



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 348 462**

(51) Int. Cl.:

A61K 38/48 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 7/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/12 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **97928698 .6**

(96) Fecha de presentación : **30.05.1997**

(97) Número de publicación de la solicitud: **0951295**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **27.10.1999**

(54) Título: **Composiciones de uso en la inhibición de la angiogénesis mediada por α -V- β 3.**

(30) Prioridad: **31.05.1996 US 18733 P**
31.05.1996 US 15869 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.12.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.12.2010

(73) Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

(72) Inventor/es: **Brooks, Peter y**
Cheresh, David, A.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Descripción

Campo técnico

- 5 La presente invención se refiere en general al campo de la medicina, y se refiere específicamente a composiciones para uso en la inhibición de la angiogénesis de tejidos usando antagonistas del receptor $\alpha_v\beta_3$ de vitronectina.

Antecedentes

10

Las integrinas son una clase de receptores celulares que se sabe que se unen a las proteínas de matriz extracelular y, por consiguiente, median las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, a las que se hace referencia en general como episodios de adhesión celular. Sin embargo, aunque muchas integrinas y los ligandos que se unen a una integrina están descritos en la bibliografía, la función biológica de muchas integrinas sigue siendo difícil de determinar. Los receptores integrina constituyen una familia de proteínas con características estructurales compartidas de complejos no covalentes de glicoproteínas heterodiméricas formadas por subunidades α y β .

15

20

Ahora se sabe que el receptor de vitronectina, denominado por su característica original de unión preferencial a vitronectina, hace referencia a tres diferentes integrinas, denominadas $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. Horton, Int. J. Exp. Pathol. 71: 741-759 (1990). La $\alpha_v\beta_1$ se une a fibronectina y vitronectina. La $\alpha_v\beta_3$ se une a una gran diversidad de ligandos, incluyendo fibrina, fibrinógeno, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand, osteospondina y sialoproteína I ósea. La $\alpha_v\beta_5$ se une a la vitronectina. Las funciones de adhesión celular específica que estas tres integrinas juegan en las muchas interacciones celulares en tejidos están todavía bajo investigación, sin embargo, está claro que existen diferentes integrinas con diferentes funciones biológicas.

25

30

Un sitio de reconocimiento importante en el ligando para muchas integrinas es la secuencia de tripéptidos arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). RGD se encuentra en todos los ligandos identificados anteriormente para las integrinas del receptor de vitronectina. Este sitio de reconocimiento de RGD puede estar imitado por polipéptidos ("péptidos") que contienen la secuencia de RGD, y tales péptidos RGD son inhibidores conocidos de la función de integrina. Sin embargo, es importante indicar que,

35

dependiendo de la secuencia y estructura del péptido de RGD, la especificidad de la inhibición puede alterarse para dirigir las integrinas específicas.

Para análisis sobre el sitio de reconocimiento de RGD, véase Pierschbacher y col.,
5 Nature, 309: 30-33 (1984) y Pierschbacher y col., Proc. Natls. Acad. Sci. USA, 81: 5985-5988 (1984). Diversos polipéptidos de RGD de especificidad de integrina variable también han sido descritos por Grant y col., Cell, 58: 933-943 (1989), Cheresh, y col., Cell, 58: 945-953 (1989), Aumailley y col., FEBS Letts., 291: 50-54 (1991), y Pfaff y col., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238 (1994), y en las Patentes de Estados Unidos números
10 4.517.686, 4.578.079, 4.589.881, 4.614.517, 4.661.111, 4.792.525, 4.683.291, 4.879.237, 4.988.621, 5.041.380 y 5.061.693.

La angiogénesis es un proceso de vascularización de tejidos que implica el crecimiento de nuevos capilares sanguíneos en desarrollo en un tejido, y se denomina también
15 neovascularización. El proceso está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de músculo liso. Se cree que el proceso tiene lugar en una cualquiera de tres formas: los vasos o capilares pueden surgir de vasos preexistentes; desarrollo de novo de vasos pueden surgir de células precursoras (vasculogénesis); o vasos pequeños existentes pueden aumentar de diámetro. Blood y col., Bioch. Biophys. Acta, 1032: 89-
20 118 (1990). Se sabe que las células endoteliales vasculares contienen al menos cinco integrinas dependientes de RGD, incluyendo el receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$), los receptores de colágeno tipos I y IV ($\alpha_1\beta_1$), el receptor de laminina ($\alpha_2\beta_1$), el receptor de fibronectina/laminina/colágeno ($\alpha_3\beta_1$) y el receptor de fibronectina ($\alpha_5\beta$). Davis y col., J. Cell. Biochem., 51: 206-218 (1993). Se sabe que la célula de músculo liso contiene al
25 menos seis integrinas dependientes de RGD, incluyendo, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

La angiogénesis es un proceso importante en el desarrollo neonatal, pero también es importante en la cicatrización de heridas y en la patogénesis de una gran diversidad de enfermedades clínicamente importantes incluyendo inflamación de tejidos, artritis,
30 crecimiento tumoral, retinopatía diabética, degeneración macular por neovascularización de la retina y afecciones similares. Estas entidades clínicas asociadas a la angiogénesis se denominan enfermedades angiogénicas. Folkman y col., Science, 235: 442-447 (1987). La angiogénesis está por lo general ausente en tejidos adultos o maduros, aunque se produce en la curación de heridas y en el ciclo de crecimiento del cuerpo
35 lúteo. Véase, por ejemplo, Moses y col., Science., 248: 1408-1410 (1990).

Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis sería una terapia útil para restringir el crecimiento tumoral. La inhibición de la angiogénesis se ha propuesto por (1) inhibición de la liberación de las “moléculas angiogénicas” tales como el bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico), (2) neutralización de moléculas angiogénicas, tal como mediante el uso de anticuerpos anti- β bFGF, y (3) inhibición de la respuesta de células endoteliales a estímulos angiogénicos. Esta última estrategia ha recibido atención, y Folkman y col., *Cancer Biology*, 3: 89-96 (1992), han descrito varios inhibidores de respuesta de células endoteliales, incluyendo el inhibidor de la colagenasa, inhibidores del recambio de membrana basal, esteroides angiostáticos, los inhibidores de la angiogénesis derivados de hongos, factor 4 de plaquetas, trombospondina, fármacos contra artritis tales como penicilamina D y tiomalato de oro, análogos de la vitamina D₃, interferón alfa, y similares que podrían usarse para inhibir la angiogénesis. Para otros inhibidores propuestos de angiogénesis, véase Blood y col., *Bioch. Biophys. Acta.*, 1032: 89-118 (1990), Moses y col., *Science*, 248: 1408-1410 (1990), Ingber y col., *Lab. Invest.*, 59: 44-51 (1988), y las Patentes de estados Unidos números 5.092.885, 5.112.946, 5.192.744, y 5.202.352. Ninguno de los inhibidores de la angiogénesis descritos en las referencias anteriores está dirigido a la inhibición de $\alpha_v\beta_3$.

También se han descrito péptidos que contienen RGD que inhiben el receptor $\alpha_v\beta_3$ de vitronectina. Aumailley y col., *FEBS Letts.*, 291: 50-54 (1991), Choi y col., *J. Vasc. Surg.*, 19: 125-134 (1994), Smith y col., *J. Biol. Chem.*, 265: 12267-12271 (1990), y Pfaff y col., *J. Biol. Chem.*, 269: 20233-20238 (1994). Sin embargo, la función de la integrina $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis no se ha sugerido ni identificado nunca hasta la presente invención.

Por ejemplo, Hammes y col., *Nature Med.*, 2: 529-553 (1996) confirmaron los hallazgos de la presente invención. Específicamente, la publicación muestra que los péptidos cíclicos, incluido RGDfV cíclico, la estructura y la función del último de los que se han descrito anteriormente en las solicitudes de prioridad sobre la que se basa la presente solicitud, inhibieron la neovascularización retinal en un modelo de neovascularización retinal inducida por hipoxia en ratón. En un estudio separado que también respalda la presente invención así como las solicitudes de prioridad, Luna y col., *Lab. Invest.*, 75: 563-573 (1996) describieron dos péptidos particulares que contenían RGD metilado cíclico que eran parcialmente eficaces en la inhibición de la neovascularización retinal en el modelo de retinopatía isquémica inducida por oxígeno en ratón. Por el contrario, los péptidos de la presente invención exhiben inhibición prácticamente completa de la

neovascularización en los sistemas de los modelos descritos en el presente documento.

La inhibición de la adhesión celular in vitro usando anticuerpos monoclonales inmunoespecíficos para diversas subunidades α o β de integrinas ha implicado al receptor $\alpha_v\beta_3$ de vitronectina en la adhesión celular de una diversidad de tipos de células incluyendo células endoteliales microvasculares. Davis y col., J. Cell. Biol., 51: 206-218 (1993). Además, Nicosia y col., Am. J. Pathol., 138: 829-833 (1991), describieron el uso del péptido RGD, GRGDS, para inhibir in vitro la formación de "microvasos" de aorta de rata cultivada en gel de colágeno. Sin embargo, la inhibición de la formación de "microvasos" in vitro en cultivos de gel de colágeno no es un modelo para la inhibición de la angiogénesis en un tejido debido a que no se muestra que las estructuras de microvasos sean las mismas que los crecimientos capilares o que la formación del microvaso en el cultivo de gel de colágeno sea lo mismo que el crecimiento neovascular en un tejido intacto, tal como tejido artrítico, tejido tumoral o tejido enfermo en el que es deseable la inhibición de la angiogénesis.

Para que tenga lugar la angiogénesis, las células endoteliales deben primero degradarse y cruzar la membrana basal del vaso sanguíneo de una manera similar a la usada por las células tumorales durante la invasión y la formación de metástasis.

Los autores de la presente invención han informado previamente que la angiogénesis depende de la interacción entre las integrinas vasculares y las proteínas de matriz extracelular. Brooks, y col., Science., 264: 569-571 (1994). Además, se ha informado que la muerte celular programada (apoptosis) de las células vasculares angiogénicas se inicia por la interacción, que podría inhibirse por medio de ciertos antagonistas, de la integrina $\alpha_v\beta_3$ vascular. Brooks y col., Cell, 79: 1157-1164 (1994). Más recientemente, los autores de la presente invención han informado que la unión de la metaloproteinasa-2 de matriz (MMP-2) al receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_5$) puede inhibirse usando antagonistas de $\alpha_v\beta_5$, y de este modo puede inhibirse la función enzimática de la proteinasa. Brooks y col., Cell, 85: 683-693 (1996).

Aparte de los estudios reseñados en el presente documento, los solicitantes no son conscientes de ninguna otra demostración de que la angiogénesis pudiera inhibirse en un tejido usando inhibidores de adhesión celular. En particular, nunca se ha demostrado previamente que la función de $\alpha_v\beta_3$ se requiera para la angiogénesis en un tejido o que

los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ puedan inhibir la angiogénesis en un tejido.

Breve descripción de la invención

5 La divulgación de la presente invención demuestra que la angiogénesis en los tejidos requiere la integrina $\alpha_v\beta_3$, y que los inhibidores de $\alpha_v\beta_3$ pueden inhibir angiogénesis. La divulgación también demuestra que los antagonistas de otras integrinas, tales como $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_v\beta_1$ no inhiben la angiogénesis, presumiblemente porque estas otras integrinas no son esenciales para que tenga lugar la angiogénesis.

10

La invención describe por consiguiente compuestos para uso en la inhibición de la angiogénesis mediada por $\alpha_v\beta_3$ en un tejido.

15

El tejido a tratar puede ser cualquier tejido en el que es deseable la inhibición de la angiogénesis, tal como tejido enfermo en el que está teniendo lugar la neovascularización. Los tejidos de ejemplo incluyen tejidos inflamados, tumores sólidos, metástasis, tejidos que experimentan reestenosis y tejidos similares.

20

Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ para uso en la presente invención es capaz de unirse a $\alpha_v\beta_3$ y de inhibir de manera competitiva la capacidad de $\alpha_v\beta_3$ de unirse a un ligando natural. El antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un mimético orgánico de $\alpha_v\beta_3$ como se define en la reivindicación 1.

Breve descripción de los dibujos

25

En los dibujos que forman una parte de esta descripción:

30

Las figuras 1 A-1 D ilustran la distribución tisular de las subunidades de integrinas $\alpha_v\beta_3$ y β_1 , en piel normal y en piel sometida a curación de heridas denominada tejido de granulación. La inmunohistoquímica con anticuerpos para $\alpha_v\beta_3$ y β_1 se realizó como se describe en el Ejemplo 3A. Las Figuras 1A y 1B ilustran respectivamente la inmunorreactividad de anti- β_3 en la piel normal y en el tejido de granulación. Las Figuras 1C y 1D ilustran respectivamente la inmunorreactividad de anti- β_1 en la piel normal y en el tejido de granulación.

35

Las Figuras 2A-2D ilustran la distribución tisular de los ligandos factor von Willebrand y laminina que se unen respectivamente a las subunidades de integrinas β_3 y β_1 en la piel normal y en la piel sometida a curación de heridas denominada tejido de granulación. La inmunohistoquímica con anticuerpos para el factor von Willebrand (anti-vWF) y para laminina (anti-laminina) se realizó como se describe en el Ejemplo 3B. Las Figuras 2A y 2B ilustran respectivamente la inmunorreactividad de anti-vWF en la piel normal y en el tejido de granulación. Las Figuras 2C y 2D ilustran respectivamente la inmunorreactividad de anti-laminina en la piel normal y en el tejido de granulación.

Las Figuras 3A-3D ilustran la distribución tisular del receptor integrina de vitronectina, $\alpha_v\beta_3$, en biopsias de cáncer de vejiga, cáncer de colon, cáncer de mama y cáncer de pulmón, respectivamente. La inmunohistoquímica con el anticuerpo LM609 contra $\alpha_v\beta_3$ se realizó como se describe en el Ejemplo 3C.

La Figura 4 ilustra una microfotografía típica de una CAM de esta invención desprovista de vasos sanguíneos en un embrión de pollo de 10 días de edad sin tratar. La preparación se describe en el Ejemplo 5B.

Las Figuras 5A-5C ilustran la distribución tisular de las integrinas β_1 y $\alpha_v\beta_3$ en la preparación de CAM de esta invención.

La Figura 5A muestra la distribución de la subunidad β_1 en una preparación de CAM de 10 días de edad sin tratar según se detecta por medio de inmunorreactividad con inmunofluorescencia con CSAT, un anticuerpo anti- β_1 . La Figura 5B muestra la distribución del receptor $\alpha_v\beta_3$ en una preparación de CAM de 10 días de edad según se detecta por medio de inmunorreactividad con inmunofluorescencia con LM609, un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$. La Figura 5C muestra la distribución del receptor $\alpha_v\beta_3$ en una preparación de CAM de 10 días de edad tratada con bFGF según se detecta por inmunorreactividad con inmunofluorescencia con LM609, un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$. Los tratamientos y los resultados se describen en el Ejemplo 5C.

La Figura 6 ilustra la cuantificación en un gráfico de barras de la expresión relativa de $\alpha_v\beta_3$ y β_1 en las CAM de 10 días de edad tratadas con bFGF como se describe en el Ejemplo 6A. La intensidad de fluorescencia media se representa en el eje Y con los perfiles de integrinas representados en el eje X.

Las Figuras 7A-7C ilustran el aspecto de una CAM de 10 días de edad sin tratar, una CAM tratada con bFGF y una CAM tratada con TNF α , respectivamente, cuyos procedimientos y resultados se describen en el Ejemplo 6A.

