的化合物可以和IL-2、类视色素、干扰素、制管张素、endostatin、沙利度胺、凝血栓蛋白-1、凝血栓蛋白-2、captopryl、抗肿瘤药物如 α -干扰素、COMP（环磷酰胺、长春新碱、甲氨蝶呤和泼尼松）、依托泊苷、mBACOD（甲氨蝶呤、博来霉素、阿霉素、环磷酰胺、长春新碱和地塞米松）、PRO-MACE/MOPP（泼尼松、甲氨蝶呤(w/leucovin rescue)、阿霉素、环磷酰胺、紫杉醇、依托泊苷/氮芥、长春新碱、泼尼松和丙卡巴肼）、长春新碱、长春碱、angiostatin、TNP-470、戊聚糖多硫酸盐、血小板因子-4、制管张素、LM-609、SU-101、CM-101、Techgalan、沙利度胺、SP-PG等以及辐射。

应该认识到与本发明化合物联合使用的用于抑制、治疗或预防血管生成性疾病的药物并不仅局限于上述药物，原则上包括任何适用于治疗或预防血管生成性疾病的药物。

抑制血管生成和治疗疾病的方法

本发明提供一种用于抑制组织中血管生成从而抑制组织中因血管生成而出现的病变的方法。概括而言，这种方法包括对组织给药组合物，该组合物包含优选抑制血管生成剂量的本发明的化合物，如Pexstatin。

如前所述，血管生成包括了多个涉及组织中新血管形成的过程，如“萌发”、血管形成或血管长大，所有这些血管生成过程均涉及血管中胞外基

质胶原蛋白瓦解。除外伤愈合、黄体形成和胚胎形成外，据信决大多数的血管生成均与疾病有关，因此，本发明的治疗方法适用于治疗疾病。

作为血管生成抑制剂，本发明的化合物如Pexstatin适用于治疗原发性或转移性实体瘤，包括在乳腺、结肠、直肠、肺、下咽部、食道、胃、胰腺、肝、胆囊、胆管、小肠、尿路（包括肾、膀胱和尿路上皮），雌性生殖道（包括子宫颈、子宫、卵巢以及绒毛癌和妊娠滋养层疾病），雄性生殖道（包括前列腺、精囊、睾丸和生殖细胞肿瘤），内分泌腺（包括甲状腺、肾上腺、和脑垂体），和皮肤上的癌变，以及血管瘤，黑素瘤，肉瘤（骨骼和软组织中发生的肉瘤以及卡波西肉瘤），大脑、神经、眼睛和脑膜中发生的肿瘤（包括星细胞瘤、神经胶质瘤、成胶质细胞瘤、眼癌、神经瘤、成神经细胞瘤、许旺氏细胞瘤、脑膜瘤）。这些化合物也用于治疗造血系统癌变产生的实体瘤，如白血病（即绿色瘤、浆细胞瘤、以及蕈样肉芽肿的斑点和肿瘤和皮肤T-细胞淋巴瘤/白血病），也可用于治疗淋巴瘤（何杰金氏淋巴瘤或非何杰金氏淋巴瘤）。此外，如上所述，不论是单独使用或与放疗或其他化疗药物联合使用，这些化合物也可用于预防肿瘤的转移。

其他用途包括治疗和预防自体免疫疾病，如风湿病，免疫性或退化性关节炎，多种眼部疾病如糖尿病性视网膜病，早熟性视网膜病，角膜移植排异，晶体后纤维组织增生，新生血管性青光眼，因黄斑变性，缺氧引起的虹膜，角膜新血管形成，与感染或手术有关的血管生成，以及其他的眼部非正常的新血管形成；皮肤疾病如牛皮癣；血管疾病如血管瘤，以及动脉粥样化斑块中的毛细血管增殖，Osler-Webber综合症，心肌血管生成，斑块新血管形成，毛细血管扩张，血友病性关节，血管纤维瘤，和伤口颗粒化。其他用途包括治疗因过度或不正常地刺激内皮细胞所导致的疾病，此处不作界定，包括肠粘连，克罗恩氏病，动脉硬化症，硬皮病以及肥厚性瘢痕，即瘢痕疙瘩。其他用途作为避孕药物，抑制排卵和形成胎盘。本发明的化合物也可用于治疗这样一类疾病，其中疾病的发生产生了血管生

