(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
A61K 39/395
C07K 16/00
C07K 16/18
C07K 16/28

(45) 공고일자 2002년10월18일
(11) 등록번호 10-0327081
(24) 등록일자 2002년02월21일

(21) 출원번호	10-1996-0705163	(65) 공개번호	특1997-0701564
(22) 출원일자	1996년09월18일	(43) 공개일자	1997년04월12일
번역문제출일자	1996년09월18일		
(86) 국제출원번호	PCT/US1995/03035	(87) 국제공개번호	WO 1995/25543
(86) 국제출원일자	1995년03월09일	(87) 국제공개일자	1995년09월28일
(81) 지정국	국내특허 : 기네 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 체코 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로바키아 우크라이나 베트남 중국 에스토니아 그루지야 AP ARIPO특허 : 말라위 수단 케냐 EA 유라시아특허 : 벨라루스 카자흐스탄 러시아 아르메니아 키르기즈 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 코트디브와르		

(30) 우선권주장 08/210,715 1994년03월18일 미국(US)
08/366,665 1994년12월30일 미국(US)

(73) 특허권자 더 스크립스 리서치 인스티튜트
미국 캘리포니아주 92037 라 졸라 노스 토리 파인 로드 10550
(72) 발명자 브룩스 피터
미국 캘리포니아주 92122 샌 디에고 레본 드라이브 3550 아파트 먼트 6113
체르쉬 데이비드 에이
미국 캘리포니아주 92007 카디프 씨 빌리지 서클 2108
(74) 대리인 이병호

심사관 : 한형미

(54) 혈관형성억제에유용한조성물

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 일반적으로 의약 분야에 관한 것이고, 구체적으로 비트로넥틴 수용체 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용하여 조직의 맥관형성을 억제하는 방법 및 이를 위한 조성물에 관한 것이다.

배경기술

<2> 인테그린은 세포의 매트릭스 단백질에 결합함으로써 일반적으로 세포 접촉으로 언급되는 세포-세포 및 세포-세포외 매트릭스 상호작용을 매개하는 것으로 공지된 세포성 수용체의 한 부류이다. 그러나, 비록 많은 인테그린 및 인테그린에 결합하는 리간드가 문헌에 서술되어 있으나, 많은 인테그린의 생물학적 작용은 알려지지않은 채 남겨져 있다. 인테그린 수용체는 α 및 β 서브단위로 형성된 비공유결합된 헤테로이량체 당단백질 복합체의 구조적인 특징을 갖는 단백질군을 구성한다.

<3> 비트로넥틴에 우선적으로 결합하는 이의 본질적인 특성으로 명명된 비트로넥틴 수용체는 $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$로 정의된 3개의 상이한 인테그린을 언급하는 것으로 현재 공지되어 있다[참조: Horton, Int. J. Exp. Pathol.. 71: 741-759 (1990)]. $\alpha_v\beta_1$은 피브로넥틴 및 비트로넥틴에 결합한다. $\alpha_v\beta_3$은 피브린, 피브리노겐, 라미닌, 트롬보스폰딘, 비트로넥틴, 본 빌레브란트 인자, 오스테오스폰틴 I 및 골시알로프로테인 I을 포함하는 많은 다양한 리간드에 결합한다. $\alpha_v\beta_5$는 비트로넥틴에 결합한다. 조직내에서 이들 3종류의 인테그린이 많은 세포 상호작용에서 기능하는 특수한 세포 접촉은 여전히 연구중이나, 상이한 생물학적 작용을 하는 상이한 인테그린이 존재하는 것은 분명하다.

<4> 많은 인테그린에 대한 리간드에서의 하나의 중요한 인식 위치는 아르기닌-글라이신-아스파르트산(RGD) 트리펩타이드 서열이다. RGD는 비트로넥틴 수용체 인테그린에 대해 확인된 모든 리간드에서 발견된다. 이 RGD 인식 위치는 RGD 서열을 함유하는 폴리펩타이드("펩타이드")에 의해 모방될 수 있고 이러한 RGD 펩타이드는 인테그린 작용의 억제제로서 공지되어 있다. 그러나. RGD 펩타이드의 서열 및 구조에 의

존하여, 억제의 특이성은 표적인 특정 인테그린에 따라 변화할 수 있다는 것을 주목하는 것이 중요하다.

<5> RGD 인식 위치에 대하여 문헌[참조: Pierschbacher et al., Nature, 309:30-33 (1984), and Pierschbacher et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5985-5988 (1984)]이 논의하고 있다. 인테그린의 특이성을 변경하는 다양한 RGD 폴리펩타이드는 또한 문헌[참조: Grant et al., Cell, 58: 933-943 (1989), Cheresh. et al., Cell. 58: 945-953 (1989), Aumailley et al., FEBS Letts., 291: 50-54 (1991) 및 Pfaff et al., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238 (1994)] 및 미합중국 특허번호 제4,517,686호, 제4,578,079호, 제4,589,881호, 제4,614,517호, 4,661,111호, 제4,792,525호, 제4,683,291호, 제4,879,237호, 제4,988,621호, 제5,041,380호 및 제5,061,693호에서 서술되어 있다.

<6> 맥관형성은 조직내로 새로 발달한 혈관이 성장하는 것을 포함하는 조직 혈관신생의 과정이고, 또한 신생혈관생성(neo-vascularization)으로 불리운다. 이 과정은 표피 세포 및 평활근 세포의 침윤에 의해 매개된다. 이 과정은 다음 세가지중의 임의의 하나로 진행하는 것으로 여겨진다: 혈관이 이미 존재하는 혈관으로부터 뻗어나오거나, 혈관의 새로운 발달이 전구체 세포로부터 발생하거나(혈관생성), 존재하는 소 혈관의 직경이 확장하는 것이다[참조: Blood et al., Bioch. Biophys. Acta, 1032: 89-118 (1990)]. 혈관 표피 세포는 비트로넥틴 수용체($\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), 콜라겐 I형 및 IV형 수용체($\alpha_1\beta_1$), 라미닌 수용체($\alpha_2\beta_1$), 피브로넥틴/라미닌/콜라겐 수용체($\alpha_3\beta_1$) 및 피브로넥틴 수용체($\alpha_5\beta_1$)을 포함하는 5종류의 RGD-의존성 인테그린중 하나 이상을 함유하는 것으로 공지되어 있다[참조: Davis et al., J. Cell. Biochem., 51: 206-218 (1993)]. 평활근은 $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_v\beta_5$를 포함하는 6종류 이상의 RGD-의존성 인테그린을 함유하는 것으로 공지되어 있다.

<7> 맥관형성은 신생아 성장에서 중요한 과정이기도 하나, 상처 치유에서 및 조직 염증, 관절염, 종양 성장, 당뇨병성 망막염, 망막 등의 혈관신생 상태에 의한 황반 퇴화를 포함하는 많은 다양한 임상학적 질환의 병인론에서 또한 중요하다. 맥관형성과 연관된 이들 임상학적 증후는 맥관형성 질환으로 불리운다[참조:Folkman et al., Science, 235: 442-447 (1987)]. 맥관형성은 일반적으로 성인 또는 성숙한 조직에서는 존재하지 않으나 상처 치유 및 코르페우스 루템(corpeus leutem) 성장 주기에서 발생한다[참조: Moses et al., Science, 248: 1408-1410(1990)].

<8> 맥관형성의 억제는 종양 성장을 제한하기 위해 유용한 치료법인 것으로 제안되었다. 맥관형성은 (1)βFGF(섬유아세포 성장 인자)와 같은 "맥관형성 분자"의 방출의 억제, (2)항-βFGF 항체의 사용과 같은 맥관형성 분자의 중화 및 (3)맥관형성 자극에 대한 표피 세포 반응의 억제에 의해 억제될 수 있다고 제안되었다. 이 문헌의 전략은 주목을 받았고. 문헌[참조: Folkman et al., Cancer Biology, 3:89-96 (1992)]에는 콜라게나아제 억제인자, 기저막 회전 억제인자, 지혈성 스테로이드, 진균류-유도된 맥관형성 억제인자, 혈소판 인자 4, 트롬보스폰딘, 관절염 약제(예:D-페니실라민 및 금 티오말레이트), 비타민 D_3 유사체, 알파-인터페론 및 맥관형성을 억제하기위해 사용될 수 있는 것 등을 포함하는 몇몇 표피 세포 반응 억제인자가 서술되어 있다. 추가로 제안된 맥관형성의 억제인자는 문헌[참조: Blood et al., Bioch. Biophys. Acta. 1032: 89-118 (1990), Moses et al., Science, 248: 1408-1410 (1990). Ingber et al., Lab. Invest., 59: 44-51 (1988)] 및 미합중국 특허 제5,092,885호, 제5,112,946호, 제5,192,744호 및 제5,202,352호에 서술되어 있다. 상기 참조문헌에서 서술된 맥관형성의 억제인자중 어느 것도 $\alpha_v\beta_3$의 억제를 위해 표적화되지 않는다.

<9> 비트로넥틴 수용체 $\alpha_v\beta_3$를 억제하는 RGD-함유 펩타이드가 또한 서술된다[참조: Aumailley et al., FEBS Letts., 291: 50-54 (1991), Choi et al., J. Vasc. Surg., 19: 125-134 (1994), Smith et al., J. Biol. Chem., 265: 12267-12271 (1990) 및 Pfaff et al., J. Biol. Chem. 269: 20233-20238 (1994)]. 그러나, 맥관형성에서 인테그린 $\alpha_v\beta_3$의 역할은 본 발명이 이루어지기까지 제안되거나 확인되지 않았다.

<10> 다양한 인테그린 α 또는 β 서브단위에 대해 면역특이적인 모노클로날 항체를 사용한 시험관내 세포 접촉의 억제는 미세혈관 표피 세포를 포함하는 다양한 세포 유형의 세포 접촉에서 $\alpha_v\beta_3$가 연루되어 있다는 것을 밝혔다[참조: Davis et al., J. Cell. Biol., 51: 206-218 (1993)]. 또한 문헌[참조: Nicosia, et al., Am. J. Pathol., 138: 829-833 (1991)]은 콜라겐 겔에서 배양된 래트 대동맥으로부터의 "미세혈관"의 형성을 억제한다는 것을 서술하고 있다. 그러나, 미세혈관 구조는 모세관 발생과 동일하거나 콜라겐 겔 배양물에서 미세혈관의 형성이 관절염 조직, 종양 조직 또는 맥관형성의 억제가 바람직한 질병 조직과 같은 원 조직내로 신생맥관 성장과 동일한 것으로 보이지 않기 때문에 콜라겐 겔 배양물에서 시험관내 "미세혈관"의 형성 억제는 조직내에서 맥관형성의 억제에 대한 모델이 아니다.

<11> 그러므로, 본원에서 보고된 연구이외에, 출원인은 맥관형성이 세포 접촉의 억제인자를 사용하여 조직내에서 억제될 수 있다는 또 다른 어떤 증거에 대해 알지못한다. 특히, $\alpha_v\beta_3$ 기능이 조직에서의 맥관형성을 위해 요구되거나 $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 조직에서 맥관형성을 억제할 수 있다는 것도 입증되지 않았다.

<12> 발명의 간단한 설명

<13> 본 발명은 조직내 맥관형성이 인테그린 $\alpha_v\beta_3$을 필요로 하고 $\alpha_v\beta_3$ 의 억제인자가 맥관형성을 억제할 수 있다는 증거를 기술한다. 본 명세서는 또한 기타 인테그린(예: $\alpha_v\beta_5$ 또는 $\alpha_v\beta_1$)의 길항제가 아마 이들 기타 인테그린이 맥관형성의 유발에 필수적인 것이 아니기 때문에 맥관형성을 억제하지 않는다는 것을 또한 증명한다.

<14> 그러므로 본 발명은 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 맥관형성-억제량을 포함하는 조성물을 조직에 투여하는 것을 포함하는 조직내 맥관형성을 억제하는 방법을 서술하고 있다.

<15> 치료되어야 할 조직은 맥관형성의 억제가 바람직한 임의의 조직, 즉, 혈관 신생이 일어나는 질병

조직일 수 있다. 이 조직의 예는 염증 조직, 고형 종양, 전이조직, 재발협착증 조직등을 포함한다.

<16> 본 발명의 방법에 사용하기 위한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 $\alpha_v\beta_3$에 결합할 수 있고 천연 리간드에 결합하는 $\alpha_v\beta_3$의 능력을 경쟁적으로 억제할 수 있다. 바람직하게, 길항제는 기타 인테그린보다는 $\alpha_v\beta_3$에 대해 특이성을 보인다.

<17> 특히 바람직한 실시양태에서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 피브리노겐 또는 기타 RGD-함유 리간드가 $\alpha_v\beta_3$에 결합하는 것을 억제하나 실질적으로는 피브리노겐이 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 결합하는 것을 억제하지는 않는다. 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 $\alpha_v\beta_3$와 면역반응 하는 폴리펩타이드 또는 모노클로날 항체 또는 이의 작용성 단편일 수 있다.

<18> [도면의 간단한 설명]

<19> 본 명세서의 일부분을 이루는 도면에서, 도 1a 내지 1d는 정상적인 피부 및 육아(granulation) 조직으로 지칭된 상처 치유과정에 있는 피부에서 인테그린 서브단위 β_3 및 β_1의 조직 분포를 예시한다. β_3 및 β_1에 대한 항체로의 면역조직화학을 실시예 3A에서 서술된 바와 같이 수행한다. 도 1a 및 1b는 각각 정상적인 피부 및 육아 조직에서 항-β_3의 면역반응성을 예시한다. 도 1c 및 1d는 각각 정상적인 피부 및 육아 조직에서 항-β_1의 면역반응성을 예시한다.

<20> 도 2a 및 2d는 정상적인 피부 및 육아 조직으로 지칭된 상처 치유 과정에 있는 피부에서 각각 인테그린 서브단위, β_3 및 β_1에 결합하는 본 빌레브란트 인자 및 라디닌 리간드의 조직 분포를 예시한다. 본 빌레브란트 인자(항-vWF) 및 라미 닌(항-라미닌)에 대한 항체로의 면역조직화학을 실시예 3B에서 서술된 바와 같이 수행한다. 도 2a 및 2b는 각각 정상적인 피부 및 육아 조직에서 항-vWF의 면역반응성을 예시한다. 도 2c 및 2d는 각각 정상적인 피부 및 육아 조직에서 항-라미닌의 면역반응성을 예시한다.

<21> 도 3a 내지 3d는 각각 방광암, 직장암, 유방암 및 폐암의 생검 조직에서 비트로넥틴 인테그린 수용체인 $\alpha_v\beta_3$의 조직 분포를 예시한다. $\alpha_v\beta_3$에 대한 LM609 항체로의 면역조직화학을 실시예 3C에서 서술되는 바와 같이 수행한다.

<22> 도 4는 비처리된 10일된 병아리 배에서 혈관이 전혀없는 본 발명의 CAM의 통상적인 현미경사진을 예시한다. 제제를 실시예 5B에서 서술한다.

<23> 도 5a 내지 5c는 본 발명의 CAM 제제에서 인테그린 β_1 및 $\alpha_v\beta_3$의 조직 분포를 예시한다. 도 5a는 CSAT, 항-β_1 항체로의 면역형광 면역반응에 의해 검출되는 비처리된 10일된 CAM 제제에서 β_1 서브단위의 분포를 보여준다. 도 5b는 LM609, 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체로의 면역형광 면역반응에 의해 검출되는 비처리된 10일된 CAM 제제에서 $\alpha_v\beta_3$ 수용체의 분포를 보여준다. 도 5c는 LM609, 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체로의 면역형광 면역반응에 의해 검출되는 바와 같은 βFGF 처리된 10일된 CAM 제제에서 $\alpha_v\beta_3$ 수용체의 분포를 보여준다. 치료 및 결과는 실시예 5C에 서술한다.

<24> 도 6은 실시예 6A에서 서술된 바와 같이 비처리된 것과 βFGF 처리된 10일된 CAM에서 $\alpha_v\beta_3$ 및 β_1의 상대적인 발현은 막대 그래프로 정량화하여 예시한다. 평균 형광 강도를 Y-축에 플롯하고 인테그린 프로파일을 X-축에 플롯한다.

<25> 도 7a 내지 7c는 실시예 6A에서 서술된 방법 및 결과인, 비처리된 10일된 CAM, βFGF 처리된 CAM 및 TNFα 처리된 CAM의 외관을 각각 예시한다.

<26> 도 8a 내지 8e는 실시예 7A1)에서 서술된 바와 같은 10일된 CAM에서 FGF-유도된 맥관형성에 대한 국소적인 항체 치료의 효과를 예시한다. 도 8a는 혈관이 없는 비처리된 CAM 제제를 보여준다. 도 8b는 βFGF 처리로 유도된 혈관계가 없는 영역내로 새로운 혈관계의 침윤을 보여준다. 도 8c, 8d 및 8e 각각은 β_1(항-β_1; CSAT), $\alpha_v\beta_5$(항-$\alpha_v\beta_5$;P3G2) 및 $\alpha_v\beta_3$(항-$\alpha_v\beta_3$; LM609)에 대한 항체의 효과를 보여준다.

<27> 도 9a 내지 9c는 실시예 7D2)에서 서술된 바와 같은 종양에 의해 유도되는 맥관형성에 대한 합성 펩타이드 66203의 정맥 주입의 효과를 예시한다. 도 9a는 종양 유도로 인한 맥관형성에 대한 대조군 펩타이드로의 정맥 처리는 억제 효과가 없음을 보여준다. 펩타이드 66203(사이클릭 RGD 종양)의 정맥 주입에 의한 이러한 맥관형성의 억제는 도 9b에 보여준다. 종양-치료 영역에 인접한 영역에서 펩타이드 66203을 정맥 주입하여도 이미 존재하는 성숙한 혈관에 대해서는 억제 효과 또는 세포독성이 없음을 도 9c(사이클릭 RGD에 인접한 CAM)에 보여준다.

<28> 도 10a 내지 10c는 실시예 7B1)에서 서술된 바와 같은 성장 인자 유도된 맥관형성에 대한 모노클로날 항체의 정맥내 투여의 효과를 예시한다. 도 10a는 항체 처리에 노출되지않은 βFGF-유도된 맥관형성(대조군)을 보여준다. 도 10b에서 보이는 바와 같이 유사한 제제를 항-$\alpha_v\beta_5$ 항체 P3G2로 처리한 경우 맥관형성의 억제를 일으키지 않았다. 도 10c에서 보이는 바와 같이 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체 LM609의 처리로 맥관형성이 억제되었다.

<29> 도 11a 내지 11c는 실시예 7C에서 서술된 바와 같이 항-인테그린 항체의 국소 투여후의 배 맥관형성에 대한 효과를 예시한다. 맥관형성은 도 11a 및 11b에서 각각 나타낸 항-β_1 및 항-$\alpha_v\beta_5$로 CAM을 6일 처리해도 억제되지 않는다. 오히려, 도 11c에서 보이는 바와 같이 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체 LM609로의 처리는 혈관 형성의 억제를 일으킨다.

<30> 도 12는 실시예 7D1)에서 서술된 바와 같이 CAM 제제에서 종양화되는 혈관의 수의 정량화를 예시한다. 그래프는 CSAT(항-β_1), LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 및 P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)중 어느 것을 국소 투여한 결과를 Y-축

상에 플롯함으로써 혈관의 수를 보여준다.

<31> 도 13a 내지 13d는 실시예 9A1)a에서 서술된 바와 같이 초기 종양 중량과 처리된지 7일후 습윤 종양 중량을 비교하여 예시한다. 각 막대는 그룹당 5 내지 10 종양의 평균±표준편차를 나타낸다. 종양은 사람 흑색종(M21-L)(도 13a), 췌장암 (Fg)(도 13b), 폐암(UCLAP-3)(도 13c) 및 후두암(HEp3)(도 13d) CAM 제제로부터 유도되고 PBS, CSAT(항-β_1) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 정맥내로 처리된다. 이 그래프는 Y-축에 종양 중량을 플롯하고 X-축상에 CSAT(항-β_1), LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 PBS중 어느 것을 정맥 투여한 결과를 플롯한다.

<32> 도 14a 및 14b는 실시예 9A1)a에서 서술된 바와 같이 P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)(도 14a) 및 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)(도 14b)로 처리되고 헤마톡실린 및 에오신으로 염색된 종양의 조직학적 절편을 예시한다. 도 14a에서 보이는 바와 같이 대조군 항체(P3G2)로 처리된 종양은 유사분열도(화살표의 촉) 및 다수의 혈관(화살)으로 나타나는 바와 같은 다수의 생존가능하고 활동적으로 분열하는 종양 세포를 보여준다. 대조적으로 도 14b에서 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)으로 치리된 종양에서는 생존가능한 종양 세포 또는 혈관은 거의 검출되지 않는다.

<33> 도 15a 내지 15e는 실시예 9A1)b에서 서술되는 바와 같은 펩타이드로 처리된 M21L 종양에 상응하고 하기와 같다: 도 15a는 대조군 사이클릭 RGD 펩타이드 (69601)로 처리된 것이고: 도 15b는 사이클릭 RGD 펩타이드(66203)로 처리된 것이고, 도 15c는 사이클릭 RGD 펩타이드(66203)로 처리된 동일한 배로부터 취한 인접한 CAM 조직이고; 도 15d는 대조군 R4D(69601)로 처리된 고 배율(×13)의 종양이고: 도 15e는 사이클릭 RGD 펩타이드(66203)로 처리된 고 배율(×13)의 종양이다. 도 15d는 RAD 대조군 펩타이드(69601)로 처리된 종양으로부터의 정상 혈관을 도시한다. 도 15e는 사이클릭 RGD 펩타이드(66203)로 처리된 종양(화살표)으로부터 파괴된 혈관의 예를 도시한다.

<34> 도 16a 내지 16e는 실시예 10에서 서술된 바와 같은 생체내에서 래빗 눈 모델 검정에서 맥관형성의 길항제에 의한 맥관형성의 억제를 나타낸다. 도 16a 및 16b는 βFGF 및 mAb P1F6(항-$\alpha_v\beta_5$)의 존재하에서 래빗 눈의 맥관형성의 억제를 도시한다. 도 16c, 16d 및 16e는 βFGF 및 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)의 존재하에서 래빗 눈의 맥관형성의 억제를 도시한다.

<35> 도 17은 실시예 11A에서 서술된 바와 같이 생체내에서 마우스:사람 키메라 마우스 모델이 어떻게 생성되는가 하는 흐름 도표를 나타낸다. SCID 마우스로부터의 피부의 일부분을 사람 신생아 포피로 대체하고 4주 동안 치유한다. 이식이 치유된 후 사람 포피를 사람 종양 세포와 접목한다. 4주동안 사람 피부로부터 사람 종양내로 성장하는 사람 혈관계와 함께 사람 종양으로 이루어진 측정가능한 종양이 나타난다.

<36> 도 18은 실시예 12a 및 실시예 12b에서 각각 서술되는 바와 같이 mAb-처리 된 및 펩티-이드-처리된 CAM으로부터 유도되고 FACS 분석으로부터 측정되는 바와 같은 어팝 태그(Apop Tag)으로 염색된 단일 세포의 퍼센트를 예시한다. 검은 막대 및 점 막대는 각각 검정에 앞서 24시간 및 48시간 처리된 배로부터의 세포를 나타낸다. 각 막대는 3종류의 복제물의 평균±표준편차를 나타낸다. CAM은 실시예 12A2)에서 서술된 바와 같이 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 CSAT(항-β_1) 또는 PBS로 처리된다. CAM은 실시예 12B와 같이 또한 사이클릭 펩타이드 66203(사이클로-RGDfV, 펩타이드 203으로 나타냄) 또는 대조군 사이클릭 펩타이드 69601(사이클로-RADfV, 펩타이드 601로 나타냄)으로 처리된다.

<37> 도 19a 및 19b는 CSAT(항-β_1)(도 19a) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)(도 19b)로 처리되고 어팝 태그 및 프로피듐 요오드로 염색되고 실시예 12C와 같이 FACS로 분석한 배로부터의 CAM의 단일 세포 현탁액의 조합된 결과를 예시한다. Y 축은 세포의 수로서 표시된 어팝 태그 염색을 나타내고(세포사멸), X 축은 프로피듐 요오드 염색을 나타낸다(DNA 양). 수평선은 어팝 태그 염색을 위한 음성 게이트를 나타낸다. 왼쪽 및 오른쪽 패널은 각각 CSAT(항-β_1)(도 19a) 및 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)(도 19b)로 처리된 배로부터의 CAM 세포를 의미한다. 세포 주기 분석을 조건마다 대략 8,000회 분석을 수행한다.

<38> 도 20a 내지 20c는 CSAT(항-β_1)처리된 배로부터의 CAM 조직을 나타내고 도 20d 내지 도 20f는 실시예 12C에서 서술된 바와 같이 제조된 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 처리된 배로부터의 CAM 조직을 나타낸다. 도 20a 및 도 20d는 어팝 태그으로 염색되고 D.I.C. 이미지상에 겹쳐놓은 형광(FITC)으로 가시화된 조직을 도시한다. 도 20b 및 20e는 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)으로 염색되고 형광(로다민)에 의해 가시화된 동일한 조직을 도시한다. 도 20c 및 도 20f는 황색 염색이 공위치 측정을 나타내는 어팝 태그 및 LM609로 염색된 동일한 조직의 합친 이미지이다. 막대는 각각 왼쪽 및 오른쪽 패널에서 15 및 50㎛을 나타낸다.

<39> [발명의 상세한 설명]

<40> A. 정의

<41> 아미노산 잔기: 아미노산은 이의 펩타이드 연결부에서 폴리펩타이드의 화학적 절단(가수분해)에 의해 형성된다. 본원에서 서술된 아미노산 잔기는 바람직하게는 "L" 이성체형이다. 그러나 바람직한 작용성이 폴리펩타이드에 의해 유지되는 한 "D" 이성체형의 잔기는 임의의 "L" 이성체로 치환될 수 있다. NH_2는 폴리펩타이드의 아미노산 말단에 존재하는 유리 아미노 그룹을 의미한다. COOH는 폴리펩타이드의 카복시 말단에 존재하는 유리 카복시 그룹을 의미한다. 표준 폴리펩타이드 명명법[문헌참조: J. Biol. Chem., 243: 3552-59 (1969) and adopted at 37 CFR § 1 822(b)(2)]에 따라, 아미노산 잔기에 대한 약어는 하기의 표에 나타낸다.

약어		아미노산
1자	3자	
Y	Tyr	타이로신
G	Gly	글라이신
F	Phe	페닐알라닌
M	Met	메티오닌
A	Ala	알라닌
S	Ser	세린
I	Ile	이소루이신
L	Leu	루이신
T	Thr	트레오닌
V	Val	발린
P	Pro	프롤린
K	Lys	라이신
H	His	히스티딘
Q	Gln	글루타민
E	Glu	글루탐산
Z	Glx	글루타민 및/또는 글루탐산
W	Trp	트립토판
R	Arg	아르기닌
D	Asp	아스파르트산
N	Asn	아스파라긴
B	Asx	아스파르트산 및/또는 아스파라긴
C	Cys	시스테인
X	Xaa	알려지지않음/기타
또한 하기 의미이다.		
BOC		3급-부틸옥시카보닐
DCCI		디사이클로헥실카보디이미드
DMF		디메틸포름아미드
OMe		메톡시
HOBt		1-하이드록시벤조트리아졸

<43> 모든 아미노산 잔기 서열은 본원에서 왼쪽 및 오른쪽 방향이 아미노-말단으로부터 카복시-말단의 통상적인 방향인 식에 의해 나타낸다는 것을 주목해야 한다. 아미노산 잔기 서열의 시작 또는 끝에서 대시(dash)는 하나 이상의 아미노산 잔기의 추가 서열에 결합하는 펩타이드를 의미한다.

<44> 폴리펩타이드: 폴리펩타이드는 인접하는 아미노산 잔기의 알파-아미노 그룹과 카복시 그룹간의 펩타이드 결합에 의해 서로 연결된 아미노산 잔기의 선형 연결물을 의미한다.

<45> 펩타이드: 본원에서 사용된 바와 같이 펩타이드는 폴리펩타이드에서와 같이 서로 연결된 약 50개 이하의 아미노산 잔기의 선형 연결물을 의미한다.

<46> 사이클릭 펩타이드: 사이클릭 펩타이드는 상응하는 선형 펩타이드로부터 유도된 것으로, 유리 N- 또는 C-말단이 존재하지않는 펩타이드를 의미하고, 상응하는 선형 펩타이드의 N-말단이 상기 상응하는 선형 펩타이드의 C-말단 카복실레이트와 아미드 결합을 형성한 것이다.

<47> 단백질: 단백질은 폴리펩타이드에서와 같이 서로 연결된 50개 이상의 아미노산 잔기의 선형 연결물을 의미한다.

<48> 합성 펩타이드: 합성 펩타이드란 천연 단백질 및 이의 단편에는 없는 아미노산 잔기가 서로 펩타이드 결합으로 화학적으로 생성된 쇄를 의미한다.

<49> B. 일반적인 사항

<50> 본 발명은 맥관형성이 특이적인 비트로넥틴 수용체 $\alpha_v\beta_3$에 의해 매개되고 $\alpha_v\beta_3$ 기능의 억제는 맥관형성을 억제한다는 사실의 발견에 일반적으로 관련한 것이다. 이 발견은 맥관형성이 다양한 질병의 진행에서 작용하는 기능 때문에 중요하다. 맥관형성을 억제함으로써, 질병을 방해하고, 증상을 개선하고 어떤 경우 질병을 치료할 수 있다.

<51> 신생 혈관의 성장이 질병과 연관된 병인인 경우, 맥관형성의 억제는 질병의 유해한 효과를 감소시킬 것이다. 이 예는 류마티스성 관절염, 당뇨병성 망막증, 염증성 질환, 재발협착증 등을 포함한다. 신생 혈관의 성장이 유해한 조직의 성장을 지지하는 경우, 맥관형성의 억제는 조직에 제공되는 혈액을 감소시킬 것이고 그럼으로써 혈액 공급을 요구하는 조직괴의 감소를 가져올 것이다. 이 예는 종양의 두께가 수 밀리미터 이상으로 성장하고 고형 종양의 전이가 이루어지기 위해 계속적으로 혈관신생이 요구되는 종양의 성장을 포함한다.

<52> 본 발명의 방법은 이 치료법이 혈관생성에 대해 매우 선택적이고 다른 생물학적 작용이 없기 때문에 부분적으로 효과적이다. 실시예에서 보이는 바와 같이, 단지 신생 혈관이 성장하는 경우만이 실질적인 $\alpha_v\beta_3$를 함유하고 따라서 치료방법은 역으로 성숙한 혈관에 영향이 없다. 또한, $\alpha_v\beta_3$는 정상적인 조직에서 널리 분포되지 않고 오히려 신생 혈관상에서 선택적으로 발견된다. 그럼으로써 치료법은 신생 혈관 성장을 선택적으로 표적화할 수 있다.