5 Las Figuras 8A-8E ilustran el efecto del tratamiento tópico con anticuerpos en la angiogénesis inducida por bFGF en una CAM de 10 días de edad como se describe en el Ejemplo 7A1). La Figura 8A muestra una preparación de CAM sin tratar que está desprovista de vasos sanguíneos. La Figura 8B muestra la infiltración de vasculatura nueva en una área previamente desprovista de vasculatura inducida por el tratamiento
10 con bFGF. Las Figuras 8C, 8D y 8E muestran respectivamente los efectos de los anticuerpos contra β_1 (anti- β_1 ; CSAT), $\alpha_v\beta_5$ (anti- $\alpha_v\beta_5$; P3G2) y $\alpha_v\beta_3$ (anti- $\alpha_v\beta_3$; LM609).

Las Figuras 9A-9C ilustran el efecto de la inyección intravenosa del péptido sintético 66203 en la angiogénesis inducida por tumores como se describe en el Ejemplo 7E2). La
15 Figura 9A muestra la ausencia de efecto inhibitor del tratamiento intravenoso con un péptido del control (tumor tratado con péptido de control) en la angiogénesis resultante de la inducción tumoral. La inhibición de tal angiogénesis por la inyección intravenosa del péptido 66203 (tumor tratado con RGD cíclico) se muestra en la Figura 9B. La ausencia de efectos inhibidores o de citotoxicidad en los vasos maduros preexistentes tras la
20 infusión intravenosa del péptido 66203 en una área adyacente al área tratada del tumor se muestra en la Figura 9C (CAM adyacente a tumor tratado con RGD cíclico).

Las Figuras 10A-10C ilustran el efecto de la aplicación intravenosa de anticuerpos monoclonales para la angiogénesis inducida por factores de crecimiento como se
25 describe en el Ejemplo 7B1). La Figura 10A muestra la angiogénesis inducida por bFGF no expuesta al tratamiento con anticuerpos (control). No hubo inhibición de la angiogénesis cuando se trató una preparación similar con el anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_5$ P3G2 como se muestra en la Figura 10B. La inhibición de la angiogénesis tuvo lugar con el tratamiento con el anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$ LM609 como se muestra en la Figura 10C.

30

Las Figuras 11A-11C ilustran el efecto en la angiogénesis embrionaria tras la aplicación tópica de los anticuerpos anti-integrina como se describe en el Ejemplo 7C. La angiogénesis no resultó inhibida por el tratamiento de una CAM de 6 días con los anticuerpos anti- β_1 y anti- $\alpha_v\beta_5$ que se muestran respectivamente en las Figuras 11A y
35 11B. En cambio, el tratamiento con el anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$ LM609 dio lugar a la inhibición

de la formación de capilares sanguíneos como se muestra en la Figura 11C.

La Figura 12 ilustra la cuantificación del número de vasos que entran en un tumor en una preparación de CAM como se describe en el Ejemplo 7D1). El gráfico muestra el número de vasos representados en el eje Y resultante de la aplicación tópica de CSAT (anti- β_1), LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$).

Las Figuras 13A-13D ilustran una comparación entre los pesos húmedos de los tumores 7 días después del tratamiento y los pesos iniciales de los tumores como se describe en el Ejemplo 9A1)a. Cada barra representa la media $\pm$ E.E. de 5-10 tumores por grupo. Los tumores eran procedentes de preparaciones CAM de melanoma humano (M21-L) (Figura 13A), de carcinoma pancreático (Fg) (Figura 13B), de carcinoma del pulmón (UCLAP-3) (Figura 13C), y de carcinoma de laringe (HEp3) (Figura 13D) y tratados por vía intravenosa con PBS, CSAT (anti- β_1) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$). Los gráficos muestran el peso del tumor representado en el eje Y resultante de la aplicación intravenosa de CSAT (anti- β_1), LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o PBS como se indica en el eje X.

Las figuras 14A y 14B ilustran secciones histológicas de tumores tratados con anticuerpo P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) (Figura 14A) y con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) (Figura 14B), y teñidas con hematoxilina y eosina como se describe en el Ejemplo 9A1)b. Según se muestra en la Figura 14A, los tumores tratados con el anticuerpo de control (P3G2) mostraron numerosas células tumorales viables y en división activa como lo indican las figuras mitóticas (puntas de flecha) así como los múltiples vasos sanguíneos (flechas) a través del estroma del tumor. En cambio, se detectaron pocas, si acaso alguna, células tumorales o vasos sanguíneos viables en los tumores tratados con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) en la Figura 14B.

Las Figuras 15A-15E corresponden a tumores M21L tratados con péptidos como se describe en el Ejemplo 9A2) y se presentan de la siguiente manera: Figura 15A, péptido RAD cíclico de control (69601); Figura 15B, péptido RGD cíclico (66203); Figura 15C, tejido adyacente a la CAM tomado de los mismos embriones tratados con péptido RGD cíclico (66203) y aumento alto (13x) de los tumores tratados con el péptido RAD de control (69601) en la Figura 15D o el péptido RGD cíclico (66203) en la Figura 15E. La Figura 15D representa los vasos normales del tumor tratado con el péptido RAD de control (69601). La Figura 15E representa ejemplos de vasos sanguíneos rotos de

tumores tratados con péptido RGD cíclico (66203) (flechas).

Las Figuras 16A-16E representan la inhibición de la angiogénesis por medio de antagonistas de la angiogénesis en el ensayo del modelo de ojo de conejo in vivo como se describe en el Ejemplo 10. La figura 16A y 16B representan la angiogénesis del ojo de conejo en presencia de bFGF y del Acm P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$). Las Figuras 16C, 16D y 16E representan la inhibición de la angiogénesis del ojo de conejo en presencia de bFGF y del Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$).

La Figura 17 representa un diagrama de flujo de cómo se generó el modelo de ratón quimérico ratón:ser humano in vivo como se describe en el Ejemplo 11. Se reemplazó una porción de piel de un ratón SCID con prepucio neonatal humano y se dejó cicatrizar durante 4 semanas. Después de la cicatrización del injerto, se inoculó el prepucio humano con células tumorales humanas. Durante el siguiente período de 4 semanas, se estableció un tumor que podía medirse, que comprendía un tumor humano con crecimiento de vasculatura humana desde la piel humana hacia el tumor humano.

La Figura 18 ilustra el porcentaje de células individuales procedentes de las CAM tratadas con Acm y tratadas con péptido y teñidas con Apop Tag según se determina por el análisis FACS y como se describe en el Ejemplo 12. Las barras negras y punteadas representan células de embriones tratados 24 horas y 48 horas antes del ensayo, respectivamente. Cada barra representa la media $\pm$ E.E. de tres réplicas. Las CAM se trataron con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), o CSAT (anti- β_1), o PBS. Las CAM se trataron también con el péptido cíclico 66203 (ciclo-RGDfV, indicado como Péptido 203) o con el péptido cíclico de control 69601 (ciclo-RADfV, indicado como Péptido 601).

Las Figuras 19A y 19B ilustran los resultados combinados de las suspensiones celulares individuales de las CAM de embriones tratados con CSAT (anti- β_1) (Figura 19A) o con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) (Figura 19B), teñidas con Apop Tag y yoduro de propidio, analizado por medio de FACS como se describe en el Ejemplo 12C. El eje Y representa la tinción de Apop Tag en números de células (Apoptosis), el eje X representa la tinción de yoduro de propidio (contenido de ADN). La línea horizontal representa la entrada negativa para la tinción de Apop Tag. Los paneles izquierdo y derecho indican células de CAM de embriones tratados con CSAT (anti- β_1) (Figura 19A) y LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) (Figura 19B), respectivamente. El análisis del ciclo celular se realizó por medio del análisis de

aproximadamente 8.000 episodios por condición.

Las Figuras 20A-20C representan el tejido de CAM de embriones tratados con CSAT (anti- β_1) y las Figuras 20D-20F representan el tejido de CAM de embriones tratados con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) preparados como se describe en el Ejemplo 12C. Las Figuras 20A y 20D representan los tejidos teñidos con Apop Tag y visualizados por fluorescencia (FITC) superpuestos en una imagen de contraste de interferencia diferencial (D.I.C.). Las Figuras 20B y 20E representan los mismos tejidos teñidos con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) y visualizados por fluorescencia (rodamina). Las Figuras 20C y 20F representan imágenes combinadas de los mismos tejidos teñidos con Apop Tag y LM609 en las que la tinción amarilla representa la colocalización. La barra representa 15 y 50 μM en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente.

La Figura 21 muestra el resultado de una inhibición del ensayo de unión celular con el péptido 85189 como se describe en el Ejemplo 4A. Los efectos del antagonista peptídico se evaluaron sobre un intervalo de dosificación de 0,001 a 100 μM según se representa en el eje X. La unión celular se representa en el eje Y medida a una densidad óptica (D.O.) de 600 nm. La unión celular se midió en superficies recubiertas con vitronectina (líneas discontinuas) frente a superficies recubiertas con laminina (líneas continuas).

Las Figuras 22A y 22B muestran la secuencia consecutiva de ADNc de la MMP-2 de pollo junto con la secuencia de aminoácidos deducida mostrada en la segunda línea. Las líneas tercera y cuarta muestran respectivamente la secuencia de aminoácidos deducida de la MMP-2 humana y de ratón como se describe en el Ejemplo 4A. La secuencia de ADNc del pollo se presenta en ID. SEC. N° 29 junto con la secuencia de aminoácidos codificada que también se presenta por separado como ID. SEC. N° 30. La numeración del primer nucleótido de la región 5' sin traducir y la región que codifica la secuencia de proenzima que se muestra en la Figura 22A como número negativo se presenta en realidad como número 1 en el Listado de Secuencias haciendo que la última parezca más larga que la figura; sin embargo, la secuencia de nucleótidos en la figura es idéntica en longitud y secuencia a la que se presenta en el listado con excepción de la numeración. Por consiguiente, las referencias a la posición de nucleótidos para la MMP-2 de pollo o humana en la memoria descriptiva, tal como en los cebadores para uso en la amplificación de fragmentos de MMP-2, se basan en la posición de los nucleótidos según se indica en la figura y no como se presenta en el Listado de Secuencias.

La Figura 23 muestra los resultados en forma de gráfico de barras de un ensayo de unión al receptor en fase sólida para la unión de MMP-2 yodada al $\alpha_v\beta_3$ con y sin la presencia de inhibidores como se describe además en el Ejemplo 4B. Los datos se representan como CPM unido en el eje Y frente a los diversos inhibidores potenciales y controles.

5

La Figura 24 muestra a especificidad de las composiciones de MMP-2 procedentes de pollo para cualquiera de los receptores integrina $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ en presencia de inhibidores de MMP-2 como se describe además en el Ejemplo 4B. Los datos se presentan como se describe en la leyenda en la Figura 23.

10

La Figura 25 muestra el efecto de la proteína de fusión MMP-2 (410-637) GST de pollo en la angiogénesis inducida por bFGF como se describe en el Ejemplo 7A3). Las Figuras 25A-B y 25C-D muestran respectivamente los efectos del control (una proteína de fusión que contiene un fragmento no MMP-2) y de la proteína de fusión del fragmento de MMP-2 con GST.

15

Las Figuras 26 y 27 ilustran ambas, en forma de gráfico de barras, el índice de angiogénesis (una medición de puntos de ramificación) de los efectos de la proteína de fusión MMP-2 (410-637) GST de pollo (marcada CTMMP-2) frente al control (RAP-GST o GST-RAP) en las CAM tratadas con bFGF como se describe en el Ejemplo 7A3). El índice angiogénico se representa en el eje Y frente a los tratamientos separados en el eje X.

20

La Figura 28 muestra los efectos de péptidos y de compuestos orgánicos en la angiogénesis inducida por bFGF según se miden por el efecto en los puntos de ramificación representados en el eje Y frente a los diversos tratamientos en el eje X, incluidos bFGF solo y CAM tratadas con bFGF con los péptidos 69601 ó 66203 y los compuestos orgánicos 96112, 96113 y 96229, como se describe en los Ejemplos 7B y 14.

25

La Figura 29 muestra gráficamente la respuesta a la dosis del péptido 85189 en la inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF como se describe además en el Ejemplo 7B2) donde el número de puntos de ramificación se representa en el eje Y frente a la cantidad de péptido administrado al embrión en el eje X.

30

La Figura 30 muestra la actividad inhibidora de los péptidos 66203 (marcado 203) y

35

85189 (marcado 189) en la angiogénesis inducida por bFGF en el ensayo de CAM como se describe en el Ejemplo 7B2). Los controles incluyeron CAM tratadas con bFGF sin péptidos y el péptido 69601 (marcado 601). Los datos se representan como se describe en la leyenda para la Figura 27.

5

Las figuras 31A-L muestran el efecto de diversos tratamientos frente a las preparaciones de CAM no tratadas durante el transcurso del tiempo que comienza a las 24 horas y finaliza a las 72 horas como se describe además en el Ejemplo 7B3). Las fotografías para las categorías marcadas, bFGF, bFGF + MAID (tratado con bFGF seguido por exposición a la proteína de fusión MMP2 (2-4) GST de pollo) y bFGF + control (tratamiento con bFGF seguido por MMP-2 (10-1) de pollo) se muestran respectivamente en las Figuras 31A-C, 31D-F, 31G-I y 31J-L.

Las figuras 32, 33 y 34 muestran respectivamente la reducción en el peso del tumor para los tumores UCLAP-3, M21-L y FgM tras la exposición intravenosa al péptido de control 69601 y al antagonista 85189 como se describe además en el Ejemplo 9A. Los datos se representan con el peso del tumor en el eje Y frente a los tratamientos con péptido en el eje X.

La figura 35 ilustra el efecto de péptidos y de anticuerpos en el crecimiento tumoral del melanoma en el modelo de ratón quimérico:ser humano como se describe además en el Ejemplo 11B. Los péptidos evaluados incluyeron el control 69601 (marcado 601) y el antagonista 85189 (marcado 189). El anticuerpo probado era LM609. El volumen del tumor en mm³ se representa en el eje Y frente a los diversos tratamientos en el eje X.

25

Las Figuras 36A y B muestran respectivamente el efecto del antagonista 85189 (marcado 189) comparado con el péptido de control 69601 (marcado 601) en la reducción del volumen y el peso húmedo de tumores M21L sobre un intervalo de dosificación de 10, 50 y 250 ug/inyección como se describe además en el Ejemplo 11C.

30

Las Figuras 37A y 37B muestran la eficacia del péptido antagonista 85189 (marcado 189 con una línea continua y círculos rellenos) frente al péptido de control 69601 (marcado 601 en una línea discontinua y cuadrados abiertos) en la inhibición del volumen del tumor M21L en el modelo ratón:humano con dos diferentes regímenes de tratamiento como se describe además en el Ejemplo 11C. El volumen del tumor en mm³ se representa en el

35

eje Y frente a los días en el eje X.

Las Figuras 38 a 42 ilustran de manera esquemática las diversas síntesis químicas de moléculas orgánicas de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ como se describe además en el Ejemplo 13.

Las Figuras 43 y 44 muestran los efectos de diversas moléculas orgánicas en la angiogénesis inducida por bFGF en un ensayo de CAM como se describe además en el Ejemplo 14. Los puntos de ramificación se representan en el eje Y frente a los diversos compuestos usados a 250 ug/ml en el eje X en la Figura 43 y a 100 ug/ml en la Figura 44.