成现象，如猫抓病（*Rochelena nivalis quintosa*）和溃疡（*Helicobacter pylori*）。在手术，特别是治疗可切除的肿瘤之前，给药本发明的化合物可以减少出血。

本发明的方法是有效的，这部分是因为治疗对于血管生成具有高度的选择性而不作用于其他的生理过程。此外，本发明的化合物是强效的，使用剂量低，这也可以给治疗带来好处。

能够使血管生成变为病态的组织或器官（包括组织化的组织）包括皮肤、肌肉、内脏、结缔组织、关节、骨骼等组织，受到血管生成的刺激后血管能够侵入到这些组织中。本发明所采用术语“组织”也包含所有的体液、分泌物等，如血清、血液、脑脊髓液、血浆、尿、关节滑液、玻璃体液。

因此，在一个实施方案中，被治疗的组织是发炎的组织，所抑制的血管生成是在发炎的组织中造成新血管形成的发炎组织的血管生成。在这种情况下，本发明的方法试图抑制关节组织，如慢性关节风湿病病人的关节组织，免疫性或非免疫性发炎的组织，牛皮癣组织等中的血管生成。

理想地，本发明多种实施方案的治疗对象是人，虽然理论上本发明对于所有哺乳动物均有效，在本发明中将所有哺乳动物均归于“患者”范畴内。从这一角度讲，应当认为哺乳动物是指需要治疗血管生成的任何哺乳动物。例如，患者可以是猪、奶牛、马、山羊、绵羊、骡子、驴、狗、猫、兔、小鼠和大鼠。

在另一相关的实施方案中，被治疗的组织是糖尿病性视网膜病、黄斑变性、新生血管性青光眼患者的视网膜组织，所抑制的血管生成是在视网膜组织中造成新血管形成的视网膜组织的血管生成。

在另一相关的实施方案中，被治疗的组织是实体瘤、转移性病灶、皮肤癌、乳腺癌、血管瘤血管或纤维瘤等肿瘤患者的肿瘤组织，所抑制的血管生成是在肿瘤组织中造成新血管形成的肿瘤组织的血管生成。本发明方法所治疗的典型实体瘤组织包括肺癌、胰腺癌、乳腺癌、结肠癌、咽喉癌、

卵巢癌、卡波济氏肉瘤等组织。实施例中描述了示例性的肿瘤组织血管生成以及血管生成抑制。

肿瘤组织血管生成的抑制是一个特别优选的实施方案，因为新血管形成在肿瘤的生长中具有重要的作用。在缺乏新血管形成的肿瘤组织中，肿瘤组织不能获得所需的营养物质，其生长速度减缓，增大停止，衰退并且最终坏死，结果导致肿瘤被杀灭。通过抑制新血管形成的作用，本发明的方法对于肿瘤转移的形成也有抑制作用，这是因为（1）转移性病灶的形成需要母体肿瘤的血管生成，从而使转移的肿瘤细胞离开母体肿瘤，（2）在建立新的位点时转移的肿瘤细胞也需要新血管形成，以支持转移性病灶生长的需要。

在一相关的实施方案中，本发明试图将本发明的方法与其他方法，如作用于实体瘤并抑制肿瘤转移的常规化学疗法联合使用。典型地，在化疗期间或之后给药血管生成抑制剂，虽然在化疗完成后再抑制血管生成是更优选的，因为此时肿瘤组织正在诱导血管生成，通过向肿瘤组织提高血液和供应进行恢复，此时肿瘤组织对于毒性进攻是有响应的。此外，优选在手术切除实体瘤后执行抑制血管生成的方法，以防出现转移性病灶。

再狭窄是一种平滑肌细胞（SMC）在经皮经管冠状动脉成形术位点上迁移和增殖的过程，阻碍了手术的成功。在再狭窄期间与血管有关的SMC的迁移和增殖涉及可以被本发明方法所抑制的血管生成的过程。因此，本发明也试图在血管成形术后通过抑制血管生成相关的过程抑制再狭窄。对抑制再狭窄，典型地，在血管成形术后给药本发明的化合物2至28天，更优选地，在手术后给药约14天。