<53> $\alpha_v\beta_3$의 억제만이 맥관형성을 효과적으로 억제할 것이라는 발견은 특이성이 매우 높고 그럼으로 상대적으로 독성이 매우 낮은 치료학적 조성물의 개발을 가능하게 한다. 본 발명이 하나 이상의 인테그린을 억제하는 능력이 있는 펩타이드-기초 시약을 사용하는 것을 기술하였을지라도 $\alpha_v\beta_3$를 더욱 선택적으로 억제하는 시약을 고안할 수 있고 그럼으로 $\alpha_v\beta_3$에 의해 매개되는 것 이외의 기타 생물학적 과정을 억제하는 부작용은 없다.

<54> 예를 들어, 본 발명의 교시에서 보이는 바와 같이, $\alpha_v\beta_3$ 기능의 억제에 대해 유사하게 선택적인 $\alpha_v\beta_3$과의 면역반응에 대해 매우 선택적인 모노클로날 항체를 제조하는 것이 가능하다. 또한. RGD-함유 펩타이드를 본원에서 서술된 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$의 억제에 대해 선택적으로 고안될 수 있다.

<55> 본 발명의 발견에 앞서, 맥관형성 및 맥관형성에 의존하는 임의의 과정이 $\alpha_v\beta_3$의 생물학적 기능을 길항하는 시약을 사용하여 생체내에서 억제될 수 있다는 것은 공지되지 않았다.

<56> C. 맥관형성의 억제를 위한 방법

<57> 본 발명은 조직에서 맥관형성의 억제를 위한 방법을 제공하고, 그럼으로써 맥관형성에 의존하는 조직의 작용들을 억제한다. 일반적으로 본 방법은 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 맥관형성-억제 양을 포함하는 조성물을 조직내로 투여하는 것을 포함한다.

<58> 초기에 서술한 바와 같이, "발아(sprouting)" 맥관형성 또는 혈관 확장을 포함하고, 모든 맥관형성 과정이 $\alpha_v\beta_3$의 발현에 의존하고 이에 의해 매개되는 조직의 혈관신생을 포함하는 다양한 과정을 포함한다. 외상성 상처 치유, 황체 형성 및 배형성을 제외하고는, 대부분의 맥관형성 과정이 발병 과정과 연관되어 있어 본 치료 방법을 사용하는 것이 질병에 대해 선택적이고 유해한 부작용이 없다.

<59> 맥관형성이 중요하게 여겨지는 다양한 질병이 존재하며, 이 질병은 이에 제한되지는 않으나 면역성 및 비-면역성 염증, 만성 관절 류마티즘 및 건선과 같은 염증성 질환, 당뇨병성 망막염, 혈관신생성 녹내장, 재발협착증, 아테롬성경화증 플라크에서 모세혈관 증식 및 골다공증과 같은 부적절한 또는 부적당한 혈관 침입과 연관된 장애 및 고형 종양, 고형 종양 전이, 혈관종, 카포시 육종 및 종양 성장을 지지하는 혈관신생을 필요로하는 암과 같은 장애와 연관된 암을 포함하는 맥관형성 질병으로 불리운다.

<60> 그러므로, 병든 조직에서 맥관형성을 억제하는 방법은 질병의 증상을 개선하고 질병에 따라서, 질병의 치료에 기여한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 조직내에서 그 자체로서 맥관형성의 억제를 고려한 것이다. 조직내에서 맥관형성의 정도 및 본 발명의 방법에 의한 억제정도는 면역조직화학에 의한 $\alpha_v\beta_3$-면역양성 비성숙 및 신생 혈관 구조를 검출하기 위한 실시예에서 서술하는 바와 같은 다양한 방법으로 평가할 수 있다.

<61> 본원에서 서술된 바와 같이, 임의의 다양한 조직 또는 기관화된 조직으로 이루어진 기관은 피부, 근육, 장, 연결 조직, 관절, 골 및 혈관이 맥관형성성 자극에 반응하여 침입할 수 있는 조직 등을 포함하는 질병 상태에서의 맥관형성을 지지할 수 있다.

<62> 그러므로, 한 관련된 실시양태에서, 치료될 조직이 염증 조직이고 억제될 맥관형성이 염증 조직의 혈관신생이 존재하는 염증 조직 맥관형성이다. 이 경우에, 본 발명의 방법은 만성 관절 류마티즘 환자와 같은 관절 조직, 면역성 또는 비면역성 염증 조직, 건선 조직 등에서 맥관형성의 억제를 고려한다.

<63> 본 발명의 원리가 용어 "환자"에 포함되는 경향이 있는 모든 포유동물에 관하여 효과적이라고 나타나지만, 많은 실시양태에서 본 발명에서 치료된 환자는 바람직하게는 사람 환자이다. 본 명세서에서, 포유동물은 맥관형성과 연관된 질병의 치료가 바람직한 임의의 포유동물 종, 특히 농업적 및 가축 포유동물을 포함하는 것으로 이해된다.

<64> 또 다른 관련된 실시양태에서, 치료될 조직이 당뇨병성 망막염, 황반 퇴화 또는 혈관신생성 녹내장 환자의 망막 조직이고 억제되는 맥관형성이 망막 조직의 혈관신생이 존재하는 망막 조직 맥관형성이다.

<65> 또 다른 관련 실시양태에서, 치료될 조직이 고형 종양, 전이조직, 피부암, 유방암, 혈관종 또는 맥관섬유종 등의 암 환자의 종양 조직이고 억제되는 맥관형성이 종양 조직의 혈관신생이 존재하는 종양

조직 맥관형성이다. 본 발명에 의해 치료가능한 통상적인 고형 종양 조직이 폐, 췌장, 유방, 결장, 후두, 난소 등의 조직을 포함한다. 예시적인 종양 조직 맥관형성 및 이의 억제가 실시예에서 서술된다.

<66> 종양 조직 맥관형성의 억제는 혈관신생이 종양 성장에 중요한 역할을 하기 때문에 특히 바람직한 실시양태이다. 고형 조직의 혈관신생의 부재하에서, 종양조직은 필요한 영양분을 수득하지 못하고 성장이 느려지며, 추가적인 성장을 멈추고, 퇴화하며 궁극적으로 괴사성이 되어 종양이 죽게된다.

<67> 환언하면, 본 발명은 본 발명의 방법에 따라 종양 맥관형성을 억제함으로써 종양 혈관신생을 억제하는 방법을 제공한다. 유사하게, 본 발명은 맥관형성-억제 방법을 실행함으로써 종양 성장을 억제하는 방법을 제공한다.

<68> 본 발명의 방법은 또한 (1)전이의 형성이 전이성 암 세포가 일차 종양으로 부터 배출될 수 있도록 일차 종양의 혈관형성을 필요로하고, (2)이차 위치에서 전이의 구축이 전이조직의 성장을 보조하기 위해 혈관신생을 필요로하기 때문에 전이조직의 형성에 대해 또한 특히 효과적이다.

<69> 관련 실시양태에서, 본 발명은 고형 종양에 대한 및 전이조직의 구축의 조절에 대한 지시된 통상적인 화학치료법과 같은 치료법과 함께 본 방법의 실행을 고려할 수 있다. 종양 조직이 종양 조직에 혈액 공급 및 영양분을 제공하여 회복하는 맥관형성을 유도함으로써 독성에 반응하는 경우에 화학치료법의 섭생후 맥관형성을 억제하는 것이 바람직할지라도, 맥관형성 억제제의 투여는 통상적으로 화학치료법 동안 또는 이후 수행한다. 또한, 고형 종양이 전이조직에 대한 예방법으로서 제거되는 경우 수술후 맥관형성 억제 방법을 적용하는 것이 바람직하다.

<70> 종양 혈관신생의 억제에 관한한 본 발명의 방법이 적용되고, 종양 조직 성장의 억제, 종양 전이 조직 형성의 억제 및 구축된 종양의 퇴화에 또한 본 발명이 적용될 수 있다. 실시예는 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 1회 정맥내 투여한 경우 구축된 종양이 퇴화하는 것을 증명한다.

<71> 재발협착증은 혈관성형술의 성공을 방해하는 경피 내강 관상 혈관성형술 위치에서의 평활근 세포(SMC) 이동 및 증식 과정이다. 재발협착증동안 SMC의 이동 및 증식은 본 발명의 방법에 의해 억제되는 맥관형성 과정이 고려될 수 있다. 그러므로 본 발명은 또한 혈관성형술 과정후 환자에서 본 발명에 따라 맥관형성을 억제함으로써 재발협착증을 억제하는 것을 고려한다. 재발협착증의 억제를 위해, $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 통상적으로 혈관성형후 약 2 내지 28일 동안, 통상적으로 약 처음 14일 동안 투여된다.

<72> 조직에서 맥관형성을 억제하기 위한 본 발명의 방법 및 맥관형성-관련 질병의 치료를 위해 본 발명을 실행하기 위한 본 발명의 방법은 맥관형성이 일어나고 있거나 일어날 위험이 있는 조직을 $\alpha_v\beta_3$가 이의 천연 리간드의 결합을 억제할 수 있는 치료학적으로 유효량의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 포함하는 조성물에 접촉시키는 것을 포함한다. 그러므로 본 발명의 방법은 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 함유하는 치료학적으로 유효량의 생리학적으로 허용되는 조성물을 환자에 투여하는 것을 포함한다.

<73> $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 투여하기 위한 투여량 범위는 본원에서 후술되는 바와 같이 길항제의 형태 및 이의 효능에 의존하고, 맥관형성 및 맥관형성에 의해 매개되는 질환의 증상을 개선하는 바람직한 효과를 일으키기에 충분한 양이다. 투여량은 과점조도 증후군, 폐수종, 울혈성 심부전증등과 같은 역 부작용을 일으킬정도로 대량이어서는 안된다. 일반적으로, 투여량은 환자의 나이, 상태, 성별 및 질병의 정도에 따라 변할 수 있고 당업자가 측정할 수 있다. 투여량은 또한 내과의사가 임의의 합병증에 따라 적용할 수 있다.

<74> 치료학적 유효량은 치료되어야할 조직에서 맥관형성의 측정 가능한 억제를 일으키기에 충분한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 양, 즉 맥관형성-억제 양이다. 맥관형성의 억제는 본원에서 서술된 바와 같은 면역조직화학법에 의해 또는 당업자에게 공지된 기타 방법에 의해 동일계에서(in situ) 측정될 수 있다.

<75> $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$ 모사체, RGD-함유 펩타이드, 항-$\alpha_v\beta_3$ 모노클로날 항체 또는 이의 단편의 형태를 취할 수 있는 한 효능 및 "치료학적 유효량"의 표현이 다양할 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 그러나, 본 발명의 검정 방법에 의해 나타나는 바와 같이, 당업자는 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효능을 쉽게 평가할 수 있다.

<76> $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효능을 CAM 검정에서, 생체내 래빗 눈 검정에서, 생체내 키메라 마우스:사람 검정 등의 검정에서 맥관형성의 억제를 포함하는 다양한 수단에 의해 및 본원에서 서술된 바와 같은 모든 $\alpha_v\beta_3$에 대한 천연 리간드의 결합 억제를 측정함으로써 측정할 수 있다.

<77> 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 0.5㎛미만의, 바람직하게는 0.1㎛미만, 더욱 바람직하게는 0.05㎛미만의 길항제 농도의 용액중에서 피브리노겐 또는 비트로넥틴과 같은 천연 리간드의 $\alpha_v\beta_3$에의 결합을 실질적으로 억제할 수 있다. "실질적으로"란 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 존재하에서 피브리노겐의 결합이 억제에 의해 최소한 50% 이상 감소한 것을 의미하고, 50% 억제를 본원에서는 IC_{50} 값으로 나타낸다.

<78> 더욱 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 기타 인테그린보다는 $\alpha_v\beta_3$에 대해 특이성을 보인다. 그러므로 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 실질적으로 $\alpha_v\beta_3$에 피브리노겐이 결합하는 것을 억제하나 $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ 또는 $\alpha_{IIb}\beta_3$과 같은 기타 인테그린에 피브리노겐이 결합하는 것을 억제하지 않는다. 피브리노겐이 기타 인테그린에 결합하는 것을 억제하는 경우의 IC_{50} 활성과 비교하여 피브리노겐이 $\alpha_v\beta_3$에 결합하는 것을 억제하는 경우의 IC_{50} 활성이 10배 내지 100배 더 낮은 $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 특히 바람직하다. 피브리노겐이 인테그린에 결합하는 것을 억제하는 경우의 IC_{50} 활성을 측정하기 위한 예시적인 검정법은 실시예에서 기술된다.

<79> 모노클로날 항체 형태인 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 치료학적 유효량은 통상적으로 생리학적으로

허용되는 조성물로 투여되는 경우 혈장 농도가 약 0.01㎍/㎖ 내지 약 100㎍/㎖, 바람직하게는 약 1㎍/㎖ 내지 약 5㎍/㎖, 통상적으로 약 5㎍/㎖이 되도록 하기에 충분한 양이다. 다르게 말하자면, 투여량은 하루 또는 수일동안 1회 이상의 투여량으로 약 0.1㎎/㎏ 내지 약 300㎎/㎏, 바람직하게 약 0.2㎎/㎏ 내지 약 200㎎/㎏, 가장 바람직하게는 약 0.5㎎/㎏ 내지 약 20㎎/㎏ 범위에서 변할 수 있다.

<80> 길항제가 모노클로날 항체의 단편 형태인 경우, 그 양은 전체 항체 질량에 비례하여 이 단편의 질량에 근거하여 용이하게 조절될 수 있다. 바람직한 혈장 몰랄농도는 약 2μM 내지 약 5㎜M이고, 바람직하게는 약 100μM 내지 약 1㎜M 항체 길항제이다.

<81> 폴리펩타이드 또는 기타 유사한-크기의 소분자 $\alpha_v\beta_3$ 모사체 형태인 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 치료학적 유효량은 통상적으로 생리학적으로 허용되는 조성물로 투여되는 경우 혈장 농도가 약 0.1㎍/㎖ 내지 약 200㎍/㎖ 바람직하게는 약 1㎍/㎖ 내지 약 150㎍/㎖이 되도록 하기에 충분한 폴리펩타이드 양이다. 약 500g/몰의 질량의 폴리펩타이드에 기초하여 바람직한 혈장 몰랄농도는 약 2μM 내지 약 5㎜M이고, 바람직하게는 약 100μM 내지 약 1㎜M 폴리펩타이드 길항제이다. 다르게 말하자면, 체중당 투여량은 하루 또는 수일 동안 1회 이상의 투여량으로 약 0.1㎎/㎏ 내지 약 300㎎/㎏, 바람직하게 약 0.2㎎/㎏ 내지 약 200㎎/㎏ 범위에서 변할 수 있다.

<82> 본 발명의 모노클로날 항체 또는 폴리펩타이드는 주사에 의해 비경구적으로 또는 시간에 따라 점진적으로 주입하여 투여될 수 있다. 치료될 조직은 통상적으로 전신 투여에 의해 신체에서 발작을 일으킬 수 있으므로 흔히 치료학적 조성물을 정맥내로 투여하여 치료될지라도 표적 조직이 표적 분자를 함유할 가능성이 있는 경우 기타 조직 및 운반 수단이 고려된다. 그러므로 본 발명의 모노클로날 항체 또는 폴리펩타이드는 정맥내로, 복강내로, 근육내로, 피하내로, 동내로 및 피내로 투여될 수 있고, 연동에 의해 운반될 수 있다.

<83> 본 발명의 모노클로날 항체 또는 폴리펩타이드를 함유하는 치료학적 조성물은 통상적으로 예를 들어 단위 투여량을 정맥내로 주사하여 투여된다. 본 발명의 치료학적 조성물에서 사용되는 경우 용어 "단위 투여량"은 투여대상에 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 구별되는 단위로서, 각 단위는 선결된 활성 물질의 계산된 양을 함유하여 필요한 희석물(예: 담체 또는 비히클)과 함께 바람직한 치료학적 효과를 일으키는 것을 의미한다.

<84> 실시예에서 나타나는 바와 같은 바람직한 실시양태에서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 정맥내로 단일투여량으로 투여된다.

<85> 조성물은 투여량 제형과 양립가능한 방식으로 치료학적으로 유효량으로 투여된다. 투여량 및 투여시간은 치료될 대상, 투여대상의 활성 성분을 이용할 수 있는 수투여량 및 바람직한 치료효과의 정도에 의존한다. 투여될 활성 성분의 정확한 양은 실행자의 판단에 의존하고 각 개인에 특이적이다. 그러나, 전신 적용을 위한 적합한 투여 범위는 본원에서 기술되어 있고 투여의 경로에 의존한다. 투여를 위한 적합한 섭생은 또한 가변적이나, 초기 투여후 한시간 이상의 간격으로 후속적인 주사 또는 기타 투여를 반복하는 것이 통상적이다. 대안적으로, 생체내 치료를 위한 구체적인 범위로 혈액중 농도를 유지하기 위해 충분한 계속적인 정맥내 주입이 고려된다.

<86> 본 실시예에 의해 증명된 바와 같이, 맥관형성의 억제 및 종양 퇴화는 길항제와 초기 접촉후 7일 정도에서 일어난다. 7일 내지 6주, 바람직하게는 약 14일 내지 28일 동안 길항제를 추가로 또는 지속적으로 노출시키는 것이 바람직하다.

<87> 관련 실시양태에서, 실시예는 $\alpha_v\beta_3$의 억제와 $\alpha_v\beta_3$를 함유하는 혈관신생 세포에서 세포사멸의 유도간의 관계를 증명한다. 그러므로, 본 발명은 또한 조직의 혈관신생에서 세포사멸의 억제를 위한 방법을 고려한다. 당해 방법은 모든 조직에서 맥관혈성의 억제 및 이로 인한 상태를 위해 본원에서 실질적으로 실행된다. 유일한 인식가능한 차이는 세포사멸이 신속하게, 통상적으로 길항제 접촉후 약 48시간에 분명히 나타나는 효과 발휘 시간의 차이이나, 맥관형성의 억제 및 종양 퇴화는 본원에서 서술된 바와 같이 더욱 느린 것이 분명하다. 이러한 차이는 바람직한 투여 시간, 및 효과면에서 치료학적 섭생에 영향을 미친다. 통상적으로, 혈관 신생의 세포사멸을 위해 약 24시간 내지 약 4주동안 투여할 수 있고, 48시간 내지 7일 동안이 바람직하다.

<88> D. 치료학적 조성물

<89> 본 발명은 본원에서 서술된 바와 같은 치료학적 방법을 실행하기 위해 유용한 치료학적 조성물을 고려한다. 본 발명의 치료학적 조성물은 활성성분으로서 용해되거나 분산된 본원에서 서술된 바와 같은 $\alpha_v\beta_3$ 길항제와 함께 생리학적으로 허용되는 담체를 함유한다. 바람직한 실시양태에서, 치료학적 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 조성물은 치료학적 과정을 위해 포유동물 또는 사람 환자에게 투여되는 경우 면역원성이 아니다.

<90> 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "약제학적으로 허용되는", "생리학적으로 허용되는" 및 이의 문법상 변이어(예: 조성물, 담체, 희석제 및 시약)는 상호 혼용되어 사용되고, 바람직하지 않은 생리학적 효과(예: 구역질, 현기증 및 배탈등)를 일으키지 않고 포유동물에 투여가능한 물질을 나타낸다.

<91> 본원에서 분산되거나 용해된 활성성분을 함유하는 약리학적 조성물의 제조는 당업계에 널리 공지되어 있고 제형에 제한되지 않는다. 통상적으로 상기 조성물은 액제 또는 현탁제와 같이 주사가능한 것으로 제조되나, 용제, 또는 현탁제에 적합한 고형, 사용전 액제로 제조될 수도 있다. 제제는 또한 유화될수도 있다.

<92> 활성성분은 본원에서 서술된 치료학적 방법에서 사용하기에 적합한 양으로 약제학적으로 허용되고 활성성분과 상용가능한 부형제와 혼합될 수 있다. 적합한 부형제는 예를 들어, 물, 염수, 덱스트로즈, 글리세롤, 에탄올 등 및 이의 조합물이다. 또한, 필요하다면, 조성물은 활성성분의 효능을 강화시킬 수 있는 습윤제 또는 유화제, pH 완충제 등과 같은 보조 물질을 소량 함유할 수 있다.

<93> 본 발명의 치료학적 조성물은 또한 본원의 성분의 약제학적으로 허용되는 염을 포함한다. 약제학

적으로 허용되는 염은 무기산(예: 염산 또는 인산) 또는 유기산(예: 아세트산, 타르타르산 및 만델산 등)과 형성되는 산부가염(폴리펩타이드의 유리 아미노 그룹과 형성됨)을 포함한다. 유리 카복실 그룹과 형성된 염은 또한 무기 염기(예: 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘 또는 수산화 제2철) 및 유기 염기(예: 이소프로필아민, 트리메틸아민, 2-에틸아미노 에탄올, 히스티딘, 프로카인등)로부터 유도될 수 있다.

<94> 특히 바람직한 것은 사이클릭 폴리펩타이드 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 제조에서 사용되는 경우 TFA 및 HCl의 염이다. 대표적인 펩타이드 염은 실시예에서 서술된다.

<95> 생리학적으로 허용되는 담체는 당해 분야에 널리 공지되어 있다. 액체 담체의 예는 활성성분 및 물 뿐만 아니라 어떤 물질도 함유하지 않거나 생리학적 pH값에서 인산 나트륨과 같은 완충액, 인산염-완충된 염수와 같은 생리학적 염수 또는 이들 모두를 함유한 멸균 수용액이다. 또한, 수용성 담체는 하나 이상의 완충액 염 및 염화나트륨, 염화칼륨, 덱스트로즈, 폴리에틸렌 글리콜 및 기타 용질과 같은 염을 함유할 수 있다.

<96> 액제 조성물은 또한 물을 첨가한 및 물을 배제한 액체 상을 함유할 수 있다. 이러한 부가적인 액제상의 예는 글리세린, 목화씨 유와 같은 식물성 유 및 수-유 유액이다.

<97> 치료학적 조성물은 맥관형성-억제량의 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 함유하며, 통상적으로 총 치료학적 조성물의 중량당 0.1 중량% 이상의 양의 길항제를 함유하도록 제형화된다. 중량%는 총 조성물에 대한 억제제의 중량 비율이다. 그러므로 예를 들어 0.1중량%는 총 조성물의 100 그램당 억제제 0.1 그램이다.

<98> E. 인테그린 $\alpha_v\beta_3$의 길항제

<99> $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 조직에서 맥관형성의 억제를 위한 본 발명의 방법에서 사용되고, 천연 $\alpha_v\beta_3$ 리간드와 기능적 상호작용을 방해하는 방식으로 $\alpha_v\beta_3$와 상호작용하는 화합물을 포함하는 다양한 형태를 취할 수 있다. 예시적인 길항제는 본원에서 서술된 바와 같이 길항제 활성을 나타내는 모든 것, 즉 $\alpha_v\beta_3$ 상에 리간드 결합 위치로부터 유도된 $\alpha_v\beta_3$의 유사체, $\alpha_v\beta_3$-리간드 결합 상호작용에 관여하는 구조적인 영역을 모방한 $\alpha_v\beta_3$ 또는 $\alpha_v\beta_3$의 천연 리간드의 모사체, $\alpha_v\beta_3$에 대해 특이적인 천연 리간드의 기능성 결합 도메인에 상당하는, 특히 $\alpha_v\beta_3$의 천연 리간드의 RGD-함유 도메인에 상당하는 서열을 갖는 폴리펩타이드 및 $\alpha_v\beta_3$ 또는 천연 리간드와 면역반응하는 항체 등을 포함하고 이 모두는 본 원에 기술한 바와 같이 길항제 활성을 나타낸다.

<100> 1. 폴리펩타이드

<101> 한 실시양태에서, 본 발명은 폴리펩타이드 형태인 $\alpha_v\beta_3$ 길항제이다. 폴리펩타이드(펩타이드) $\alpha_v\beta_3$ 길항제는 $\alpha_v\beta_3$-리간드 상호작용을 포함하는 영역에서 $\alpha_v\beta_3$의 천연 리간드 또는 $\alpha_v\beta_3$ 자체의 서열 특성을 갖을 수 있고 본원에서 서술된 바와 같은 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 활성을 나타낸다. 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 펩타이드는 RGD 트리펩타이드를 함유하고 RGD-함유 영역에서의 천연 리간드 서열에 상당한다.

<102> 바람직한 RGD-함유 펄리펩타이드는 피브리노겐, 비트로넥틴, 본 빌레브란트 인자, 라미닌, 트롬보스포딘 등의 리간드와 같은 $\alpha_v\beta_3$의 천연 리간드의 RGD-함유 영역의 아미노산 잔기 서열에 상당하는 서열을 가진다. 이들 $\alpha_v\beta_3$ 리간드의 서열은 널리 공지되어 있다. 그러므로 피브리노겐 및 비트로넥틴이 바람직할지라도, $\alpha_v\beta_3$ 길항제 펩타이드는 임의의 천연 리간드로부터 유도될 수 있다.

<103> 특히 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 펩타이드는 전술된 바와 같은 기타 인테그린과 비교되는 경우 이의 천연 리간드에 결합하는 $\alpha_v\beta_3$를 우선적으로 억제한다. 이들 $\alpha_v\beta_3$- 특이성 펩타이드는 적어도 $\alpha_v\beta_3$의 특이성이 기타 인테그린의 억제와 같은 바람직하지 않은 부작용을 감소시키기 때문에 특히 바람직하다. $\alpha_v\beta_3$에 대한 선택성을 갖는 바람직한 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 펩타이드의 확인은 실시예에서 서술된 ELISA와 같은 통상적인 결합의 억제 검정에서 용이하게 확인될 수 있다.

<104> 한 실시양태에서, 본 발명의 폴리펩타이드는 약 100개 이하의 아미노산 잔기, 바람직하게는 약 60개 이하의 아미노산 잔기, 더욱 바람직하게는 약 30개 이하의 아미노산 잔기를 포함한다. 펩타이드는 특히 바람직하게는 사이클릭이나 선형 또는 사이클릭일 수 있다.

<105> 바람직한 사이클릭 및 선형 펩타이드 및 이의 정의는 실시예의 표 1에 나타낸다.

<106> 대상 폴리펩타이드는 필요한 서열을 포함하고 본원에서 서술된 바와 같은 검정에서 $\alpha_v\beta_3$ 길항제로서 작용할 수 있는 한 $\alpha_v\beta_3$ 천연 리간드의 아미노산 잔기 서열과 동일할 필요성은 없다는 것을 이해해야 한다.

<107> 대상 폴리펩타이드는 폴리펩타이드가 $\alpha_v\beta_3$ 길항제인 한 아미노산 잔기 서열이 본원에서 나타나는 폴리펩타이드의 유사체, 단편 또는 화학적 유도체를 포함한다. 그러므로, 당해 폴리펩타이드를 이의 사용에서 특정 이점을 제공하는 다양한 변화, 치환, 삽입 및 결실시킬 수 있다. 이와 관련하여, 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 폴리펩타이드는 하나 이상의 변화가 이루어진 상술된 펩타이드의 서열과 동일하다기 보다는 상응하며, 본원에서 정의된 바와 같은 하나 이상의 검정에서 $\alpha_v\beta_3$ 길항제로서 작용할 수 있는 능력을 유지한다.

<108> 그러므로, 폴리펩타이드는 아미드, 단백질과의 접합체, 사이클릭 펩타이드, 폴리머화된 펩타이드, 유사체, 단편, 화학적으로 개질된 펩타이드 등의 유도체를 포함하는 임의의 다양한 형태의 펩타이드 유도체일 수 있다.

<109> 용어 "유사체"는 하나 이상의 잔기가 기능적으로 유사한 잔기로 보존적으로 치환되어 있고 본원에서 서술된 $\alpha_v\beta_3$ 길항제 활성을 보이는 본원에서 구체적으로 나타낸 서열과 실질적으로 동일한 아미노산 잔기를 갖는 폴리펩타이드를 포함한다. 보존적인 치환의 예는 이소루이신, 발린, 루이신 또는 메티오닌과 같은 하나의 비극성(소수성) 잔기로의 기타 아미노산의 치환, 하나의 극성(친수성) 잔기로의 기타 아미노산의 치환(예: 아르기닌과 라이신 사이, 글루타민과 아스파라긴 사이, 글라이신과 세린 사이), 라이신, 아르기닌 또는 히스티딘과 같은 염기성 잔기로의 기타 아미노산의 치환 또는 아스파르트산 또는 글루탐산과 같은 산성 잔기로의 기타 아미노산의 치환을 포함한다.

<110> 용어 "보존적인 치환"은 또한 폴리펩타이드가 필요한 억제 활성을 보인다면 비유도체화된 잔기 대신에 화학적으로 유도된 잔기의 사용을 포함한다.

<111> "화학적 유도체"는 작용성 측쇄 그룹의 반응에 의해 화학적으로 유도체화 된 하나 이상의 잔기를 갖는 대상 폴리펩타이드로 정의된다. 상기 유도체화된 분자는 예를 들어 유리 아미노 그룹이 유도체화되어 아민 하이드로클로라이드, p-톨루엔 설포닐 그룹, 카보벤족시 그룹, t-부틸옥시카보닐 그룹, 클로로아세틸 그룹 또는 포르밀 그룹을 형성하는 분자를 포함한다. 유리 카복실 그룹은 유도체화되어 염, 메틸 및 에틸 에스테르 또는 기타 형태의 에스테르 또는 하이드라지드를 형성할 수 있다. 유리 하이드록실 그룹은 유도체화되어 O-아실 또는 O-알킬 유도체를 형성할 수 있다. 히스티딘의 이미다졸 질소는 유도체화되어 N-이미벤질히스티딘을 형성한다. 또한 화학적 유도체로서 20개의 표준 아미노산의 하나 이상의 천연 아미노산 유도체를 함유하는 펩타이드를 포함한다. 예를 들어 프롤린은 4-하이드록시프롤린으로 치환될 수 있고; 라이신은 5-하이드록시라이신으로 치환될 수 있고, 히스티딘은 3-메틸히스티딘으로 치환될 수 있고; 세린은 호모세린으로 치환될 수 있고; 라이신은 오르니틴으로 치환될 수 있다.