Descripción detallada de la invención

A. Definiciones

Residuo de aminoácido: Un aminoácido formado tras la digestión química (hidrólisis) de un polipéptido en sus enlaces peptídicos. Los residuos de aminoácidos descritos en el presente documento están de preferencia en la forma isomérica "L". Sin embargo, los residuos en la forma isomérica "D" pueden sustituirse por cualquier residuo de aminoácido L, con la condición de que la propiedad funcional deseada esté retenida por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el extremo amino terminal de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el extremo carboxi terminal de un polipéptido. Manteniendo la nomenclatura de polipéptidos convencional (descrita en J. Biol. Chem., 243: 3552-3559 (1969) y adoptada en 37 CFR § 1.822 (b) (2)), las abreviaturas para los residuos de aminoácidos se muestran en la siguiente tabla de correspondencia:

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
de 1 letra	de 3 letras	
Y	Tyr	tirosina
G	Gly	glicina
F	Phe	fenilalanina

(continúa)

Símbolo de 1 letra	Símbolo de 3 letras	Aminoácido
M	Met	metionina
A	Ala	alanina
S	Ser	serina
I	Ile	isoleucina
L	Leu	leucina
T	Thr	treonina
V	Val	valina
P	Pro	prolina
K	Lys	lisina
H	His	histidina
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	triptófano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	cisteína
X	Xaa	desconocido/otro

Además los siguientes tienen los significados que se muestran a continuación:

BOC	terc-butiloxycarbonilo
DCCI	diciclohexilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
OMe	metoxi
HOBt	1-hidroxibenzotriazol

Debe observarse que todas las secuencias de residuos de aminoácidos se representan en el presente documento por medio de fórmulas cuya orientación izquierda y derecha están en la dirección convencional del extremo amino terminal hacia el extremo carboxi

terminal. Además, debe observarse que una línea en el comienzo o en el final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico a una secuencia adicional de uno o más residuos de aminoácidos.

- 5 Polipéptido: Se refiere a una serie lineal de residuos de aminoácidos conectados unos a otros por enlaces peptídicos entre el grupo amino alfa y el grupo carboxi de residuos de aminoácidos contiguos.

- 10 Péptido: Como se usa en el presente documento se refiere a una serie lineal de no más de aproximadamente 50 residuos de aminoácidos conectados el uno al otro como en un polipéptido.

- 15 Péptido cíclico: Se refiere a un compuesto que tiene una estructura de anillo de heteroátomos que incluye varios enlaces amida como en un péptido típico. El péptido cíclico puede ser un polipéptido lineal ciclizado (cabeza a cola) en el que un extremo N terminal del péptido lineal ha formado un enlace amida con el carboxilato terminal del péptido lineal, o puede contener una estructura de anillo en la que el polímero es homodético o heterodético y comprende enlaces amida y/u otros enlaces para cerrar el anillo, tales como puentes disulfuro, enlaces tioéster, tioamidas, guanidino, y similares.

- 20 Proteína: Se refiere a una serie lineal de más de 50 residuos de aminoácidos conectados el uno al otro como en un polipéptido.

- 25 Proteína de fusión: Se refiere a un polipéptido que contiene al menos dos dominios de polipéptido diferentes unidos de manera operativa por medio de un enlace peptídico típico ("condensados"), en el que los dos dominios corresponden a péptidos que no se encuentran condensados en la naturaleza.

- 30 Péptido sintético: Se refiere a una cadena de residuos de aminoácidos unidos juntos mediante enlaces peptídicos producida químicamente que está libre de proteínas de origen natural y fragmentos de las mismas.

B. Consideraciones generales

- 35 La presente invención se refiere generalmente al descubrimiento de que la angiogénesis

está mediada por el receptor $\alpha_v\beta_3$ específico de vitronectina, y que la inhibición de la función de $\alpha_v\beta_3$ inhibe la angiogénesis. Este descubrimiento es importante debido a la función que desempeña la angiogénesis en una diversidad de procesos patológicos. Inhibiendo la angiogénesis, se puede intervenir en la enfermedad, mejorar los síntomas, y en algunos casos curar la enfermedad.

Cuando el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos es la causa de, o contribuye a, la patología asociada con una enfermedad, la inhibición de la angiogénesis reducirá los efectos perjudiciales de la enfermedad. Los ejemplos incluyen artritis reumatoide, retinopatía diabética, enfermedades inflamatorias, reestenosis, y similares. Cuando se requiere el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos para soportar el crecimiento de un tejido perjudicial, la inhibición de la angiogénesis reducirá el suministro de sangre al tejido y por consiguiente contribuirá a la reducción de masa de tejido en los requerimientos de suministro de sangre. Los ejemplos incluyen el crecimiento de tumores en los que la neovascularización es un requerimiento continuo con el fin de que el tumor crezca más allá de unos pocos milímetros de espesor, y para el establecimiento de metástasis de tumores sólidos.

Los compuestos para uso según la presente invención son eficaces en parte gracias a que la terapia es altamente selectiva para la angiogénesis y no para otros procesos biológicos. Como se muestra en los ejemplos, solamente el crecimiento de nuevos vasos contiene $\alpha_v\beta_3$ sustancial, y por consiguiente los procedimientos terapéuticos no afectan adversamente a los vasos maduros. Además, $\alpha_v\beta_3$ no está ampliamente distribuido en los tejidos normales, sino se encuentra más bien selectivamente en los vasos nuevos, asegurando de ese modo que la terapia puede dirigirse selectivamente al crecimiento de vasos nuevos.

Previo a los descubrimientos de la presente invención, no se sabía que la angiogénesis, y cualquiera de los procesos dependientes de la angiogénesis, podían inhibirse in vivo por el uso de reactivos definidos en la reivindicación 1 que antagonizan la función biológica de $\alpha_v\beta_3$.

C. Procedimientos para la inhibición de la angiogénesis

La invención proporciona compuestos, según se definen en la reivindicación 1, para uso

en un procedimiento de inhibición de la angiogénesis en un tejido, y por lo tanto la inhibición de episodios en el tejido que dependen de la angiogénesis. En general, los compuestos se administran al tejido en una composición que comprende una cantidad inhibidora de la angiogénesis de dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$.

5

Como se describió anteriormente, la angiogénesis incluye una diversidad de procesos que implican la neovascularización de un tejido que incluye “desarrollo de brotes”, vasculogénesis, o agrandamiento de capilares, todos estos procesos de angiogénesis están mediados por y son dependientes de la expresión de $\alpha_v\beta_3$. Con excepción de la curación de heridas traumáticas, formación de cuerpo lúteo y la embriogénesis, se cree que la mayoría de los procesos de la angiogénesis están asociados con procesos patológicos y por lo tanto el uso de los presentes procedimientos terapéuticos es selectivo para la enfermedad y no tiene efectos secundarios perjudiciales.

10

Existe una diversidad de enfermedades en las que se cree que la angiogénesis es importante, denominadas enfermedades angiogénicas, que incluyen pero no se limitan a, trastornos inflamatorios tales como inflamación inmune y no inmune, reumatismo articular crónico y psoriasis, trastornos asociados con invasión inapropiada e inoportuna de capilares tales como retinopatía diabética, glaucoma neovascular, reestenosis, proliferación capilar en placas ateroscleróticas y osteoporosis, y enfermedades asociadas al cáncer, tales como tumores sólidos, metástasis de tumores sólidos, angiofibromas, fibroplasia retrolental, hemangiomas, sarcoma de Kaposi y cánceres similares que requieren neovascularización para soportar el crecimiento tumoral.

20

Por consiguiente, los procedimientos que inhiben la angiogénesis en un tejido enfermo mejoran los síntomas de la enfermedad y, dependiendo de la enfermedad, pueden contribuir a la curación de la enfermedad. En una forma de realización, la invención contempla los compuestos según se definen en la reivindicación 1 para uso en la inhibición de la angiogénesis, per se, en un tejido. La extensión de la angiogénesis en un tejido, y por consiguiente el grado de inhibición alcanzado por los compuestos presentes, pueden evaluarse mediante una diversidad de procedimientos, tales como se describen en los ejemplos para detectar las estructuras de los capilares nacientes e inmaduros de $\alpha_v\beta_3$ inmunopositivos mediante inmunohistoquímica.

30

Según se describe en el presente documento, cualquiera de una diversidad de tejidos u

35

órganos comprendidos por tejidos organizados, pueden soportar angiogénesis en afecciones patológicas incluidos la piel, el músculo, el intestino, el tejido conectivo, las articulaciones, los huesos y tejidos similares en los que los vasos sanguíneos pueden invadir tras los estímulos angiogénicos.

5

Por consiguiente, en una forma de realización relacionada, un tejido a tratar es un tejido inflamado y la angiogénesis a inhibir es la angiogénesis del tejido inflamado donde está presente neovascularización del tejido inflamado. En esta clase de compuestos definidos en la reivindicación 1 están contemplados compuestos para uso en la inhibición de la angiogénesis en tejidos artríticos, tales como en un paciente con reumatismo articular crónico, tejido inflamado inmune y no inmune, en tejidos psoriáticos y similar.

El paciente a tratar según la presente invención y en sus muchas de sus formas de realización es deseablemente un paciente humano, aunque se entiende que los principios de la invención indican que la invención es eficaz con respecto a todos los mamíferos, que se pretende que estén incluidos en el término "paciente". En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie de mamífero en la que es deseable el tratamiento de enfermedades asociadas con la angiogénesis, particularmente especies de mamíferos de ganadería y domésticos.

20

En otra forma de realización relacionada, un tejido a tratar es un tejido retinal de un paciente con enfermedad retinal tal como retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular y la angiogénesis a inhibir es la angiogénesis del tejido retinal donde está presente neovascularización del tejido retinal.

25

En otra forma de realización relacionada, un tejido a tratar es un tejido tumoral de un paciente con un tumor sólido, una metástasis, un cáncer de piel, un cáncer de mama, un hemangioma o angiofibroma y cánceres similares, y la angiogénesis a inhibir es la angiogénesis del tejido tumoral donde está presente neovascularización de un tejido tumoral. Los tejidos típicos de tumores sólidos que pueden tratarse por los presentes procedimientos incluyen tejidos de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe, ovario y similares. La angiogénesis de tejido tumoral de ejemplo y su inhibición, está descrita en los Ejemplos.

30

La inhibición de la angiogénesis del tejido tumoral es una forma de realización

35

particularmente de preferencia por la importante función que desempeña la neovascularización en el crecimiento tumoral. En ausencia de neovascularización del tejido tumoral, el tejido tumoral no obtiene los nutrientes necesarios, se retarda su crecimiento, cesa el crecimiento adicional, remite y en última instancia se vuelve necrótico dando como resultado la destrucción del tumor.

En otras palabras, la presente invención proporciona compuestos para uso en un procedimiento de inhibición de la neovascularización del tumor al inhibir la angiogénesis del tumor según los presentes procedimientos. De manera similar, la invención proporciona compuestos inhibidores de la angiogénesis, para uso en la inhibición del crecimiento tumoral.

Los compuestos son también particularmente eficaces contra la formación de metástasis porque (1) su formación requiere la vascularización de un tumor primario de modo que las células del cáncer metastático puedan migrar fuera del tumor primario y (2) su establecimiento en un sitio secundario requiere la neovascularización para dar soporte al crecimiento de las metástasis.

En una forma de realización relacionada, la invención contempla la puesta en práctica de los compuestos para uso en el procedimiento conjuntamente con otras terapias tales como la quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos y para el control del establecimiento de la metástasis. El inhibidor de la angiogénesis se administrará típicamente durante o después de la quimioterapia, aunque es preferible inhibir la angiogénesis después de un régimen de quimioterapia en momentos en que el tejido tumoral esté respondiendo al asalto tóxico induciendo angiogénesis para recuperar la provisión de un suministro de sangre y de nutrientes al tejido tumoral. Además, es preferible administrar los compuestos para uso en la inhibición de la angiogénesis después de la cirugía en la que se han eliminado los tumores sólidos como profilaxis contra la metástasis.

En la medida en que los compuestos son para uso en la inhibición de la neovascularización tumoral, también pueden ser para uso en la inhibición del crecimiento del tejido tumoral, en la inhibición de la formación de metástasis del tumor y en la regresión de tumores establecidos. Los Ejemplos demuestran la regresión de un tumor establecido tras una única administración intravenosa de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según la

presente invención.

La reestenosis es un procedimiento de migración y de proliferación de células de músculo liso (SMC) en el sitio de la angioplastia coronaria transluminal percutánea que obstaculiza el éxito de la angioplastia. La migración y la proliferación de SMC durante la reestenosis puede considerarse un proceso de angiogénesis que es inhibido por los presentes compuestos. Por consiguiente, la invención también contempla compuestos para uso en la inhibición de la reestenosis al inhibir la angiogénesis en un paciente tras los procedimientos de angioplastia. Para la inhibición de la reestenosis, el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se administra típicamente después del procedimiento de angioplastia durante desde aproximadamente 2 hasta aproximadamente 28 días, y más típicamente durante aproximadamente los primeros 14 días después del procedimiento.

Los presentes compuestos para uso en la inhibición de la angiogénesis en un tejido, y por consiguiente también para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la angiogénesis, deben administrarse a un tejido en el que esté produciéndose angiogénesis, o que esté en riesgo de que se produzca, por el que los compuestos estén en una composición que comprenda una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ capaz de inhibir la unión de $\alpha_v\beta_3$ a su ligando natural. Por consiguiente, los compuestos para uso en el procedimiento deben administrarse a un paciente en una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición fisiológicamente tolerable que contenga un antagonista de $\alpha_v\beta_3$.

Los intervalos de dosificación para la administración del antagonista de $\alpha_v\beta_3$ dependen de la forma del antagonista y de su potencia, como se describe además en el presente documento, y son cantidades suficientemente grandes para producir el efecto deseado en el que la angiogénesis y los síntomas de la enfermedad mediados por la angiogénesis mejoran. La dosificación no debe ser tan grande como para causar efectos secundarios adversos, tales como síndromes de hiperviscosidad, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca congestiva, y similares. Por lo general, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y la extensión de la enfermedad en el paciente y puede ser determinada por un experto en la técnica. La dosificación también puede ser ajustada por el médico individual en caso de cualquier complicación.

Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad del antagonista de $\alpha_v\beta_3$ suficiente

para producir una inhibición medible de la angiogénesis en el tejido tratado, es decir, una cantidad inhibidora de la angiogénesis. La inhibición de la angiogénesis puede medirse in situ por inmunohistoquímica, como se describe en el presente documento, o por otros procedimientos conocidos por el experto en la técnica.

5

En la medida en que el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ puede tomar la forma de cualquiera de cinco miméticos orgánicos diferentes, como se define en la reivindicación 1, debe apreciarse que puede variar la potencia, y por consiguiente la expresión de una cantidad “terapéuticamente eficaz”. Sin embargo, como se muestra por los presentes
10 procedimientos de ensayo, un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ para uso según la presente invención.

La potencia de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ puede medirse por una diversidad de medios que incluyen la inhibición de la angiogénesis en el ensayo de CAM, en el ensayo del ojo de
15 conejo in vivo, en el ensayo de ratón quimérico:ser humano in vivo, y midiendo la inhibición de la unión del ligando natural $\alpha_v\beta_3$, todo como se describe en el presente documento, y ensayos similares.

Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de preferencia tiene la capacidad de inhibir sustancialmente la
20 unión de un ligando natural tal como fibrinógeno o vitronectina a $\alpha_v\beta_3$ en disolución en concentraciones del antagonista inferiores a 0,5 micromolar (μM), de preferencia inferiores a 0,1 μM , y de más preferencia inferiores a 0,05 μM . Por “sustancialmente” se entiende que se observa al menos una reducción del 50 por ciento en la unión del fibrinógeno por la inhibición en presencia del antagonista de $\alpha_v\beta_3$, y en el presente
25 documento al 50% de inhibición se lo denomina valor CI_{50} .

Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de más preferencia exhibe selectividad par $\alpha_v\beta_3$ sobre otras integrinas. Por consiguiente, un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de preferencia inhibe sustancialmente la unión del fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ pero no inhibe sustancialmente la unión
30 del fibrinógeno a otra integrina, tal como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_{IIb}\beta_3$. Resulta particularmente de preferencia un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ que exhiba una actividad CI_{50} 10 veces a 100 veces inferior para inhibir la unión del fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ comparado con la actividad CI_{50} para inhibir la unión del fibrinógeno a otra integrina. Los ensayos de ejemplo para medir la actividad CI_{50} para inhibir la unión del fibrinógeno a una integrina se describen en los
35 Ejemplos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se describe como una cantidad de polipéptido tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para alcanzar una concentración en plasma de desde aproximadamente 0,1 microgramos (μg) por mililitro (ml) hasta aproximadamente 200 $\mu\text{g/ml}$, de preferencia desde aproximadamente 1 $\mu\text{g/ml}$ hasta aproximadamente 150 $\mu\text{g/ml}$. Basándose en un polipéptido que tiene una masa de aproximadamente 500 gramos por mol, la concentración de preferencia en plasma en molaridad es desde aproximadamente 2 micromolar (μM) hasta aproximadamente 5 milimolar (mM) y de preferencia desde aproximadamente 100 μM hasta 1 mM del polipéptido antagonista. Es decir, la dosificación por peso corporal puede variar desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg , y de preferencia desde aproximadamente 0,2 mg/kg hasta aproximadamente 200 mg/kg , en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

El término "monodosis", cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención, se refiere a unidades físicamente separadas como dosis unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculado para que produzca el efecto terapéutico deseado combinado con el diluyente requerido; es decir, portador o vehículo.

En una forma de realización de preferencia como se muestra en los Ejemplos, el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se administra en una única dosis intravenosa.

Las composiciones deben administrarse de una manera compatible con la formulación de dosificación y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a determinar y los tiempos dependen del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo y el grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades exactas de ingrediente activo que es necesario administrar dependen del juicio del médico y son particulares para cada individuo. Sin embargo, en el presente documento se dan a conocer intervalos de dosis adecuados para aplicación sistémica y dependen de la ruta de administración. Los regímenes de administración adecuados también son variables, pero están representados por una administración inicial seguida por dosis repetidas en intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Como alternativa, está contemplada la infusión intravenosa continua suficiente para mantener las concentraciones en sangre en los intervalos especificados para las terapias in vivo.

Como se demuestra por medio de los presentes Ejemplos, la inhibición de la angiogénesis y la regresión tumoral tienen lugar ya a los 7 días tras la puesta en contacto inicial con el antagonista. La exposición adicional o prolongada al antagonista es de preferencia durante 7 días a 6 semanas, de preferencia de aproximadamente 14 a 28 días.

En una forma de realización relacionada, los Ejemplos demuestran la relación entre la inhibición de $\alpha_v\beta_3$ y la inducción de la apoptosis en las células de la neovasculatura que llevan $\alpha_v\beta_3$. Por consiguiente, también se describen compuestos para uso en los procedimientos para la inhibición de la apoptosis en la neovasculatura de un tejido. Por consiguiente, los compuestos se usan sustancialmente como se describe en el presente documento para la inhibición de la angiogénesis en todos los tejidos y afecciones descritos. La única diferencia notable es el tiempo en que se produce el efecto, que es que la apoptosis se manifiesta rápidamente, típicamente aproximadamente 48 horas después de entrar en contacto con el antagonista, mientras que la inhibición de la angiogénesis y la regresión tumoral se manifiestan más lentamente, como se describe en el presente documento. Esta diferencia afecta el régimen terapéutico en términos de tiempo de administración y efecto deseado. Típicamente, la administración para la apoptosis de la neovasculatura puede ser durante 24 horas hasta aproximadamente 4 semanas, aunque resulta de preferencia la administración durante 48 horas hasta 7 días.

D. Composiciones terapéuticas

La presente invención contempla las composiciones terapéuticas útiles para poner en práctica los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento. Las composiciones terapéuticas para uso según la presente invención contienen un vehículo fisiológicamente tolerable junto con un antagonista ~~de~~ $\alpha_v\beta_3$ como se describe en el presente documento, disuelto o disperso en el mismo como un ingrediente activo. En una forma de realización de preferencia, la composición terapéutica del antagonista ~~de~~ $\alpha_v\beta_3$ no es inmunogénica cuando se administra a un paciente mamífero o humano para fines terapéuticos.

Como se usa en el presente documento, los términos “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y variaciones gramaticales de los mismos, referidos a composiciones, vehículos, diluyentes y reactivos, se usan indistintamente y representan

que los materiales son aptos para la administración en o a un mamífero sin la producción de efectos fisiológicos indeseables tales como náuseas, mareos, molestias gástricas y similares.

- 5 La preparación de una composición farmacológica que contiene ingredientes activos disueltos o dispersos en la misma se entiende bien en la técnica y no necesita estar limitada basándose en la formulación. Típicamente tales composiciones se preparan como inyectables o bien como disoluciones o suspensiones líquidas, sin embargo, también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para disolución, o suspensiones, 10 en líquido antes del uso. La preparación también puede emulsionarse.

El ingrediente activo puede mezclarse con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades adecuadas para uso en los procedimientos terapéuticos descritos en el presente documento. Los excipientes 15 adecuados son, por ejemplo, agua, disolución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares y sus combinaciones. Además, si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsivos, agentes tamponadores de pH y similares que potencian la eficacia del ingrediente activo.

- 20 La composición terapéutica de la presente invención puede incluir sales farmacéuticamente aceptables de los componentes de las mismas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen sales de adición de ácido (formadas con grupos amino libres del polipéptido) que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos tales como ácido acético, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilos libres 25 también pueden proceder de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína y similares.

- 30 Particularmente de preferencia son las sales de TFA y HCl cuando se usan en la preparación de antagonistas del polipéptido cíclico $\alpha\beta_3$. Las sales representativas de péptidos se describen en los Ejemplos.

Los vehículos fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Los vehículos 35 líquidos de ejemplo son disoluciones acuosas estériles que no contienen materiales

además de los ingredientes activos y agua, o que contienen un tampón tal como fosfato sódico a un valor de pH fisiológico, disolución salina fisiológica o ambos, tal como disolución salina tamponada con fosfato. Aún además, los vehículos acuosos pueden contener más de una sal tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y de potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas pueden también contener fases líquidas además de y con exclusión del agua. Tales otras fases líquidas de ejemplo son glicerina, aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón, y emulsiones agua-aceite.

Una composición terapéutica contiene una cantidad inhibidora de angiogénesis de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención, típicamente formulado para contener una cantidad de al menos 0,1 por ciento en peso de antagonista por peso de composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una relación en peso del inhibidor a la composición total. Por consiguiente, por ejemplo, 0,1 por ciento en peso es 0,1 gramos de inhibidor por 100 gramos de composición total.

E. Antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$

La presente invención se refiere a ciertos antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, denominados "miméticos", que poseen la capacidad de "imitar" un dominio de unión en el ligando de $\alpha_v\beta_3$ implicado en la interacción funcional del receptor y del ligando, y por consiguiente interfieren con (es decir, inhiben) la función normal, para uso en la inhibición de la angiogénesis mediada por $\alpha_v\beta_3$ en un tejido.

Un mimético de esta invención es una molécula con base orgánica y por consiguiente se lo denomina mimético orgánico. Las moléculas de mimético orgánico que tienen efecto como antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ por ser un mimético para un ligando de $\alpha_v\beta_3$ son los Compuestos 7, 9, 10, 12 y 14, según se describen en el Ejemplo 10.

F. Procedimientos para ensayar el antagonismo de $\alpha_v\beta_3$

Están disponibles una serie de procedimientos para ensayar el antagonismo de $\alpha_v\beta_3$.

El primer ensayo mide la inhibición de la unión directa del ligando natural $\alpha_v\beta_3$, y una

forma de realización de preferencia se describe en detalle en los Ejemplos. El ensayo típicamente mide el grado de inhibición de la unión de un ligando natural, tal como el fibrinógeno, a $\alpha_v\beta_3$ aislado en la fase sólida por ELISA.

- 5 El segundo ensayo mide la angiogénesis en la membrana corioalantoica de pollo (CAM) y se denomina el ensayo de CAM. El ensayo de CAM ha sido descrito en detalle por otros, y además se ha usado para medir tanto la angiogénesis como la neovascularización de tejidos tumorales. Véase Ausprunk y col., Am. J. Pathol., 79: 597-618 (1975) y Ossonski y col., Cancer Res., 40: 2300-2309 (1980).

10

El ensayo de CAM es un modelo de ensayo reconocido para angiogénesis in vivo porque se produce la neovascularización del tejido entero. Los vasos sanguíneos de embrión de pollo reales se hacen crecer en la CAM o en el tejido desarrollado en la CAM.

- 15 Como se demuestra en el presente documento, el ensayo de CAM ilustra la inhibición de la neovascularización basándose tanto en la cantidad como en la extensión de crecimiento de nuevos vasos. Además, es fácil controlar el crecimiento de cualquier tejido transplantado tras la CAM, tal como un tejido tumoral. Finalmente, el ensayo es particularmente útil debido a que existe un control interno para evaluar la toxicidad en el sistema de ensayo. El embrión de pollo se expone a cualquier reactivo de prueba y por
20 consiguiente, la salud del embrión es una indicación de toxicidad.

- El tercer ensayo que mide la angiogénesis es el modelo de ojo de conejo in vivo y se denomina el ensayo de ojo de conejo. El ensayo de ojo de conejo se ha sido descrito en
25 detalle por otros y se ha usado además para medir tanto la angiogénesis como la neovascularización en presencia de inhibidores angiogénicos tales como la talidomida. Véase, D'Amato, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91: 4082-4085 (1994).

- El ensayo de ojo de conejo es un modelo de ensayo bien reconocido para la
30 angiogénesis in vivo porque el proceso de neovascularización, ejemplificado por los capilares sanguíneos de conejo que crecen desde el borde de la córnea hacia el interior de la córnea, se visualizan fácilmente a través de la córnea naturalmente transparente del ojo. Además, tanto la extensión como la cantidad de estimulación o inhibición de la neovascularización o regresión de la neovascularización pueden controlarse fácilmente
35 durante el tiempo.

Finalmente, el conejo se expone a cualquier reactivo de prueba y por consiguiente la salud del conejo es una indicación de la toxicidad del reactivo de prueba.

El cuarto ensayo mide la angiogénesis en el modelo de ratón quimérico ratón:ser humano, y se denomina el ensayo de ratón quimérico. El ensayo ha sido descrito en detalle por otros, y se ha descrito además en el presente documento para medir la angiogénesis, neovascularización y regresión de tejidos tumorales. Véase Yan y col., J. Clin. Invest., 91: 986-996 (1993). El ensayo de ratón quimérico es un modelo de ensayo útil para la angiogénesis in vivo porque los injertos de piel transplantados se asemejan mucho histológicamente a la piel humana normal y tiene lugar la neovascularización del tejido entero en el que se desarrollan capilares sanguíneos humanos reales a partir de la piel humana injertada en el tejido tumoral humano en la superficie de la piel humana injertada. El origen de la neovascularización hacia el injerto humano puede demostrarse por medio de tinción inmunohistoquímica de la neovascularización con marcadores de células endoteliales específicos humanos.

Como se demuestra en el presente documento, el ensayo de ratón quimérico demuestra la regresión de la neovascularización basándose tanto en la cantidad como en la extensión de la regresión del crecimiento de capilares nuevos. Además, es fácil controlar los efectos en el crecimiento de cualquier tejido transplantado sobre la piel injertada, tal como un tejido tumoral. Finalmente, el ensayo es útil porque hay un control interno para la toxicidad en el sistema de ensayo. El ratón quimérico se expone a cualquier reactivo de prueba, y por consiguiente la salud del ratón es una indicación de la toxicidad.

G. Artículo de fabricación

También se describe un artículo de fabricación que es un envase etiquetado para proporcionar un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ para uso según la invención. Un artículo de fabricación comprende al material de envasado y a agente farmacéutico contenido dentro del material de envasado.

El agente farmacéutico en un artículo de fabricación es cualquiera de los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ para uso según la presente invención, formulado en una forma farmacéuticamente aceptable como se describe en el presente documento según las indicaciones dadas a conocer. El artículo de fabricación contiene a cantidad de agente farmacéutico suficiente

para uso en el tratamiento de una afección indicada en el presente documento, en monodosis o en dosis múltiples.

El material de envasado comprende una etiqueta que indica el uso del agente farmacéutico contenido en el mismo, por ejemplo, para tratar afecciones asistidas por la inhibición de la angiogénesis, y afecciones similares que se dan a conocer en el presente documento. La etiqueta puede incluir además las instrucciones para el uso y la información relacionada que puede ser necesaria para la comercialización. El material de empaquetado puede incluir envase(s) para el almacenamiento del agente farmacéutico.

Según se utiliza en el presente documento, el término material de envasado se refiere a un material tal como vidrio, plástico, papel, lámina de metal, y similar capaz de mantener dentro de medios fijados un agente farmacéutico. Por consiguiente, por ejemplo, el material de envasado pueden ser viales de plástico o de vidrio, sobres laminados y envases similares utilizados para contener una composición farmacéutica que incluye el agente farmacéutico.

El material de envasado puede incluir una etiqueta que represente una expresión tangible que describa el contenido del artículo de fabricación y el uso del agente farmacéutico contenido en el mismo.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos referidos a esta invención son ilustrativos y no deben considerarse, por supuesto, como limitantes específicamente de la invención.

1. Preparación de péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

a. Procedimiento de síntesis

Los polipéptidos lineales y cíclicos que se presentan en la Tabla I se sintetizaron usando técnicas de síntesis convencionales en fase sólida como, por ejemplo, las descritas por Merrifield, Adv. Enzymol., 32: 221-296 (1969), y Fields, G. B. y Noble, R. L. Int. J. Peptide Protein Res., 35: 161-214 (1990).

Dos gramos (g) de BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe (ID. SEC. N° 1) se disolvieron primero en 60 mililitros (ml) de metanol al que se le añadieron 1,5 ml de disolución de hidróxido de sodio 2 N formando una mezcla. A continuación, la mezcla se agitó durante 3 horas a 20 grados centígrados (20 °C). Tras la evaporación, el residuo se resuspendió en agua y se acidificó hasta pH 3 con HCl diluido y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se secó sobre Na₂SO₄, se evaporó nuevamente y el BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH resultante (ID. SEC. N° 2) se agitó a 20 °C durante 2 horas con 20 ml de HCl 2 N en dioxano. La mezcla resultante se evaporó obteniendo H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH (ID. SEC. N° 3) que se disolvió posteriormente en una mezcla de 1800 ml de diclorometano y 200 ml de dimetilformamida (DMF) seguido por enfriamiento hasta 0 °C.

A continuación, se añadieron de manera sucesiva con agitación 0,5 g de dicitohexilcarbodiimida (DCCI), 0,3 g de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 0,23 ml de N-metilmorfolina.

La mezcla resultante se agitó durante otras 24 horas a 0 °C y a continuación a 20 °C durante otras 48 horas. La disolución se concentró y se trató con un intercambiador de iones de lecho mixto para retirar las sales. Tras retirar la resina resultante mediante filtración, la disolución transparente se evaporó y el residuo se purificó por medio de cromatografía dando como resultado la recuperación de ciclo(-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (ID. SEC. N° 4). Los siguientes péptidos que se presentan en la Tabla I usando las abreviaturas de residuos de aminoácidos con el código de una letra única e identificados por una designación numérica de péptido, se obtuvieron de manera análoga: ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (ID. SEC. N° 5); ciclo(Arg-Ala-Asp-D-Phe-Val) (ID. SEC. N° 6); ciclo(Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val) (ID. SEC. N° 9); ciclo(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (ID. SEC. N° 7); y ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-NMeVal) (la metilación está en el nitrógeno alfa-amino del enlace amida del residuo valina) (ID. SEC. N° 15).