可以采用注射或滴注非肠道给药本发明的化合物。虽然典型的方法是通过全身性给药使药物进入被治疗的组织中，因而最常见的方法是静脉给药本发明的化合物，但是也可以尝试通过其他的组织或采用其他给药方法进行给药，目标组织也有可能含有靶向分子。因此，本发明的化合物，包括多肽及其衍生物，可以通过静脉、腹腔、皮下、腔内、经皮、局部、眼

内、口服、鼻腔等途径进行给药，也可以采用蠕动装置给药。

可以通过给药编码本发明化合物的合成基因实现本发明化合物的给药，其中在合成基因表达后产生了本发明的化合物。

本发明的药用组合物可以采用常规的静脉给药，如注射的方式进行给药。对于本发明的药用组合物而言，采用术语“单元剂量”指适用于作为单次剂量的物理上分立的单元，各单元含有预定数量的化学材料，与所需稀释剂，即载体或媒介一起产生所需的治疗效果。

本发明化合物的剂量范围依据化合物的形式以及随后将详细讨论的效能而定，其用量应大到产生所需的效果，使受血管生成调控的血管生成和症状减轻。剂量不能大到出现不良的副作用，如出现超高粘度综合症、肺气肿、充血性心力衰竭等。概括而言，本领域的技术人员可以根据病人的年龄，症状、性别和病情的不同来确定剂量。在出现并发症时也可以由医生来调整剂量。

对于人或哺乳动物，本发明化合物的每日总剂量（一次或分次使用）为例如每天0.0001至300 mg/kg体重，更优选为1至300 mg/kg体重。

检测方法

本发明的化合物也适用于监测组织中的血管生成。一旦与目标组织结合后，本发明的化合物可以被直接或间接地检测。对于包含一个可检测标记如荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属或诊断染料的化合物，可以直接进行检测。

此外，可以通过二级相互作用进行检测。例如，可以采用可检测的标记抗体监测化合物的位置。对于不同化合物，本领域的技术人员可以确定适用的二级抗体。

为进行体内检测，优选采用可检测的标记化合物。通过静脉、肌肉注射等方法对患者给药标记的化合物。特别优选为适用于在患者体内检测的标记。例如，顺磁性标记的化合物可以用核磁共振成像技术检测，放射性

标记的化合物也可以被检测出来。

以下为适用于检测的本发明实施方案的实例：

在一个实施方案中，本发明是一种监测组织中的血管生成的方法，其中将组织和本发明的化合物如Pexstatin与所述组织接触。在这种方法中，例如，所述组织为体外的和体内的组织，所述化合物通过静脉给药、经皮给药、滑膜内给药、肌肉给药、肿瘤内给药、眼内给药、鼻腔给药、鞘内给药、局部给药、口服等途径进行给药。此外，在这种方法中，所述化合物和荧光染料、放射性标记、顺磁性重金属、诊断染料或酶结合。在本方法的另一个实施方案中，组织和多肽接触的步骤包括对组织给药编码本发明多肽的合成基因，当基因表达后在组织中产生了本发明的多肽。

其他用途

本发明还提供检测本发明化合物的方法。因此，在一个实施方案中，本发明提供一种检测样品中本发明多肽的方法，其包括将样品和可与所述多肽结合或形成复合物的化合物接触足够长的时间，以生成复合物，检测这种复合物，如果检测到复合物就说明检测到了本发明的多肽。在这一实施方案中，结合本发明多肽的化合物可以是抗体。

此外，也可以用本发明的多肽制作亲和柱，用于纯化对于和本发明多肽抗血管生成活性有关的受体。众所周知，受体分离和纯化后可以得到氨基酸序列，以此可以鉴别和分离出编码受体的多聚核苷酸。这样就可以通过基因重组表达受体得到大量的受体，例如可以利用这些受体进行高通量筛选试验，以鉴别出其他的血管生成抑制剂。