<112> 본 발명의 폴리펩타이드는 하나 이상의 첨가 및/또는 결실 또는 필요한 활성이 유지되는 한 본원에서 나타낸 서열의 폴리펩타이드의 서열과 비교되는 잔기를 갖는 임의의 폴리펩타이드를 또한 포함한다.

<113> 용어 "단편"은 아미노산 잔기 서열을 본원에서 나타낸 폴리펩타이드의 것보다 짧은 아미노산 서열을 갖는 임의의 대상 폴리핍타이드를 의미한다.

<114> 본 발명의 폴리펩타이드가 $\alpha_v\beta_3$ 천연 리간드의 서열과 동일하지 않은 경우 통상적으로 하나 이상의 보존된 또는 비보존된 치환이 이루어지기 때문에 통상적으로 약 30 수% 이하만큼, 바람직하게는 약 10 수% 이하의 아미노산 잔기가 치환된다. 본 발명의 폴리펩타이드가 간편하게 표지 또는 고체 매트릭스, 또는 담체에 부착되도록 하는 "링커"를 제공할 목적으로 폴리펩타이드의 말단에 추가적인 잔기가 첨가될 수 있다.

<115> 본 발명의 폴리펩타이드와 사용될 수 있는 표지, 고체 매트릭스 및 담체는 하기에서 서술된다.

<116> 아미노산 잔기 링커는 통상적으로 하나 이상의 잔기이고 40개 이상의 잔기, 흔히 1 내지 10개의 잔기일 수 있으나 $\alpha_v\beta_3$ 리간드 에피토프를 형성하지 않는다. 링커로 사용되는 통상적인 아미노산 잔기는 타이로신, 시스테인, 라이신, 글루탐산 및 아스파르트산 등이다. 또한, 대상 폴리펩타이드는 또 다른 언급이 없는 경우, 말단-NH_2 아실화(예: 아세틸화 또는 티오글리콜산 아미드화), 말단 카복실아미드화(예: 암모니아, 메틸아민 등의 말단 개질제로)에 의해 개질될 수 있는 서열에 의해 $\alpha_v\beta_3$ 리간드의 천연 서열과 상이할 수 있다. 말단 개질은 공지되어 있는 것과 같이 단백질분해효소 절단에 대한 민감성을 감소시키기에 유용하므로 단백질 분해효소가 존재할 수 있는 용액, 특히 생물학적 체액에서 폴리펩타이드의 반감기를 연장시키기 위해 사용된다. 이에 관하여, 폴리펩타이드 사이클릭화는 또한 유용한 말단 개질이고, 본원에서 서술된 바와 같은 사이클릭 펩타이드에서 준수되는 생물학적 활성의 관점에서 사이클화에 의해 형성된 안정한 구조 때문에 특히 바람직하다.

<117> 본 발명의 임의의 펩타이드는 약제학적으로 허용되는 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 펩타이드와 염을 형성할 수 있는 적합한 산은 트리플루오로아세트산(TFA), 염산(HCl), 브롬산, 과염소산, 질산, 티오시안산, 황산, 인산 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 락트산, 피루브산, 옥살산, 말론산, 숙신산, 말레산, 푸마르산, 안트라닐산, 신남산, 나프탈렌 설폰산, 설파닐산 등과 같은 무기산을 포함한다. HCl 및 TFA 염이 특히 바람직하다.

<118> 본 발명의 펩타이드와 염을 형성할 수 있는 적합한 염기는 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨 등과 같은 무기 염기; 및 모노-, 디- 및 트리-알킬 및 아릴 아민(예: 트리에틸아민, 디이소프로필아민, 메틸 아민, 디메틸 아민 등) 및 임의로 치환된 에탄올아민(예: 에탄올아민, 디에탄올아민 등)과 같은 유기 염기를 포함한다.

<119> 본 발명의 펩타이드는 또한 본원에서 대상 폴리펩타이드를 의미하고, 재조합 DNA 기술을 포함하는 폴리펩타이드 기술 분야의 당업자에게 공지된 임의의 기술에 의해 합성될 수 있다. 고체상 메릴필드-형 합성과 같은 합성 화학 기술은 순도, 항원성 특이성, 바람직하지 않은 부산물이 없음, 생산의 용이성 등의 이유로 바람직하다. 유용한 많은 기술이 문헌[참조: Steward et al., "고체상 펩타이드 합성". W.H.Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, et al., "펩타이드 합성", John Wiley & Sons, Second Edition, 1976; J.Meienhofer, "호르몬성 단백질 및 펩타이드", Vol. 2, p. 46, Academic Press (New York), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32: 221-96, 1969; Fields et al., Int J.Peptide Protein Res., 35: 161-124 1990 및 고체상 펩타이드 합성에 대한 미국 특허 제4,224,946호 및 고전적인 용액 합성에 대한 문헌(Schroder et al., "펩타이드", Vol. 1, Academic Press (New York), 1965)]에 상세히 요약되어 있고, 이들은 본원의 참조문헌으로 인용되어 있다. 상기 합성에서 사용가능한 적합한 보호 그룹은 상기 문헌 및 본원에서 참조문헌으로 인용된 문헌[참조: J.F.W.McOmie, "유기 화학에서 보호 그룹", Plenum Press, New York, 1973]에 서술되어 있다.

<120> 일반적으로, 고려되는 고체상 합성 방법은 하나 이상의 아미노산 잔기 또는 적합하게 보호된 아미노산 잔기를 늘어나는 펩타이드에 연속적으로 첨가하는 것을 포함한다. 정상적으로, 제1 아미노산 잔기의 아미노 또는 카복실 그룹은 적합한, 선택적으로 제거가능한 보호 그룹에 의해 보호된다. 상이한, 선택

적으로 제거 가능한 보호 그룹은 라이신과 같은 반응성 측쇄 그룹을 함유하는 아미노산에 대해 사용된다.

<121> 예시적으로 고체상 합성을 사용하여, 보호된 또는 유도체화된 아미노산이 보호되지 않는 카복실 또는 아미노 그룹을 통해 불활성 고체 지지체에 부착된다. 아미노 또는 카복실 그룹의 보호 그룹을 선택적으로 제거하고 적합하게 보호된 상보적인(아미노 또는 카복실) 그룹을 갖는 서열에서 다음 아미노산을 고체 지지체에 이미 부착된 잔기와 아미드 연결을 형성하기 위해 적합한 조건하에서 혼합하고 반응시킨다. 아미노 그룹 또는 카복실 그룹의 보호 그룹은 신규하게 첨가된 아미노산 잔기로부터 제거되고 다음 아미노산(적합하게 보호된)을 첨가한다. 모든 바람직한 아미노산이 적절한 서열에서 연결된 후, 임의의 잔류하는 말단 및 측쇄 그룹의 보호 그룹(및 고체 지지체)는 연속적으로 또는 동시에 제거되어, 최종 선형 폴리펩타이드를 수득한다.

<122> 상술되는 바와 같은 실시예로서 제조된 선형 폴리펩타이드는 반응하여 이에 상응하는 사이클릭 펩타이드를 형성할 수 있다. 펩타이드를 사이클릭화하기 위한 예시적인 방법은 문헌[참조: Zimmer et al., Peptides 1992, pp. 393-394, ESCOM Science Publishers, B.V., 1993]에 의해 서술되어 있다. 통상적으로 3급 부톡시카보닐 보호된 펩타이드 메틸 에스테르를 메탄올에 용해시키고 수산화나트륨 용액을 첨가하고 혼합물을 20℃에서 반응시켜 메틸 에스테르 보호 그룹을 가수분해로 제거한다. 용매를 증발시킨 후, 3급 부톡시카보닐 보호된 보호 펩타이드를 산성화된 수성 용매로부터 에틸 아세테이트로 추출한다. 3급 부톡시카보닐 그룹 보호 그룹을 온화한 산성 조건하에서 디옥산 공용매에서 제거한다. 수득된 유리 아미노 및 카복실 말단을 갖는 보호되지않은 선형 펩타이드를 디클로로메탄 및 디메틸포름아미드의 혼합물에서 1-하이드록시벤조트리아졸 및 N-메틸모르폴린의 존재하에서 상응하는 사이클릭 펩타이드로 전환시킨다. 생성되는 사이클릭 펩타이드를 이어서 크로마토그래피로 정제한다.

<123> 특히 바람직한 사이클릭 펩타이드 합성 방법은 문헌[참조: Gurrath et al., Eur.J.Biochem., 210; 911-921 (1992)]에 의해 서술되어 있고 실시예에서도 서술된다. 본 발명의 방법에서 사용하기 위해 특히 바람직한 펩타이드는 c-(GrGDFV)(서열확인번호: 4), c-(RGDfV)(서열확인번호: 5), c-(RADfV)(서열확인번호: 6), c-(RGDFv)(서열확인번호: 7) 및 선형 펩타이드 YTAECKPQVTRGDVF(서열확인번호: 8)이고, 여기서 "c-"는 사이클릭 펩타이드를 의미하고, 대문자는 L-아미노산을 코드하는 단일 문자이고 소문자는 D-아미노산을 코드하는 단일 문자이다. 이들 펩타이드의 아미노산 잔기 서열은 각각 서열확인번호: 4, 5, 6, 7 및 8에 나타낸다.

<124> 2. 모노클로날 항체

<125> 본 발명은 한 실시양태에서 $\alpha_v\beta_3$와 면역반응하는 모노클로날 항체 형태에서 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 서술하고 본원에서 서술되는 바와 같은 이의 천연 리간드에 결합하는 $\alpha_v\beta_3$를 억제한다. 본 발명은 또한 항체를 생성하는 세포주, 세포주를 생성하기 위한 방법 및 모노클로날 항체를 생성하는 방법을 서술한다.

<126> 본 발명의 모노클로날 항체는 1)분리된 $\alpha_v\beta_3$와 면역반응하고, 2)피브리노겐이 $\alpha_v\beta_3$에 결합하는 것을 억제하는 항체 분자를 포함한다. $\alpha_v\beta_3$에 우선적으로 결합하는 바람직한 모노클로날 항체는 하이브리도마 세포주 ATCC HB 9537에 의해 분비되는 mAb LM609의 면역반응 특성을 갖는 모노클로날 항체를 포함한다. 하이브리도마 세포주 ATCC HB 9537는 부다페스트 조약에 따라 1987년 9월 15일에 미국 메릴랜드주 록크빌 파크라운 드라이브 1301에 소재하는 아메리칸 타입 컬쳐콜렉션 (ATCC)에 기탁되어 있다.

<127> 다양한 문법상의 형태에서 용어 "항체 또는 항체 분자"는 면역글로블린 분자의 군집 및/또는 면역글로블린 분자의 면역학적 활성 분획, 즉 항체 결합 부위 또는 파라토프를 함유하는 분자를 의미하는 선별 명사로서 본원에서 사용된다.

<128> "항체 결합 부위"는 항원에 특이적으로 결합하는 중쇄 및 경쇄 가변 부위 및 초가변 부위로 이루어진 항체 분자의 구조적인 부분이다.

<129> 본 발명에 사용하기 위한 예시적인 항체는 당업계에서 Fab, Fab', $F(ab')_2$ 및 F(v)로 공지된 부분을 포함하는 파라토프를 함유하는 완전한 면역글로블린 분자, 실질적으로 완전한 면역글로블린 분자 및 면역글로블린 분자의 일부분이고 항체 단편을 또한 의미한다.

<130> 또 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 모노클로날 항체로 부터 유도된 Fab 단편을 포함하는 절단된 면역글로블린 분자를 고려한다. Fc 수용체가 결실된 Fab 단편은 가용성이고, 혈청 반감기에서 치료학적 이점 및 가용성 Fab 단편을 사용하는 모드에서 진단학적 이점을 부여한다. 가용성 Fab 단편의 제조는 일반적으로 면역학적 기술에서 공지되어 있고 다양한 방법에 의해 성취될 수 있다.

<131> 예를 들어, 항체의 Fab 및 $F(ab')_2$ 부분(단편)은 공지된 방법에 의해 실질적으로 완전한 항체상에 각각 파파인 및 펩신의 단백질분해 반응에 의해 제조된다 [참조: 미국 특허 제4,342,566호 Theofilopolous and Dixon]. Fab' 항체 단편은 또한 널리 공지되어 있고, 머캅토에탄올을 사용한 2개의 중쇄 부분을 연결하는 디설피드 결합을 환원시키고 요오도아세트아미드와 같은 시약을 사용하여 생성되는 단백질 머캅탄을 알킬화시킴으로써 $F(ab')_2$ 부분으로부터 생성된다. 완전한 면역글로블린 분자를 함유하는 항체가 바람직하고 본원에서 예시되는 바와 같이 사용된다.

<132> 다양한 문법상 형태에서 용어 "모노클로날 항체"는 특정 에피토프와 면역 반응할 수 있는 항체 결합 부위의 한 종류만 함유하는 항체 분자의 군집을 의미한다. 그러므로 모노클로날 항체는 통상적으로 면역반응하는 임의의 에피토프에 대한 단일 결합 친화성을 나타낸다. 그러므로 모노클로날 항체는 상이한 에피토프(예: 이중 특이적 모노클로날 항체)에 대해 면역특이적인 다수의 항체 결합 부위를 갖는 항체 분자를 포함할 수 있다.

<133> 모노클로날 항체는 통상적으로 단지 한 종류의 항체 분자만을 분비하는 하이브리도마로 불리우는 단일 세포의 클론에 의해 생산되는 항체로 이루어진다. 하이브리도마 세포는 항체-생성 세포와 골수종 세포주 또는 기타 자가-불멸 세포주를 융합시킴으로써 형성된다. 상기 항체의 제조는 본원에서 인용된 문헌[참조: Kohler and Milstein, Nature 256: 495-497 (1975)]에서 서술되어 있다. 또 다른 방법은 문헌[참

조: Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press. Inc. (1987)]에 서술되어 있다. 제조된 하이브리도마 상층액은 $\alpha_v\beta_3$와 면역반응하는 항체 분자의 존재에 대하여 및 $\alpha_v\beta_3$가 천연 리간드에 결합하는 것을 억제하는 것에 대해 스크린될 수 있다.

<134> 요약하여, 모노클로날 항체 조성물이 생산되는 하이브리도마를 형성하기 위해, 골수종 세포주 또는 기타 자가-불멸 세포주는 문헌[참조: Cheresh et al., J.Biol.Chem., 262: 17703-17711 (1987)]에 서술된 바와 같은 M21 사람 흑색종 세포로부터 분리된 $\alpha_v\beta_3$와 같은 $\alpha_v\beta_3$ 원으로 과면역화된 포유동물 비장으로부터 수득된 임파구와 융합된다.

<135> 골수종 세포주는 임파구와 동일한 종으로부터의 하이브리도마를 제조하기 위해 사용되는 것이 바람직하다. 통상적으로 마우스 균주 129 G1X'이 바람직한 포유동물이다. 본 발명에서 사용하기 위한 적합한 마우스 골수종은 각각 CRL 1580 및 CRL 1581하에 미국 매릴랜드주 록크빌 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션으로부터 입수 가능한 하이포산틴-아미노프테린-티미딘 민감성(HAT) 세포주 P3X63-Ag8.653 및 Sp2/0-Ag14를 포함한다.

<136> 비세포는 통상적으로 폴리에틸렌 글리콜(PEG) 1500을 사용하여 골수종 세포와 융합된다. 융합된 하이브리드는 HAT에 대한 민감성에 의해 선별된다. 본 발명의 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마는 본 실시예에서 서술된 효소 결합된 면역흡착 검정(ELISA)를 사용하여 밝혀낸다.

<137> 본 발명의 모노클로날 항체는 적합한 특이성을 갖는 항체 분자를 분비하는 하이브리도마를 함유하는 영양 배지에서 모노클로날 하이브리도마를 배양함으로써 생성될 수 있다. 배양물은 하이브리도마가 배지에서 항체 분자를 분비하기에 충분한 조건 및 시간하에서 유지된다. 항체-함유 배지를 수거한다. 항체 분자는 공지된 기술에 의해 추가로 분리될 수 있다.

<138> 본 조성물의 제조를 위해 유용한 매개체는 당업계에서 공지되어 있고 상업적으로 구입가능하며 합성 배양 배지, 동계교배 마우스 등을 포함한다. 예시적인 합성 배지는 4.5gm/l 글루코즈, 20mM 글루타민 및 20% 태 송아지 혈청으로 보충된 둘배코 최소 필수 배지(DMEM; Dulbecco et al., Virol, 8: 396, 1959]이다. 예시적인 동계교배 마우스 균주는 Balb/c이다.

<139> 모노글로날 항체, 하이브리도마 세포 또는 하이브리도마 세포 배양물을 생성하는 기타 방법도 공지되어 있다[참조: 모노클로날 항체 분리 방법에 대하여, Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 5728-5732 (1989); 및 Huse et al., Science, 246: 1275-1281 (1989)].

<140> 본 발명에 의해 또한 고려되는 것은 하이브리도마 세포 및 본 발명의 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마 세포를 함유하는 배양물이다. 특히 바람직한 것은 ATCC HB 9537로 지칭되는 모노클로날 항체 mAb LM609를 분비하는 하이브리도마 세포주이다. mAb LM609는 문헌[참조: Cheresh et al., J. Biol. Chem., 262: 17703-17711 (1987)]에서 서술되어 있고 이의 제조는 실시예에서 또한 서술된다.

<141> 본 발명은 한 실시양태에서, mAb LM609의 면역반응 특성을 갖는 모노클로날 항체이다.

<142> 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체와 예비선별된 표적 분자와의 결합을 방해하는지를 확인함으로써 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체와 동일한 특이성을 갖는지 여부를 과도한 실험없이 결정할 수 있다. 고체상에 존재하는 경우, 표준 경쟁 분석에서, 표적 분자에 결합하는 모노클로날 항체의 결합 감소에 의해 나타나는 바와 같이, 시험되는 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체와 경쟁하는 경우, 2개의 모노클로날 항체는 동일한 또는 밀접하게 관련된 에피토프에 결합할 것이다.

<143> 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체의 특이성을 갖는지를 결정하기 위한 또 다른 방법은 본 발명의 모노클로날 항체와 정상적으로 반응성인 표적분자를 예비 항온처리하고 시험되는 모노클로날 항체가 표적 분자에 결합하는 능력을 억제하는지를 측정하기 위해 시험될 모노클로날 항체를 첨가하는 것이다. 시험되는 모노클로날 항체가 억제되는 경우, 대개 이는 본 발명의 모노클로날 항체와 동일한 또는 기능적으로 동등한, 에피토프 특이성을 가진다.

<144> 모노클로날 항체가 본 발명의 모노클로날 항체의 특이성을 갖는지를 측정하기 위한 또 다른 방법은 문제의 항체의 CDR 부위의 아미노산 잔기 서열을 측정하는 것이다. 이의 CDR 부위에서 동일한 또는 기능적으로 동등한 아미노산 잔기 서열을 갖는 항체 분자는 동일한 결합 특이성을 갖는다. 폴리펩타이드를 서열화하기 위한 방법은 당업계에서 공지되어 있다.

<145> 항체의 면역특이성, 이의 표적 분자 결합 능력 및 에피토프에 대해 나타나는 친화성은 항체와 면역반응하는 에피토프에 의해 규정된다. 에피토프 특이성은 면역글로블린 항체 중쇄의 가변 부위의 아미노산 잔기 서열 부분 및 경쇄 가변 부위 아미노산 잔기 서열 부분에 의해 규정된다.

<146> 용어 "결합 특이성을 갖는"의 사용은 동등한 모노클로날 항체가 동일한 또는 유사한 면역반응(결합) 특성을 나타내고 예비선별된 표적분자에의 결합에서 경쟁하는 것을 나타낸다.

<147> 사람화된 모노클로날 항체는 특히 사람에서 치료학적으로 사용될 수 있는 한 뮤린 모노클로날 항체에 대한 특정 이점을 제공한다. 구체적으로는, 사람 항체는 "외래" 항원만큼 재빨리 순환계로부터 제거되지 않고 외래 항원 및 외래 항체와 동일한 방식으로 면역 시스템을 활성화시키지 않는다. "사람화된" 항체를 제조하기 위한 방법은 당업계에서 일반적으로 공지되어 있고 본 발명의 항체에 용이하게 적용될 수 있다.

<148> 그러므로 본 발명은 한 실시양태에서 항원에 결합하는 항체의 능력을 실질적으로 방해하지 않고 사람 면역 시스템의 성분을 도입하기 위한 자가 이식에 의해 사람화된 본 발명의 모노클로날 항체를 고려한다.

<149> 3. $\alpha_v\beta_3$-특이성 모사체

<150> 본 발명은 폴리펩타이드, 항체 및 "모사체"로 지칭되는 기타 분자를 포함할 수 있고 $\alpha_v\beta_3$ 기능

을 방해할 수 있는 능력을 갖는 $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 일반적으로 본 발명에서 사용될 수 있다는 것을 증명한다. 특히 바람직한 것은 구체적으로 $\alpha_v\beta_3$ 기능을 특이적으로 방해하나 기타 인테그린의 기능을 방해하지 않는 길항제이다.

<151> 시약이 필수적인 생물학적 활성을 보유하는 한 다양한 시약이 본 발명의 방법에서 사용하기에 적합할 수 있다고 본 명세서에서는 이해된다. 이 시약은 일반적으로 이들이 수용체 및 리간드의 기능적 상호작용에서 포함된 $\alpha_v\beta_3$ 또는 $\alpha_v\beta_3$ 리간드상에 결합 도메인과 유사한 능력을 보유하고 있어 정상적인 기능을 방해(즉, 억제)하기 때문에 모사체를 의미한다.

<152> $\alpha_v\beta_3$ 모사체는 상술된 특성을 나타내는 항체 또는 리간드-유도된 펩타이드이외의 임의의 분자이다. 상술된 결합 도메인의 결합 포켓과 같은 형태인 화합물 또는 기타 분자인 펩타이드의 합성 유사체일 수 있다.

<153> $\alpha_v\beta_3$ 모사체의 고안은 분자 모델링, 2차원 핵 자기 공명(2-D NMR) 분석, X-선 결정학, 펩타이드, 펩타이드 유사체 또는 기타 화학적 중합체 라이브러리의 랜덤 스크린닝 및 시약 고안 방법론 등을 포함하는 당업계에서 공지된 약물-고안을 위한 임의의 다양한 구조적인 분석 방법에 의해 수행될 수 있다.

<154> $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 소형의 폴리펩타이드 또는 모노클로날 항체일 수 있고 $\alpha_v\beta_3$의 선택적인 억제의 기능적 특성을 공유하는 2개의 다양한 상이한 화학적 구조일 수 있다는 것을 보여주는 본 명세서에서 나타나는 광범위한 구조적인 증거에서, 본 발명의 방법에서 유용한 대상 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 구조를 제한할 필요가 없으나 본원에서 규정된 바와 같이 임의의 $\alpha_v\beta_3$ 모사체를 포함한다.

<155> F. $\alpha_v\beta_3$의 길항제를 확인하기 위한 방법

<156> 본 발명은 또한 본 발명의 방법에 따라 사용하기 위한 후보 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 확인하기 위한 분석 방법을 서술한다. 이 분석 방법에서, 후보자 분자는 천연 리간드에 $\alpha_v\beta_3$가 결합하는 것을 억제하는 이들의 효능에 대해 평가되고, 추가로 조직에서 맥관형성을 억제하는 이들의 효능에 대해 평가된다.

<157> 제1 검정은 천연 리간드의 $\alpha_v\beta_3$에의 직접적인 결합을 억제하는 것을 측정하고, 바람직한 실시양태는 실시예에서 상세히 서술된다. 이 검정법은 통상적으로 ELISA에 의해 고체상에서 천연 리간드(예: 피브리노겐)의 분리된 $\alpha_v\beta_3$로의 결합을 억제하는 정도를 측정한다.

<158> 검정법은 또한 $\alpha_v\beta_3$에 대한 특이성을 나타내나 천연 리간드가 기타 인테그린에 결합하는 것을 억제하지 않는 화합물을 확인하기 위해 사용될 수 있다. 특이성 검정은 $\alpha_v\beta_3$ 및 기타 인테그린을 동시에 별개의 검정 챔버에서 천연 리간드에 결합하는 이들 각각의 능력 및 예비선별된 리간드에 결합하는 인테그린의 각각의 능력을 억제하는 후보 화합물에 대해 동시에 스크린하는 평형 ELISA 검정에 의해 수행된다. 바람직한 스크리닝 검정 형태는 실시예에서 서술된다.

<159> 두 번째 검정은 병아리 융모요막(CAM)에서 맥관형성을 측정하고 이를 CAM 검정으로 부른다. CAM 검정은 기타 문헌에 의해 상세히 서술되어 있고 추가로 종양 조직의 맥관형성 및 혈관신생을 측정하기 위해 사용되었다[참조: Ausprunk et al., Am. J. Pathol., 79: 597-618(1975) 및 Ossonski et al., Cancer Res., 40: 2300-2309(1980)].

<160> CAM 검정은 전체 조직의 혈관신생이 일어나고 활동적인 병아리 배 혈관이 CAM내로 또는 CAM상에 성장된 조직내로 성장하고 있기 때문에 생체내 맥관형성에 대해 잘 인식된 검정 모델이다.

<161> 본원에서 증명된 바와 같이, CAM 검정은 신생 혈관성장의 양 및 정도에 근거한 혈관신생의 억제를 예시한다. 추가로 종양 조직과 같은 CAM상에 조직이식된 임의의 조직의 성장을 모니터하기 용이하다. 최종적으로, 검정은 특히 검정 시스템에서 독성에 대한 내부 대조군이 있기 때문에 특히 유용하다. 병아리 배를 임의의 시험 시약에 노출시키므로, 배의 건강은 독성의 지표이다.

<162> 맥관형성을 측정하는 세 번째 검정은 래빗 눈 모델로서 생체내 래빗 눈 검정으로 부른다. 래빗 눈 검정은 기타 문헌에 의해 상세히 서술되고 있고, 추가로 탈리도미드와 같은 맥관형성성 억제제의 존재하에서 맥관형성 및 혈관신생을 측정하기 위해 사용되었다[참조: D'Amato, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4082-4085 (1994)].

<163> 래빗 눈 검정은 망막내로 망막의 테두리로부터 성장하는 래빗 혈관에 의해 예시된, 혈관신생 과정이 눈의 천연적으로 투명한 각막을 통해 용이하게 가시화되기 때문에 생체내 맥관형성에 대해 잘 인식되는 검정 모델이다. 추가로 혈관신생의 자극 또는 억제 또는 혈관신생의 퇴화의 정도 및 양 모두를 용이하게 시간에 따라 모니터할 수 있다.

<164> 최종적으로, 래빗은 임의의 시약에 노출되므로, 래빗의 건강은 시험 시약의 독성의 지표이다.

<165> 키메라 마우스: 사람 마우스 모델에서 맥관형성을 측정하는 네 번째 검정은 키메라 마우스 검정으로 부른다. 검정은 기타 문헌에 의해 상세히 서술되고 추가로 맥관형성, 혈관신생 및 종양 조직의 퇴화를 측정하기 위해 본원에서 서술되어 있다[참조: Yan, et al., J. Clin. Invest., 91: 986-996(1993)]. 키메라 마우스 검정은, 조직이식된 피부 이식조직은 정상적인 피부와 조직학적으로 유사하고 실질적인 사람 혈관이 자가이식된 사람 피부로부터 자가이식된 사람 피부의 표면상의 사람 종양 조직내로 성장하는 전체 조직의 혈관신생이 발생하고 있기 때문에 생체내 맥관형성을 위해 유용한 검정 모델이다. 사람 이식 조직내로 혈관신생의 기원은 사람-특이적인 표피 세포 마커로 혈관신생을 면역조직학적 염색에 의해 증명될 수 있다.

<166> 본원에서 증명되는 바와 같이, 키메라 마우스 검정은 신생 혈관 성장의 퇴화의 양 및 정도에 근거한 혈관신생의 퇴화를 증명한다. 추가로 종양 조직과 같은 이식된 피부상에 조직이식된 임의의 조직의

성장에 대한 영향을 모니터하기가 용이하다. 최종적으로, 검정은 검정 시스템에서 독성에 대한 내부 대조군이 있기 때문에 유용하다. 키메라 마우스는 임의의 시험 시약에 노출되므로, 마우스의 건강이 독성의 지표이다.

<167> [실시예]

<168> 본 발명에 관한 하기 실시예는 예시적인 것이며, 본 발명을 특별히 제한하는 것으로 생각해서는 안될 것이다. 게다가, 현재 밝혀지거나 이후에 개발된 본 발명의 변형도 본 기술분야의 전문가의 견지에서 이하 청구되는 본 발명의 범위내에 포함되어야 한다.

<169> 1. 합성 펩타이드의 제조

<170> 표 1에 수록된 선형 및 사이클릭 폴리펩타이드는 문헌[참조: Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96,(1969), and Field, G. B. and Noble, R.L... Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, (1990)]에 기술된 바와 같이 표준 고체-상 합성 방법을 사용하여 합성한다.

<171> BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe(서열확인 번호 1) 2g을 먼저 메탄올 60ml에 용해시키고, 여기에 2N 수산화나트륨 용액 1.5ml를 가하여 혼합물을 형성한다. 이어서, 당해 혼합물을 3시간 동안 20℃에서 교반시킨다. 증발시킨 후, 잔사를 물에 침지시키고, 묽은 HCl로 pH 3으로 산성화시킨 다음 에틸 아세테이트로 추출한다. 당해 추출물을 Na_2SO_4 상에서 건조시키고, 다시 증발시킨 다음 생성된 BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp- Phe-Val-OH(서열확인 번호 2)를 디옥산중의 2N HCl 20ml를 사용하여 2시간 동안 20℃에서 교반시킨다. 생성된 혼합물을 증발시켜 H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH(서열확인 번호 3)을 수득하고, 이어서 디클로로메탄 1800ml 및 디메틸포름아미드(DMF) 200ml의 혼합물에 용해시켜 0℃로 냉각시킨다. 이어서, 디사이클로헥실카보디이미드(DCCI) 0.5g, 1-하이드록시벤조트리아졸(HBOt) 0.3g 및 N-메틸모르폴린 0.23ml를 연속적으로 교반하면서 가한다.