Un péptido designado como 66203, que tiene una secuencia idéntica a la del péptido 62184, sólo difería del último por contener la sal HCl en lugar de la sal TFA presente en 62184. Lo mismo es cierto para los péptidos 69601 y 62185 y para 85189 y 121974.

b. Procedimiento de síntesis alternativa

i. Síntesis de ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal). Sal de TFA

- Fmoc-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-DPhe-NMeVal-ONa se sintetiza usando procedimientos en fase sólida de tipo Merrifield añadiendo de manera secuencial NMeVal, DPhe, Asp(OBut), Gly y Fmoc-Arg(Mtr) en etapas a una resina de 4-hidroximetil-fenoximetil-poliestireno (resina tipo Wang) (los procedimientos de síntesis de péptidos de tipo Merrifield habituales se aplican como se describen en Houben-Weyl, 1.c., Volumen 15/II, Páginas 1 a 806 (1974). La resina de poliestireno y los precursores de residuos de aminoácidos están comercialmente disponibles de las compañías químicas Aldrich, Sigma o Fluka). Tras completar la adición secuencial de los residuos de aminoácidos, se elimina a continuación la resina de la cadena peptídica usando una mezcla 1:1 de TFA/diclorometano que proporciona el producto Fmoc-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-DPhe-NMeVal-OH. El grupo Fmoc se elimina a continuación con una mezcla 1:1 de piperidina/DMF que proporciona el precursor bruto Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-DPhe-NMeVal-OH que se purifica a continuación por HPLC de la manera habitual.
- Para la ciclización, una disolución de 0,6 g de Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBut)-DPhe-NMeVal-OH (sintetizado anteriormente) en 15 ml de DMF (dimetilformamida; Aldrich) se diluye con 85 ml de diclorometano (Aldrich) y se añaden 50 mg de NaHCO₃. Tras enfriar en una mezcla de hielo seco/acetona, se añaden 40 µl de difenilfosforil azida (Aldrich). Tras dejar en reposo a temperatura ambiente durante 16 horas, se concentró la disolución. El concentrado se filtra en gel (columna G10 Sefadex en isopropanol/agua 8:2) y a continuación se purifica por HPLC de la manera habitual. El tratamiento con TFA (ácido trifluoroacético)/H₂O (98:2) dio ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NmeVal) x TFA que se purificó a continuación se purificó por HPLC de la manera habitual;
- TR = 19,5; EM-BAR (M+H): 589

ii. Síntesis de “sal interna”

- La sal de TFA se elimina del péptido cíclico producido anteriormente suspendiendo el ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) x TFA en agua seguido por la evaporación bajo vacío para eliminar el TFA. El péptido cíclico formado se denomina “sal interna” y se designa ciclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal). El término “sal interna” se utiliza porque el péptido cíclico contiene dos residuos cargados de manera opuesta que se equilibran el uno al otro intraelectrónicamente para formar una molécula general sin carga. Uno de los residuos cargados contiene un resto ácido y el otro residuo cargado contiene un resto

amino. Cuando el resto ácido y el resto amino están en estrecha proximidad el uno con el otro, el resto ácido puede ser desprotonado por el resto amino que forma una especie carboxilato/sal de amonio con una carga general neutra.

5 iii. Tratamiento con HCl para dar ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) x HCl

Se disuelven 80 mg de ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) en HCl 0,01 M de cinco a seis veces y se liofiliza después de cada operación de disolución. La purificación posterior por HPLC da ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) x HCl; EM-BAR (M+H): 589.

10

iv. Tratamiento con ácido metanosulfónico para dar ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) x MeSO₃H

Se disuelven 80 mg de ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) en MeSO₃H 0,01 M (ácido metanosulfónico) de cinco a seis veces y se liofiliza después de cada operación de disolución. La posterior purificación por HPLC da ciclo-(Arg-Gly-Asp-DPhe-NMeVal) x MeSO₃H; TR = 17,8; EM-BAR (M+H): 589.

15

Los procedimientos alternativos de ciclización incluyen la derivatización de las cadenas de grupos laterales de un precursor acíclico del péptido con restos sulfhidrilo, y cuando se exponen a condiciones de pH ligeramente más alto que el fisiológico normal (pH 7,5), se forman enlaces disulfuro intramoleculares con otros grupos sulfhidrilo presentes en la molécula formando péptido cíclico. Además, el resto carboxilato del extremo C terminal de un precursor acíclico del péptido puede hacerse reaccionar con un resto sulfhidrilo libre presente dentro de la molécula para producir los péptidos ciclizados con enlaces tioéster.

20

25

En los ensayos de inhibición de la angiogénesis como se describe en el Ejemplo 7, en los que se usaron péptidos sintéticos, el péptido 66203 en HCl fue ligeramente más eficaz para inhibir la angiogénesis que el péptido idéntico en TFA.

30

Tabla 1

Péptido	Secuencia aminoácidos	de	ID. SEC. N°
Designación			
62181	ciclo(GrGDFV)		4

		(continúa)		
Péptido		Secuencia aminoácidos	de	ID. SEC. Nº
Designación				
62184	(66203*)	ciclo(RGDfV)		5
62185	(69601*)	ciclo(RADfV)		6
62187		ciclo(RGDFv)		7
62880		YTAECKPQVTRGDVF		8
62186		ciclo(RaDFV)		9
62175		ciclo(ARGDfL)		10
62179		ciclo (GRGDfL)		11
62411		TRQVVCDLGNPM		12
62503		GVVRNNEALARLS		13
62502		TDVNGDGRHDL		14
121974	(85189*)	ciclo (RGD-NH ₂ Me-V)		15
112784		ciclo (RGEf-NH ₂ Me-V)		16
hump-2	(410-631)**			17
huMMP-2	(439-631)**			18
huMMP-2	(439-512)**			19
huMMP-2	(439-546)**			20
huMMP-2	(510-631)**			21
huMMP-2	(543-631)**			22
chMMP-2	(410-637)***			23
chMMP-2	(445-637)***			24
chMMP-2	(445-518)***			25
chMMP-2	(445-552)***			26
chMMP-2	(516-637)***			27
chMMP-2	(549-637)***			28

* Los péptidos designados con un asterisco están preparados en HCl y son idénticos en secuencia al péptido designado en la misma línea; los péptidos sin asterisco están preparados en TFA. Las letras en minúscula indican un aminoácido D; las letras en mayúscula indican un aminoácido L.

** Las secuencias de residuos de aminoácidos de MMP-2 humana para péptidos sintéticos están indicadas por las posiciones de residuos correspondientes mostradas en las Figuras 22A y 22B. (MMP-2 se refiere a un miembro de la familia de enzimas metaloproteinasas de matriz).

Las secuencias de MMP-2 humana se presentan con los residuos naturales de cisteína pero no se presentan con los residuos de cisteína diseñados por ingeniería genética como se describe para los péptidos de fusión. Los residuos de aminoácidos naturales se sustituyeron por residuos de cisteína no naturales en las posiciones de los residuos indicados para facilitar la solubilidad de las proteínas sintéticas así como de las proteínas de fusión expresadas y para asegurar el plegamiento adecuado para la presentación del sitio de unión.

*** Las secuencias de residuos de aminoácidos de MMP-2 de pollo para los péptidos sintéticos se indican por las posiciones de los residuos correspondientes que se muestran en las Figuras 22A y 22B. Las secuencias de MMP-2 de pollo se presentan con los residuos de cisteína naturales pero no con los residuos de cisteína diseñados por ingeniería genética como se describe para los péptidos de fusión como se describió anteriormente.

2. Anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

El anticuerpo monoclonal LM609 secretado por el hibridoma ATCC HB 9537 se produjo
 5 usando procedimientos convencionales de hibridomas por inmunización con $\alpha_v\beta_3$ aislado adsorbido sobre perlas de Sefarosa-lectina de lenteja. El $\alpha_v\beta_3$ se había aislado de células del melanoma humano designado M21, y el anticuerpo se produjo como está descrito por Cheresch y col., J. Biol. Chem., 262: 17703-17711 (1987). Las células M21 fueron proporcionadas por el Dr. D. L. Morton (Universidad de California en Los Ángeles, CA) y
 10 se cultivaron en cultivos en suspensión en medio de cultivo RPMI 1640 que contenía L-glutamina 2 mM, sulfato de gentamicina 50 mg/ml y suero de ternera fetal al 10%.

Se ha mostrado que el anticuerpo monoclonal LM609 reacciona inmunológicamente de manera específica con el complejo $\alpha_v\beta_3$, y no reacciona inmunológicamente con la
 15 subunidad α_v , con la subunidad β_3 ni con otras integrinas.

3. Caracterización de la distribución tisular de la expresión de $\alpha_v\beta_3$

A. Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-receptores de integrina

20

Durante la cicatrización de heridas, las membranas basales de los vasos sanguíneos expresan varias proteínas adhesivas, que incluyen el factor von Willebrand, fibronectina y fibrina. Además, varios miembros de la familia de integrinas de receptores de adhesión se expresan sobre la superficie de células de músculo liso y endoteliales cultivadas. Véase,

Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 6471 (1987); Janat y col., J. Cell Physiol., 151: 588 (1992); y Cheng y col., J. Cell. Physiol., 139: 275 (1989). Entre estas integrinas está $\alpha_v\beta_3$, el receptor de células endoteliales para el factor von Willebrand, fibrinógeno (fibrina) y fibronectina como está descrito por Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471 (1987). Esta integrina inicia una vía de señales dependiente de calcio que da lugar a la migración de células endoteliales, y por consiguiente parece desempeñar una función fundamental en la biología de las células vasculares como está descrito por Leavelsey y col., J. Cell Biol., 121:163 (1993).

- 10 Para investigar la expresión de $\alpha_v\beta_3$ durante la angiogénesis, se obtuvo tejido humano de granulación de heridas o piel normal adyacente de pacientes bajo consentimiento, se lavó con 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato y se incluyó en medio O.T.C. (Tissue Tek). Los tejidos incluidos se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido durante aproximadamente 30 a 45 segundos. Se cortaron secciones de seis micrómetros de espesor de los bloques congelados en un micrótopo criostatizado para la posterior tinción de inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos para cualquiera de las integrinas β_3 ($\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_{IIb}\beta_3$) o la subfamilia de integrinas β_1 .

Los resultados de la tinción de piel humana normal y de tejido de granulación de heridas se muestran en las Figuras 1A–1D. Para el análisis inmunohistoquímico de las secciones congeladas se usaron anticuerpos monoclonales AP3 y LM534, dirigidos a las integrinas β_3 y β_1 , respectivamente. Los experimentos con tejido de cuatro donadores humanos diferentes dieron idénticos resultados. Las microfotografías se muestran con un aumento de 300x.

25 La integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresó de manera abundante en los vasos sanguíneos en el tejido de granulación (Figura 1B) pero no fue detectable en la dermis ni en el epitelio de la piel normal del mismo donador (Figura 1A). Por el contrario, las integrinas β_1 se expresaron de manera abundante en los vasos sanguíneos y en las células estromales tanto en la piel normal (Figura 1C) como en el tejido de granulación (Figura 1D) y, como se mostró anteriormente según está descrito por Adams y col., Cell, 63: 425 (1991), en las células basales dentro del epitelio.

B. Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-ligando

También se examinó la presencia de los ligandos para las integrinas α_3 y β_1 , factor von Willebrand y laminina, respectivamente, en otras secciones de humana normal y tejido de granulación preparadas anteriormente. El factor von Willebrand se localizó en los vasos sanguíneos en la piel normal (Figura 2A) y en el tejido de granulación (Figura 2B), mientras que la laminina se localizó en todos los vasos sanguíneos así como también en la membrana basal epitelial en ambas preparaciones de tejidos (Figuras 2C y 2D).

C. Distribución de anticuerpos anti- $\alpha_v\beta_3$ en tejido canceroso

Además de los análisis anteriores, también se examinaron biopsias de tejido canceroso de pacientes humanos para evaluar la presencia y la distribución de $\alpha_v\beta_3$. Los tejidos se prepararon como se describe en el Ejemplo 1, con excepción de que se tiñeron con el anticuerpo monoclonal LM609 preparado en el Ejemplo 2, que es específico para el complejo del receptor integrina, $\alpha_v\beta_3$. Además, los tumores también se prepararon para el análisis histológico microscópico por medio de fijación de ejemplos representativos de los tumores en fijador Bulins durante 8 horas y cortes de secciones en serie y tinción con hematoxilina y eosina.

Los resultados de la tinción de inmunoperoxidasa de tejidos de cáncer de vejiga, de mama y de pulmón se muestran en las Figuras 3A-3D, respectivamente. $\alpha_v\beta_3$ se expresa de manera abundante sólo en los vasos sanguíneos presentes en las cuatro biopsias de cáncer analizadas y no se expresa en ninguna de las otras células presentes en el tejido. Los resultados que se describen en el presente documento muestran por consiguiente que el receptor integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresa selectivamente en tipos de tejidos específicos, a saber, tejidos granulados, metastásicos y otros tejidos en los que tiene lugar la angiogénesis y en tejidos anormales en los que se ha detenido la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos tejidos proporcionan por consiguiente una diana ideal para los aspectos terapéuticos de la presente invención.

4. Identificación de péptidos sintéticos específicos para $\alpha_v\beta_3$ detectados por inhibición de unión celular y por un ensayo de unión de ligando a receptor (no es parte de la invención)

A. Inhibición de unión celular

Como un medio para determinar la especificidad de los antagonistas de la presente

invención por el receptor integrina, se llevaron a cabo los ensayos de inhibición de unión celular como se describe a continuación.

Brevemente, células de la línea CS-1 de melanoma de hámster que carecen de expresión de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_3$ se transfectaron primero con un plásmido para expresar la subunidad β_3 como fue descrito previamente por Filardo y col., J. Cell Biol., 130: 441-450 (1995). La especificidad de los posibles antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ se determinó por la capacidad para bloquear la unión de las células CS-1 que expresan $\alpha_v\beta_3$ a placas recubiertas con VN o laminina. Como un ejemplo de un ensayo típico, los pocillos se recubrieron en primer lugar con el sustrato a una concentración de 10 ug/ml durante la noche. Tras aclarar y bloquear con BSA al 1% desnaturalizado por calor en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos, se mezcló el péptido 85189 (ID. SEC. N° 15) en un intervalo de concentraciones de 0,0001 uM a 100 uM, por separado con células CS-1 para aplicar a los pocillos con un número de células de 50.000 células/pocillo. Después de una incubación de 10-15 minutos a 37 °C, se desechó la disolución que contenía las células y los péptidos. A continuación, se determinó el número de células unidas tras la tinción con cristal violeta al 1%. El cristal violeta asociado a las células se eluyó por la adición de 100 microlitros (ul) de ácido acético al 10%. La adhesión celular se cuantificó por la medición de la densidad óptica del cristal violeta eluido a una longitud de onda de 600 nm.

Figura 21 muestra el resultado de un ensayo típico con un antagonista de $\alpha_v\beta_3$, en el presente documento, el péptido 85189. No se detectó ninguna inhibición con el péptido en superficies recubiertas con laminina. Por el contrario, se obtuvo la inhibición completa de la unión en las superficies recubiertas con VN con una concentración de péptido de 10 uM o superior, como se muestra con la curva de respuesta a las dosis.