为满足多种用途的需要，可以将本发明的化合物与同位素、酶、载体蛋白、细胞毒性药物、荧光分子、化学发光剂、生物发光剂和其他化合物化学偶联。例如，可以对多肽作标记，使检测其和抗血清结合能力的试验易于进行，或者使检测具有相关受体的细胞类型的试验易于进行。概括而言，以多肽中氨基酸中的官能团为基础选择偶联技术，所述官能团包括但

不限于氨基、巯基、羧基、酰胺基、苯酚基和咪唑基。可以采用多种试剂，包括戊二醛、dizodized benzidine、碳二亚胺和对苯醌。

采用适于具体偶联反应的技术确定偶联反应的效率。例如，采用氯胺T和高比活性的 NaI^{125} 可以实现用 I^{125} 标记多肽。采用偏亚硫酸氢钠终止反应并且在一次性的柱中对反应化合物进行脱盐。将标记的多肽从柱中洗脱下来并收集。对各份洗脱液取样，用 γ -计数器测量放射性。以此方式，所制得的标记多肽不含游离的 NaI^{125} 。

测量本发明化合物的试剂盒也是本发明的组成部分。可以采用最高效价和专一性的抗血清检测血浆、尿、组织和细胞培养基提取物中的本发明多肽，采用这种抗血清可以得到快速、可靠、灵敏以及专一性检测和定位本发明多肽的试剂盒。这种试剂盒可以采用（但不限于）以下技术：竞争性或非竞争性试验，放射免疫试验（RIA），生物发光和化学发光试验，荧光试验，sandwich技术，免疫放射技术，斑点印迹技术，包括ELISA的酶联免疫技术，微量滴定板，用于快速监测尿液或血液的涂布抗体的条或浸渍片，以及免疫细胞化学技术。可以采用本领域为人所熟知的方法确定各试剂盒的范围、灵敏度、精度、可靠性、专一性和重现性。

上述试剂盒可以包含使用说明、抗血清、一种或多种本发明的多肽、以及可能被放射标记的本发明多肽和/或用于沉淀多肽/抗体复合物的试剂。如本领域技术人员所熟知的那样，这种试剂盒可以用于检测具有肿瘤或不具有肿瘤的动物和人的体液或组织提取液中的本发明多肽。

本发明还试图提供一种可用于指示或定位本发明多肽在组织或细胞中分布的试剂盒。例如通过免疫组织化学技术和试剂盒，这些技术已为本领域的普通技术人员所熟知。这种试剂盒采用抗血清作用于本发明的多肽，以及可能的封闭性血清和连接荧光分子如异硫氰酸荧光素或一些用于指示一级血清的其他试剂的二级抗血清。利用这种方法可以检查肿瘤切片中多肽产生的位点和多肽受体的位点。此外，可以制作一种含有放射标记的核酸的试剂盒，这种核酸被用于原位杂化，以检测编码本发明化合物的

信使RNA。

所有参考文献均全文引用作为参考。

实施例

实施例1

全身性给药Pexstatin对于鸡胚胎中黑素瘤生长的影响作用

将CS-I黑素瘤细胞(5×10^6)接种在10天龄的鸡胚胎的鸡绒毛尿囊膜(CAM)上。24小时后对胚胎静脉注射50 μ g的Pexstatin或PBS空白对照。7天的温育期结束后,将肿瘤切除并测量其湿重。结果列于图1中。数据表示为每一条件下5—10个胚胎中肿瘤的平均重量 $\pm$ 标准偏差。

结论:如图1所示,与对照相比,全身性给药Pexstatin在7天内对于CS-I黑素瘤生长的抑制率约为60%。这些试验被重复了2至3次,结果基本类似。此外,在试验期间没有观察到毒副作用。这些试验结果说明在这一动物模型中Pexstatin是一种强效的抗肿瘤多肽。