<172> 생성된 혼합물을 24시간 동안 0℃에서 및 이어서 48시간 동안 20℃에서 교반시킨다. 당해 용액을 농축시키고, 혼합된 베드 이온 교환기로 처리하여 염으로부터 이를 유리시킨다. 생성된 수지를 여과하여 제거하고, 투명한 용액을 증발시킨 다음 잔사를 크로마토그라피로 정제하여 사이클로(-Gly-D- Arg-Gly-Asp-Phe-Val)(서열확인 번호 4)를 회수한다. 단일 문자 코드 아미노산 약어를 사용하여 표 1에 수록되고 펩타이드 번호 표시에 의해 확인되는 하기 펩타이드를 유사하게 수득한다: 사이클로(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)(서열확인 번호 5): 사이클로(Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (서열확인 번호 6) ; 사이클로(Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val)(서열확인번호 9): 사이클로 (Arg-Gly-Asp- Phe-D-Val)(서열확인 번호 7). 펩타이드 62184의 서열과 동일한 서열을 갖는 66203으로 표시된 펩타이드는 62184에 존재하는 TFA 염이 아닌 염 HCl을 함유한다는 점에서만 62184의 펩타이드와 상이하다. 합성 펩타이드를 사용한 실시예 7에서 기술된 바와 같이 맥관형성 검정의 억제에 있어서, HCl을 포함하는 66203 펩타이드는 TFA중의 동일한 펩타이드보다 맥관형성을 억제하는데 있어 약간 더 효과적이다.

<173> [표 1]

펩타이드 번호	아미노산 서열*	서열확인 번호
62181	사이클로(GrGDFV)	4
62184	사이클로(RGDfV)	5
62185	사이클로(RADfV)	6
62187	사이클로(RGDFv)	7
62880	YTAECKPQVTRGDVF	8
62186	사이클로(RaDFV)	9
62175	사이클로(ARGDfL)	10
62179	사이클로(GRGDfL)	11
62411	TRQVVCDLGNPM	12
62503	GVVRNNEALARLS	13
62502	TDVNGDGRHDL	14

* 소문자는 D-아미노산을 나타내고, 대문자는 L-아미노산을 나타낸다.

<175> 펩타이드 62185의 서열과 동일한 서열을 갖는 69601로서 표시되는 펩타이드는 62184에 존재하는

TFA 염 대신에 염 HCl을 포함한다는 점에서만 62185와 상이하다.

<176> 2. 모노클로날 항체

<177> 하이브리도마 ATCC HB 9537에 의해 방출된 모노클로날 항체 LM609는 세파로즈-렌틸 렉틴 비드상으로 흡수된 분리 $\alpha_v\beta_3$을 사용한 면역화에 의해 표준 하이브리도마 방법을 사용하여 제조한다. $\alpha_v\beta_3$는 M21로 명명된 사람 흑색종 세포로부터 분리하고, 항체는 문헌[참조: Cheresh et al., J. Biol. Chem., 262: 17703-17711(1987)]에 기술된 바와 같이 제조한다. M21 세포는 Dr. D.L. Morton(캘리포니아 로스엔젤레스 소재의 캘리포니아 대학)에게서 수득하고, 2mM L-글루타민, 50mg/ml 젠타마이신 설페이트 및 10% 송아지 태아 혈청을 포함하는 RPMI 1640 배양 배지중의 현탁 배지에서 성장시킨다.

<178> 모노클로날 항체 LM609는 $\alpha_v\beta_3$ 복합체와 특이적으로 면역반응하고 α_v 아단위, β_3 아단위 또는 기타 인테그린과 면역반응하지 않는 것으로 밝혀졌다.

<179> 3. $\alpha_v\beta_3$ 발현의 조직 분포 특성

<180> A. 항-인테그린 수용체 항체를 사용한 면역형광 방법

<181> 상처 치유시 혈관의 기저막은 본 빌레브란트(von Willebrand) 인자, 피브로넥틴 및 피브린을 포함하는 몇몇의 점착성 단백질을 발현한다. 또한, 몇몇 종류의 인테그린계 점착 수용체는 배양된 평활근 및 내피 세포의 표면에서 발현된다[참조: Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 6471(1987), Janat et al., J. Cell Physiol., 151: 588(1992): and Cheng et al., J. Cell Physiol., 139: 275 (1989)]. 이들중에서 인테그린은 문헌[참조: Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84: 6471(1987)]에 기술된 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$, 본 빌레브란트 인자에 대한 내피세포 수용체, 피브리노겐(피브린) 및 피브로넥틴이다. 당해 인테그린은 내피세포 이동을 유도하는 칼슘-의존성 시그날 경로를 개시함으로, 문헌[참조: Leavelsey et al., J. Cell Biol., 121: 162(1993)]에 기술된 바와 같은 혈관 세포 생물학에서 중요한 역할을 담당한다고 생각된다.

<182> 맥관 형성시 $\alpha_v\beta_3$의 발현을 조사하기 위해, 사람 상처 육아 조직 또는 인접한 정상 표피를 동의하는 환자로부터 수득하고, 인산염 완충된 염수 1ml로 세척하여 O.T.C. 배지(Tissue Tek)에 포매(embedding)한다. 포매 조직을 약 30 내지 45초 동안 액체 질소로 급속히 동결시킨다. 인테그린의 β_3 인테그린($\alpha_v\beta_3$ 또는 $\alpha_{IIb}\beta_3$) 또는 β_1 아과에 대해 특이적인 항체로 연속적으로 면역퍼옥시다제 염색시키기 위해 항온기 마이크로톰상에서 6 마이크론 두께의 단편을 동결된 괴로부터 절단한다.

<183> 정상 사람 피부 및 상처 육아 조직을 염색시킨 결과는 도1a 내지 도1d에 제시되어 있다. β_3 및 β_1 인테그린에 대한 모노클로날 항체 AP3 및 LM534를 동결된 단편의 면역조직화학 검정에 사용한다. 4개의 다른 사람 공여체로부터의 조직을 사용한 실험으로 동일한 결과가 수득된다. 300배 확대된 광학 현미경 사진을 도시한다.

<184> $\alpha_v\beta_3$ 인테그린은 육아 조직의 힐관상에서 풍부하게 발현되지만(도 1b), 동일한 공여체로부터의 정상 피부 단편 및 내피 세포에서는 검출되진 않는다(도 1a). 대조적으로, β_1 인테그린은 정상 표피(도 1c) 및 육아 조직(도 1d) 모두의 혈관 및 스트로마 세포상에서 및 문헌[참조: Adam et al., Cell, 63: 425(1991)]에 기술된 바와 같이 내피중의 기저 세포 모두에서 풍부하게 발현된다.

<185> B. 항-리간드 항체를 사용한 면역형광 방법

<186> 또한, 상기 제조한 사람 정상 피부 및 육아 조직의 또다른 단편을 β_3 및 β_1 인테그린, 본 빌레브란트 인자 및 라미닌의 존재에 대해 각각 검사한다. 본 빌레브란트 인자는 정상 피부(도 2a) 및 육아 조직(도 2b)의 혈관에 위치하는 반면, 라미닌은 조직 제제 모두(도 2c 및 2d)의 내피 기저막 뿐만 아니라 모든 혈관에 위치한다.

<187> C. 암 조직상의 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체의 분포

<188> 상기 검정방법 이외에도, 사람 환자의 암 조직 검체를 $\alpha_v\beta_3$의 존재 및 분포에 대해 시험한다. 조직은 인테그린 수용체 복합물 $\alpha_v\beta_3$에 특이적인 실시예 2에서 제조한 모노클로날 항체 LM609를 사용하여 염색시킨 것을 제외하고는 실시예 1A에 기술된 바와 같이 제조한다. 또한, 종양은 현미경적 조직 검정을 위해 8시간 동안 Bulins Fixative으로 대표적인 종양을 고정시켜 제조하고, 연속적인 단편을 절단하여 H&E를 염색시킨다.

<189> 방광, 결장암 및 폐암 조직의 면역퍼옥시다제 염색의 결과는 각각 도 3a 내지 도 3d에 제시되어 있다. $\alpha_v\beta_3$은 검정된 4개의 암 검체에 존재하는 혈관상에서만 풍부하게 발현되는 반면, 조직에 존재하는 기타 어떠한 세포상에서도 검출되지 않는다.

<190> 따라서, 본원에 기술된 결과는 $\alpha_v\beta_3$ 인테그린 수용체가 특이적 조직 형태, 즉 맥관 형성이 발생하는 육아된 대사 조직 및 기타 조직에서 선택적으로 발현되지만 새로운 혈관의 형성이 정지된 정상 조직에서는 발현되지 않음을 보여준다. 따라서, 이들 조직은 본 발명의 치료 양태에 이상적인 표적을 제공한다.

<191> 4. 리간드-수용체 결합 검정에 의해 검출된 $\alpha_v\beta_3$-특이적 합성 펩타이드의 확인

<192> $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 수용체 결합 활성을 길항시키는 이들의 능력을 정제된 리간드-수용체 결합 검정으로 측정함으로써 실시예 1에서 제조한 합성 펩타이드를 스크리닝한다. 당해 결합 연구에 대한 방법은 문헌[참조: Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:10003-10007(1993), Smith et al., J.

Biol. Chem., 265:11008-11013(1990), and Pfaff et al., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238(1994)]에 기술되어 있으며, 이의 내용은 참조로서 본원에 인용된다.

<193> 본원에는 수용체가 고체 지지체에 고정되어 있고 리간드 및 길항제가 가용성인 리간드-수용체 결합 검정으로 길항제를 확인하는 방법이 기술되어 있다. 또한, 본원에는 리간드가 고체 지지체에 고정되어 있고 수용체 및 길항제가 가용성인 리간드-수용체 결합 검정으로 길항제를 확인하는 방법이 기술되어 있다.

<194> 요약하면, 선택 정제된 인테그린을 웰당 50ng의 피복 농도로 Titertek 미소역가 웰에서 별도로 고정시킨다. 리간드-수용체 결합 검정에 사용된 수용체의 정제 방법은 본 기술분야에 공지되어 있으며, 본 기술분야의 당업자에게 친숙한 방법으로 용이하게 수득할 수 있다. 18시간 동안 4℃에서 항온처리한 후, 트리스-완충된 염수중의 소 혈청 알부민(BSA) 10mg/ml를 사용하여 평판상의 비특이적 결합부위를 차단한다. 억제 연구를 위해, 인테그린 수용체, $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 ^{125}I-비트로넥틴 또는 ^{125}I-피브리노겐의 결합을 억제시키는 표 1중에서 선택된 다양한 농도의 펩타이드의 능력을 시험한다. 이들 리간드가 특정한 인테그린, 즉 $\alpha_v\beta_3$의 경우에는 비트로넥틴 및 $\alpha_{IIb}\beta_3$의 경우에는 피브리노겐에 대해 최상의 결합력을 나타낼지라도, 어느 수용체에 대한 피브리노겐의 결합을 차단시키기 위해 펩타이드를 사용하는 결합 억제 연구로 리간드에 대한 수용체의 최대 결합을 절반으로 억제시키는데 요구되는 펩타이드의 정확한 양(μM)을 측정할 수 있다. 방사선 표지된 리간드는 1nM의 농도로 사용하고, 결합은 비표지된 합성 펩타이드를 사용하여 별도로 수행한다.

<195> 3시간 동안 항온처리한 후, 세척하여 유리 리간드를 제거하고, 결합된 리간드를 감마 계측기로 검출한다. 표 1에 수록된 사이클릭 펩타이드를 선택 사용하여 별도로 고정시킨 $\alpha_v\beta_3$ 및 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 수용체에 대한 수용체 및 방사선 표지된 피브리노겐의 결합을 억제시킬 경우, 데이터 수치간의 오차가 통상적으로 11% 이하인 검정 데이터를 고도로 수득할 수 있다. IC_{50} μM의 값은 표 2에 도시된 바와 같이 2회 평균 데이터 수치 ± 표준 편차로서 표시된다.

<196> [표 2]

펩타이드 번호	$\alpha_v\beta_3$(IC50 μM)	$\alpha_{IIb}\beta_3$(IC50 μM)
62181	1.95±0.62	14.95±7.48
62184	0.05±0.001	0.525±0.10
62185	0.885±0.16	100±0.001
62187	0.05±0.001	0.26±0.056
62186	57.45±7.84	100±0.001
62175	1.05±0.07	0.63±0.18
62179	0.395±0.21	0.055±0.007

<198> 따라서, 각각 D-아미노산 잔사를 포함하는 RGD-함유 또는 RGD-유도된 사이 클릭 펩타이드 62181, 62184, 62185 및 62187은 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 수용체와 비교하여 최대 억제의 절반을 억제시키는데 요구되는 저농도의 펩타이드로 측정한 바와 같이 $\alpha_v\beta_{3b}$에 대한 피브리노겐의 결합을 우선적으로 억제한다. 대조적으로, 기타 RGE-함유 또는 RGE-유도된 사이클릭 펩타이드 62186, 62175 및 62179는 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 피브리노겐 결합을 차단하는데 효과적이지 못하거나 $\alpha_v\beta_3$과 비교하여 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합을 우선적으로 억제하지 못한다. 이들 결과는 최근 문헌[참조: Pfaff, et al., J. Biol. Chem., 269:20233-20238(1994)]에서 공개된 결과와 일치하며, 사이클릭 펩타이드 RGDFV(여기서, F는 D-아미노산 잔기를 의미한다)는 $\alpha_v\beta_3$인테그린에 대한 피브리노겐의 결합을 특히 억제하고 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 또는 $\alpha_5\beta_1$ 인테그린에 대해서는 억제하지 않는다. 유사한 결합 억제 검정이 RGD 모티프, α_v 수용체 아단위 및 α_{IIb} 수용체 아단위로부터 유도된 서열 또는 비트로넥틴 리간드 아미노산 잔기 서열를 포함하거나 결실한 선형 펩타이드로 수행한다. 선형 펩타이드, 62880(VN-유도된 아미노산 잔기 35 내지 49), 62411(α_v-유도된 아미노산 잔기 676 내지 687), 62503(α_v-유도된 아미노산 잔기 655 내지 667) 및 62502(α_{IIb}-유도된 아미노산 잔기 296 내지 306)은 표 1에 수록되어 있다. 이러한 각각의 펩타이드를 분리 검정에 사용하여 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 또는 $\alpha_v\beta_3$에 대한 비트로넥틴(VN) 또는 피브리노겐 (FG)중 하나의 결합을 억제시킨다. 각 실험에서 개개 검정의 IC_{50} μM 데이터는 표 3에 도시되어 있다.

<199> [표 3]

펩타이드 번호	$\alpha_{IIb}\beta_3$ IC_{50} (μM)		$\alpha_v\beta_3$ IC_{50} (μM)	
	FG	VN	FG	VN
62880	4.2	0.98	<0.1	0.5
62411	>100	>100	>100	>100
62503	>100	>100	>100	>100
62502	90	5	>100	>100

<201> 선형화된 펩타이드를 사용하여 선택된 인테그린에 대한 리간드 결합억제 검정의 결과는 펩타이드 62880만이 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 수용체와 비교하여 최대억제의 절반을 억제시키는데 요구되는 저농도의 펩타이드로 측정한 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$에 대한 FG 또는 VN의 최대 결합의 절반을 억제시키는데 효과적인 것을 나타낸다. 펩타이드 62502가 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 VN 결합을 차단시키는데 효과적일지라도, 기타 어떠한 선형화된 펩타이드도 $\alpha_v\beta_3$에 대한 리간드 결합을 차단시키는데 효과적이지 않다.

<202> 따라서, 본원에 기술된 리간드-수용체 검정을 사용하여, 본 발명을 실행하는데 비트로넥틴 수용체($\alpha_v\beta_3$) 길항제로서 사용되는 바와 같이 특정한 인테그린 수용체, 특히 $\alpha_v\beta_3$에 대해 선택적인 특이성을 나타내는 사이클릭 또는 선형의 합성 펩타이드를 스크리닝할 수 있다.

<203> 5. 미처리된 병아리 융모요막(CAM)의 특성화

<204> A. CAM의 제조

<205> 혈관 형성은 정상 배 맥관형성이 성숙한 혈관의 형성을 유발한 후에 융모요막(CAM)상에서 유도될 수 있다. 혈관 형성은 문헌[참조: Leibovich et al., Nature, 329: 630(1987) 및 Ausprunk et al., Am. J. Pathol., 79: 597(1975)]에 기술된 바와 같이 특이적 사이토킨 또는 종양 단편에 대한 반응으로 유도할 수 있다. CMV는 실시예 6 및 7에 각각 기술된 바와 같이 혈관 형성의 연속적인 유도 및 이의 억제를 위해 병아리 배로부터 제조한다. 생후 10일된 병아리 배를 McIntyre Poultry(Lakeside, CA)로부터 수득하여 37℃에서 60% 습도로 항온처리한다. 작은 기능 드릴(Dremel, Division of Emerson Electric Co. Racine WI)을 사용하면서 공기 포켓 위로 직접 계란의 말단에 있는 껍질을 통해 작은 구멍을 만든다. 제2 구멍은 계란을 불빛에 비춰 미리 검사한 배 혈관 이외의 영역에 넓은 크기로 계란에 구멍을 뚫는다. 원래의 구멍에 부의 압력을 적용하는데, 이것은 CAM(융모요막)이 껍질 막을 벗겨내고 CAM 위로 인조 공기 포켓를 발생시킨다. 소형 모델 연마 휠 (Dremel)을 사용하여 적가된 CAM 위의 껍질을 통해 1.0cm x 1.0cm 면적의 영역을 절단한다. 작은 영역이 밑에 있는 CAM에 직접 접근하도록 한다.

<206> 이어서, 생성된 CAM 제제를 배 혈관신생에 대한 효과를 평가하는데 사용된 모델을 반영하는 CAM에 대한 추가의 처리 없이 6일 동안의 배형성, 즉 활성 혈관신생에 의해 표시된 단계에 사용하거나 혈관형성이 정지된 10일 동안의 배형성에 사용한다. 따라서, 실시예 6에 기술된 바와 같이 사이토킨 처리 또는 종양 접촉에 대한 반응으로 재생된 혈관 형성을 유도하기 위해 본 발명에 후자의 제제를 사용한다.

<207> B. CAM의 조직학

<208> 실시예 8에 기술된 바와 같이 병아리 배로부터 절단된 병아리 배 CAM 및/또는 사람 종양의 현미경적 구조를 검정하기 위해, CAM 및 종양을 실시예 3A에 기술된 바와 같이 동결 절단을 위해 제조한다. 6 마이크론 두께의 단편을 면역형광 검정용 항온기 마이크로톰상에서 동결된 블록으로부터 절단한다.

<209> 도 4는 비처리되고 10일 경과한 CAM에서 혈관이 없는 부분의 전형적인 광현미경 사진을 보여준다. CAM 시스템에서의 혈관 형성이 당해 배형성 단계에 의해 정지되기 때문에, 당해 시스템은 인접한 부분으로부터 현재 임의의 혈관을 결실한 CAM의 부분까지 현존하는 혈관으로부터 새로운 혈관계의 생성을 자극하기 위해 본 발명에 유용하다.

<210> C. 면역형광법의 의해 검출된 CAM에서의 인테그린 단면

<211> CAM 조직에 존재하는 인테그린 수용체의 조직 분포를 관찰하기 위해, 종양 조직 및 병아리 CAM 조직 모두의 6㎛ 동결 단편을 30초 동안 아세톤에 고착시키고, 문헌[참조: Buck et al., J. Cell. Biol., 107:2351(1988)]에 기술된 바와 같이 β_1 인테그린 아단위에 특이적인 모노클로날 항체인 10㎍/ml mAb CSAT를 사용한 면역형광법으로 염색시키고, 이것을 대조군으로 사용하거나 실사예 2에서 제조된 LM609를 대조군으로 사용한다. 1차 염색은 염소 항-마우스 로다민 표지된 2차 항체(Tago)의 1:250 희석액을 사용한 염색으로 수행하여 1차 면역 반응 생성물을 검출한다. 이어서, 당해 단편을 Zeiss 면역형광법 화합물 현미경을 사용하여 검정한다.

<212> 면역 형광법의 검정 결과는 비처리되고 10일 경과한 병아리 배에 존재하는 성숙한 혈관이 인테그린 β_1 아단위를 발현시킴을 보여준다(도 5a). 대조적으로, 도 5A에 도시된 조직의 연속 단편은 LM609와의 어떠한 면역반응성도 나타나지 않았다(도 5b). 따라서, LM609 항체에 의해 검출된 인테그린 $\alpha_v\beta_3$은 비처리되고 10일 경과된 병아리 배에 존재하는 성숙한 혈관에 의해 활성적으로 발현되지 않는다. CAM 모델 및 하기 실시예에 도시된 바와 같이, 혈관은 정상의 배형성으로 새로운 성장을 진행하거나 사이토킨 또는 종양에 의해 유도되는 반면에, 혈관은 $\alpha_v\beta_3$을 발현시킨다. 그러나, 혈관신생 후 혈관이 성장을 멈출 경우

$\alpha_v\beta_3$의 발현은 면역형광 검정법에 의해 검출할 수 없는 수준까지 감소한다. 성숙한 혈관에서의 발현 결핍과는 대조적으로 혈관 형성 과정을 겪은 혈관에서 이와 같은 $\alpha_v\beta_3$ 발현의 조절은 CAM 맥관형성 검정 시스템을 사용하여 모델화한 하기 실시예에 도시된 바와 같이 혈관형성을 조절 및 억제시키기는 본 발명의 독특한 능력을 제공한다.

<213> 6. CAM 맥관형성 검정

<214> A. 성장 인자에 의해 유도된 맥관형성

<215> 실시예 5a에 참조로 제공된 바와 같이 사이토킨 또는 성장 인자에 의해 유도되는 맥관형성을 도시한다. 본원에 기술된 실험에 있어서, 실시예 5에 기술된 CAM 제제에서의 맥관형성은 본원에 기술된 바와 같이 CAM 혈관내에 국부적으로 존재하는 성장 인자에 의해 유도된다.

<216> 맥관형성은 Hanks 조절된 염 용액(HBSS, GIBCO, Grand Island, NY)로 포화시킨 5mm x 5mm Whatman 피터 디스크(Whatman 여과지 제1번)를 위치시켜 유도하거나 혈관이 없는 영역에 10일 경과한 병아리 배의 CAM 상에 150ng/ml의 재조합 기본 섬유아세포 성장인자(βFGF)(Genzym, Cambridge, MA)를 포함하는 HBSS에 의해 유도하고, 당해 영역을 테이프로 후에 밀봉한다. 다른 검정에 있어서, 125ng/ml의 βFGF가 혈관 성장을 유도하는데 또한 효과적이다. 맥관형성은 72시간 후에 광현미경에 의해 모니터한다. CAM들 순간 동결시키고, 6㎛의 항온 단편을 아세톤으로 고착시킨 다음, 10㎍/ml의 항-β_1 모노클로날 항체 CSAT 또는 LM609를 사용하여 실시예 5C에 기술된 바와 같이 면역형광법으로 염색시킨다.

<217> 도 5c에서 면역형광 광현미경 사진은 도 5b에 도시된 미처리된 병아리 CAM에서의 $\alpha_v\beta_3$ 발현의 부재와는 대조적으로 병아리 CAM에 대한 βFGF-유도된 맥관형성시에 $\alpha_v\beta_3$의 증가된 발현을 보여준다. $\alpha_v\beta_3$은 βFGF-처리된 CAM 상의 다수의 혈관(75% 내지 80%)에서 용이하게 검출가능하다. 또한, 인테그린 β_1의 발현은 비처리된 CAM에서 볼수 있는 것으로부터 변화하지 않는 반면에 β_1은 자극된 혈관상에서 용이하게 검출가능하다.

<218> 이어서, $\alpha_v\beta_3$ 및 β_1의 상대적인 발현을 CAM 항온 단편의 레이저 초점 상 검정에 의해 βFGF-유도된 혈관생성시에 정량화한다. 이어서, 염색된 단편을 Zeiss 레이저 초점 현미경으로 검정한다. LM609로 염색시킨 25개의 혈관 및 CSAT로 염색된 15개의 혈관(평균 크기-1200 평방 ㎜, 350 내지 3,500㎟ 범위)를 랜덤 부분으로부터 선택하고, 단위 부분당 각각의 혈관에 대한 평균 로다민 형광을 레이저 초점 상 검정에 의해 임의의 단위로 측정한다. 데이터는 혈관의 임의의 단위에서의 평균 형광 강도±표준 오차(SE)로서 표시된다.

<219> 도 6에 제시된 결과는 Wilcoxon Rank Sum Test($P<0.0001$)로 측정한 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$의 염색이 βFGF로 처리한 CAM 상에서 현저하게 증강(4배 이상)된 반면에, β_1 염색은 βFGF 처리와 크게 상이하지 않았다.

<220> 또한, CAM 검정을 사용하여 β_1 및 β_3 인테그린의 발현에 미치는 또다른 효능있는 혈관생성 유도인자, 즉 종양 괴사 인자-알파(TNFα)의 효과를 검사한다. βFGF 또는 TNFα로 침지시키고 10일 경과한 배의 CAM 상에 놓은 필터 디스크는 72시간 후에 국소 혈관생성을 촉진시키는 것으로 밝혀졌다.

<221> 당해 결과는 비처리(도 7a)되거나 βFGF로 처리(도 7b) 또는 TNFα(도 c)로 처리된 CAM의 광현미경 사진에서 밝혀졌다. 혈관은 βFGF 및 TNFα 처리된 제제 모두에서 용이하게 명백해지지만, 비처리된 CAM에서는 존재하지 않는다. 따라서, 성장 인자/사이토킨의 국소 적용은 인접한 부분에 있는 성숙한 혈관으로부터 본래에 혈관이 없는 부분으로 혈관생성을 유도한다. 도 5c에 도시된 바와 같이 βFGF-유도된 혈관 및 $\alpha_v\beta_3$의 동시 발현이라는 측면에서, TNFα의 처리는 비교할만한 활성을 발생시킨다.

<222> 이들 발견은 사람 및 병아리 모두에 있어서 혈관생성과 관련된 혈관이 증강된 $\alpha_v\beta_3$의 발현을 나타낸다는 것을 보여준다. 이와 결부하여, 배양된 내피 세포상에서 $\alpha_v\beta_3$의 발현은 문헌[참조: Janat et al., J. Cell Physiol., 151: 588(1992): Enenstein et al., Exp. Cell Res., 203: 499(1992) 및 Swerlick et al., J. Invest, Derm., 99: 715(1993)]에 기술된 바와 같이 시험관내에서 여러 가지 사이토킨에 의해 유도될 수 있다.

<223> 항체 및 펩타이드 억제제가 성장-인자 유도된 맥관형성에 미치는 효과는 실시예 7A 및 7B에 제시되어 있다.

<224> B. 배 맥관형성

<225> 배 혈관신생의 자연적 형성에 미치는 맥관형성 억제 인자의 효과를 평가하기 위해 CAM 제제를 전술된 바와 같이 6일 경과한 배의 병아리 배를 제조한다. 당해 성장 단계에서, 혈관은 새롭게 성장하므로 $\alpha_v\beta_3$이 배 맥관형성에 관여하는지를 측정하는 유용한 시스템을 제공한다. CAM 시스템은 검정을 10일이 아닌 6일 경과한 배에서 수행하는 것을 제외하고는 상술된 바와 같이 제조한다. 본 발명의 항체 및 펩타이드를 사용한 처리에 의해 배 맥관형성에 미치는 효과는 실시예 7C에 제시되어 있다.

<226> C. 종양에 의해 유도된 맥관형성

<227> 종양-유도된 맥관형성에 있어서 $\alpha_v\beta_3$의 역할을 조사하기 위해, 여러 가지 $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 흑색종 및 암종 단편을 문헌[참조: Brooks et al., J. Cell Biol., 122: 1351(1993)] 및 본원에 기술된 바와 같이 생후 17일 경과한 병아리 배의 CAM으로부터 미리 성장시켜 분리한 CAM 검정에 사용한다. 당해 단편은 완충액의 존재만으로 광범위한 혈관신생을 유도한다.

<228> 맥관형성은 CAM상에 종양 단편의 직접적인 축적에 의해 CAM 검정 시스템에서 유도된다. 병아리 배 CAM의 제조는 상술된 공정과 동일하다. 여과지 디스크 대신에, $\alpha_v\beta_3$ 음성 종양인 흑색종 M21L, 사람

폐암 종양 UCLAP-3, 사람 췌장암 세포주 FG[참조: Cheresh et al., Cell 58: 945-953, 1989], 또는 사람 후두암 세포주 HEp3중의 어느 하나의 50mg 내지 55mg을 본래에 혈관이 없는 부분에 있는 CAM상에 위치시킨다.

<229> 모두 $\alpha_v\beta_3$ 음성인 M21L 사람 흑색종 세포주, UCLAP-3 사람 폐암 세포주 FG 췌장암 세포주 또는 HEp3 사람 후두암 세포주을 사용하여 병아리 배의 CAM상에서 고형 사람 종양을 성장시킨다. 8 x 10^6의 M21-L, UCLAP-3 및 FB 또는 5 x 10^5의 HEp3 세포의 단일 세포 현탁액을 멸균 HBSS 30㎕의 전체 용적으로 CAM에 먼저 적용시킨다. 구멍을 테이프로 밀봉시키고, 배를 7일 동안 배양시켜 사람 종양 병변을 성장시킨다. 7일 후에, 이제 17일 경과한 배의 종양을 CAM으로부터 절단하고, 주위의 CAM 조직으로부터 절단 분리한다. 당해 종양은 맥관형성 또는 종양 성장 검정에 사용하기 위해 50mg 내지 55mg의 종양 단편으로 얇게 절단한다. 종양 단편을 혈관이 없는 부분에 실시예 6A에 기술된 바와 같이 10일 경과한 병아리 배 CAM의 새로운 세트상에 놓는다.

<230> 병아리 배 CAM상에서 생체내 성장된 종양을 염색시켜 실시예 3A에 기술된 바와 같이 mAb LM609를 사용하여 $\alpha_v\beta_3$를 발현시킨다. $\alpha_v\beta_3$ 발현의 결핍을 나타내는 종양세포의 어떠한 특이적 염색도 관찰되지 않았다.

<231> 이어서, 이러한 CAM 종양 제제를 실시예 7D 및 실시예 7E에 기술된 바와 같이 연속적으로 처리하여 종양-유도된 맥관형성에 미치는 항체 및 펩타이드의 효과를 측정한다. 또한, CAM 종양 제제를 실시예 8, 9 및 12에 기술된 바와 같이 처리하여 종양의 퇴화 및 맥관형성성 혈관의 괴사 및 혈관 세포에 미치는 항체 및 펩타이드의 효과를 측정한다.

<232> 7. CAM 검정에서 측정된 맥관형성의 억제

<233> A. 억제제의 국소 적용에 의한 성장 인자-유도된 맥관형성의 억제

<234> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<235> $\alpha_v\beta_3$가 맥관형성에 있어서 활성적인 역할을 담당하는지를 측정하기 위해, βFGF 또는 TNFα로 포화시킨 여과 디스크를 CAM 상에 놓고, 이어서 모노클로날 항체(또한 mAb로서도 언급됨), LM609($\alpha_v\beta_3$에 대해 특이성), CSAT(β_1에 대해 특이성) 또는 P3G2($\alpha_v\beta_5$에 대해 특이성)을 당해 제제에 가한다.