Se realizaron ensayos similares con proteínas de fusión que contenían diversas regiones de la proteína MMP-2. Los polipéptidos procedentes de MMP-2 incluyen regiones del extremo C terminal de MMP-2 activas en la interacción de unión con $\alpha_v\beta_3$ y, por consiguiente, capaces de inhibir la activación de MMP-2 y actividades asociadas. Estos polipéptidos se preparan como polipéptidos sintéticos que tienen una secuencia procedente del dominio C terminal de MMP-2 como se describe en el Ejemplo 1, o como proteínas de fusión que incluyen todo o una porción del dominio C terminal de MMP-2, preparadas como se describe a continuación. Las moléculas de MMP-2 C terminal se presentan para secuencias específicas tanto de pollo como humanas.

El dominio C terminal de MMP-2 procedente de pollo, también conocido como el dominio de hemopexina inmediatamente contiguo a la región de bisagra, comprende los residuos de aminoácidos 445-637 de MMP-2. La secuencia de nucleótidos completa y la secuencia de aminoácidos codificados de MMP-2 de pollo se describen a continuación.

5 La secuencia de nucleótidos y la secuencia codificada de aminoácidos de MMP-2 humana también se describen a continuación. El dominio C terminal en MMP-2 humana que corresponde a la región de 445-637 de pollo comienza en el residuo de aminoácido 439 y termina con el 631 debido a seis residuos que faltan de la secuencia humana como se muestra en las Figuras 22A y 22B. Ambos péptidos sintéticos C terminales de MMP-2,
10 de origen humano y de pollo para su uso en la práctica los procedimientos de la presente invención se presentan en la Tabla 1. Las secuencias de residuos de aminoácidos de los péptidos sintéticos son las mismas que las generadas por las equivalentes de proteína de fusión recombinante pero sin el componente de fusión de GST. Las proteínas de fusión C terminales de MMP-2 procedentes tanto de pollo como de seres humano se preparan
15 como se describe a continuación.

Una proteína de fusión de MMP-2 es un polipéptido quimérico que tiene una secuencia del dominio C terminal de MMP-2 o una porción del mismo fusionada (unida de manera operativa por medio de enlace peptídico) a una proteína (de fusión) transportadora, tal
20 como la glutatión sulfhidrilo transferasa (GST).

Para amplificar diversas regiones de MMP-2 de pollo y humana, se diseñaron secuencias de cebadores en base a las secuencias de ADNc respectivas conocidas de MMP-2 de pollo y humana. La hebra superior completa de la secuencia de nucleótidos del ADNc de
25 MMP-2 de pollo sin transformar, también conocida como progelatinasa, se muestra en las Figuras 22A y 22B junto con la secuencia de aminoácidos deducida que se muestra en la segunda línea (Aimes y col., Biochem. J., 300: 729-736, 1994). La tercera y cuarta líneas de la figura muestran respectivamente la secuencia de aminoácidos de MMP-2 humana (Collier y col., J. Biol. Chem., 263: 6579-6587 (1988)) y de ratón (Reponen y col., J. Biol.
30 Chem., 267: 7856-7862 (1992)). Los residuos idénticos se indican por medio de puntos, mientras que los residuos diferentes se presentan por su nomenclatura de una letra según la IUPAC. Los residuos faltantes se indican mediante un guión. La numeración de los residuos de aminoácidos comienza desde el primer residuo de la proenzima, presentándose los residuos del péptido señal con números negativos. La secuencia de
35 nucleótidos se numera en consecuencia. La iniciación supuesta de la traducción (ATG)

está marcada con tres puntas de flecha hacia adelante y la señal de terminación de la traducción (TGA) se indica por medio de un asterisco. Las secuencias amino terminales para la proenzima y para la enzima activa de pollo figuran con diamantes y puntas de flecha simples. Las secuencias de nucleótidos y de residuos de aminoácidos de progelatinasa de pollo aparecen juntas como ID. SEC. N° 29 mientras que la secuencia de residuos de aminoácidos codificados se presenta por separado como ID. SEC. N 30.

Los moldes para la generación de regiones amplificadas de MMP-2 de pollo fueron: un ADNc que codificaba el polipéptido MMP-2 integral maduro de pollo, proporcionado por el Dr. J. P. Quigley, de la Universidad Estatal de Nueva York en Stony Brook, Nueva York o un ADNc generado a partir de un molde de ARN celular total obtenido por técnicas convencionales de una muestra escindida de tejido de la membrana corioalantoica de pollo. Para este último, el ADNc se obtuvo con transcriptasa inversa de MuLV y un cebador específico secuencia abajo para los nucleótidos del extremo 3'-terminal, 5'ATTGAATTCTTCTACAGTTCA3' (ID. SEC. N° 31), cuyos extremos 5' y 3' eran respectivamente complementarios a los nucleótidos 1932-1912 de la secuencia de MMP-2 de pollo publicada. La reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR) se realizó según las especificaciones del fabricante para el Kit de PCR de ARN GeneAmp (Perkin Elmer). El cebador también se diseñó para contener un sitio de restricción de EcoRI interno.

A partir de cualquiera de los moldes de ADNc descritos anteriormente, se obtuvo una serie de regiones C terminales de MMP-2 de pollo, teniendo cada una el residuo cisteína natural en la posición 637 en el extremo carboxi terminal, por PCR con el cebador 3' presentado anteriormente (ID. SEC. N° 31) apareado con uno de una serie de cebadores 5' que se presentan a continuación. Las regiones amplificadas codificaron las siguientes proteínas de fusión de MMP-2, que tienen secuencias correspondientes a las posiciones de residuos de aminoácidos como se muestra en las Figuras 22A y 22B y también se presentan en ID. SEC. N° 30: 1) 203-637 2) 274-637; 3) 292-637; 4) 410-637; 5) 445-637. Los cebadores 5' o secuencia arriba para amplificar cada una de las regiones de nucleótidos para codificar las proteínas de fusión de MMP-2 presentadas anteriormente se diseñaron para codificar los sitios de inicio del polipéptido en posición 3' a un sitio de restricción de BamHI interno diseñado, es decir, introducido por PCR, para permitir la unión direccional en los vectores de expresión pGEX-1λT o pGEX-3X. Los cebadores 5' incluyeron las siguientes secuencias, los extremos 5' y 3' que corresponden a las

posiciones de nucleótidos 5' y 3' indicadas de la secuencia de MMP-2 de pollo, como se muestra en la Figura 22A y 22B (la posición de los residuos de aminoácidos de los sitios de inicio también se indican para cada cebador): 1) Nucleótidos 599-619, que codifican un sitio de inicio 203 5'ATGGGATCCACTGCAAATTTTC3' (ID. SEC. Nº 32); 2) Nucleótidos 5 809-830, que codifican un sitio de inicio 274 5'GCCGGATCCATGACCAGTGTA3' (ID. SEC. Nº 33); 3) Nucleótidos 863-883, que codifican un sitio de inicio 292 5'GTGGGATCCCTGAAGACTATG3' (ID. SEC. Nº 34); 4) Nucleótidos 1217-1237, que codifican un sitio 410 5'AGGGGATCCTTAAGGGGATTC3' (ID. SEC. Nº 35); y 5) Nucleótidos 1325-1345, que codifican un sitio de inicio 445 10 5'CTCGGATCCTCTGCAAGCACG3' (ID. SEC. Nº 36).

Las regiones de nucleótidos indicadas del molde de ADNc se amplificaron posteriormente durante 35 ciclos (temperatura de hibridación 55 °C) según las instrucciones del fabricante para el sistema de PCR Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim). Los 15 productos resultantes de la PCR se purificaron en gel, se digirieron con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI y se volvieron a purificar antes de unirlos en el vector pGEX-1λT o pGEX-3X (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) que se habían digerido de manera similar y también desfosforilado antes de la reacción de unión. La elección del plásmido se basó en el marco de lectura necesario del producto de amplificación. Las células 20 competentes de las cepas BSJ72 o BL21 de E. coli se transformaron con las construcciones separadas por choque térmico. Las colonias resultantes se examinaron para verificar la incorporación del plásmido respectivo que codifica la proteína de fusión de MMP-2 mediante PCR antes de la secuenciación didesoxi de los clones positivos para verificar la integridad de la secuencia codificadora introducida. Además, la verificación de 25 la incorporación del plásmido se confirmó por medio de la expresión de la proteína de fusión GST-MMP-2 del tamaño adecuado.

La purificación de cada una de las proteínas de fusión de GST-MMP-2 recombinantes se realizó usando cultivos inducidos por IPTG en fase logarítmica esencialmente como está 30 descrito por el fabricante para el sistema GST Gene Fusion (Pharmacia Biotech). En resumen, se lisaron las bacterias recuperadas por medio de ultrasonido y se incubaron con detergente antes de aclarar e inmovilizar la proteína recombinante en glutatión acoplado a sefarosa 4B (Pharmacia Biotech). Después de un lavado exhaustivo, se eluyeron las proteínas de fusión inmovilizadas por separado de la matriz de afinidad con 35 glutatión reducido 10 mM en Tris-HCl 50 mM, pH 8,0 y se dializaron extensamente frente

a PBS para eliminar el glutatión residual antes de usar.

Los intentos previos para producir proteínas de fusión entre los residuos de MMP-2 de pollo 445 y 637, que sólo tenían un residuo de cisteína codificado, dieron como resultado productos insolubles. Por consiguiente, para generar otras proteínas de fusión de MMP-2 solubles procedentes de la región C terminal que no incluyeran un residuo de cisteína terminal endógeno como estaba presente en la proteína de fusión descrita anteriormente, se introdujeron secuencias de nucleótidos en regiones de MMP-2 amplificadas para codificar un residuo de cisteína, de ser necesario, dependiendo de la proteína de fusión particular. Un residuo de cisteína está naturalmente presente en la secuencia de MMP-2 de pollo en la posición 446 y en la posición de 637. En la secuencia humana, estas posiciones corresponden respectivamente a 440 y 631. Por consiguiente, las proteínas de fusión se diseñaron para contener residuos de cisteína terminal diseñados en los extremos amino o carboxi terminales de las secuencias de MMP-2 de pollo de interés, para proporcionar los enlaces disulfuro con la cisteína que se presenta naturalmente en el otro extremo, como lo exige la construcción.

Los cebadores de oligonucleótidos se diseñaron en consecuencia para permitir la amplificación de las regiones del extremo C terminal de MMP-2 de pollo para la expresión de proteínas de fusión de MMP-2/GST solubles. Las regiones del extremo C terminal de MMP-2 de pollo amplificadas incluyen las que codifican las posiciones de residuos de aminoácidos 445-518, 445-552, 516-637 y 549-637. Para las proteínas de fusión que contienen el residuo 517, se sustituyó una cisteína por el residuo de tirosina codificado naturalmente para permitir la formación del enlace disulfuro con cualquier cisteína en la posición del residuo 446 ó 637. Para las proteínas de fusión que contienen el residuo 551, se sustituyó una cisteína por el residuo de triptófano codificado naturalmente para permitir la formación del enlace disulfuro con cualquier cisteína codificada naturalmente en la posición del residuo 446 ó 637.

Brevemente, la construcción del plásmido pGEX-3X que codifica la proteína de fusión GST/MMP-2(410-637) recombinante preparada anteriormente se utilizó como molde para la amplificación según el protocolo del fabricante para el Kit de PCR Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim) utilizando una serie de cebadores de oligonucleótidos, cuyo diseño se basó en la secuencia de MMP-2 de pollo publicada (también se muestra en las Figuras 22A y 22B). Un cebador secuencia arriba, diseñado para codificar un sitio de

inicio de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 445 después de un sitio de restricción de la endonucleasa BamHI interno diseñado por ingeniería genética para su inserción en el vector de GST pGEX-3 X, tenía la secuencia de nucleótidos (5' CTCGGATCCTCTGCAAGCACG3' (ID. SEC. N° 37)). Los extremos 5' y 3' del cebador correspondían respectivamente a las posiciones 1325-1345 de la secuencia de MMP-2 de pollo en la figura. Otro cebador secuencia arriba, diseñado para codificar un sitio de inicio de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 516 después de un sitio de restricción de BamHI interno diseñado por ingeniería genética para su inserción en el vector de GST pGEX-1λT y para codificar un residuo de cisteína en la posición 517, tenía la secuencia de nucleótidos (5'GCAGGATCCGAGTGCTGGGTTTATAC3' (ID. SEC. N° 38)). Los extremos 5' y 3' del cebador correspondían respectivamente a las posiciones 1537-1562 de la secuencia de MMP-2 de pollo. Un tercer cebador secuencia arriba, diseñado para codificar un sitio de inicio de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 549 después de un sitio de restricción de la endonucleasa EcoRI interno diseñado por ingeniería genética para su inserción en el vector de GST pGEX-1λT y para codificar un residuo de cisteína en la posición 551, tenía la secuencia de nucleótidos (5'GCAGAATTCAACTGTGGCAGAAACAAG3' (ID. SEC. N° 39)). Los extremos 5' y 3' del cebador correspondían respectivamente a las posiciones 1639-1665 de la secuencia de MMP-2 de pollo.

Estos cebadores secuencia arriba se utilizaron por separado con uno de los siguientes cebadores secuencia abajo que se presentan a continuación para producir las regiones anteriormente descritas del dominio C terminal MMP-2 de pollo. Un primer cebador secuencia abajo (complementario), diseñado para codificar un sitio de terminación de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 518, para codificar un residuo de cisteína en la posición 517 y para contener un sitio de restricción de endonucleasa EcoRI interno para su inserción en un vector de GST, tenía la secuencia de nucleótidos (5'GTAGAATTCCAGCACTCATTTCTGCG3' (ID. SEC. N° 40)). Los extremos 5' y 3' del cebador, escritos en dirección 5'-3', eran respectivamente complementarios en parte a las posiciones 1562-1537 de la secuencia de MMP-2 de pollo. Un segundo cebador secuencia abajo, diseñado para codificar un sitio de terminación de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 552, para codificar un residuo de cisteína en la posición 551 y para contener un sitio de restricción de endonucleasa EcoRI interno para su inserción en un vector de GST, tenía la secuencia de nucleótidos (5'TCTGAATTCTGCCACAGTTGAAGG3' (ID. SEC. N° 41)). Los extremos 5' y 3' del

cebador, escritos en dirección 5'-3', eran respectivamente complementarios en parte a las posiciones 1666-1643 de la secuencia de MMP-2 de pollo. Un tercer cebador secuencia abajo, diseñado para codificar un sitio de terminación de la proteína MMP-2 de pollo en la posición 637 y para contener un sitio de restricción de endonucleasa EcoRI interno para su inserción en un vector de GST, tenía la secuencia de nucleótidos (5'ATTGAATTCTTCTACAGTTCA3' (ID. SEC. N° 42)). Los extremos 5' y 3' del cebador, escritos en dirección 5' -3', eran respectivamente complementarios en parte a las posiciones 1932-1912 de la secuencia de MMP-2 de pollo.

10 Las regiones del extremo carboxi terminal de MMP-2 de pollo delimitadas por los anteriores cebadores secuencia arriba y secuencia abajo, utilizados en combinaciones particulares para producir las proteínas de fusión conteniendo al menos un residuo de cisteína diseñado por ingeniería genética como se describió anteriormente, se amplificaron por separado durante 30 ciclos con una temperatura de hibridación de 55 °C de acuerdo con las instrucciones del fabricante para el sistema de PCR Expand High Fidelity (Boehringer Mannheim). Los productos resultantes de la amplificación se purificaron por separado, se digirieron con enzimas de restricción BamHI y/o EcoRI según fuera necesario, y se volvieron a purificar antes de la unión en el vector apropiado de la proteína de fusión con GST, pGEX-3X o pGEX-1λT, como se indicó anteriormente por el marco de lectura del cebador de oligonucleótidos secuencia arriba. Para unir los productos amplificados de MMP-2, los vectores se digirieron de manera similar y se desfosforilaron antes de la reacción de unión. Las células competentes de la cepa BL21 de E. coli se transformaron por separado con las construcciones de vector conteniendo MMP-2 resultantes por choque térmico. Las colonias resultantes se examinaron para verificar la incorporación del plásmido adecuado que codifica la proteína de fusión mediante PCR y la producción de la proteína de fusión-GST de tamaño adecuado antes de la secuenciación dideoxi de los clones positivos para verificar la integridad de la secuencia codificadora introducida. La purificación de las proteínas de fusión con GST se realizó a continuación usando cultivos inducidos por IPTG en fase logarítmica esencialmente como se describió anteriormente para producir otras proteínas de fusión GST-MMP-2.