实施例2

全身性给药Pexstatin对于裸鼠体内黑素瘤生长的影响作用

将M21人黑素瘤细胞(2×10^6)皮下注射至雌性裸鼠体内。24小时后每天对裸鼠静脉注射100 μ g的Pexstatin或PBS空白对照。每天用卡尺测量肿瘤的大小。结果列于图2中。数据表示为各时间点肿瘤的平均尺寸 $\pm$ 标准偏差。按下式估算肿瘤的体积: $V = L^2 \times W / 2$, 其中V=体积, L=长度, W=宽度。

结论:如图2所示,与对照相比,全身性给药Pexstatin对于M21人黑素瘤生长的抑制率约为80至90%。这些试验被重复了2次,结果基本类似。此外,在试验期间没有观察到毒副作用。这些试验结果说明在这一动物模型中Pexstatin是一种强效的抗肿瘤多肽。

实施例3

全身性给药Pexstatin对于体内血管生成的影响作用

A) 将用 β FGF饱和的过滤板置于在10天龄的鸡胚胎的鸡绒毛尿囊膜(CAM)上。24小时后对胚胎静脉注射50 μ g的Pexstatin或PBS空白对照。3天的温育期结束后,取出过滤板和周围的CAM组织,对过滤板区域内的血管分权点进行计数,定量评价血管生成。图3显示了典型试验中CAM组织的情况。

B) 图4显示了采用Pexstatin的血管生成试验的定量结果。数据表示为每一条件下5—10个胚胎中的平均值 $\pm$ 标准偏差。血管生成指数等于实验胚胎中血管分权点的数目减去不用 β FGF时CAM中血管分权点的数目。

结论:如图4所示,与对照相比,全身性给药50 μ g的Pexstatin抑制了 β FGF诱导出的血管生成,与对照相比,抑制率约为90%。重要的是在试验期间没有观察到对胚胎的毒副作用。此外,对于正常的休眠血管而言,这种MMP-2的肽片断即使是有作用,其作用也非常小。

实施例4

Pexstatin对于体内B16黑素瘤转移的影响作用

采用鸡胚胎肿瘤转移模型评价Pexstatin对于体内B16黑素瘤转移的影响作用。简而言之,在12天龄的鸡胚胎中接种B16黑素瘤细胞(2.5×10^4)和静脉注射的Pexstatin(10 μ g/胚胎)或对照多肽。此外,还增加一个未作处理的对照(NT)。7天的温育期结束后,将胚胎处死并取出肺作分析。对于每个肺叶上的黑素瘤病变进行计数。结果列于图5中。数据表示为每一条件下5—10个胚胎中转移性病灶的平均数目 $\pm$ 标准偏差。

结论:如图5所示,与对照相比,Pexstatin对于B16黑素瘤转移的抑制率约为80%。事实上在一些胚胎中未检测到肿瘤,或者即使检测到了其数目也很少。由于肿瘤转移试验中不大可能涉及血管生成,这些结果说明Pexstatin对于肿瘤细胞侵入和内皮细胞侵入有作用。综合起来看,这些试

验数据证明Pexstatin在体内具有强烈的抗肿瘤转移的作用，为Pexstatin用于人的临床试验提供了进一步的证据。

实施例5

Pexstatin在完整MMP-2中的相对位置的概述

完整MMP-2的晶体结构已经被测定。图6显示了Pexstatin的相对位置（氨基酸582—590），位于MMP-2中血液结合素域中的环状结构中。图中Pexstatin被表示为项目1。

所有在本发明中被引用的出版物均全文引用作为参考。

应该认识到以上的发明描述仅起描述和解释作用，而不适用于对本发明进行精确的界定。同时也应该认识到在不背离本发明的精神的基础上，本领域的技术人员可以对本发明作改动。本发明的范围应由以下权利要求来界定。