<236> βFGF로 포화시킨 여과 디스크에 의해 10일 경과한 병아리 배의 CAM 상에서 맥관형성이 유도된다. 이어서, 디스크를 멸균 HBSS 25㎕의 전체 용적중의 mAb 25mg을 포함하는 HBSS 50ml로 0, 24 및 48시간에서 처리한다. 72시간에서, CAM을 수거하여 35mm 페트리 디쉬에 넣은 다음, 인산염 완충된 염수 1ml로 1회 세척한다. 이어서, 여과지의 하부 및 CAM 조직을 Olympus 입체 현미경하에 2명의 관찰자로 하여금 이중맹의 형식으로 검정한다. 맥관형성 억제는 CAM이 디스크하에 직접 CAM의 혈관 침윤의 >50% 감소를 나타낼 경우에 현저한 것으로 고려된다. 실험은 조건당 6 내지 7개의 배를 사용하여 항체당 4회 반복한다.

<237> βFGF-유도된 맥관형성에 미치는 mAb의 처리 효과의 결과는 도 8a 내지 8b에 제시되어 있다. 혈관이 없는 비처리된 CAM 재제를 도 8b에 도시된 βFGF-혈관 유도와 비교하기 위해 도 8a에 도시하고, 그에 미치는 mAb의 효과를 도 8c 내지 8e에 도시한다. mAb LM609로 처리된 이들 CAM의 약 75%는 도 8e에 도시된 바와 같이 맥관형성의 >50% 억제를 나타내고, 이들중 대부분은 혈관 침윤이 없는 것으로 나타났다. 대조적으로, 완충수 대조군(도 8a) 및 mAb CSAT로 처리된 디스크(도 8c) 및 P3G2(도 8d)는 광범위한 맥관형성을 일정하게 나타냈다.

<238> 맥관형성을 TNFα를 사용하여 유도하는 경우 동일한 결과가 수득된다. 혈관이 없는 부분에 인접한 정상 혈관 성장에 존재하는 선재하는 성숙 혈관에 대한 이들 동일한 항체의 효과를 검사하기 위해, mAb로 포화시킨 여과 디스크를 사이토킨을 국소 적용시키지 않은 10일 경과한 배의 CAM의 맥관 형성된 영역상에 놓는다. 입체 현미경하에 가시화하여 검정한 바와 같이 3개의 mAb 중의 어느것도 선재하는 혈관에 영향을 미치지 않는다. 따라서, mAb LM609는 새로운 혈관 성장만을 선택적으로 억제하고, 인접한 부위에 존재하는 성숙한 혈관에 영향을 미치지 않는다. 이와 동일한 효과가 각각 실시예 7A2) 및 7E2)에 기술된 바와 같이 국소 또는 정맥내 적용된 합성 펩타이드의 적용시에도 발견된다.

<239> 2) 합성 펩타이드의 처리

<240> 또한, CAM 검정을 본 발명의 합성 펩타이드로 수행하여 성장 인자 유도된 맥관형성에 미치는 사이클릭 및 선형화된 펩타이드의 효과를 측정한다. 당해 펩타이드는 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조하고, 펩타이드 80㎍을 총 용적 25μl의 멸균 HBSS에 넣는다. 당해 펩타이드 용액을 CAM 제제에 즉시 적용시키고, 24시간 및 48시간에서 다시 적용한다. 72시간에서 여과지 및 주위의 CAM 조직을 절단하고, 상술된 바와 같이 관찰한다.

<241> 이렇게 밝혀진 검정 결과는 합성 펩타이드를 종양 유도된 혈관내로 정맥내 주사한 실시예 7E2)에 기술된 바와 같이 도 9a 내지 9c에 도시한 결과와 유사하다. 여기서, 대조군 펩타이드 62186의 경우, 도 9a에 도시된 바와 같이 βFGF-유도된 혈관은 방해받지 않고 유지된다. 대조적으로, 사이클릭 RGD 펩타이드 62814를 여과지에 적용하는 경우, 새로운 맥관이 없는 부분을 제외한 혈관의 형성은 억제된다. 당해 효과는 하기 실시예 7E2)에 기술된 바와 같이 도 9b에 도시된 유형과 유사하다. 또한, 정맥내 주사된 펩타이드에 대해 도 9c에 도시된 바와 같이, 성숙한 혈관이 성장 인자 포화된 여과지의 위치로부터 여전히 떨어져 있는 부분에 있어서는 이러한 동떨어진 맥관상에 합성 펩타이드를 국소 처리하는 경우 어떠한 효과도 없었다. 따라서. 맥관형성에 대한 펩타이드의 억제 활성은 성장 인자에 의해 유도된 맥관형성 부분에 제한되고, 선재하는 인접 성숙 혈관에 영향을 미치지 않거나 주변에 대해 어떠한 유해한 세포독성도 유발하지 않는다.

<242> 유사한 검정을 실시예 1에서 제조하고 표 1에 수록된 기타 합성 펩타이드로 수행한다.

<243> B. 억제제의 정맥내 적용에 의한 성장 인자-유도된 맥관형성의 억제

<244> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<245> CAM 제제내로 정맥내 주입된 모노클로날 항체를 사용한 성장 인자-유도된 맥관형성의 효과를 또한 본 발명에 사용하기 위해 평가한다.

<246> 정맥내 주사용 병아리 배 CAM은 일부 변형체를 사용하여 본질적으로 실시예 7A에 기술된 바와 같이 제조한다. 불빛에 비춰 검사하는 과정중에 뚜렷한 혈관을 선택하고, 계란 껍질상에 표시를 하여 이의 위치를 나타낸다. 껍질에 구멍을 내고, CAM을 적가한 다음, βFGF 포화된 여과지를 상술된 바와 같이 CAM 상에 놓는다. 구멍을 무균 테이프로 밀봉하고, 배를 배양기에 넣는다. 24시간 경과하여, 미리 선택한 뚜렷한 혈관위에 직접 계란 껍질의 측면부에 두 번째 작은 구멍을 주위깊게 절단한다. 완전한 배의 막을 제외한 외부 계란 껍질을 주위깊게 제거한다. 껍질막을 소량의 광유(Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT)를 사용하여 투명하게 만들어 혈관을 용이하게 가시화한다. 정제된 무균 mAb 또는 이하 기술되는 합성 펩타이드를 멸균 PBS 총 용적 100μl중에서 배당 IgG 200㎍의 투여량으로 30 표준침으로 1회 혈관내로 직접 접종시킨다. 구멍을 테이프로 밀봉시키고, 배를 72시간 동안 배양한다. 여과 디스크 및 주위의 CAM 조직을 전술된 바와 같이 검정한다.

<247> LM609를 사용하여 미리 정맥내 접종시킨 CAM 조직 또는 종양 조직에서 LM609 mAb의 위치를 측정하기 위해, 본원 및 하기 실시예에 기술된 바와 같이 고착된 단편을 실온에서 1시간 동안 HBSS중의 2.5% BSA로 차단시키고, 염소 항-마우스로다민 표지된 2차 항체(Tago)의 1:250 희석액으로 염색시킨다. 이어서, 단편을 Zeiss 면역형광 화합물 현미경으로 검정한다.

<248> βFGF 유도된 혈관 CAM 제제에 대한 정맥내 항체 처리의 결과는 도 10a 내지 10c에 도시되어 있다. 도 10a는 βFGF 처리의 결과 유도된 맥관형성을 도시한다. 도 10b에 도시된 바와 같이 mAb P3G2, 항-$\alpha_v\beta_5$ 항체에 정맥내 노출할 경우 βFGF 유도된 혈관의 존재에 있어서 어떠한 변화도 없었다. 대조적으로, LM609, 항-$\alpha_v\beta_3$ 항체를 사용하여 βFGF 유도된 맥관형성 CAM 제제를 처리하면 도 10c에 제시된 바와 같이 여과지 부분 내에서의 새로운 혈관의 성장이 완전히 억제되었다. 따라서, 맥관형성에 미치는 억제 효과는 LM609 항-$\alpha_v\beta_3$-특이성 항체에 의한 $\alpha_v\beta_3$ 수용체 활성의 억제를 유발한다. $\alpha_v\beta_5$의 차단이 CAM 여과지 부분에서의 맥관신생의 형성을 억제하지 않기 때문에, $\alpha_v\beta_5$는 새로운 혈관의 성장을 위한 αvβ3와 비교하여 본질적이지 않다.

<249> 2) 합성 펩타이드의 처리

<250> 실시예 1에서 제조한 합성 펩타이드를 상술된 바와 같이 CAM 제제의 성장인자 유도된 혈관내로 분리하여 정맥내 주사한다. 혈관의 생존력에 대한 펩타이드의 효과를 유사하게 평가한다.

<251> C. 국소 적용에 의한 배 맥관형성의 억제

<252> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<253> $\alpha_v\beta_3$가 배 맥관형성에 관여하는지를 측정하기 위해, CAM상의 혈관의 새로운 성장에 미치는 LM609의 효과를 6일 경과한 배에서 검사하고, 단계를 실시예 5A에 기술된 바와 같이 활성 맥관신생에 의해 표시한다. CAM 검정은 사이토킨의 부재하에 6일된 배의 CAM 상에 놓여진 mAb로 포화시킨 디스크를 연속적으로 국소 적용하여 실시예 6C에 기술된 바와 같이 수행한다. 3일 후, CAM을 절단하여 사진촬영한다. 각각의 실험에는 그룹당 6개의 배가 포함되고 2회 반복된다.

<254> CSAT(도 11a) 또는 P3G2(도 11b)가 아닌 항체 LM609(도 11c)는 이러한 조건하에 혈관 성장을 차단하며, 이것은 $\alpha_v\beta_3$이 맥관형성의 유도를 위해 첨가된 성장 인자와는 독립적인 배 맥관신생에 있어서 실질적인 역할을 담당함을 나타낸다.

<255> 2) 합성 펩타이드의 처리

<256> 실시예 1에서 제조한 합성 펩타이드를 CAM에의 국소 적용 또는 혈관에의 정맥내 적용에 의해 상기와 같이 제조된 실시예 5A2)에 기술된 바와 같은 배 CAM 제제에 가한다.

<257> 혈관의 생존력에 미치는 펩타이드의 효과를 유사하게 평가한다.

<258> D. 국소 적용에 의한 종양-유도된 맥관형성의 억제

<259> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<260> 배 맥관형성에 미치는 항-$\alpha_v\beta_3$ 길항제, LM609 및 펩타이드 62181, 62184, 62185, 62187 및 62880의 효과를 평가하는 상술된 맥관형성의 검정 이외에, 종양-유도된 맥관형성에서의 $\alpha_v\beta_3$의 역할을 또한 조사한다. 유도인자로서 17일된 병아리 배의 CAM으로부터 미리 성장 및 분리한 $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 M21-L 흑색종 단편을 유도인자로서 사용한다. 당해 단편은 실시예 6C에 기술된 바와 같이 제조한다.

<261> 실시예 7a1)에 상술된 바와 같이, mAb는 HBSS 25μl중에서 25㎍의 농도로 분리하여 국소 적용하고, 구멍을 테이프로 밀봉한다. 동일한 형태로 24시간 및 48시간에서 mAb를 다시 가한다. 72시간에서, 종양 및 주위의 CAM 조직을 실시예 7A1)에 기술된 바와 같이 검정한다.

<262> 실시예 6C에 기술된 바와 같이, 배양된 M21-L 세포를 이식시켜 초기에 종양을 유도하는데 이는 문헌[참조: Felding-Habermann et al., J. Clin. Invest., 89: 2018(1992)]에 기술된 바와 같이 10일된 병아리 배의 CAM상에서 인테그린 $\alpha_v\beta_3$를 발현시키지 않는다. 이들 $\alpha_v\beta_3$-음성 단편은 단독의 완충액, 또는 mAbS CSAT (항 B_1) 또는 P3G2(항 $\alpha_v\beta_5$)의 존재하에 광범위한 혈관 신생을 유도한다. 대조적으로, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)는 종양 매스 및 주위의 CAM내로 대부분의 혈관을 침투시키지 못한다.

<263> 종양-유도된 맥관형성에 미치는 mAb의 효과를 정량화하기 위해, CAM의 초점면내에 종양을 포함하는 혈관을 이중맹 형태로 두명의 관찰자에 의해 입체 현미경으로 계수한다. 도 12에 제시된 각각의 데이터 막대는 2회 실험을 수행한 각각의 그룹에 있어서 12개의 CAM으로부터 혈관의 평균치 ± SE를 나타낸다.

<264> 당해 정량 검정으로 Wilcoxon Rank Sum 시험에 의해 측정된 같이 완충액 또는 기타 mAb P3G2 또는 CSAT(P<0.0001)로 처리된 종양과 비교하여 mAb LM609로 처리한 종양을 포함하는 혈관의 수가 3배 감소한 것으로 나타났다. M21-L 종양이 $\alpha_v\beta_3$를 발현하지 않는다는 사실은 mAb LM609가 종양세포에서 보다 혈관에 직접 영향을 미침으로써 맥관형성을 억제시킴을 나타낸다. 이들 결과는 $\alpha_v\beta_3$의 조직학적 분포가 종양내의 혈관으로 제한되고 종양 세포 자체에 한정되지 않는, 도 3a 내지 도 3d에 도시된 암 조직 검체에 있어서 $\alpha_v\beta_3$의 조직학적 분포와 상응한다.

<265> 2) 합성 펩타이드를 사용한 처리

<266> 실시예 1에서 제조한 합성 펩타이드를 상술한 바와 같이 종양 유도된 맥관형성 CAM 검정 시스템에 국소 적용한다. 혈관의 생존력에 미치는 펩타이드의 효과를 유사하게 검정한다.

<267> E. 정맥내 적용에 의한 종양-유도된 맥관형성의 억제

<268> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<269> 실시예 7D1)에 기술된 바와 같이 제조한 종양 유도된 혈관을 정맥내 주사에 의해 적용된 mAb로 처리한다. 종양을 실시예 7D1)에 기술된 바와 같이 CAM상에 놓고, 구멍을 테이프로 밀봉시킨 다음, 24시간 경과하여 정제된 mAb 200㎍을 상술된 바와 같이 병아리 배 혈관내에 1회 정맥내 접종한다. 이어서, 병아리 배를 7일동안 항온처리한다. 이어서, 맥관형성의 정도를 상술된 바와 같이 관찰한다. 하기 실시예 8에 기술된 바와 같이, 이 기간 후에 종양을 절단하고 이의 중량을 검정하여 종양 성장에 미치는 항체 노출의 효과 및 억제를 측정한다.

<270> 2) 합성 펩타이드를 사용한 처리

<271> CAM 검정 시스템에서 종양 유도된 혈관에의 펩타이드 노출 효과를 또한 평가한다. 종양-CAM 제제를 상술한 바와 같이 사용하지만, mAb의 정맥내 주사 대신에 실시예 1 및 실시예 7A2)에 기술된 바와 같이 제조한 합성 펩타이드를 가시화된 혈관내에 분리하여 정맥내 주사한다.

<272> 즉 HCl 염을 함유하는 사이클릭 펩타이드 66203 및 대조군 펩타이드 62186을 사용한 CAM 검정 결과는 도 9a 내지 도 9c에 도시되어 있다. 도 9a에서, 대조군 펩타이드를 사용한 처리는 본래에 CAM의 혈관이 없는 부분으로 성장시키기 위해 종양 처리에 의해 유도된 대량의 혈관에 영향을 미치지 않는다. 대조적으로, 사이클릭 RGD 펩타이드 66203, $\alpha_v\beta_3$에 대한 길항제를 여과지에 적용하는 경우, 혈관의 형성은 도 9b에 도시된 바와 같이 새로운 혈관이 없는 부분을 제외하고 억제된다. RGD-함유 펩타이드의 억제 효과는 특이적이며, 종양의 위치와 인접한 혈관에 어떠한 유해효과도 없는 것으로 증명된 바와 같이 위치한다. 따라서, 도 9c에서는 억제 펩타이드를 CAM 검정 시스템내로 정맥내 주사할 경우, 종양의 위치와 인접한 부분에서 CAM에 선재하는 성숙한 혈관에 대한 어떠한 효과도 관찰되지 않았다. 당해 위치에 있는 선재하는 혈관은 이들 선재하는 혈관으로부터의 종괴내로 새로운 혈관의 생성이 억제될지라도 상기 혈관내에서 유동하는 억제 펩타이드에 의해 어떠한 영향도 받지 않는다. 따라서, 실시예 4에서 리간드-수용체 검정으로 $\alpha_v\beta_3$의 길항제인 것으로 앞서 밝혀진 66203 및 62184를 포함하는 합성 펩타이드는 혈관의 성장을 제한하고 선재하는 성숙 혈관의 성장을 제한하지 않는 맥관형성을 억제하는 것으로 입증되었다. 또한, 펩타이드의 정맥내 주입은 도 9c에서 완전한 혈관에 의해 입증된 바와 같이 주위의 부분에 어떠한 유해한 세포독성도 유발하지 않는다.

<273> 유사한 검정을 실시예 1에서 제조한 기타 합성 펩타이드를 사용하여 수행하고 표 1에 수록한다.

<274> 8. CAM 검정에서 측정한 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 종양 조직 성장의 억제

<275> 실시예 7D1)에 기술된 바와 같이, 성장 인자 또는 종양 유도된 맥관형성에 미치는 항-$\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효과를 시각적으로 검정하는 것 이외에, 길항제의 효과를 노출에 이은 종괴 변화를 측정하여 또한 평가한다. 당해 검정에 있어서, 종양 유도된 길항 CAM 검정 시스템은 실시예 6C 및 7D에 기술된 바와 같이 제조한다. 7일 동안의 배양기간 후에, 생성된 종양을 CAM으로부터 절단하고, 잔류하는 CAM 조직 밖으로 정돈한 다음, 인산염 완충 염수 1ml로 세척하여 각각의 종양에 대해 습윤 중량을 측정한다.

<276> 또한, 현미경적 조직학적 검정을 위한 종양의 제조는 Bulins Fixative에서 8시간 동안 대표적인 종양을 고착시키고 파라핀에 혼입시키는 것을 포함한다. 연속 단편을 절단하고, 현미경적 검정을 위해 헤마톡실린 및 에오신(H&E)으로 염색시킨다[참조: Gladson, et al., J. Clin. Invest., 88: 1924(1991)]. 단편은 250배로 Olympus 화합물 현미경을 사용하여 사진 촬영한다.

<277> A. 국소 적용

<278> 대조군 완충액(HBSS), P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)을 국소 적용한 전형적인 사람 흑색종 종양(M21L) 중량의 결과는 표 4에 기술되어 있다. 배의 수는 표 하단에 도시된 바와 같이 SE의 평균과 함께 계산된 각각으로부터 평균 종양 중량을 mg으로 각각 처리한 것으로부터 계산한다.

<279> [표 4]

배 번호	mAb 처리	종양 중량(mg)
1	HBSS	108
2		152
3		216
4		270
5		109
6		174
1	P3G2	134
2		144
3		408
4		157
5		198
6		102
7		124
8		99
1	LM609	24
2		135
3		17
4		27
5		35
6		68
7		48
8		59

<281> mAb 처리 평균 종양 중량(mg)

<282> HBSS 대조군 172±26

<283> P3G2 171±36

<284> LM609 52±13

<285> CAM 검정 시스템에서 LM609에 대한 $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 흑색종 종괴의 노출은 172mg±26 내지 52mg±13의 비처리된 평균 종양 중량을 감소시킨다. P3G2 항체는 종괴에 어떠한 영향도 미치지 않는다. 따라서, $\alpha_v\beta_3$-특이성 LM609 항체의 국소적용에 의해 $\alpha_v\beta_3$ 수용체의 차단은 선행의 실시예에서 도시된 바와 같이 맥관형성의 억제와 함께 종괴의 퇴화를 유발한다. P3G2에 노출시킨 종괴의 측정된 직경은 평균적으로 약 8mm 내지 1cm이다. 대조적으로, LM609-처리된 종양은 직경이 평균 2 내지 3mm이었다.

<286> 이들 종양의 동결된 단편은 LM609에 노출시킨 종양의 결실 또는 유기 세포구조와는 대조적으로 P3G2에 노출시킨 종양에 대해 완전한 종양 포켓구조를 나타낸다. 따라서, $\alpha_v\beta_3$ 수용체 활성은 $\alpha_v\beta_3$ 음성 종양을 위해 필수적이어서 $\alpha_v\beta_3$-발현 혈관신생의 성장에 의해 육성된 이의 크기를 유지한다. 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 $\alpha_v\beta_3$의 차단은 궁극적으로 종괴를 감소시키는 종양내에서 맥관형성을 억제시킨다.

<287> B. 정맥내 적용

<288> 대조군 완충액(PBS, 인산염 완충된 염수), CSAT(항-β_1) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)를 국소 적용시킨 전형적인 암종(UCLAP-3) 중량의 결과는 표 5에 수록되어 있다. 배의 수는 표 하단에 도시된 바와 같이 SE의 평균과 함께 계산된 각각으로부터 평균 종양 중량으로 처리한 각각에 대해 계산한다.

<289> [표 5]

배 번호	mAb 처리	종양 중량(mg)
1	PBS	101
2		80
3		67
4		90
1	CSAT	151
2		92
3		168
4		61
5		70
1	LM609	16
2		54
3		30
4		20
5		37
6		39
7		12

<291> mAb 처리 평균 종양 중량(mg)

<292> PBS 대조군 85±7

<293> CSAT 108±22

<294> LM609 30±6

<295> CAM 검정 시스템에서 LM609에 대한 $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 종괴의 노출은 85mg±7 내지 30mg±6의 비처리된 평균 종양 중량을 감소시킨다. CSAT 항체는 종괴의 중량에 영향을 미치지 않는다. 따라서, $\alpha_v\beta_3$-특이적 LM609 항체의 정맥내 적용에 의한 $\alpha_v\beta_3$ 수용체의 차단은 선행 실시예에 도시된 바와 같이 맥관생성의 억제와 함께 상기 흑색종 종괴에 대해 퇴화시킨 바와 같이 암종을 퇴화시킨다. 또한, 사람 흑색종 종말 성장은 LM609의 정맥내 주사에 의해 유사하게 억제된다.

<296> 9. CAM 검정으로 측정한 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 종양 조직 성장의 퇴화

<297> 종양 성장 및 생존율에 미치는 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효과를 평가하기 위해, 사람 흑색종의 단편 및 폐, 췌장 및 후두암종의 단편을 실시예 5A에 기술된 바와 같이 10일된 배의 CAM 상에 놓는다.

<298> A. 정맥내 적용

<299> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<300> a. LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 및 CSAT(항-β_1)을 사용한 처리

<301> $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 흑색종 M21-L, 암종 FG, 사람 폐암 UCLAP-3, 또는 사람 췌장 암종 HEp3의 암종 단편을 사용하여 CAM을 이식시킨 후 24시간 경과하여, 배를 PBS 단독으로 또는 mAB LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 CSAT(항-β_1)의 단일 투여량 (300μm/100μl)으로 정맥내 주사한다. 종양을 추가로 6일 동안 증식시킨다. 배양 기간 말기에, 당해 종양을 주의깊게 절단하고, 주위의 CAM 조직 밖으로 절단한다. 종양절단은 용이하게 한정될 수 있는 고체 종괴만을 제거하는 2개의 독립된 조사기로 수행한다. 종양의 윤곽이 명확하여 고체 종양 괴로부터 용이하게 식별가능한 얇은 반투막(CAM)을 종양 괴 그 자체를 방해하지 않으면서 제거한다. 절단된 종양을 정량하고, 형태학적 및 조직학적으로 검사한다.

<302> 도 13에 도시된 바와 같이, 7일 후에 습윤 종양 중량을 측정하고, 처리전의 최초 종양 중량과 비교한다. 각각의 막대는 그룹당 평균±종양 5 내지 10개의 S.E.를 나타낸다. 시험된 모든 종양에 있어서 대조군과 비교했을때 mAb LM609는 종양 성장을 현저하게 억제시킨다($p<0.001$). 모든 경우에 PBS 또는 CSAT로 처리한 종양을 증식시킨다. 대조적으로, mAb LM609는 이들 종양의 성장을 방해할 뿐만 아니라, 대부분의 경우에서 광범위한 퇴화를 유도한다. 중요하게는, 이들 종양 세포는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$를 발현시키지

않으며, 이는 성장의 억제가 직접 종양 세포에 대해서보다 맥관신생에 미치는 당해 항체의 항-맥관형성 효과에 기인함을 입증한다.

<303> b. LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 및 P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)를 사용한 처리

<304> 사람 M21-L 흑색종 종양 단편(50mg)을 실시예 5A에 기술된 바와 같이 10일된 배의 CAM 상에 이식시킨다. 24시간 경과한 후, PBS 단독으로 또는 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)의 단일 투여량(300㎍/100㎕)을 사용하여 배를 정맥내 주사한다. 이어서, 상기 실시예 9A1)에 기술된 바와 같이 종양을 증식시키고, 본원에 기술된 바와 같이 형태학적 및 조직학적으로 검사한다.

<305> mAb P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 처리한 대표적인 예의 M21-L 종양을 형태학적으로 검사한다. P3G2 처리된 종양은 거대(8mm의 직경)하고 바람직하게 혈관형성된 반면에, mAb LM609로 처리된 종양은 소형(3mm의 직경)이고 혈관에서 검출 불가능하였다.

<306> 조직학적 단편을 제조하고 실시예 9A1) a에 기술된 바와 같이 헤마톡실린 및 에오신으로 오염시켜 당해 종양을 추가로 검사한다. 도 14(패널 상부)에 도시된 바와 같이, mAb P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)로 처리된 종양은 종양 스트로마를 통해 복수의 혈관(화살표)에 의해서 뿐만 아니라, 유사분열(화살표 상단)에 의해 표시된 바와같이 종양 세포가 대부분이 생존하고 활성적으로 분열하는 종양 세포인 것으로 밝혀졌다. 대조적으로, 임의 생존하는 종양 세포 또는 혈관중의 일부만이 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)으로 처리한 종양에서 검출되었다(도 14, 패널 하단). 이러한 결과는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$의 길항제가 생체내에서 다양한 사람 종양의 성장 억제 및 퇴화를 유발하는 종양-유도된 맥관형성을 억제한다는 것을 입증한다. 종양 성장후 7일 경과(배성 17일)한 후 검사한 배를 $\alpha_v\beta_3$ 길항제로 처리하든지간에 전체 검사에 대해 정상적이었음에 주목해야 한다. 이러한 발견은 당해 인테그린의 길항제가 배를 성장시키는데 있어서 비독성임을 나타낸다.

<307> 2) 합성 펩타이드를 사용한 처리

<308> 실시예 5A에 기술된 바와 같이 10일된 배의 CAM 상에 사람 M21-L 흑색종 종양 단편(50mg)을 이식시킨다. 24시간 경과한 다음, 배에 사이클로 RADfV(69601) 및/또는 사이클로-RGDfV(66203) 300㎍/100㎕를 단일 정맥내 주사로 투여한다. 총 72시간 경과하여, 종양을 제거하고, 형태학적으로 검사한 다음, 실시예 9A1)에 기술된 바와 같이 스테레오 현미경으로 사진촬영한다.

<309> 도 15a 내지 15e에 도시된 패널은 다음과 같다: 도 15a는 이중 샘플을 사이클로-RADfV 펩타이드(69601)로 처리한 것이고, 도 15b는 이중 샘플을 사이클로-RGDfV 펩타이드(66203)으로 처리한 것이며, 도 15c는 동일한 배로부터 채취한 인접한 CAM 조직을 사이클로-RGDfV 펩타이드(66203)으로 처리한 것이고, 도 15d 및 15e는 펩타이드로 처리된 종양의 높은 배율을 나타낸다(13×). 도 15d는 대조군 펩타이드(69601) 처리된 종양의 정상 혈관을 도시한다. 도 15e는 사이클로-RGDfV 펩타이드(66203) 처리된 종양의 차단된 혈관의 예를 도시한다(화살표).

<310> 이들 결과는 펩타이드 66203만이 혈관 형성을 억제하고, 또한 종양에 인접한 CAM 조직에 있는 혈관은 영향을 받지 않음을 예시한다.

<311> 10. 생체내에서 레빗 안구 모델 검정에 의해 측정된 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 종양 조직 성장의 퇴화

<312> 성장 인자-유도된 길항제에 미치는 항-$\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효과는 안구의 각막에 의해 예시된 바와 같이 천연적으로 투명한 구조에서 관찰할 수 있다. 새로운 혈관을 각막 가장자리에서 성장시키는데, 이는 혈액 공급이 충분하고, 각막의 중심에 대해서는 혈액 공급이 정상적이지 못하다. 혈관형성의 자극제, 예를 들어 βFGF는 각막에 적용되는 경우 각막의 가장자리로부터 새로운 혈관의 성장을 유도한다. 맥관형성의 길항제가 각막에 적용되는 경우 각막의 가장자리로부터 새로운 혈관의 성장을 억제한다. 따라서, 각막은 각막 가장자리로부터 용이하게 식별가능한 거친 콜라겐-충진된 각막으로의 내피 세포의 침입을 통해 맥관형성이 일어난다. 따라서, 래빗 안구 모델 검정은 안구의 각막내로 직접 당해 화합물을 이식시킨 후 맥관형성의 자극 및 억제를 직접 관찰하기 위한 생체내 모델을 제공한다.

<313> A. 생체내 래빗 안구 모델 검정

<314> 1) 성장인자에 의해 유도된 맥관형성

<315> 성장 인자 βFGF를 사용한 생체내의 래빗 안구 모델 검정에서 유도된 맥관형성을 하기에 기술한다.

<316> a. 성장 인자 및 모노클로날 항체를 포함하는 하이드론 펠렛의 제조

<317> 성장 인자 및 mAb를 포함하는 하이드론 중합체 펠렛을 문헌[참조: D'Amato, et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 91: 4082-4085(1994)]에 기술된 바와 같이 제조한다. 각각의 펠렛에는 수크랄페이트(Carafet, Marion Merrel Dow Corporation)에 결합된 성장 인자 βFGF 650ng이 포함되어 βFGF를 안정화시키고 주위 조직내로 완만하게 방출시킨다. 또한, 하이드론 펠렛은 PBS중의 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 mAb P1F6(항-$\alpha_v\beta_5$) 40㎍이 포함되도록 제조한다. 펠렛은 이의 표면내에 2.5mm로 중심 구멍을 뚫은 특별히 제조된 Teflon 항아리로 성형한다. 약 12㎕의 성형물을 각각의 항아리내에 넣고, 밤새 멸균 후드에서 중합시킨다. 이어서, 펠렛을 자외선 조사로 멸균시킨다.