Los resultados de los ensayos de inhibición de la unión celular con diversas proteínas MMP-2 de pollo, así como con otros péptidos indican que MMP-2 intacta, la proteína de fusión CTMMP-2(2-4) de los residuos 445-637 y el péptido 66203 (ID. SEC. N° 5), pero

no MMP-2 (1-445) y el control de péptido 69601, inhibieron la adhesión de las células CS-1 que expresan β_3 a vitronectina pero no a laminina y, por consiguiente, inhibieron la unión del receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) a vitronectina al interferir con la actividad de unión de $\alpha_v\beta_3$ normal. Otras proteínas de fusión CTMMP-2 probadas, 7-1 de los residuos 274-637, 10-1 de los residuos 292-637 y 4-3 de los residuos 274-400 tuvieron menos efecto en la adhesión celular en comparación con 2-4.

Además de las proteínas de fusión MMP-2 GST de pollo que se han descrito anteriormente, se produjeron dos proteínas de fusión MMP-2 GST humanas para expresar las regiones de aminoácidos 203-631 y 439-631 del polipéptido de proenzima MMP-2 humana madura. Las regiones indicadas corresponden respectivamente a las regiones de MMP-2 de pollo 203-637 y 445-637. Las proteínas de fusión MMP-2 GST humanas se produjeron por PCR, como se describió anteriormente para las proteínas de fusión MMP-2 GST de pollo utilizando un molde de ADNc que codificaba el marco de lectura abierto de MMP-2 humana completo proporcionado por el Dr. W. G. Stetler-Stevenson en el National Cancer Institute, Bethesda, MD. Las secuencias de los cebadores 5' secuencia arriba se diseñaron en base a la secuencia de MMP-2 publicada anteriormente (Collier y col., J. Biol. Chem., 263: 6579-6587 (1988)) y para codificar un sitio de restricción de EcoRI interno para permitir la inserción de los productos amplificados en el vector adecuado.

Un cebador secuencia arriba, diseñado para codificar un sitio de inicio de la proteína MMP-2 humana en la posición 203 después de un sitio de restricción interno de endonucleasa EcoRI diseñado por ingeniería genética para su inserción en el vector de GST pGEX-1 λ T, tenía la secuencia de nucleótidos (5'GATGAATTCTACTGCAAGTT3' (ID. SEC. N° 43)). Los extremos 5' y 3' del cebador correspondían respectivamente a las posiciones 685-704 de la secuencia del marco de lectura abierto de MMP-2 humana. Otro cebador secuencia arriba, diseñado para codificar un sitio de inicio de la proteína MMP-2 humana en la posición 439 después de un sitio de restricción de EcoRI interno diseñado por ingeniería genética para su inserción en el vector de GST pGEX-1 λ T, tenía la secuencia de nucleótidos (5'CACTGAATTCATCTGCAAACA3' (ID. SEC. N° 44)). Los extremos 5' y 3' del cebador correspondían respectivamente a las posiciones 1392 y 1412 de la secuencia del marco de lectura abierto de MMP-2 humana.

Cada uno de los cebadores anteriores se utilizaron por separado con un cebador

secuencia abajo, que tenía extremos 5' y 3' respectivamente complementarios a las bases 1998 y 1978 de la secuencia de MMP-2 humana que termina de manera distal al marco de lectura abierto de MMP-2 y dirige la terminación de la proteína después del residuo de aminoácido 631. Los productos amplificados producidos expresaron las proteínas de fusión que contenían los residuos de aminoácidos de MMP-2 humana 203-631 (ID. SEC. Nº 45) y 439-631 (ID. SEC. Nº 18).

Los productos resultantes de la PCR se purificaron, se digirieron con EcoRI y se volvieron a purificar para la unión en un plásmido pGEX-1AT que se digirió de manera similar y se desfosforiló antes de la reacción de unión. Las células se transformaron como se describió anteriormente.

También se prepararon otras proteínas de fusión de MMP-2 humana conteniendo los residuos de aminoácidos 410-631 (ID. SEC. Nº 17), 439-512 (ID. SEC. Nº 19), 439-546 (ID. SEC. Nº 20), 510-631 (ID. SEC. Nº 21) y 543-631 (ID. SEC. Nº 22) como se describió anteriormente para uso en los procedimientos de la presente invención.

B. Ensayo de unión del ligando al receptor

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 junto con las proteínas de fusión de MMP-2 descritas anteriormente se cribaron además por medio de la medición de su capacidad para antagonizar la actividad de unión al receptor $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ en ensayos de unión de ligandos purificados al receptor. El procedimiento para estos estudios de unión ha sido descrito por Barbas y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90: 10003-10007 (1993), Smith y col., J. Biol. Chem., 265: 11008-11013 (1990) y Pfaff y col., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238 (1994), cuyas descripciones se incorporan en el presente documento por referencia.

En el presente documento se describe un procedimiento para identificar antagonistas en un ensayo de unión de ligando al receptor en el que el receptor se inmoviliza en un soporte sólido y el ligando y antagonista son solubles. También se describe un ensayo de unión de ligando al receptor en el que el ligando se inmoviliza en un soporte sólido y el receptor y antagonistas son solubles.

En resumen, las integrinas purificadas seleccionadas se inmovilizan por separado en

pocillos de microvaloración de Titertek a una concentración de recubrimiento de 50 nanogramos (ng) por pocillo. La purificación de los receptores usados en los ensayos de unión de ligando al receptor se conocen bien en la técnica y se obtienen fácilmente con procedimientos familiares para los expertos en la técnica. Tras la incubación durante 18 horas a 4 °C, se bloquearon los sitios de unión no específicos en la placa con 10 miligramos/mililitro (mg/ml) de albúmina sérica bovina (BSA) en disolución salina tamponada con Tris. Para los estudios de inhibición, se probaron diversas concentraciones de péptidos seleccionados de la Tabla I para evaluar la capacidad de bloquear la unión de vitronectina marcada con ^{125}I o fibrinógeno marcado con ^{125}I a los receptores integrina, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$. Aunque estos ligandos muestran unión óptima para una integrina particular, vitronectina para $\alpha_v\beta_3$ y fibrinógeno para $\alpha_{IIb}\beta_3$, la inhibición de los estudios de unión usando péptidos para bloquear la unión de fibrinógeno a cualquier receptor permitió la determinación exacta de la cantidad en micromoles (μM) del péptido necesaria para lograr la inhibición de la mitad de la máxima unión del receptor al ligando. Los ligandos marcados radiactivamente se usaron en concentraciones de 1 nM y la unión se estimuló por separado con péptidos sintéticos no marcados.

Tras una incubación de tres horas, se eliminó el ligando libre mediante lavado y el ligando unido se detectó por medio de conteo gamma. Los datos de los ensayos en los que se usaron péptidos cíclicos seleccionados, que se presentan en la Tabla 1, para inhibir la unión de los receptores y el fibrinógeno marcado radiactivamente a los receptores $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ inmovilizados por separado, fueron altamente reproducibles con el error entre puntos de datos típicamente inferior al 11%. Los datos de CI_{50} en micromoles ($\text{CI}_{50} \mu\text{M}$) están expresados como el promedio de puntos de datos por duplicado $\pm$ la desviación estándar como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Péptido N°	$\alpha_v\beta_3$ ($\text{CI}_{50} \mu\text{M}$)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ ($\text{CI}_{50} \mu\text{M}$)
62181	$1,96 \pm 0,62$	$14,95 \pm 7,84$
62184	$0,05 \pm 0,001$	$0,525 \pm 0,10$
62185	$0,885 \pm 0,16$	$100 \pm 0,001$
62187	$0,05 \pm 0,001$	$0,26 \pm 0,056$
62186	$57,45 \pm 7,84$	$100 \pm 0,001$

(continúa)

Péptido N°	$\alpha_V\beta_3$ (CI ₅₀ μ M)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (CI ₅₀ μ M)
62175	1,05 $\pm$ 0,07	0,63 $\pm$ 0,18
62179	0,395 $\pm$ 0,21	0,055 $\pm$ 0,007

Por consiguiente, los péptidos cíclicos que contienen RGD o derivatizados con RGD, 62181, 62184, 62185 y 62187, teniendo cada uno un residuo de aminoácido D, exhibieron inhibición preferencial de la unión de fibrinógeno con el receptor $\alpha_V\beta_3$, según se mide por la concentración más baja del péptido necesaria para la inhibición de la mitad del máximo en comparación con la necesaria para el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. En contraste, los otros péptidos cíclicos que contienen RGD o derivatizados con RGD, 62186, 62175 y 62179, fueron menos eficaces en el bloqueo de la unión de fibrinógeno a $\alpha_V\beta_3$ o exhibieron inhibición preferencial de la unión de fibrinógeno a $\alpha_{IIb}\beta_3$, en comparación con $\alpha_V\beta_3$. Estos resultados son coherentes con los recientemente publicados por Pfaff, y col., J. Biol. Chem., 269: 20233-20238 (1994) en los que el péptido cíclico RGDEEV (en el que E indica un residuo de aminoácido D) inhibió específicamente la unión de fibrinógeno a la integrina $\alpha_V\beta_3$ y no a las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_5\beta_1$. Se realizó la inhibición similar de los ensayos de unión con péptidos linealizados que tenían o carecían de un motivo RGD, cuyas secuencias se obtuvieron de las secuencias de residuos de aminoácidos de la subunidad α_V del receptor, de la subunidad α_{IIb} del receptor o del ligando vitronectina. Las secuencias de los péptidos lineales, 62880 (residuos de aminoácidos 35-49 procedentes de VN), 62411 (residuos de aminoácidos 676-687 procedentes de α_V); 62503 (residuos de aminoácidos 655-667 procedentes de α_V) y 62502 (residuos de aminoácidos 296-306 procedentes de α_{IIb}), se presentan en la Tabla 1. Cada uno de estos péptidos se utilizó en ensayos independientes para inhibir la unión de vitronectina (VN) o de fibrinógeno (FG) a $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_V\beta_3$. Los datos de CI₅₀ en micromoles (CI₅₀ μ M) de un ensayo individual para cada experimento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Péptido N°	$\alpha_{IIb}\beta_3$ CI ₅₀ (uM)	$\alpha_v\beta_3$ CI ₅₀ (uM)
	FG	VN
62880	4,2	<0,1
62411	>100	>100
62503	>100	>100
62502	90	>100

Los resultados de los ensayos de inhibición de unión de ligandos a receptores integrina seleccionados con péptidos linealizados muestran que sólo el péptido 62880 fue eficaz para inhibir la mitad de la máxima unión de FG o VN a $\alpha_v\beta_3$ según se mide por la concentración más baja de péptido necesaria para lograr la mitad de la máxima inhibición en comparación con el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ninguno de los otros péptidos linealizados fue eficaz en el bloqueo de la unión del ligando a $\alpha_v\beta_3$ aunque el péptido 62502 fue eficaz en el bloqueo de la unión de VN a $\alpha_{IIb}\beta_3$.

En otros ensayos de unión de ligando a receptor llevados a cabo como se describió anteriormente, con la excepción de que la detección de la unión o de la inhibición de la misma fue con ELISA e IgG anti-conejo de cabra conjugada a peroxidasa, se mostró que los ligandos VN, MMP-2 y fibronectina en un intervalo de 5-50 ng/pocillo y presentados en orden de eficacia, se unen al receptor $\alpha_v\beta_3$ inmovilizado mientras que el colágeno no se une. Además, se evaluó la capacidad de los péptidos para inhibir la unión de MMP-2 o VN a $\alpha_v\beta_3$ inmovilizado con los péptidos 69601 (ID. SEC. N° 6) y 66203 (ID. SEC. N° 5). Sólo el péptido 66203 fue eficaz para inhibir la unión de cualquier sustrato al receptor $\alpha_v\beta_3$, mientras que el péptido 69601 de control no tuvo ningún efecto con ningún ligando.

La especificidad de la unión de MMP-2 a los receptores integrina se confirmó con un ensayo de unión al receptor en fase sólida en el que se mostró que MMP-2 yodada se unía a $\alpha_v\beta_3$ y no a $\alpha_{IIb}\beta_3$, que habían sido inmovilizados en una fase sólida (300 CPM unidas frente a aproximadamente 10 CPM unidas). La capacidad de un péptido o de una proteína de fusión procedentes de MMP-2 para inhibir la unión específica de MMP-2 a $\alpha_v\beta_3$ se demostró en un ensayo comparable, cuyos resultados se muestran en la Figura 23. La proteína de fusión GST-CTMMP-2(445-637) (también denominada CTMMP-2(2-4)) preparada como se describió anteriormente, marcada GST-MAID, inhibió la unión de MMP-2 yodada a $\alpha_v\beta_3$ mientras que GST sola no tuvo ningún efecto con niveles de CPM unidas comparables a los pocillos que no recibieron ningún inhibidor (marcados NT). La proteína de fusión de MMP-2 denominada CTMMP-2 (274-637), también conocida como CTMMP-2(10-1), no inhibió la unión de MMP-2 marcada a $\alpha_v\beta_3$.

La especificidad de la interacción del receptor con antagonistas procedentes de MMP-2 se confirmó con ensayos de unión y de inhibición de la unión en fase sólida. CTMMP-2(2-4), marcada en la Figura 24 como [125I] GST2-4, se unió a $\alpha_v\beta_3$ y no a $\alpha_{IIb}\beta_3$ mientras que CTMMP-2(10-1), marcada en la Figura 24 como [125I] GST10-1, no se unió a ningún

receptor en el ensayo en fase sólida in vitro. Además, el enlace de GST2-4 marcada tuvo competencia por la GST2-4 sin marcar.

Por consiguiente, el ensayo de unión del ligando al receptor descrito en el presente documento puede usarse para detectar péptidos circulares y linealizados sintéticos que exhiben especificidad selectiva para un receptor integrina particular, específicamente $\alpha_v\beta_3$, según se utilizan como antagonistas del receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) en la puesta en práctica de la presente invención.

10 5. Caracterización de la membrana corioalantoica de pollo (CAM) no tratada

A. Preparación de la CAM

La angiogénesis puede inducirse sobre la membrana corioalantoica de pollo (CAM) después de que la angiogénesis embrionaria normal haya dado como resultado la formación de vasos sanguíneos maduros. Se ha mostrado que la angiogénesis se induce en respuesta a citocinas específicas o fragmentos de tumores como está descrito por Leibovich y col., Nature., 329: 630 (1987) y Ausprunk y col., Am. J. Pathol., 79: 597 (1975). Las CAM se prepararon a partir de embriones de pollo para la posterior inducción de angiogénesis e inhibición de la misma como se describe en los Ejemplos 6 y 7, respectivamente. Los embriones de pollo de diez días se obtuvieron de McIntyre Poultry (Lakeside, CA) y se incubaron a 37°C con humedad del 60%. Se realizó un agujero pequeño a través de la cáscara en el extremo del huevo directamente sobre el saco de aire usando una pequeña broca manual (Dremel, División de Emerson Electric Co., Racine, WI). Se perforó un segundo agujero en el lado ancho del huevo en una región desprovista de vasos sanguíneos embrionarios determinada previamente mirando al trasluz el huevo. Se aplicó presión negativa al agujero original, que dio como resultado la CAM (membrana corioalantoica) tirando hacia afuera la membrana de la cáscara y creando un saco de aire falso sobre la CAM. Se recortó una ventana de 1,0 centímetro (cm) x 1,0 centímetro cuadrado a través de la cáscara sobre la CAM descendida usando una pequeña rueda dentada de modelo pequeño (Dremel). La ventana pequeña permitió el acceso directo a la CAM subyacente.