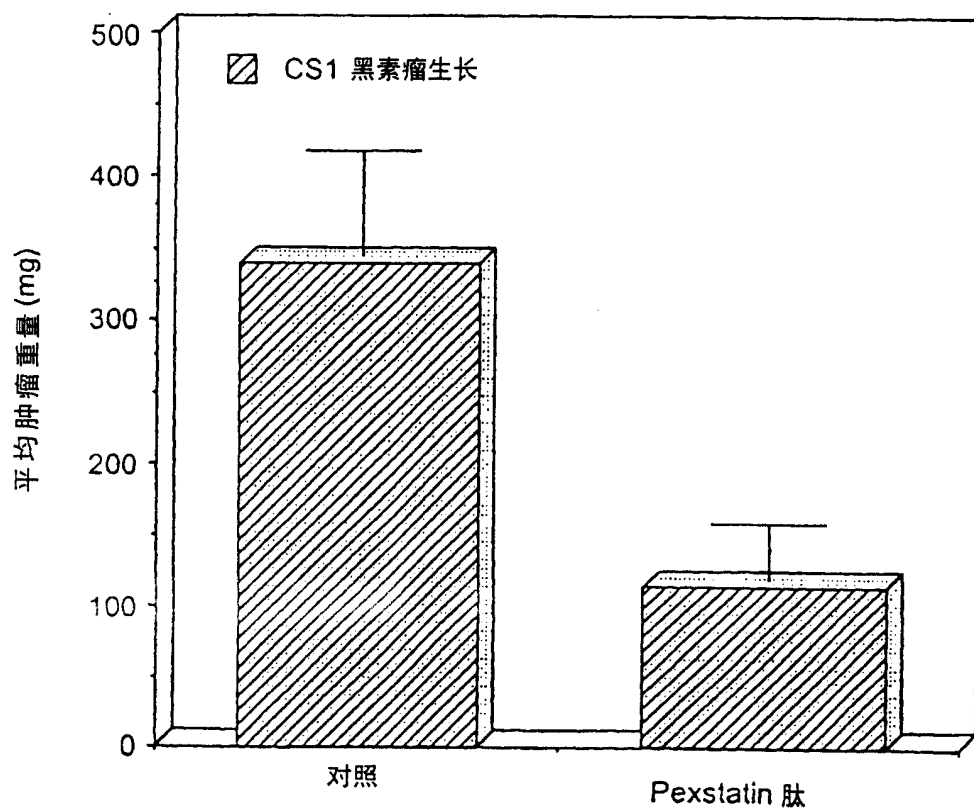


图1

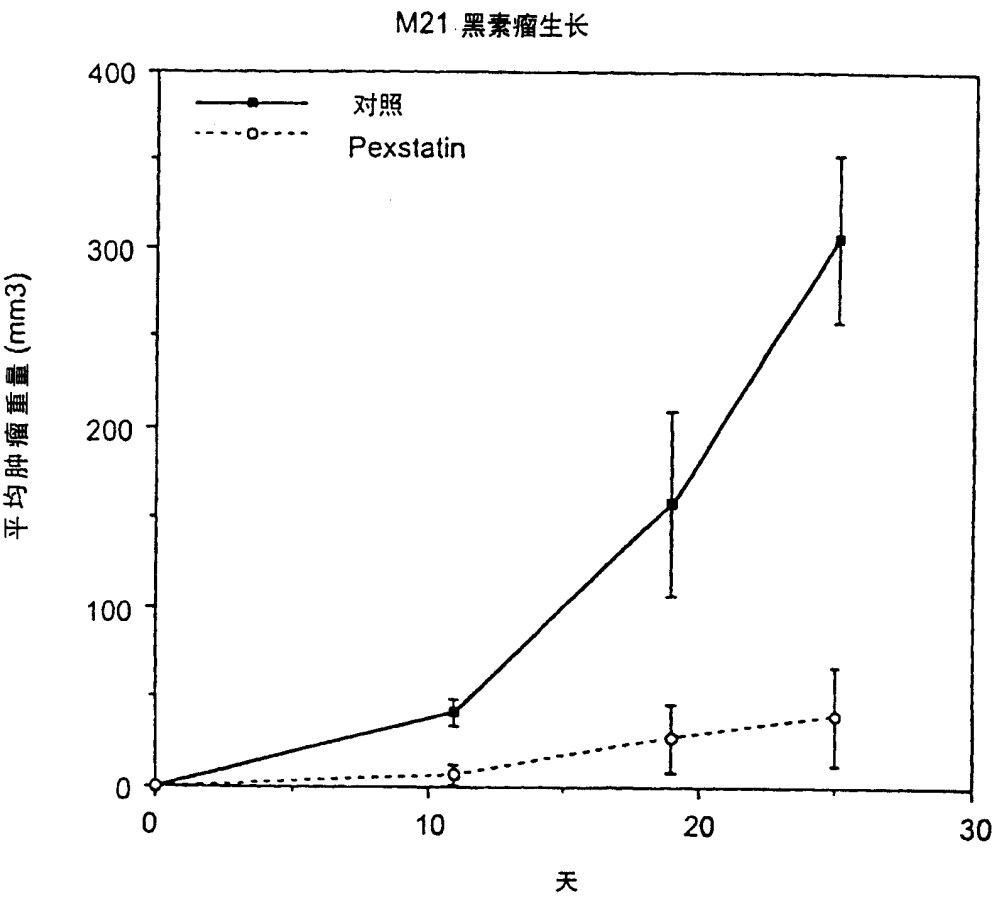
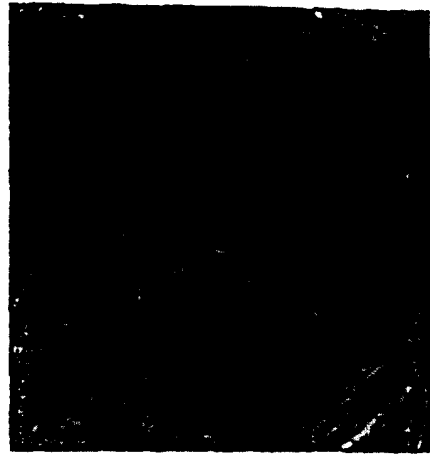