<318> b. 모노클로날 항체를 사용한 처리

<319> 각각의 실험은 한쪽 눈에 βFGF 및 LM609를 포함하는 펠렛을 투여하고 다른 한쪽눈에 βFGF 및 마우스 mAb P1F6(항-$\alpha_v\beta_5$)를 포함하는 펠렛을 투여한 3마리의 래빗으로 수행한다. 기타 mAb 및 PBS 대조군에 대해 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)를 비교하기 위해 시험하는 한쌍의 안구의 이용은 시험된 mAb 간에 현저한 차

이를 입증하기 위해 정확하게 시험하는 수단을 제공한다.

<320> P1F6 mAb는 혈관 내피세포의 표면에서 발견되지만 맥관형성과는 추정적으로 관련되지 않는 인테그린 $\alpha_v\beta_5$와 면역 반응한다. mAb P1F6이 맥관형성과 관련되는지를 측정하기 위해, 당해 mAb만을 포함하는 펠렛을 제조하고 하기한 바와 같이 검정하여 mAb가 맥관형성을 유도하지 않음을 확인한다.

<321> 시험된 모든 mAb는 널리 공지된 방법에 따라 단백질-A 세파로즈 CL-4B 친화성 칼럼 크로마토그라피를 사용하여 복수로부터 정제한다. 이어서, 용출된 면역글로블린을 PBS에 대해 투석하고, Detoxi-겔(Pierce Chemicals)로 처리하여 엔도톡신을 제거한다. 엔도톡신은 효능있는 맥관형성 및 염증 자극제인 것으로 밝혀져 있다. 따라서 mAb를 크로모겐 Limulus Amebocyte Lysate Assay(Bio-Whittaker)를 사용하여 엔도톡신의 존재에 대해 시험하고, 래빗 안구 모델 검정에서 엔도톡신을 검출할 수 없는 이들 mAb만을 사용한다.

<322> βFGF 및 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 P1F6(항-$\alpha_v\beta_5$)를 포함하는 하이드론 펠렛은 래빗의 안구에서 형성된 각막 포켓내로 삽입한다. 각각의 하이드론 펠렛에는 검정시에 βFGF를 안정화시키기 위해 수크랄페이트가 포함되어 있다. 각각의 펠렛을 래빗 각막의 중간-스트로마에서 형성된 외과적으로 형성된 "포켓"내로 이식시킨다. 수술 공정은 각각의 각막을 사진상 기록하기 위한 카메라가 설치된 광선분열기를 장착한 Wild 모델 M691 작동 현미경을 사용하여 멸균 조건하에 수행한다. 3 내지 5mm의 "포켓"을 69 비버 방광을 사용하여 각막 두께의 절반으로 3mm 절개함으로써 각막 스트로마내에 생성한다. 이리스 압설자를 사용하여 주변 절단하고, 펠렛을 연으로부터 주변 이입자 2mm로 이식시킨다.

<323> 14일의 기간 동안, βFGF 및 mAb를 이식된 펠렛으로부터 주위의 조직으로 분산시키고, 이에 의해 각막 가장자리의 맥관형성을 실행시킨다.

<324> 각각의 처리에 대한 대표적인 결과는 도 16a 내지 16e에 도시되어 있다. 존재하는 혈관의 양을 정량화하고, 하기 정의 되는 시계 시간적인 측면에서 기술한다. 시계를 시간으로 나눈바와 같이 안구를 동일한 방법으로 12개의 동일한 부분으로 분리한다. "혈관의 시계 시간"은 시계상으로 1시간에 상응하는 안구의 면적을 충진시키는 혈관의 양을 의미한다. βFGF만을 투여한 5마리의 래빗은 새로운 혈관이 각막의 가장자리로부터 각막의 중심을 향해 성장된 붉은 맥관형성을 나타내는데, 이는 정상적으로 혈관을 포함하지 않는다. 이들 래빗중 하나가 펠렛에 대한 1시계 시간의 혈관을 포함한다. βFGF 및 mAb LM609 모두를 투여한 래빗중 2마리가 수술 후 14일 이내에서 절대적으로 맥관형성을 검출할 수 없었다. 이들 래빗중 한 마리는 14일까지 출혈 및 성장 혈관 3포시(foci)를 포함한다. βFGF 및 P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)를 투여한 래빗중 두 마리에게서 새로운 혈관이 각막 가장자리로부터 각막내로 성장함이 발견되었다. 이들 래빗중 한 마리가 펠렛에 대해 1 내지 2시간의 혈관만을 포함한다.

<325> 래빗 안구 모델 검정에서 증명된 바와 같이, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)를 투여한 래빗에 있어서 성장 인자 βFGF의 존재하에 정상의 파라림브성 혈관상에서 어떠한 맥관성 효과도 관찰되지 않았다. 대조적으로, 맥관형성이 mAb P3G2(항-$\alpha_v\beta_5$)를 투여한 래빗에 있어서 성장 인자 βFGF의 존재하에 파라림발 혈관상에서 관찰되었다. mAb LM609에 의한 각막 맥관형성의 완전한 억제는 이미 보고된 항-맥관형성제보다 실질적으로 크다.

<326> 11. 키메라 마우스: 사람 검정에 의해 측정된 바와 같이 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 종양 조직 성장의 생체내 퇴화

<327> SCID 마우스로부터의 피부 부분을 사람 신생아 포피로 대체시켜 생체내 키메라 마우스:사람 모델을 구성한다(도 17). 피부 이식을 확인한 후, 암종 세포로 사람 포피를 접종한다. 측정 가능한 종양을 확인한 후, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 PBS중 하나를 마우스 꼬리 정맥내로 주사한다. 2 내지 3주 후에, 종양을 절단하여 중량 및 조직을 검정한다.

<328> A. 생체내 키메라 마우스:사람 검정

<329> 생체내 키메라 마우스:사람 모델을 문헌[참조: Yan, et al., J. Clin. Invest., 91: 986-996(1993)]에 기술된 바와 같이 본질적으로 제조한다. 요약하면, 피부 2㎠ 평방 부분을 SCID 마우스(6 내지 8주된)로부터 제거하고, 사람 포피로 대체한다. 마우스를 마취시키고, 털을 면도에 의해 측면 배 영역의 각 부분상에 5㎠ 부분 제거한다. 2㎠의 2개의 원형 이식 베드는 배의 하단에 있는 충분한 두께의 피부를 제거하여 제조한다. 사람 신생아 포피로부터 유도한 동일한 크기의 충분한 두께의 사람 피부 이식편을 창상 베드상에 놓고, 봉합한다. 이식편은 피부로 봉합시킨 밴드를 이용하여 피복시킨다. 또한, 세공의 천테이프를 적용하여 창상을 피복한다.

<330> M21L 사람 흑색증 세포주 또는 MDA 23.1 흉부암 세포주(ATCC HTB 26; mAb LM609를 사용한 조직 단편의 면역반응성에 의해 $\alpha_v\beta_3$ 음성)을 사용하여 SCID 마우스상의 사람 피부 이식편에 대한 고체 사람 종양을 형성한다. $5x10^6$ M21-L 또는 MDA 23.1 세포의 단일 세포 현탁액을 사람 피부 이식편내로 경피 주사한다. 이어서, 2 내지 4주 동안 마우스를 관찰하여 측정가능한 사람 종양을 성장시킨다.

<331> B. 정맥내 적용

<332> 1) 모노클로날 항체를 사용한 처리

<333> 측정 가능한 종양을 성장시킨 후, M21L 종양 세포로 주사한 SCID 마우스의 꼬리 정맥에 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)또는 PBS를 2 내지 3주간 2회 정맥내 주사한다. 이 기간 후, 종양을 피부로부터 절단하고, 주위의 조직 밖으로 정돈한다. 몇마리의 마우스를 각각의 처리로부터 평균 종양 중량을 계산하면서 평가하고, 표 6 하단에 도시한다.

<334> [표 6]

M21L 종양 번호	처 리	종양 중량(mg)
1	PBS	158
2		192
3		216
4		227
5	LM609	195
6		42
7		82
8		48
9		37
10		100
11		172

<336> 처리 평균 종양 중량(mg)

<337> PBS 198

<338> LM609 113

<339> 마우스:사람 키메라 검정 시스템에 있어서 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)에 M21L $\alpha_v\beta_3$-음성 사람 종괴의 노출은 198mg 내지 113mg의 평균 종양 중량으로 처리한 PBS로부터 감소를 유발한다.

<340> mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 및 PBS로 처리한 M21L 종양의 대표적인 예는 형태학적으로 검사한다. PBS-처리된 종양은 거대(직경 8 내지 10mm)하고 또한 양호하게 혈관화된 반면에, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 처리한 종양은 작으며(직경 3 내지 4mm) 검출가능한 혈관을 결실하고 있다.

<341> MDA 23.1 세포로 주사한 피부 이식편에서 형성된 종양은 검출 및 측정 가능하다. 확인된 종양의 형태학적 검사로 이식된 사람 조직으로부터 MDA 23.1 종양 세포내로의 혈관신생이 발생하였음이 밝혀졌다.

<342> 따라서, $\alpha_v\beta_3$-특이성 LM609 항체의 정맥내 적용에 의한 $\alpha_v\beta_3$ 수용체의 차단은 각각 실시예 9 및 10에 기술된 CAM 및 래빗 안구 모델 시스템과 마찬가지로 당해 모델 시스템에서 암종의 퇴화를 유발한다.

<343> 12. CAM 검정에 측정한 바와 같은 인테그린 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 존재하에 세포 사이클을 혼입하고 세포를 사멸시키기 위한 혈관 세포의 자극

<344> 맥관형성 공정을 βFGF 및 VEGF와 같은 사이토킨의 능력에 따라 수행하여 혈관 세포 증식을 자극한다[참조: Mignatti et al., J. Cell. Biochem, 471: 201(1991): Takeshita et al., J. Clin. Invest., 93: 662(1994); and Koyama et al., J. Cell. Physiol., 58:1(1994)]. 그러나, 시그날 빈도가 이들 혈관 세포의 성숙한 혈관 내에서의 분화를 조절할 수 있다는 것이 또한 명백하다. 따라서, 새로운 성장 또는 맥관혈성을 겪는 혈관의 성장 또는 분화와 관련된 시그날을 사용한 차단은 맥관형성을 방지할 수 있다.

<345> 인테그린 결합은 시험관 내에서의 세포사멸 또는 프로그램된 세포 치사 뿐만 아니라 세포 증식 모두에 관여하는 것으로 밝혀졌다[참조: Schwartz, Cancer Res., 51: 1503(1993); Meredith et al., Mol. Biol. Cell., 4: 953(1993); Frisch et al., J. Cell Biol., 124: 619(1994); and Ruoslahti et al., Cell, 77: 477(1994)]. 맥관형성에 미치는 $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 효과의 세밀한 검사로 불연속적이고 저해된 종양-연관된 혈관의 존재를 밝혀준다. 따라서, 혈관 연속성의 손실은 혈관의 선택적인 괴사 또는 세포사멸에 기인할 수 있다.

<346> 이와 같은 가능성을 개발하기 위해, 성장 인자 βFGF를 사용하여 맥관형성을 유도하고 mAb 및 본 발명의 사이클릭 펩타이드를 사용하여 처리한 후 CAM을 검사한다.

<347> A. 모노클로날 항체를 사용한 처리

<348> 단편화된 DNA의 유리 3'OH 그룹을 특정하게 검출하는 항체를 사용하여 순순한 조직에서 DNA의 단편을 검출하고 3'OH를 검출하기 위해 조직으로부터 분리된 DNA를 직접적으로 검사함을 포함하는 여러 가지 방법으로 세포 사멸을 검출할 수 있다.

<349> 1) DNA 단편화의 분석

<350> 실시예 6A에 도시된 바와 같이 10일된 배의 CAM상에 βFGF로 포화시킨 여과 디스크를 놓음으로써 맥관형성을 유도한다. LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)을 사용한 CAM의 면역조직학적 분석으로 βFGF를 사용한 맥관형성

개시후 12 내지 24시간 경과한 혈관상에서 $\alpha_v\beta_3$가 최대로 발현됨이 밝혀졌다. 따라서, βFGF로 자극시킨 후 24시간 경과하여 PBS 100μl 단독으로 또는 mAb CSAT(항-β_1) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 300㎍을 포함하는 PBS를 사용하여 정맥내 접종시킨다.

<351> DNA 단편화는 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$), CSAT(항-β_1), 또는 PBS를 사용하여 정맥내 접종시킨 후 24내지 48시간 경과하여 βFGF 포화된 여과 디스크 하부에 직접 CAM 조직을 절단함으로써 검출한다. 절단된 CAM 조직을 멸균 PBS를 사용하여 3회 세척하고 미세하게 다진 다음, 0.25% 세균 콜라게나제(Worthington Biochemical: Freehold, NJ)에 재현탁시키고 90분 동안 37℃에서 경우에 따라 볼텍싱시키면서 항온처리한다. 상술된 바와 같이 단세포 현탁액으로부터 동일한 수의 CAM 세포로부터 DNA를 추출한다[참조: Bissonette, et al., Nature, 359: 552(1992)]. 요약하면, 동일한 수의 CAM 세포를 0.5%(v/v) 트리톤 X-100(Sigma, St. Louis, MO)중의 10mM 트리스-Cl, pH 8.0, 10mM EDTA중에 용해시킨다. 세포 용균물을 16,000 x g으로 15분 동안 4℃에서 원심분리하여 순수한 크로마틴 펠렛으로부터 가용성 단편화 DNA를 분리한다. 단편화된 DNA를 세척, 침전 및 1.2%(w/v) 아가로즈 겔상에서 분석한다.

<352> 각각의 처리로부터 동일한 수의 CAM 세포로부터 가용성 단편화된 DNA를 분리하고, 아가로즈 겔상에서 전기영동에 의해 분리한 다음, 에티디움 브로마이드로 염색시켜 가시화한다. 처리후 24시간 경과하여 3개의 상이한 처리물을 생성하는 상대적인 양의 DNA 단편화에 있어서 어떠한 차이도 검출되지 않았다. 그러나, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 처리한 후 48시간 경과하여, mAb CSAT(항-β_1) 또는 PBS 단독으로 처리한 배와 비교할 경우 DNA 단편화에 있어서 현저한 증가가 관찰되었다.

<353> 2) 세포 주기를 개시하기 위한 혈관세포의 자극

<354> 이들 공정에 있어서 $\alpha_v\beta_3$의 역할을 실험적으로 검사하기 위해, βFGF를 사용하거나 사용하지 않고 처리한 CAM으로부터 유도된 세포를 프로피듐 요오다이드로 염색시키고, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 면역반응시킨다.

<355> mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$), CSAT(항-β_1) 또는 PBS로 처리한 후 24시간 및 48시간 경과한 배로부터 분리된 CAM을 상술된 바와 같이 세균 콜라게나제로 항온처리하여 단세포 현탁액내로 분산시킨다. 이어서, 단세포를 투과시키고, 제조업자(Oncor, Gaithersburg, MD)의 지시에 따라 어팝 태그 Insitu 검출 키트로 염색시킨다. 어팝 태그는 단편화 DNA의 유리 3'OH 그룹을 특이하게 검출하는 항체이다. 이와 같은 유리 3'OH 그룹의 검출은 사멸성(apoptotic) 세포에 대한 확립된 방법이다[참조: Gavrieli et al., J. Cell Biol., 119:493(1992)].

<356> 어팝 태그로 염색된 세포를 PBS중의 0.1%(v/v) 트리톤 X-100으로 세척하고, PBS중의 0.5%(w/v) BSA, 0.02%(w/v) 나트륨 아지드 및 RNase A 200㎍/ml를 포함하는 FACS 완충액에 재현탁시킨다. 세포를 1.5시간 동안 배양하고, 세척한 다음, 면역형광 활성화 세포 분류에 의해 분석한다. FACScan 유동 세포측정기를 사용하여 세포 형광을 측정하고, 하기 서술된 바와 같이 데이터를 분석한다.

<357> FACScan 유동 세포측정기(Becton Dickinson, Mountain View, CA)로 세포형광을 측정한다. 측면분산(SSC) 및 전면 분산(FSC)을 동시에 측정하고, 모든 데이터를 FACScan 연구 소프트웨어(Becton Dicknson, Mountain View, CA)가 장착된 휴렛 패커드(HP9000)을 사용하여 수거한다. 당해 데이터는 P.C Lysis 버전 I 소프트웨어 (Becton Dickinson, Mountain View, CA)를 사용하여 분석한다. 음성 대조군 입구는 어팝 태그 키트로부터의 1차 항체를 첨가하지 않은 세포 현탁액을 사용하여 설정한다. 동일한 입구화가 상이한 세포 처리당 약 8,000 세포를 분석할 수 있게하는 두 개의 세포 모집단에 적용한다.

<358> FACS 분석에 의해 측정된 바와 같이 mAb 처리된 CAM으로부터 유도되고 어팝 태그로 염색된 단세포의 백분율은 도 18에 도시되어 있다. 흑색 막대는 분석 24시간 전에 처리한 배의 세포를 나타낸다. 점각화된 막대는 분석 48시간 전에 처리한 배의 세포를 나타낸다. 각각의 막대는 3개 복제물의 평균 ± S.E.를 나타낸다.

<359> 도 18에 도시된 바와 같이, mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_1$)를 사용하기 2일 전에 처리한 CAM은 단독의 PBS 또는 CSAT(항-β_1)으로 처리한 CAM과 비교하는 경우 3 내지 4배 증가된 어팝 태그 염색을 나타낸다.

<360> B. 합성 펩타이드를 사용한 처리

<361> 실시예 6A에 기술된 바와 같이 성장 인자 유도된 맥관형성에 따른 CAM 분석을 본 발명의 합성 펩타이드를 사용하여 수행하고, 세포사멸에 미치는 사이클릭펩타이드의 효과를 측정한다. 펩타이드 사이클로-RGDfV (66203) 및 사이클로-RADfV(69601)는 실시예 1에 기술된 바와 같이 제조한다. 펩타이드 용액 또는 PBS를 300㎍/ml의 농도로 CAM 제제내로 주사한다. 24 및 48시간에서, 여과지 및 주위의 CAM 조직을 절단하고, 어팝 태그로 염색시켜 실시예 12A2)에 상술된 바와 같이 세포사멸을 검출한다.

<362> 도 18에 도시된 바와 같이, 펩타이드 69203(사이클로-RGDfV)를 사용하기 2일 전에 처리한 CAM은 PBS 또는 대조군 사이클릭 펩타이드 69601(사이클로-RADfV)로 처리한 CAM과 비교하여 4배 증가된 어팝 태그 염색을 나타냈다.

<363> C. 모노클로날 항체의 처리가 세포사멸 및 세포 주기에 미치는 효과

<364> 모노클로날 항체의 처리가 세포주기에 미치는 효과를 측정하기 위해 프로피듐 요오다이드를 사용한 염색에 의한 염색체 복제수 및 어팝 태그를 사용한 염색에 의한 세포사멸에 대해 단세포 현탁액을 검사한다.

<365> 실시예 12A1)에 기술된 바와 같이 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 또는 CSAT(항-β_1)또는 PBS로 처리하기 24 또는 48시간 전에 CAM의 단세포 현탁액을 제조한다.

<366> 어팝 태그를 사용한 세포의 염색에 대해, 세포 현탁액을 PBS중에 2.5%(w/v) BSA 및 0.25%(w/v)

나트륨 아지드를 포함하는 완충액으로 3회 세척한다. 이어서, 세포를 15분 동안 PBS중의 1%(w/v) 파라포름알데하이드에 고착시키고, 이어서 상술한 바와 같이 3회 세척한다. 비특이적 결합을 방지하기 위해, 단세포 현탁액을 밤새 4℃에서 PBS중의 5%(w/v) BSA로 차단시킨다. 이어서, 세포를 전술한 바와 같이 세척하고, 어팝 태그로 염색시킨 다음 실시예 12A에 기술된 바와 같이 FACScan을 사용하여 세포 형광을 측정한다.

<367> 각각의 실험조건에 대한 세포를 프로피듐 요오다이드(Sigma, St. Louis, MO)를 사용하여 PBS중의 10㎍/ml로 1시간 동안 염색시키고, PBS로 2회 세척한 다음, 염색질 응축 및 단편화를 포함하는 세포사멸의 전형적인 핵 특성에 대해 분석한다. 세포사멸성 세포의 백분율은 10 내지 15의 무작위로 선택된 현미경적 부분으로부터 세포를 형태학적으로 분석하여 평가한다.

<368> CSAT(항-β_1) 또는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로 처리하고 어팝 태그 및 프로피듐 요오다이드로 염색시켜 FACS로 분석한 배로부터 CAM의 단세포 현탁액의 합한 결과를 도 19에 도시한다. Y축은 어팝 태그 염색(세포사멸)을 나타내고, X축은 프로피듐 요오다이드 염색(DNA 함량)을 나타낸다. 수평선은 어팝 태그 염색에 대한 음성 게이트를 나타낸다. 좌측 및 우측 패널은 각각 CSAT 및 LM609 처리된 배로부터의 CAM 세포를 나타낸다. 세포 주기 분석은 조건당 약 8,000 사건을 분석하여 수행하고, 데이터를 윤곽 플롯으로 표시한다.

<369> DNA 염색 프로피듐 요오다이드로 염색시킨 단세포 샘플은 처리후 48시간 경과하여 25 내지 30%의 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 처리된 CAM이 핵 축합 및/또는 단편화의 증거를 나타내는 것으로 밝혀졌다. 이들 공정은 세포사멸을 겪은 세포의 특징이다. 이것은 세포의 90 내지 95%가 정상 핵 염색을 나타내는 CSAT(항-β_1)로 처리된 CAM과 대조적이다.

<370> 도 19에 도시된 바와 같이, LM609에 의한 세포사멸의 유도와 일치하게 DNA 1카피 미만을 포함하는 피크에서 현저한 수의 세포가 관찰되었다. 이 피크는 이미 후기 단계 세포사멸 세포에서 단편화 DNA를 나타내는 것으로 밝혀졌다[참조: Telford et al., Cytometry, 13: 137(1992)]. 게다가, 이들 AO 세포는 어팝 태그로 용이하게 염색되며, 이는 세포사멸 세포를 검출하는 이들 시약의 능력을 나타낸다. 그러나, AO에 있어서 세포의 염색 이외에도, 1 카피 이상의 DNA를 포함하는 현저한 수의 세포를 또한 어팝 태그로 염색시킨다(도 19). 이들 결과는 LM609가 이미 세포 주기에 들어간 혈관세포 중에서 세포사면을 촉진하는 능력을 가짐을 증명한다. 대조적으로, 세포 주기에 들어간 대조군 CAM으로부터 유도된 세포는 대조군 처리된 CAM에서 검출된 소량의 세포사멸 세포에 따라 최소 어팝 태그 염색을 나타냈다.

<371> 세포 주기(S 및 G2/M기)에 들어간 βFGF 자극된 CAM의 세포들 중에서 70%는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)로의 염색에 대해 양성임이 나타났다. 이것은 βFCF 비처리된 CAM으로부터의 세포 주기 과정 동안 관찰된 10% LM609 염색과 비교된다. 이들 발견은 βFGF 자극후 대부분의 $\alpha_v\beta_3$-함유 세포가 활성 증식을 나타냄을 보여준다.

<372> 이러한 발견과 함께 mAb LM609 또는 $\alpha_v\beta_3$의 사이클릭 펩타이드 길항제의 정맥내 주입이 맥관형성의 유도에 이어서 병아리 CAM내에서 세포사멸을 촉진한다는 것을 밝혀준다.

<373> 또한, CAM은 LM609와의 면역작용에 의한 $\alpha_v\beta_3$의 발현 및 어팝 태그와의 면역작용에 의한 세포사멸 과정에 있는 세포에 대해 조직학적으로 검사한다. 실시예 5a에서 제조한, 48시간 전에 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$), CSAT(항-β_1) 또는 PBS로 처리한 배에서 절단한 CAM 단편을 세척하고, OTC(Baxter)에 이식시키고, 이어서 액체 질소중에서 순간 동결시킨다. CAM 조직의 6마이크론 단편을 절단하고, 아세톤중에서 30초 동안 고착시킨 다음, 사용할 때까지 -70℃에서 저장한다. 오염시키기 위한 조직 단편은 70%(v/v) 에탄올(ETOH)중에서의 순간 세척, 이어서 PBS중에 3회 세척으로 제조한다. 이어서, 단편을 PBS중의 5%(w/v) BSA로 2시간 동안 차단시키고, 2시간 동안 mAb LM609 10㎍/ml와 함께 항온처리한다. 이어서, 단편을 세척하고, 로다민 결합된 염소 항-마우스 IgG(Fisher Scientific, Pittsburg, PA) 1:50 희석액과 함께 2시간 동안 항온처리한다. 최종적으로, 동일한 단편을 세척하고, 실시예 12A2)에 기술된 바와 같이 어팝 태그로 염색시킨다. 염색된 조직 단편을 준비하여 초점 면역형광 현미경에 의해 분석한다.

<374> 도 20에 있어서, 패널 A 내지 C는 CSAT(항-β_1) 처리된 배의 CAM 조직을 나타내고, 패널 D내지 F는 LM609(항-$\alpha_v\beta_3$) 처리된 배의 CAM 조직을 나타낸다. 패널 A 및 D는 어팝 태그로 염색시키고 D.I.C. 상위에 올려놓은 면역형광(FITC)에 의해 가시화시킨 조직을 도시한다. 패널 B 및 E는 mAb LM609(항-$\alpha_v\beta_3$)으로 오염시키고 형광(로다민)에 의해 가시화시킨 동일한 조직을 도시한다. 패널 C 및 F는 황색 오염을 동시 위치시킨 어팝 태그 및 LM609 모두로 염색시킨 동일한 조직의 통합된 상을 나타낸다. 막대는 각각 좌측 패널 및 우측 패널에서 15 및 50㎛를 나타낸다.

<375> 도 20(a-c)에 도시된 바와 같이, CSAT 또는 PBS 대조군의 정맥내 주사후, 어팝 태그로 염색시킨 것은 조직내에서 최소 수준의 세포사멸을 나타내는 최소 및 무작위를 나타냈다. 대조적으로, LM609 또는 사이클릭 펩타이드 203으로 예비 처리한 배의 CAM은 어팝 태그로 강력하게 염색시킨 대부분의 혈관을 나타낸 반면에, 최소 반응성이 주위의 비혈관 세포(도 20d-f)에서 관찰되었다. 게다가, 어팝 태그 및 LM609 모두를 사용하여 이들 조직(도 19c 및 19f)을 염색시킬 경우, 현저한 동시-위치화가 $\alpha_v\beta_3$ 길항제로 처리한 배로부터 유도된 CAM중의 이들 마커 사이에서만 관찰되었다.(도 20f). 이들 발견은 생체내에서 길항제의 유도후, 인테그린 $\alpha_v\beta_3$의 억제제가 $\alpha_v\beta_3$-함유 혈관의 세포사멸을 선택적으로 촉진시킴을 입증한다.

<376> 맥관형성이 많은 분자 및 세포 생물학적 반응에 관여하는 복잡한 공정일지라도, 몇몇 세포주들의 증거는 혈관 세포 인테그린 $\alpha_v\beta_3$가 당해 공정에서 비교적 후기의 역할을 담당함을 시사한다. 첫째, 면역조직학적 분석은 혈관 세포상의 $\alpha_v\beta_3$의 발현은 βFGF를 사용한 맥관형성의 유도후 12 내지 24시간에서 최대에 도달하는 것으로 나타났다. 둘째, $\alpha_v\beta_3$의 길항제는 복수의 활성화제에 의해 유도된 맥관형성을 방해하며, 이는 당해 수용체가 통상적인 경로에서 맥관형성을 유도하는 거의 모든 1차 시그날링 빈도의

하부에서 관련됨을 시사한다. 셋째, mAb LM609 또는 사이클릭 펩타이드 처리된 CAM은 이들 길항제로 처리한 후 48시간이 될 때까지 DNA 래더링(ladder ing)에 의해 측정된 바와 같이 세포사멸에 있어서 현저한 증가를 나타내지 않는다. 마지막으로, $\alpha_v\beta_3$의 길항제는 세포 주기에 들어가도록 유도된 혈관 세포의 세포사멸을 촉진한다.

산업상이용가능성

<377> 본원에 제시된 결과는 인테그린 결합이 생체내에서 세포 생존을 조절한다는 1차의 직접적인 증거를 제공한다. 따라서, 맥관형성이 개시되면 각각의 혈관이 분리 및 개시되어 맥관성 공급원을 향해 이동하고, $\alpha_v\beta_3$ 결합은 성숙한 혈관의 분화 및 형성을 유도하는 세포 생존을 지속시키게 하는 시그날을 제공한다. 그러나, $\alpha_v\beta_3$ 결합이 방해되는 경우 당해 세포는 이들 분자의 시그날을 수용하지 못하고 세포는 결핍에 의해 세포사멸된다. 또한, 당해 요점은 분화후에 성숙한 혈관이 더이상 생존을 위해 $\alpha_v\beta_3$ 시그날을 요하지 않으며, 따라서 당해 인테그린의 길항제와 반응하지 않음을 예상할 수 있다.

<378> 결국, 본원에 제시된 결과는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$의 길항제가 맥관형성으로 특징지워지는 종양형성 또는 기타 질환의 치료를 위한 강력한 치료방법을 제공할 수 있는 증거를 제공한다. 첫째, $\alpha_v\beta_3$의 길항제는 선재하는 혈관에 영향을 미치지 않으면서 혈관의 새로운 형성을 방해한다. 둘째, 이들 길항제는 병아리 배 생존력에 미치는 효과가 현저하지 않으며, 이는 당해 길항제가 무독성임을 시사한다. 셋째, 맥관형성은 맥관 자극과 무관하게 현저하게 억제된다. 결국, $\alpha_v\beta_3$ 길항제의 전신투여는 여러 가지 조직학적으로 독특한 사람 종양을 현저하게 퇴화시킨다.

<379> 따라서, 상술된 실시예는 인테그린 $\alpha_v\beta_3$가 여러 가지 자극에 의해 유도된 맥관형성에 있어서 중요한 역할을 담당함을 입증하며, 예를 들어 $\alpha_v\beta_3$는 혈관신생으로 특징지워지는 질환을 위해 본 발명의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용한 유용한 치료 목표이다.

<380> 상술된 명세서는 당업자가 본 발명을 실시할 수 있기에 충분한 것으로 사료된다. 본 발명은 기탁된 세포주에 의해 범위가 제한되지 않으며, 기술된 양태는 본 발명의 한가지 양태를 단순히 예시하기 위한 것으로 의도되지 때문이며, 기능상 동등한 모든 세포주도 본 발명의 범위내에 포함된다. 기재의 기탁은 본원에 포함된 문서 기술이 본 발명의 임의의 양태를 실행하는데 부적합함에 대한 시인을 구성하지 않으며, 또한 제시된 특정예에 따라 청구의 범위를 제한하는 것으로 해석하지 않는다. 실제로, 본인에 도시 및 기술된 것이외에 본 발명의 여러 가지 변형도 상술된 상세한 설명으로서 당업자에게는 명백할 것이며, 첨부된 청구의 범위내에 포함될 것이다.

<381> 서열목록

<382> (1)일반적인 정보

<383> (i)출원인:

<384> (A)성명: 더 스크립스 리서치 인스티튜트

<385> (B)가: 노쓰 토레이 파인즈 로드10666

<386> (C)시: 라 졸라

<387> (D)주: 캘리포니아

<388> (E)국가: 미국

<389> (F)우편 번호: 92037

<390> (G)전화: 619-554-2937

<391> (H)텔렉스: 619-554-6312

<392> (ii)발명의 명칭: 맥관형성 억제에 유용한 방법 및 조성물

<393> (iii)서열수: 14

<394> (iv)컴퓨터 판독형:

<395> (A)매체 형태: 플로피 디스크

<396> (B)컴퓨터: IBM PC 호환용

<397> (C)작동 시스템: PC-DOS/MS-DOS

<398> (D)소프트웨어: 페이턴트인 릴리즈 #1.0, 버젼 #1.25(EPO)

<399> (v)최근 출원 정보:

<400> (A)출원번호: PCT/US95/

<401> (B)출원일: 1995년 3월 9일

<402> (vi)우선권 출원 정보:

<403> (A)출원번호: US 08/210,715

<404> (B)출원일: 1994년 3월 18일

<405> (vi)우선권 출원 정보:
<406> (A)출원번호: US 08/366,665
<407> (B)출원일: 1994년 12월 30일
<408> (2)서열확인번호: 1에 대한 정보:
<409> (i)서열 특성:
<410> (A)길이: 6개의 아미노산
<411> (B)형태: 아미노산
<412> (C)쇄수: 일본쇄
<413> (D)위상: 선형
<414> (ii)분자형: 펩타이드
<415> (iii)가설 : 없음
<416> (iv)안티 센스: 없음
<417> (v)단편 형태: 내부형
<418> (ix)특성:
<419> (A)명칭/키: 펩타이드
<420> (B)위치: 1..6
<421> (D)기타 정보: /표지=BOC-GRGDFV-OMe/ 주="BOC는 N-말단 보호 그룹 부틸옥시카보닐을 의미하고; OMe는 C-말단 메틸 에스테르를 의미하고; 아르기닌은 2번째 위치이다."
<422> (ix)특성:
<423> (A)명칭/키: 펩타이드
<424> (B)위치: 1..6
<425> (D)기타 정보: /표지=OMe/ 주="OMe는 C-말단 보호 그룹 메틸 에스테르를 의미한다."
<426> (ix)특성:
<427> (A)명칭/키: 펩타이드
<428> (B)위치: 1..6
<429> (D)기타 정보: /표지=D-Arg/주="D-Arg중에 "D"는 2번 위치에서 아르기닌이 D-아미노산임을 의미한다."
<430> (xi)서열 설명: 서열확인번호 1
<431> Gly Arg Gly Asp Phe Val
<432> 1 5
<433> (2)서열확인번호: 2에 대한 정보:
<434> (i)서열 특성:
<435> (A)길이: 6개의 아미노산
<436> (B)형태: 아미노산
<437> (C)쇄수: 일본쇄
<438> (D)위상: 선형
<439> (ii)분자형: 펩타이드
<440> (iii)가설: 없음
<441> (iv)안티센스: 없음
<442> (v)단편 형태: 내부형
<443> (ix)특성:
<444> (A)명칭/키: 펩타이드
<445> (B)위치: 1..6
<446> (D)기타 정보: /표지=BOC/주="BOC는 N-말단 보호 그룹 그룹 3급 부틸옥시카보닐을 의미한다."
<447> (ix)특성:
<448> (A)명칭/키: 펩타이드

(B)위치: 1..6

(D)기타 정보: /표지=OH/ 주="OH는 유리 C-말단 카복실산을 의미한다."

(ix)특성:

(A)명칭/키: 펩타이드

(B)위치: 1..6

(D)기타 정보: /표지=D-Arg/주="D-Arg중에 "D"는 2번 위치에서 아르기닌이 D-아미노산임을 의미한다."

(xi)서열 설명: 서열확인번호 2

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2)서열확인번호: 3에 대한 정보:

(i)서열 특성:

(A)길이: 6개의 아미노산

(B)형태: 아미노산

(C)쇄수: 일본쇄

(D)위상: 선형

(ii)분자형: 펩타이드

(iii)가설: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)단편 형태: 내부형

(ix)특성:

(A)명칭/키: 펩타이드

(B)위치: 1..6

(D)기타 정보: /표지=H/주="H는 유리 N-말단 아민을 의미한다."

(ix)특성:

(A)명칭/키: 펩타이드

(B)위치: 1..6

(D)기타 정보: /표지=OH/ 주="OH는 유리 C-말단 카복실산을 의미한다."

(ix)특성:

(A)명칭/키: 펩타이드

(B)위치: 1..6

(D)기타 정보: /표지=D-Arg/주="D-Arg중에 "D"는 2번 위치에서 아르기닌이 D-아미노산임을 의미한다."

(xi)서열 설명: 서열확인번호 3

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2)서열확인번호: 4에 대한 정보:

(i)서열 특성:

(A)길이: 6개의 아미노산

(B)형태: 아미노산

(C)쇄수: 일본쇄

(D)위상: 사이클릭

(ii)분자형: 펩타이드

(iii)가설: 없음

(iv)안티센스: 없음

(v)단편 형태: 내부형

<493> (ix)특성:

<494> (A)명칭/키: 펩타이드

<495> (B)위치: 1..6

<496> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고; 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."

<497> (xi)서열 설명: 서열확인번호 4

<498> Gly Arg Gly Asp Phe Val

<499> 1 5

<500> (2)서열확인번호: 5에 대한 정보:

<501> (i)서열 특성:

<502> (A)길이: 5개의 아미노산

<503> (B)형태: 아미노산

<504> (C)쇄수: 일본쇄

<505> (D)위상: 사이클릭

<506> (ii)분자형: 펩타이드

<507> (iii)가설: 없음

<508> (iv)안티센스: 없음

<509> (v)단편 형태: 내부형

<510> (ix)특성:

<511> (A)명칭/키: 펩타이드

<512> (B)위치: 1..5

<513> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고, 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."

<514> (□)서열 설명: 서열확인번호 5

<515> Arg Gly Asp Phe Val

<516> 1 5

<517> (2)서열확인번호: 6에 대한 정보:

<518> (i)서열 특성:

<519> (A)길이: 5개의 아미노산

<520> (B)형태: 아미노산

<521> (C)쇄수: 일본쇄

<522> (D)위상: 사이클릭

<523> (ii)분자형: 펩타이드

<524> (iii)가설: 없음

<525> (iv)안티센스: 없음

<526> (v)단편 형태: 내부형

<527> (ix)특성:

<528> (A)명칭/키: 펩타이드

<529> (B)위치: 1..5

<530> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고; 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."

<531> (xi)서열 설명: 서열확인번호 6

<532> Arg Ala Asp Phe Val

<533> 1 5

<534> (2)서열확인번호: 7에 대한 정보:

<535> (i)서열 특성:

<536> (A)길이: 5개의 아미노산
<537> (B)형태: 아미노산
<538> (C)쇄수: 일본쇄
<539> (D)위상: 사이클릭
<540> (ii)분자형: 펩타이드
<541> (iii)가설: 없음
<542> (iv)안티센스: 없음
<543> (v)단편 형태: 내부형
<544> (ix)특성:
<545> (A)명칭/키: 펩타이드
<546> (B)위치: 1..5
<547> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고, 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."
<548> (xi)서열 설명: 서열확인번호 7
<549> Arg Gly Asp Phe Val
<550> 1 5
<551> (2)서열확인번호: 8에 대한 정보:
<552> (i)서열 특성:
<553> (A)길이: 15개의 아미노산
<554> (B)형태: 아미노산
<555> (C)쇄수: 일본쇄
<556> (D)위상: 선형
<557> (ii)분자형: 펩타이드
<558> (iii)가설: 없음
<559> (iv)안티센스: 없음
<560> (v)단편 형태: 내부형
<561> (xi)서열 설명: 서열확인번호 8
<562> Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe
<563> 1 5 10 15
<564> (2)서열확인번호: 9에 대한 정보:
<565> (i)서열 특성:
<566> (A)길이: 5개의 아미노산
<567> (B)형태: 아미노산
<568> (C)쇄수: 일본쇄
<569> (D)위상: 사이클릭
<570> (ii)분자형: 펩타이드
<571> (iii)가설: 없음
<572> (iv)안티센스: 없음
<573> (v)단편 형태: 내부형
<574> (ix)특성:
<575> (A)명칭/키: 펩타이드
<576> (B)위치: 1..5
<577> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고; 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."
<578> (xi)서열 설명: 서열확인번호 9
<579> Arg Ala Asp Phe Val

<580> 1 5

<581> (2)서열확인번호: 10에 대한 정보:

<582> (i)서열 특성:

<583> (A)길이: 6개의 아미노산

<584> (B)형태: 아미노산

<585> (C)쇄수: 일본쇄

<586> (D)위상: 사이클릭

<587> (ii)분자형: 펩타이드

<588> (iii)가설: 없음

<589> (iv)안티센스: 없음

<590> (v)단편 형태: 내부형

<591> (ix)특성:

<592> (A)명칭/키: 펩타이드

<593> (B)위치: 1..6

<594> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고; 소문자는 D-아미노산을 의미하고; 대문자는 L-아미노산을 의미한다."

<595> (xi)서열 설명: 서열확인번호 10

<596> Ala Arg Gly Asp Phe Leu

<597> 1 5

<598> (2)서열확인번호: 11에 대한 정보:

<599> (i)서열 특성:

<600> (A)길이: 6개의 아미노산

<601> (B)형태: 아미노산

<602> (C)쇄수: 일본쇄

<603> (D)위상: 사이클릭

<604> (ii)분자형: 펩타이드

<605> (iii)가설: 없음

<606> (iv)안티센스: 없음

<607> (v)단편 형태: 내부형

<608> (ix)특성:

<609> (A)명칭/키: 펩타이드

<610> (B)위치: 1..6

<611> (D)기타 정보: /표지=사이클로/주="사이클로는 사이클릭 펩타이드를 의미하고; 소문자는 D-아미노산을 의미하고, 대문자는 L-아미노산을 의미한다."

<612> (xi)서열 설명: 서열확인번호 11

<613> Gly Arg Gly Asp Phe Leu

<614> 1 5

<615> (2)서열확인번호: 12에 대한 정보:

<616> (i)서열 특성:

<617> (A)길이: 12개의 아미노산

<618> (B)형태: 아미노산

<619> (C)쇄수: 일본쇄

<620> (D)위상: 선형

<621> (ii)분자형: 펩타이드

<622> (iii)가설: 없음

<623> (iv)안티센스: 없음

<624> (v)단편 형태: 내부형

<625> (xi)서열 설명: 서열확인번호 12

<626> Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met

<627> 1 5 10

<628> (2)서열확인번호: 13에 대한 정보:

<629> (i)서열 특성:

<630> (A)길이: 13개의 아미노산

<631> (B)형태: 아미노산

<632> (C)쇄수: 일본쇄

<633> (D)위상: 선형

<634> (ii)분자형: 펩타이드

<635> (iii)가설: 없음

<636> (iv)안티센스: 없음

<637> (v)단편 형태: 내부형

<638> (xi)서열 설명: 서열확인번호 13

<639> Gly Val Val Arg Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser

<640> 1 5 10

<641> (2)서열확인번호: 14에 대한 정보:

<642> (i)서열 특성:

<643> (A)길이: 11개의 아미노산

<644> (B)형태: 아미노산

<645> (C)쇄수: 일본쇄

<646> (D)위상: 원형

<647> (ii)분자형: 펩타이드

<648> (iii)가설: 없음

<649> (iv)안티센스: 없음

<650> (v)단편 형태: 내부형

<651> (xi)서열 설명: 서열확인번호 14

<652> Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Arg His Asp Leu

<653> 1 5 10

(57) 청구의 범위

청구항 1

생리학적으로 허용되는 담체와 함께 활성 성분으로서 혈관형성 억제량의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 포함하는, 조직내 혈관형성을 억제하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합을 억제하나 실질적으로 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합은 억제하지 않는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대해 면역특이적인 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 모노클로날 항체가 모노클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 RGD-함유 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 폴리펩타이드가 c-(GrGDFV)(서열확인번호 4), c-(RGDfV)(서열확인번호 5), c-(RGDFv)(서열확인번호 7) 및 YTAECKPQVTRGDVF(서열확인번호 8) 및 이의 염으로 이루어지는 그룹중에서 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 염이 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트인 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 조직이 염증조직이고 혈관형성이 염증조직의 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 조직이 관절염 조직인 약제학적 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 관절연 조직이 류마티스성 관절염을 가진 포유동물내에 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서, 조직이 당뇨병성 망막병증 환자의 망막 조직이고 혈관형성이 망막 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 조직이 혈관종인 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 조직이 고형 종양 또는 고형 종양 전이조직이고 혈관형성이 종양 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 14

제1항에 있어서, 혈관형성 억제량이 약 2μM 내지 5mM인 약제학적 조성물.

청구항 15

제1항에 있어서, 정맥내 투여, 경피 투여, 활액낭내 투여, 근육내 투여 또는 경구 투여용 약제학적 조성물.

청구항 16

제1항에 있어서, 화학치료법과 병행하여 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 17

제1항에 있어서, 단일 투여량의 정맥내 투여용 약제학적 조성물.

청구항 18

제3항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$에 대한 모노클로날 항체가 $\alpha_v\beta_3$ 복합체에 특이적으로 결합하는 약제학적 조성물.

청구항 19

제3항에 있어서, 항체가 사람화된 항체인 약제학적 조성물.

청구항 20

제19항에 있어서, 사람화된 항체가 모노클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 21

제5항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$길항제가 사이클릭 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 22

제1항에 있어서, 혈관형성 억제량이 약 0.1mg/kg 내지 약 300mg/kg인 약제학적 조성물.

청구항 23

제1항에 있어서, 연동(peristaltic) 투여용 약제학적 조성물.

청구항 24

제1항에 있어서, 하루 1회 이상 1일 내지 수일동안 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 25

제13항에 있어서, 고형 종양 조직이 암종(carcinoma)인 약제학적 조성물.

청구항 26

제13항에 있어서, 고형 종양 조직이 폐암, 췌장암, 유방암, 결장암, 후두암 또는 난소암인 약제학적 조성물.

청구항 27

생리학적으로 허용되는 담체와 함께 활성성분으로서 혈관형성 억제량의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 포함하는, 조직내 신생혈관에서 세포사멸(apoptosis)을 유도하기 위한 약제학적 조성물.

청구항 28

제27항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합을 억제하나 실질적으로 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합은 억제하지 않는 약제학적 조성물.

청구항 29

제27항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대해 면역특이적인 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

청구항 30

제29항에 있어서, 모노클로날 항체가 모노클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 31

제27항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 RGD-함유 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 32

제31항에 있어서, 폴리펩타이드가 c-(GrDFV)(서열확인번호 4), c-(RGDfV)(서열확인번호 5), c-(RGDFv)(서열확인번호 7) 및 YTAECKPQVTRGDVF(서열확인번호 8) 및 이의 염으로 이루어지는 그룹중에서 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 33

제32항에 있어서, 염이 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트인 약제학적 조성물.

청구항 34

제27항에 있어서, 조직이 염증 조직이고 혈관형성이 염증 조직의 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 조직이 관절염 조직인 약제학적 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 관절염 조직이 류마티스성 관절염을 가진 포유동물내에 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 37

제27항에 있어서, 조직이 당뇨병성 망막병증 환자의 망막 조직이고 혈관형성이 망막 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 38

제27항에 있어서, 조직이 혈관종인 약제학적 조성물.

청구항 39

제27항에 있어서, 조직이 고형 종양 또는 고형 종양 전이조직이고 혈관형성이 종양 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 40

제27항에 있어서, 혈관형성 억제량이 약 2u M 내지 5mM인 약제학적 조성물.

청구항 41

제27항에 있어서, 정맥내 투여, 경피 투여, 활액낭내 투여, 근육내 투여 또는 경구 투여용 약제

학적 조성물.

청구항 42

제27항에 있어서, 화학치료법과 병행하여 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 43

제27항에 있어서, 단일 투여량의 정맥내 투여용 약제학적 조성물.

청구항 44

제27항에 있어서, 세포사멸이 혈관형성 억제 길항제를 투여한지 48시간 이후에 일어나는 약제학적 조성물.

청구항 45

제29항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$에 대한 모노클로날 항체가 $\alpha_v\beta_3$ 복합체에 특이적으로 결합하는 약제학적 조성물.

청구항 46

제29항에 있어서, 항체가 사람화된 항체인 약제학적 조성물.

청구항 47

제46항에 있어서, 사람화된 항체가 모로클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 48

제31항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 사이클릭 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 49

제27항에 있어서, 혈관형성 억제량이 약 0.1mg/kg 내지 약 300mg/kg인 약제학적 조성물.

청구항 50

제27항에 있어서, 연동 투여용 약제학적 조성물.

청구항 51

제27항에 있어서, 하루 1회 이상 1일 내지 수일 동안 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 52

제39항에 있어서, 고형 종양 조직이 암종(carcinoma)인 약제학적 조성물.

청구항 53

제39항에 있어서, 고형 종양 조직이 폐암, 췌장암, 유방암, 결장암, 후두암 또는 난소암인 약제학적 조성물.

청구항 54

생리학적으로 허용되는 담체와 함께 활성 성분으로서 혈관형성 억제량인 치료학적 유효량의 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 포함하는, 조직의 새로운 성장을 지지하는데 요구되는 조직으로의 혈액 공급을 저하시키기 위한 약제학적 조성물.

청구항 55

제54항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합을 억제하나 실질적으로 $\alpha_{IIb}\beta_3$에 대한 피브리노겐의 결합은 억제하지 않는 약제학적 조성물.

청구항 56

제54항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 $\alpha_v\beta_3$에 대해 면역특이적이 모노클로날 항체인 약제학적 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$에 대한 모노클로날 항체가 $\alpha_v\beta_3$ 복합체에 특이적으로 결합하는 약제학적 조성물.

청구항 58

제56항에 있어서, 모노클로날 항체가 모노클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 59

제56항에 있어서, 항체가 사람화된 항체인 약제학적 조성물.

청구항 60

제59항에 있어서, 사람화된 항체가 모노클로날 항체 LM609(ATCC HB 9537)의 면역 반응 특성을 갖는 약제학적 조성물.

청구항 61

제54항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 RGD-함유 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 62

제61항에 있어서, 폴리펩타이드가 c-(GrGDFV)(서열확인번호 4), c-(RGDfV)(서열확인번호 5), c-(RGDFv)(서열확인번호 7) 및 YTAECKPQVTRGDVF(서열확인번호 8) 및 이의 염으로 이루어지는 그룹중에서 선택되는 약제학적 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 염이 하이드로클로라이드 또는 트리플루오로아세테이트인 약제학적 조성물.

청구항 64

제61항에 있어서, $\alpha_v\beta_3$ 길항제가 사이클릭 폴리펩타이드인 약제학적 조성물.

청구항 65

제54항에 있어서, 혈관형성 억제량이 약 0.1mg/kg 내지 약 300mg/kg인 약제학적 조성물.

청구항 66

제54항에 있어서, 정맥내 투여, 활액낭내 투여, 경피 투여, 근육내 투여 또는 경구 투여용 약제학적 조성물.

청구항 67

제54항에 있어서, 연동 투여용 약제학적 조성물.

청구항 68

제54항에 있어서, 하루 1회 이상 1일 내지 수일 동안 투여되는 약제학적 조성물.

청구항 69

제54항에 있어서, 단일 투여량의 정맥내 투여용 약제학적 조성물.

청구항 70

제54항에 있어서, 조직이 관절염 조직인 약제학적 조성물.

청구항 71

제70항에 있어서, 관절염 조직이 류마티스성 관절염을 가진 포유동물내에 존재하는 약제학적 조성물.

청구항 72

제54항에 있어서, 조직이 당뇨병성 망막병증 환자의 망막 조직이고 혈관형성이 망막 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 73

제54항에 있어서, 조직이 망막 조직이고 혈관형성이 망막 혈관형성인 약제학적 조성물.

청구항 74

제73항에 있어서, 망막 조직이 당뇨병성 망막병증 또는 황반변성을 앓는 환자의 망막조직인 약제학적 조성물.

청구항 75

제1항에 있어서, 조직이 관상동맥 혈관성형술 이후 재발협착증의 위험이 있는 관상동맥인 약제학적 조성물.

요약

본 발명은 비트로넥틴 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 사용하여 조직내에서 맥관형성을 억제하는 방법, 특히 염증 조직, 종양 조직 및 전이조직에서 $\alpha_v\beta_3$ 길항제를 함유하는 치료학적 조성물을 사용하여 맥관형성을

억제하는 방법을 서술한다.

대표도

도1a

도면

도면1a

항-β3



정상적인 피부

도면1b

항-β3



육아 조직

도면1c

항-β1



정상적인 피부

도면1d

항-β1



육아 조직

도면2a

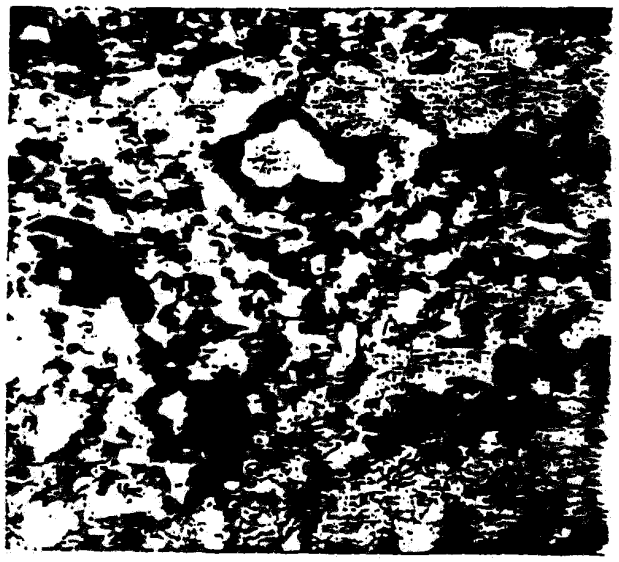
항-vWF



정상적인 피부

도면2b

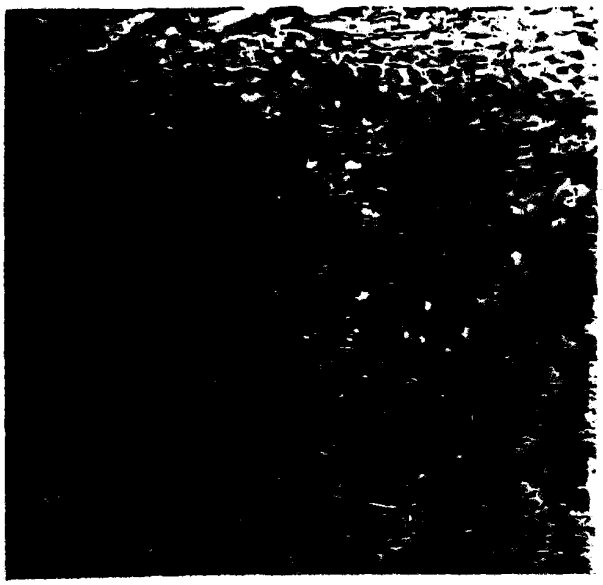
항-vWF



육아 조직

도면2c

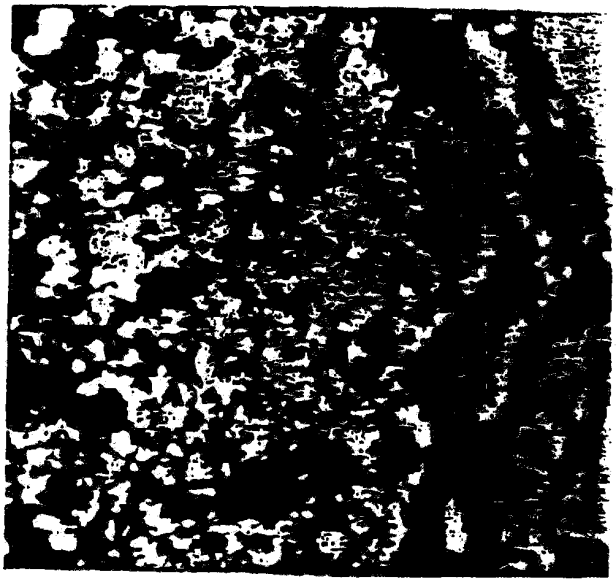
항-라미닌



정상적인 피부

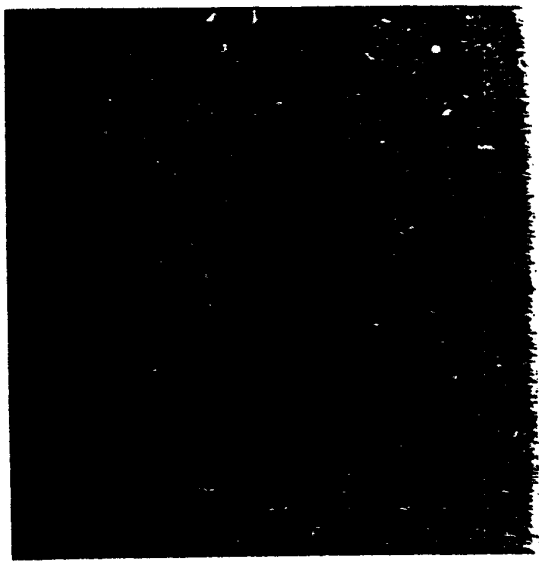
도면2d

항-라미닌



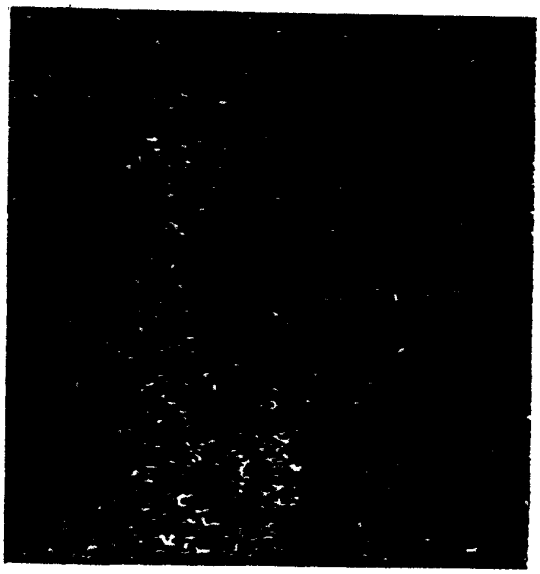
육아 조직

도면3a



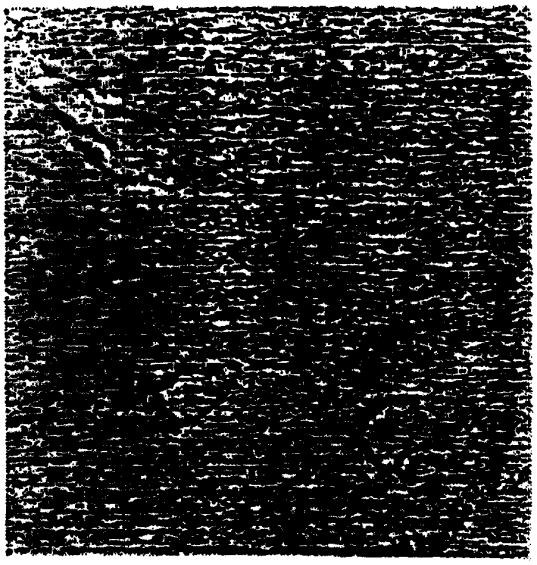
방광암

도면3b



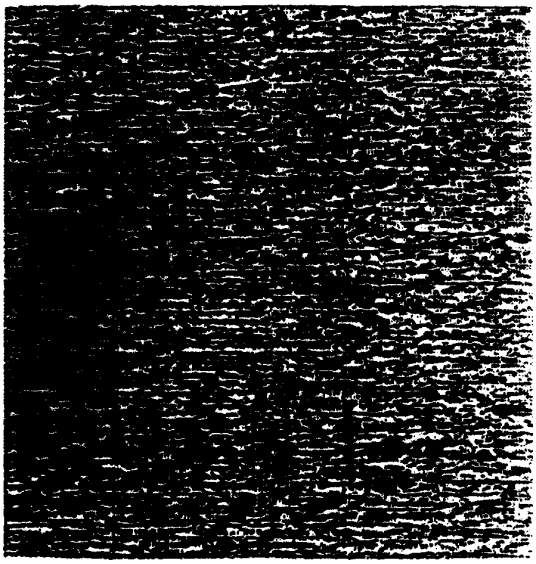
결장암

도면3c



유방암

도면3d



폐암

도면4

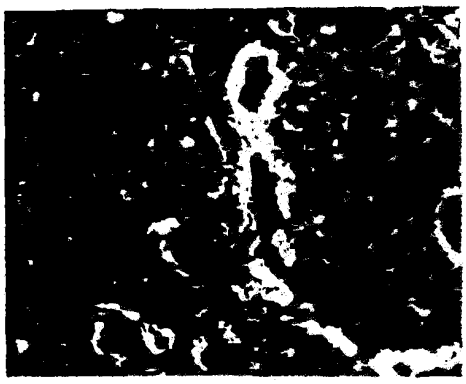


대조군

도면5a

처리되지않은

항-β_1



도면5b

처리되지않은

항-$\alpha v \beta_3$



도면5c

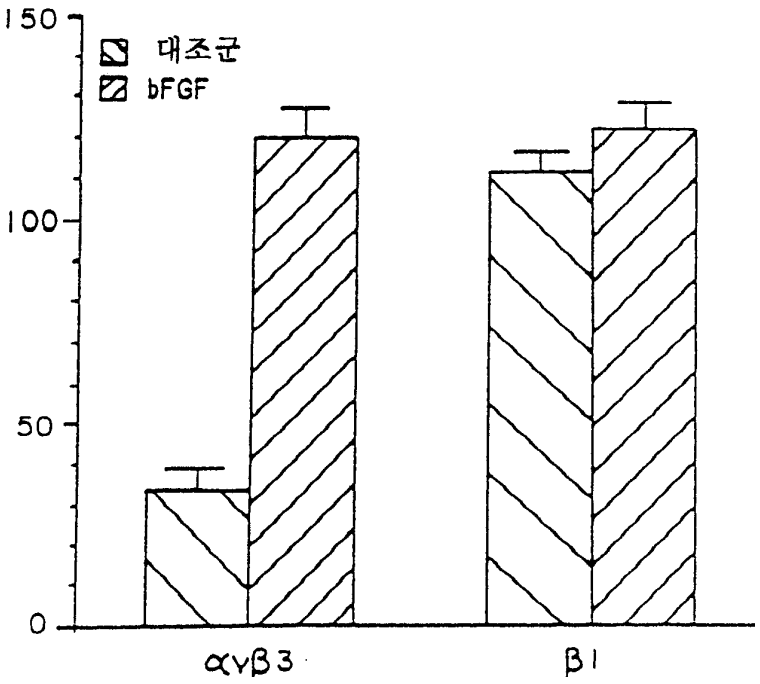
bFGF 처리된

항-$\alpha v \beta_3$



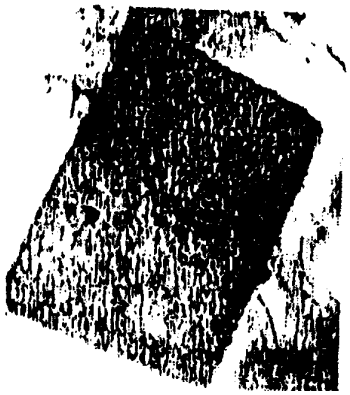
도면6

평균 형광 강도



도면7a

대조군



도면7b

bFGF



도면7c

TNF α



도면8a

대조군



도면8b

bFGF



도면8c

항-β_1



도면8d

항-$\alpha_v\beta_5$



도면8e

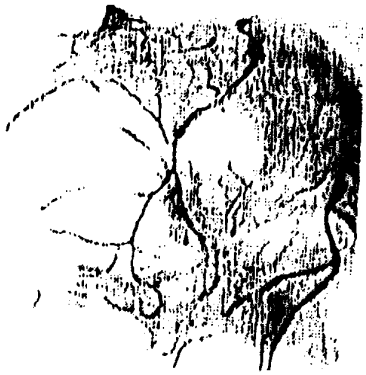
항-$\alpha v\beta_3$



도면9a

대조군 펩타이드

종양



도면9b

사이클릭 RGD

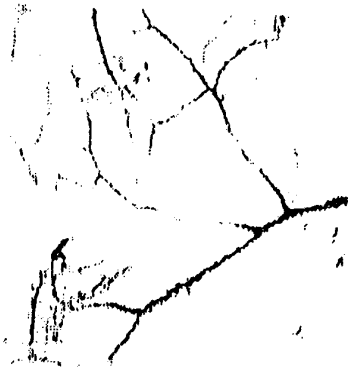
종양



도면9c

사이클릭 RGD

인접한 CAM



도면10a

대조군



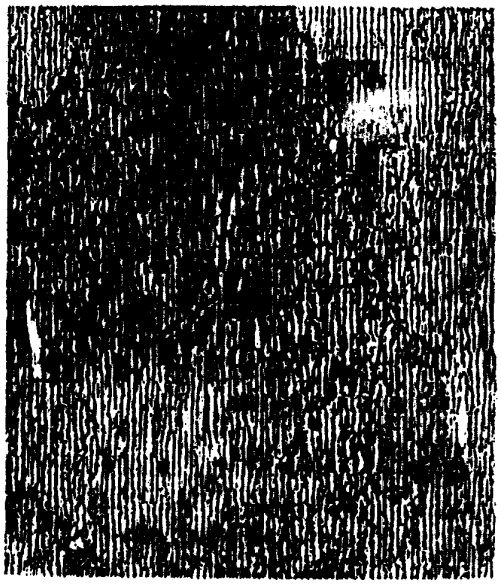
도면10b

항-$\alpha_v\beta_5$(P3G2)