图2

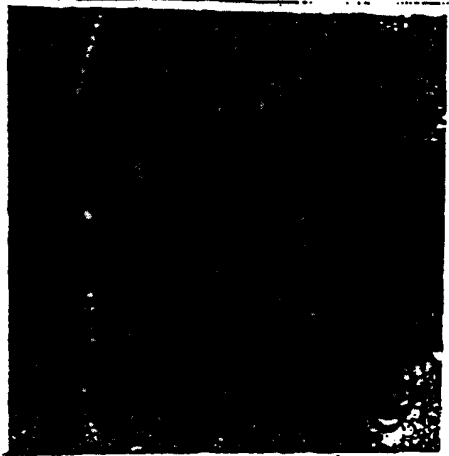
Pexstatin(MMP-2衍生肽) 对血管生成的作用



无治疗



bFGF



Pexstatin



对照肽

图3

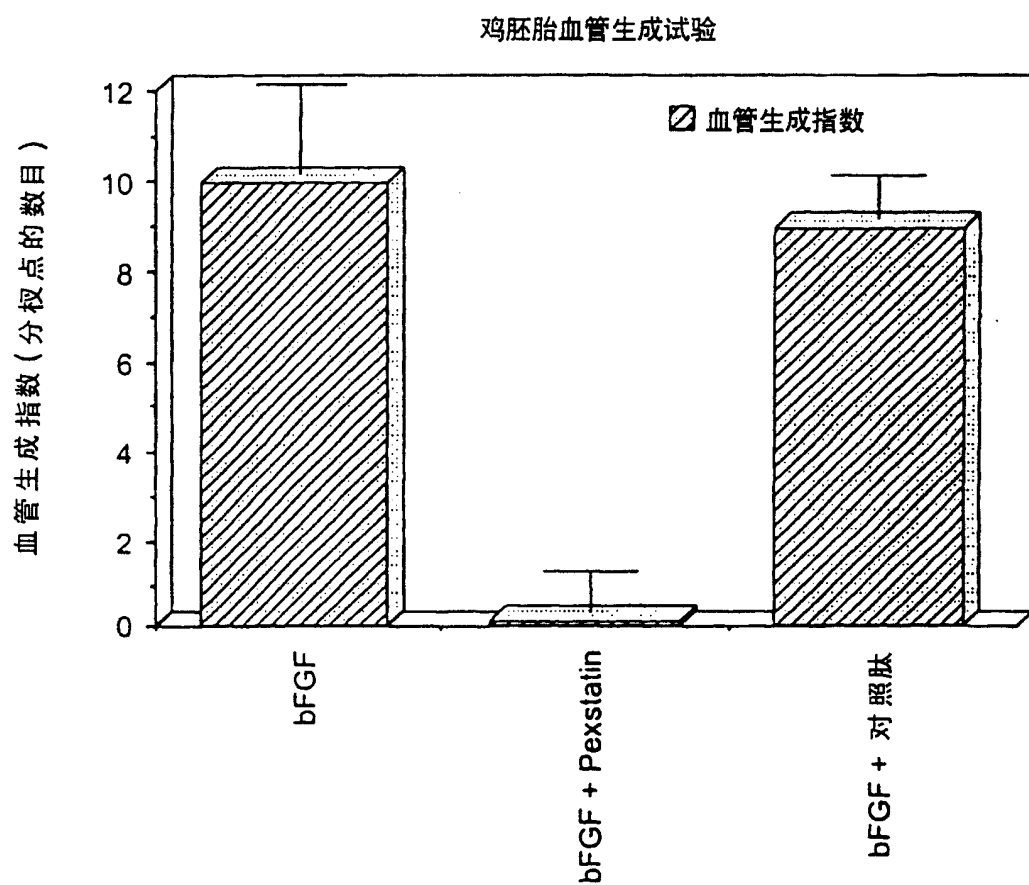


图4

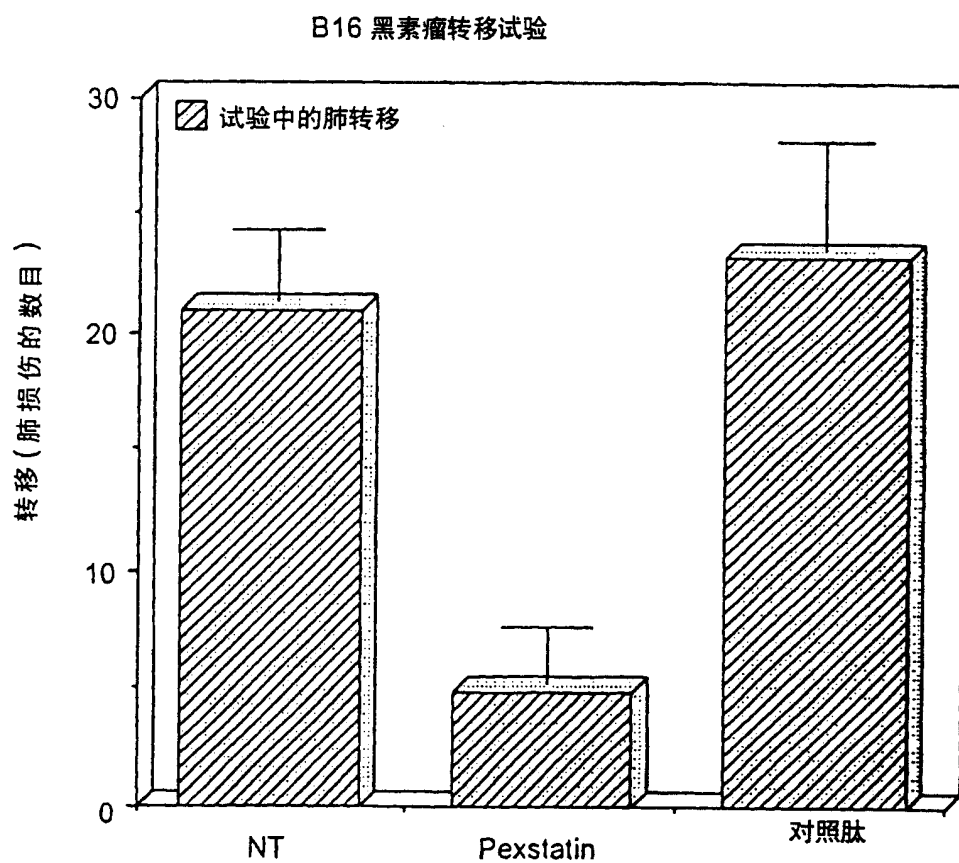


图5