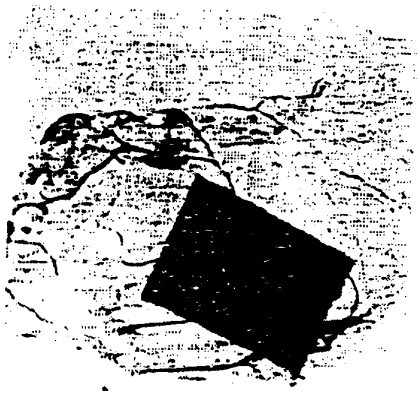
도면10c

항-$\alpha_v\beta_3$(LM609)



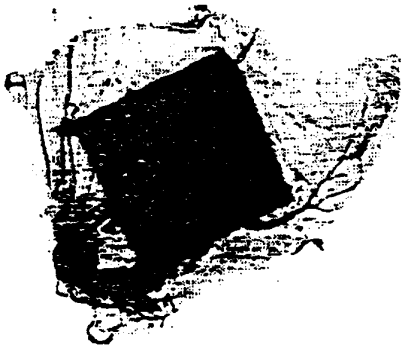
도면11a

항-β_1



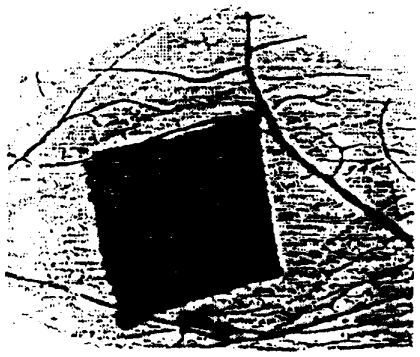
도면11b

항-$\alpha_v\beta_5$

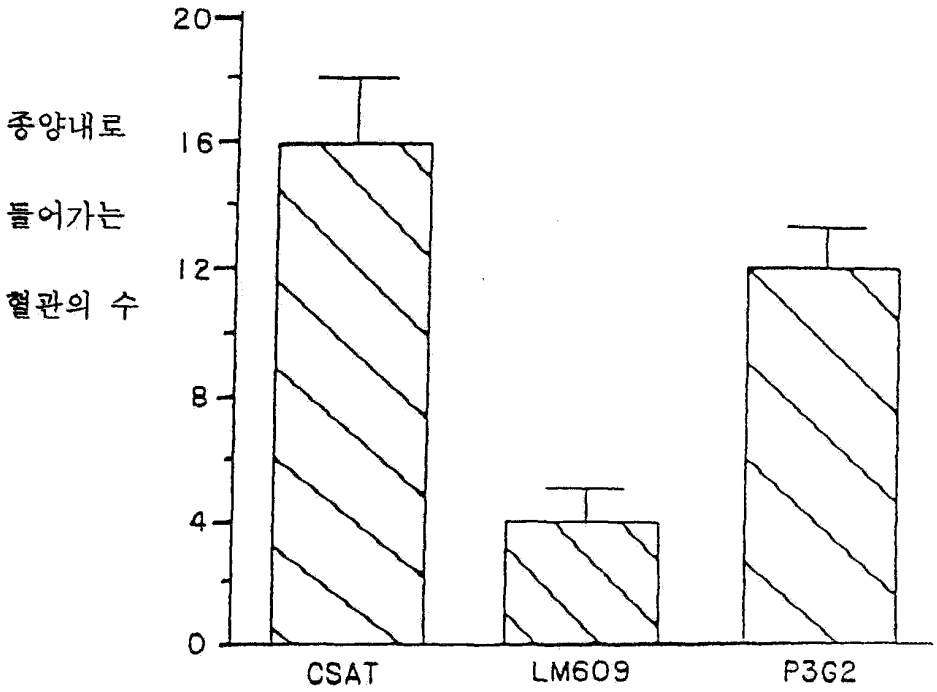


도면11c

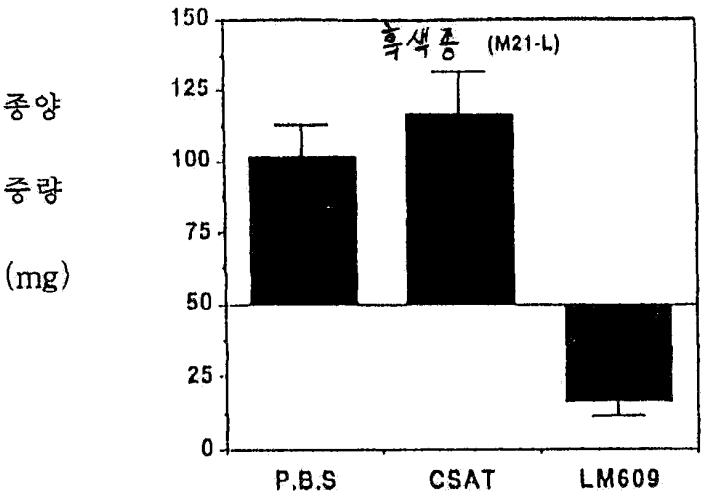
항-$\alpha v \beta_3$



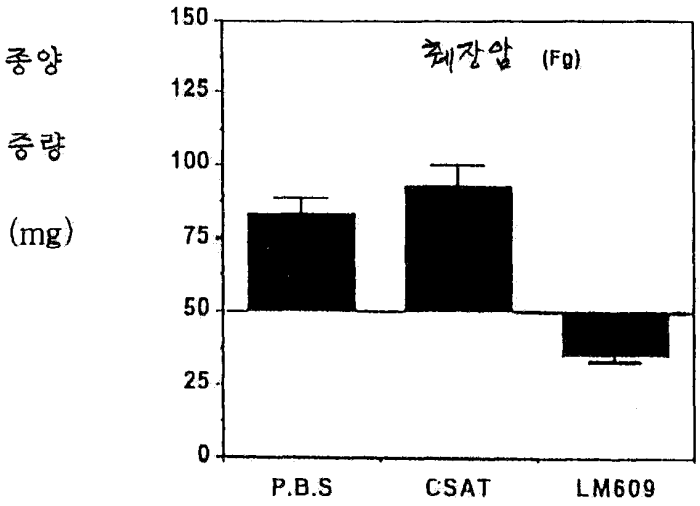
도면12



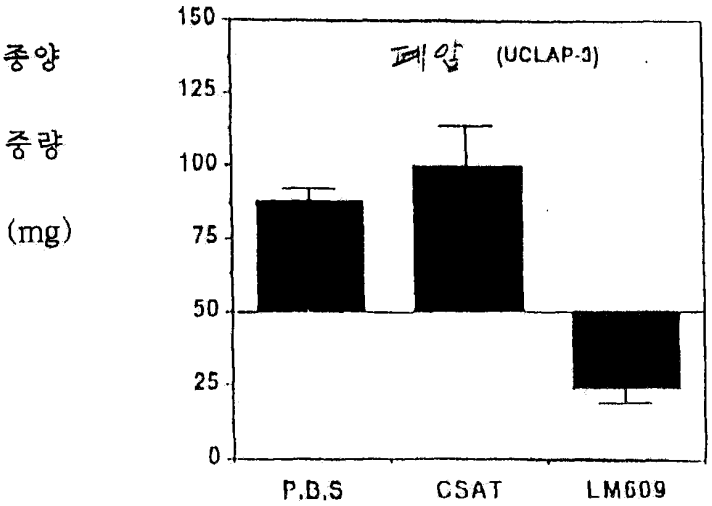
도면13a



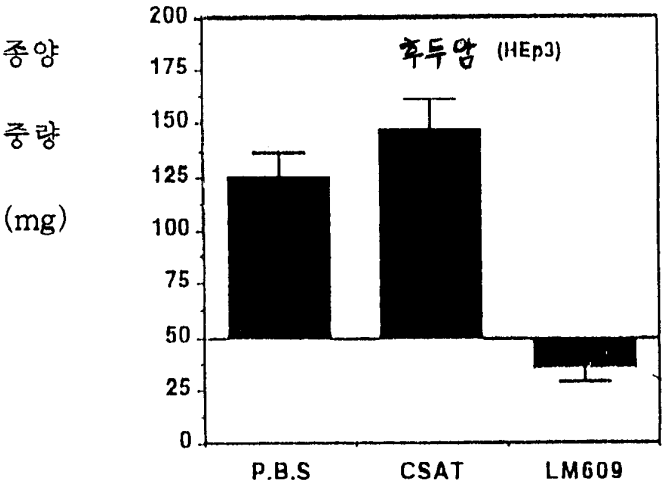
도면13b



도면13c

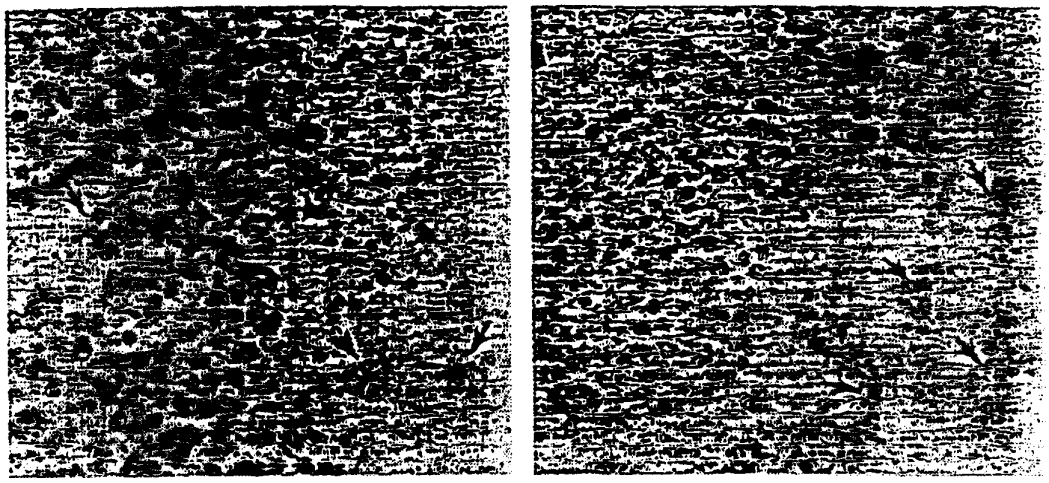


도면13d



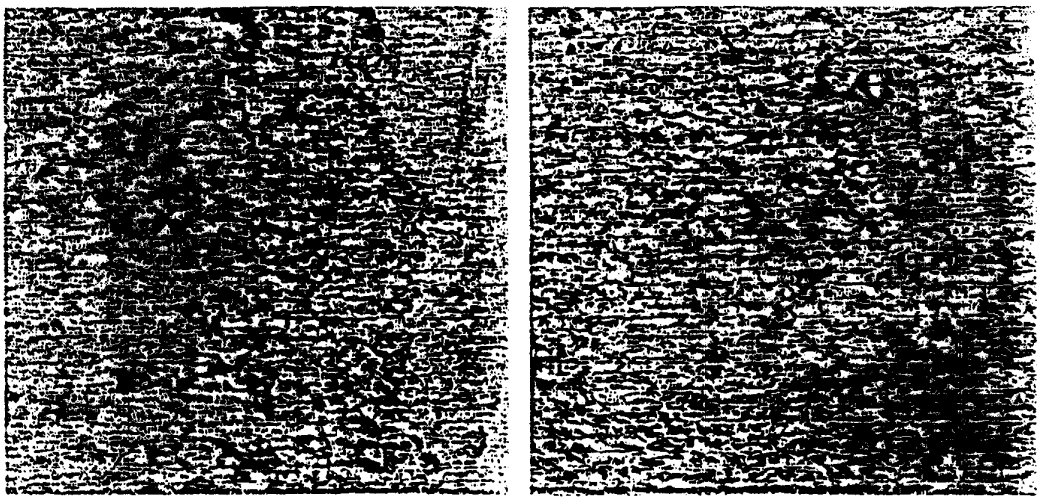
도면14a

항-$\alpha_v\beta_5$(P3G2)



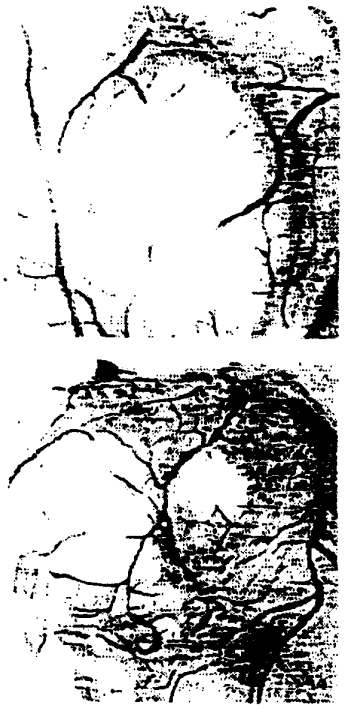
도면14b

항-$\alpha_v\beta_3$(LM609)



도면15a

대조군 펩타이드 종양



도면15b

사이클릭 RGD 종양



도면15c

사이클릭 RGD 인접한 CAM



도면15d

대조군 펩타이드



도면15e

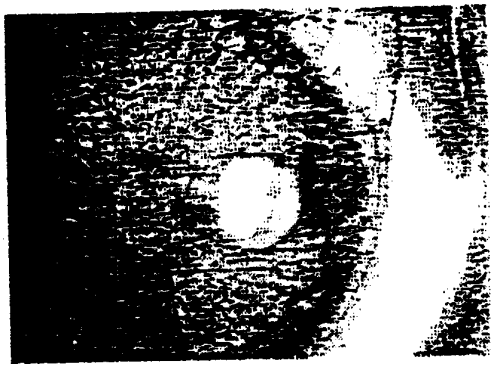
사이클릭 RGD 펩타이드



도면16a

P1F6

(항-$\alpha_v\beta_5$)



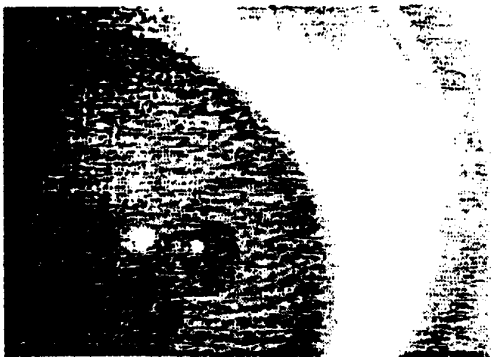
도면16b



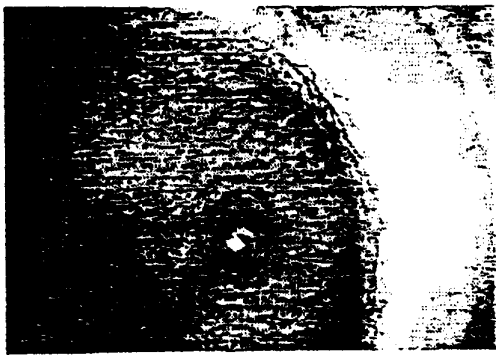
도면16c

LM609

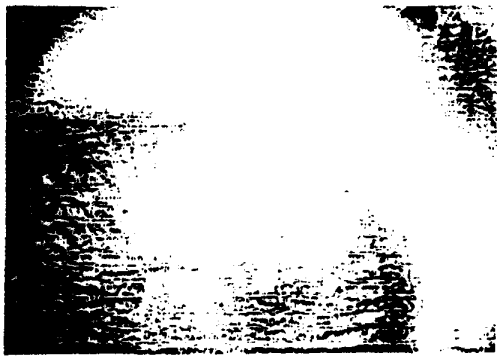
(항-$\alpha_v\beta_3$)



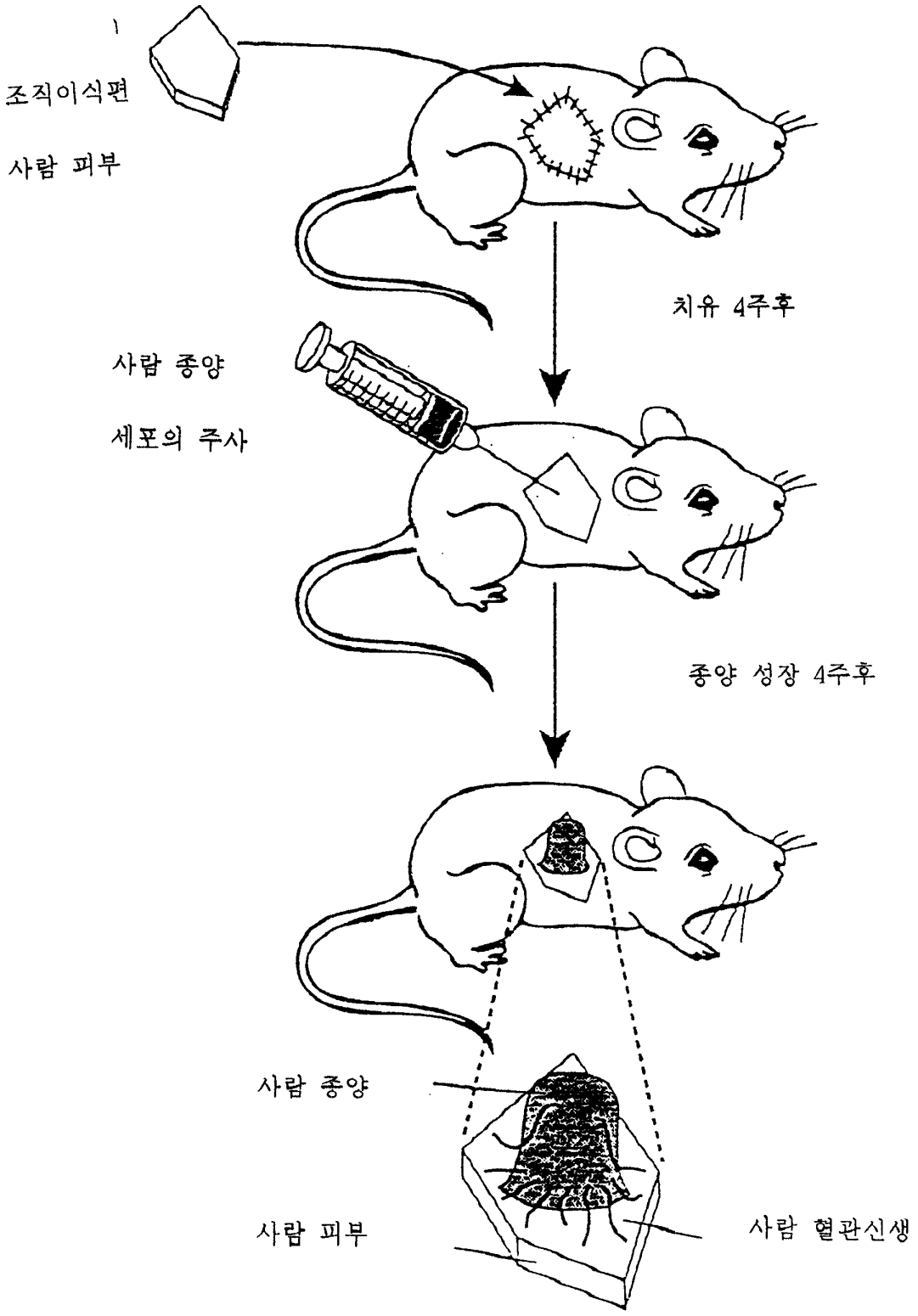
도면16d



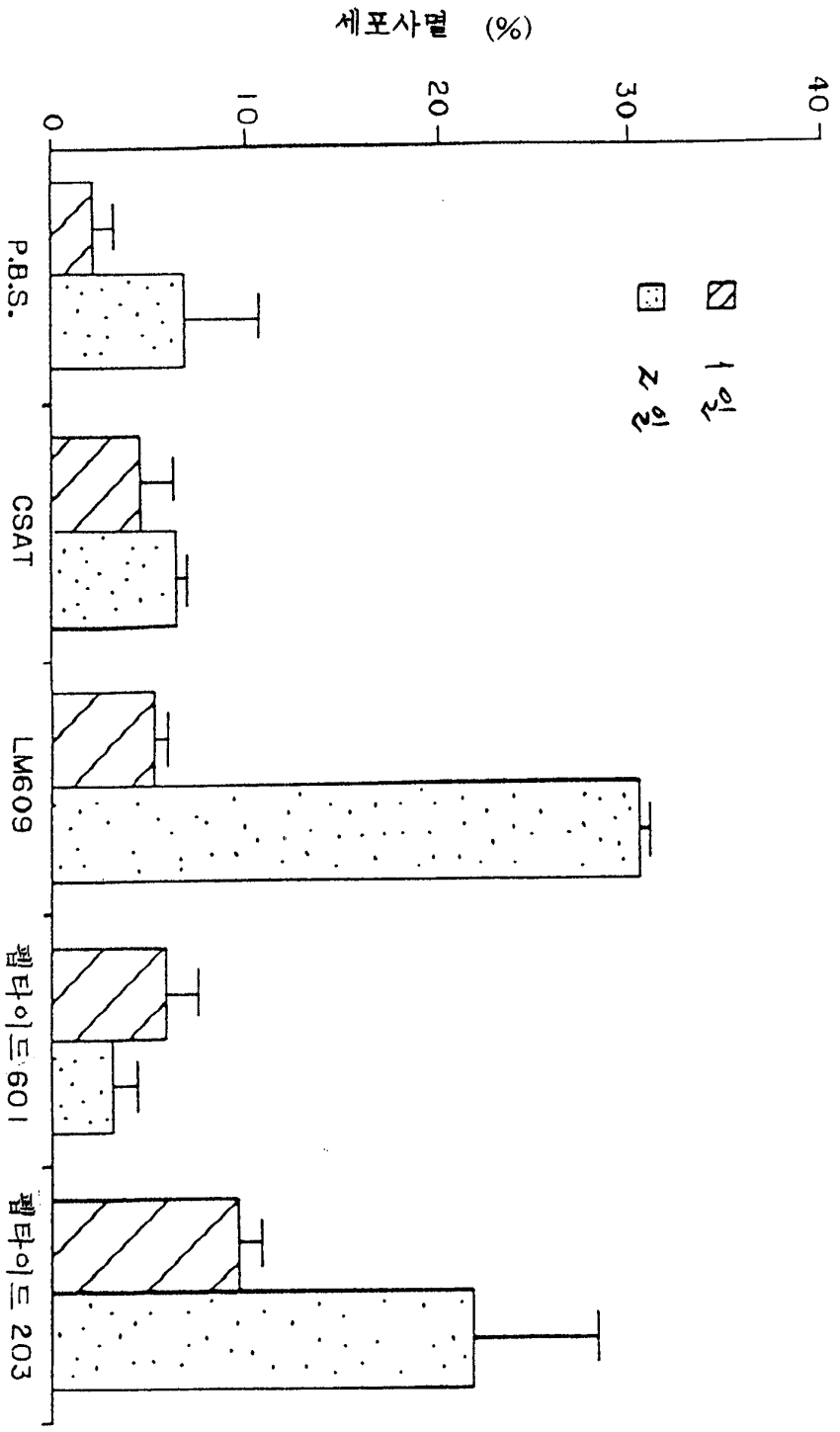
도면16e



도면17

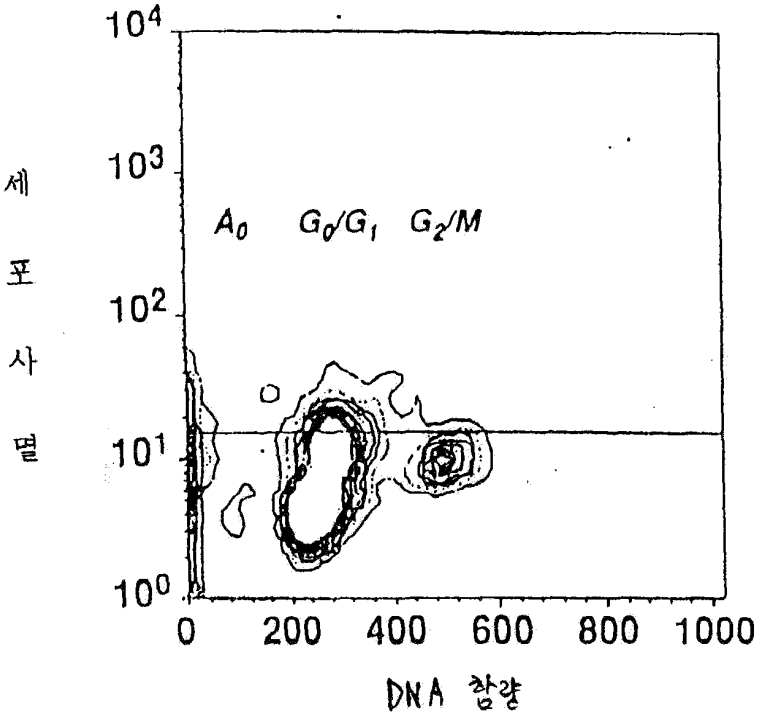


도면18

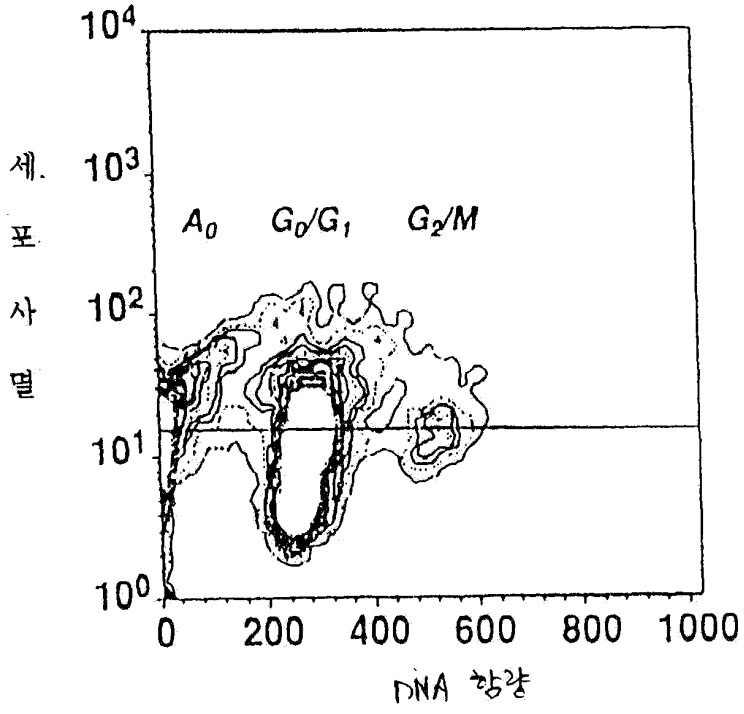


도면19

CAST(항-β_1)



LM609(항-$\alpha V \beta_3$)



도면20a



도면20b



도면20c



도면20d



도면20e



도면20f