La preparación de la CAM resultante se usó a continuación a los 6 días de embriogénesis, un estadio marcado por la neovascularización activa, sin otro tratamiento

a la CAM reflejando el modelo usado para evaluar los efectos en la neovascularización, o se usó a los 10 días de embriogénesis, cuando la angiogénesis había disminuido. La última preparación se usó, por consiguiente, en la presente invención para inducir angiogénesis renovada en respuesta al tratamiento con citocinas o al contacto con tumores como se describe en el Ejemplo 6.

B. Histología de la CAM

Para analizar la estructura microscópica de las CAM de embriones de pollo y/o tumores humanos, que se habían extirpado de los embriones de pollo como se describe en el Ejemplo 8, las CAM y los tumores se prepararon para realizar las criosecciones como se describe en el Ejemplo 3A. Se cortaron secciones de seis micrómetros (um) de espesor a partir de bloques congelados en un microtomo con criostato para el análisis de inmunofluorescencia.

La Figura 4 muestra una microfotografía típica de un área desprovista de vasos sanguíneos de una CAM de 10 días sin tratar. Como la angiogénesis en el sistema de CAM disminuye en este estadio de la embriogénesis, el sistema es útil en la presente invención para estimular la producción de nueva vascularización a partir de vasos existentes desde las áreas adyacentes hacia las áreas de la CAM que carecen de vasos en ese momento.

C. Perfiles de integrina en la CAM detectados por inmunofluorescencia

Para observar la distribución tisular de los receptores integrina en los tejidos de CAM, se fijaron secciones congeladas de 6 µm tanto de tejido tumoral como de tejidos de CAM de embrión de pollo en acetona durante 30 segundos y se tiñeron por inmunofluorescencia con el Acm CSAT 10 microgramos/mililitros, un anticuerpo monoclonal específico para la subunidad β_1 de integrina como está descrito por Buck y col., J. Cell Biol., 107: 2351 (1988) y se utilizaron de ese modo para controles, o Acm LM609 como se prepara en el Ejemplo 2. A la tinción primaria le siguió una tinción con anticuerpo secundario anti ratón de cabra marcado con rodamina 1:250 (Tago) para permitir la detección del producto de inmunorreacción primaria. A continuación las secciones se analizaron con un microscopio compuesto de inmunofluorescencia Zeiss.

Los resultados del análisis por inmunofluorescencia mostraron que los vasos sanguíneos maduros presentes en un embrión de pollo de 10 días sin tratar expresaban la subunidad β_1 de integrina (Figura 5A). Por el contrario en una sección en serie del tejido que se muestra en la Figura 5A, no se reveló inmunorreactividad con LM609 (Figura 5B). Por consiguiente, la integrina $\alpha_v\beta_3$ detectada por el anticuerpo LM609 no se estaba expresando activamente por los vasos sanguíneos maduros presentes en un embrión de pollo de 10 días de edad sin tratar. Como se muestra en el modelo de CAM y en los siguientes Ejemplos, mientras que los vasos sanguíneos están sufriendo nuevo crecimiento en la embriogénesis normal o inducida por citocinas o tumores, los vasos sanguíneos están expresando $\alpha_v\beta_3$. Sin embargo, tras la neovascularización activa, una vez que los vasos han interrumpido el desarrollo, la expresión de $\alpha_v\beta_3$ disminuye hasta niveles no detectables por medio del análisis de inmunofluorescencia. Esta regulación de la expresión de $\alpha_v\beta_3$ en los vasos sanguíneos que sufren angiogénesis en contraste con la ausencia de expresión en los vasos maduros proporciona la capacidad exclusiva de la presente invención para controlar e inhibir la angiogénesis como se muestra en los siguientes Ejemplos usando el sistema de ensayo de angiogénesis en CAM.

En otros perfiles, la metaloproteinasa MMP-2 y $\alpha_v\beta_3$ se localizaron juntos en las células endoteliales que sufrían angiogénesis tres días después de la inducción con bFGF en el modelo de CAM de 10 días de edad. MMP-2 sólo se expresó mínimamente en los vasos que carecían del receptor $\alpha_v\beta_3$. Además, MMP-2 se localizó junto con $\alpha_v\beta_3$ en los vasos sanguíneos angiogénicos asociados a tumores M21-L in vivo (tumores resultantes de la inyección de células de melanoma M21-L humano en la dermis de injertos de piel humana crecidos en ratones SCID como se describe en el Ejemplo 11) pero no con los vasos sanguíneos preexistentes no asociados a tumores. También se obtuvieron resultados similares de la asociación selectiva de MMP-2 y $\alpha_v\beta_3$ con tumores de melanoma CS-1 portadores de $\alpha_v\beta_3$ en el modelo CAM pero no con células CS-1 carentes de $\alpha_v\beta_3$.

6. Prueba de angiogénesis de CAM

A. Angiogénesis inducida por factores de crecimiento

Se ha mostrado que la angiogénesis se induce por citocinas o factores de crecimiento como se describe en el Ejemplo 5A. En los experimentos descritos en el presente

documento, la angiogénesis en la preparación de CAM descrita en el Ejemplo 5 se indujo de manera similar por los factores de crecimiento que se aplicaron por vía tópica sobre los vasos sanguíneos de la CAM como se describe en el presente documento.

- 5 La angiogénesis se indujo colocando un disco de filtro Whatman de 5 milímetros (mm) x 5 mm (papel de filtro Whatman N° 1) saturado con solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY) o HBSS que contenía factor de crecimiento de fibroblastos básico recombinante (bFGF) (Genzyme Cambridge, MA) 150 nanogramos/mililitros (ng/ml) sobre la CAM de un embrión de pollo de 10 días en una
10 región desprovista de vasos sanguíneos y las ventanas se sellaron posteriormente con cinta. En otros ensayos, bFGF 125 ng/ml resultó también eficaz para inducir el crecimiento de vasos sanguíneos. Para los ensayos en los que se evaluó la inhibición de la angiogénesis con inyecciones intravenosas de antagonistas, la angiogénesis se indujo primero con bFGF 1-2 ug/ml en medio de crecimiento de fibroblastos. La angiogénesis se
15 controló por medio de fotomicroscopía después de 72 horas. Las CAM se congelaron rápidamente después se fijaron secciones congeladas de 6µm con acetona y se tñeron mediante inmunofluorescencia como se describe en el Ejemplo 5C con 10 ug/ml de anticuerpo monoclonal anti-β₁ CSAT o LM609.
- 20 La microfotografía de inmunofluorescencia de la Figura 5C muestra expresión aumentada de α_vβ₃ durante la angiogénesis inducida por bFGF en la CAM de pollo en contraste con la ausencia de expresión de α_vβ₃ en una CAM de pollo sin tratar como se muestra en la Figura 5B. α_vβ₃ se detectó fácilmente en muchos (75% al 80%) de los vasos en las CAM tratadas con bFGF. Además, la expresión de β₁ de integrina no cambió de la observada
25 en una CAM sin tratar ya que β₁ también fue fácilmente detectable en los vasos sanguíneos estimulados.

La expresión relativa de integrinas α_vβ₃ y β₁ se cuantificó a continuación durante la angiogénesis inducida por bFGF por medio de análisis de imagen confocal con láser de
30 las secciones criostatizadas de la CAM. A continuación se analizaron las secciones teñidas con un microscopio confocal láser Zeiss. Se seleccionaron veinticinco vasos teñidos con LM609 y 15 teñidos con CSAT (tamaño promedio – 1.200 mm²), intervalo de 350 a 3.500 mm²) de campos aleatorios y se midió la fluorescencia promedio de rodamina para cada vaso por unidad de área en unidades arbitrarias por medio de
35 análisis de imagen confocal con láser. Los datos se expresan como la intensidad de

fluorescencia media en unidades arbitrarias de vasos $\pm$ error estándar (EE).

Los resultados graficados en la Figura 6 muestran que la tinción de $\alpha\beta_3$ estaba significativamente aumentada (cuatro veces mayor) en las CAM tratadas con bFGF según se determina por la prueba de sumas de categorías de Wilcoxon ($P < 0,0001$) mientras que la tinción de β_1 no era significativamente diferente con el tratamiento de bFGF.

El ensayo de CAM se usó además para examinar el efecto de otro potente inductor de la angiogénesis, el factor de necrosis tumoral alfa (α), sobre la expresión de las integrinas β_1 y β_3 . Se encontró que los discos de filtros impregnados con bFGF o $\text{TNF}\alpha$ y colocados sobre las CAM de embriones de 10 días promovían la angiogénesis local después de 72 horas.

Los resultados se muestran las microfotografías de las CAM sin tratar (Figura 7A), tratadas con bFGF (Figura 7B) o tratadas con $\text{TNF}\alpha$ (Figura 7C). Los vasos sanguíneos son fácilmente evidentes tanto en las preparaciones tratadas con bFGF como en las tratadas con $\text{TNF}\alpha$ pero no están presentes en la CAM sin tratar. Por consiguiente, la aplicación tópica de un factor de crecimiento/citocina dio como resultado la inducción de la angiogénesis a partir de vasos maduros en un área adyacente hacia un área originalmente desprovista de vasos sanguíneos. En vista de los vasos sanguíneos inducidos por bFGF y la expresión concomitante $\alpha\beta_3$ como se muestra en la Figura 5C, el tratamiento de $\text{TNF}\alpha$ da como resultado actividades comparables.

Estos hallazgos indican que tanto en seres humanos como en pollo, los vasos sanguíneos implicados en la angiogénesis muestran expresión aumentada de $\alpha\beta_3$. De manera coherente con esto, la expresión de $\alpha\beta_3$ en células endoteliales cultivadas puede inducirse mediante diversas citocinas in vitro como está descrito por Janat y col., J. Cell. Physiol., 151: 588 (1992); Enenstein y col., Exp. Cell Res., 203: 499 (1992) y Swerlick y col., J. Invest. Derm., 99: 715 (1993).

El efecto sobre la angiogénesis inducida por factores de crecimiento por medio de anticuerpos e inhibidores peptídicos se presenta en los Ejemplos 7A y 7B.

B. Angiogénesis embrionaria

La preparación de CAM para evaluar el efecto de los inhibidores de la angiogénesis en la formación natural de la neovascularización embrionaria fue el embrión de pollo de 6 días como se describió anteriormente. En este estadio en desarrollo, los vasos sanguíneos están sufriendo crecimiento nuevo y por consiguiente proporciona un sistema útil para determinar si $\alpha_v\beta_3$ participa en la angiogénesis embrionaria. El sistema de CAM se preparó como se describió anteriormente con la excepción de que el ensayo se realizó en el día 6 embrionario en lugar del día 10. El efecto sobre la angiogénesis embrionaria por medio del tratamiento con anticuerpos y péptidos de la presente invención se presenta en el Ejemplo 7C.

C. Angiogénesis inducida por tumores

Para investigar la función de $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis inducida por tumores, se usaron diversos fragmentos de melanoma y carcinoma humanos $\alpha_v\beta_3$ negativos en el ensayo de CAM que se desarrollaron previamente y se aislaron a partir de la CAM del embrión de pollo de 17 días como está descrito por Brooks y col., J. Cell. Biol., 122: 1351 (1993) y como se describe en el presente documento. Los fragmentos indujeron extensa neovascularización en presencia de tampón solo.

La angiogénesis se indujo en el sistema de ensayo de CAM mediante aposición directa de un fragmento de tumor sobre la CAM. La preparación de la CAM de embrión de pollo fue idéntica al procedimiento descrito anteriormente. En lugar de un disco de papel de filtro, se colocó un fragmento de un peso de 50 miligramos (mg) a 55 mg de un tumor de melanoma humano M21-L, de un tumor de carcinoma de pulmón humano UCLAP-3, de un carcinoma pancreático humano de la línea celular FG (Cheresh y col., Cell 58:945-953, 1989), o de un carcinoma de laringe humano de la línea celular HEP3, todos tumores negativos para $\alpha_v\beta_3$, en la CAM en un área desprovista originalmente de vasos sanguíneos.

La línea celular M21-L de melanoma humano, la línea celular UCLAP-3 de carcinoma de pulmón humano, la línea celular FG de carcinoma pancreático, o la línea celular HEP3 de carcinoma de laringe humano, todas negativas para $\alpha_v\beta_3$, se usaron para desarrollar los tumores humanos sólidos sobre las CAM de embriones de pollos. Una suspensión

individual de células de 8×10^6 células M21-L, UCLAP-3, y FB o 5×10^5 células HEP3 se aplicaron primero a las CAM en un volumen total de 30 μ l de HBSS estéril. Las ventanas se sellaron con cinta y los embriones se incubaron durante 7 días para permitir el crecimiento de lesiones tumorales humanas. Al final de los 7 días, ahora un embrión de 17 días, los tumores se extirparon nuevamente de la CAM y se recortaron sin tejido de CAM circundante. Los tumores se cortaron en fragmentos de tumor de 50 mg a 55 mg para uso en ensayos de angiogénesis o de crecimiento tumoral. Los fragmentos de tumor se colocaron en una nueva serie de CAM de embriones de pollo de 10 días como se describe en el Ejemplo 6A en un área desprovista de vasos sanguíneos.

Los tumores desarrollados in vivo en las CAM de embrión de pollo se tiñeron para la expresión de $\alpha_v\beta_3$ con el Acm LM609 como se describe en el Ejemplo 3A. No se observó tinción específica de las células tumorales indicando una ausencia de expresión de $\alpha_v\beta_3$.

Estas preparaciones de tumores de CAM se trataron posteriormente como se describe en los Ejemplo 7D y 7E para medir los efectos de los anticuerpos y los péptidos sobre la angiogénesis inducida por tumores. Las preparaciones de tumores de CAM se trataron también como se describe en los Ejemplos 8, 9 y 12 para medir los efectos de los anticuerpos y los péptidos en la regresión de tumores y en la apoptosis de vasos sanguíneos y células vasculares angiogénicas.

7. Inhibición de la angiogénesis según se mide en el ensayo de CAM

A. Inhibición de la angiogénesis inducida por factor de crecimiento mediante aplicación tópica de inhibidores

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

Para determinar si $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función activa en la angiogénesis, se colocaron discos de filtro saturados con bFGF o TNF α sobre las CAM, a continuación se añadieron a la preparación los anticuerpos monoclonales (también denominados Acm), LM609 (específico para $\alpha_v\beta_3$), CSAT (específico para $\alpha_5\beta_1$) o P3G2 o también P1F6 (ambos específicos para $\alpha_v\beta_5$).

La angiogénesis se indujo en las CAM de embriones de pollo de 10 días por medio de

discos de filtro saturados con bFGF. Los discos se trataron a continuación con 50 µl de HBSS que contenían 25 mg de Acm en un volumen total de 25 µl de HBSS estéril a 0, 24, y 48 horas. A las 72 horas, se recogieron las CAM y se colocaron en una placa de petri de 35 mm y se lavaron una vez con 1 ml de disolución salina tamponada con fosfato. A continuación se analizó el lado del fondo del papel de filtro y el tejido de CAM en un microscopio estéreo Olympus, con dos observadores de una manera de doble ciego. La inhibición de la angiogénesis se consideró significativa cuando las CAM mostraban > 50% de reducción en la infiltración de vasos sanguíneos de la CAM directamente bajo el disco. Los experimentos se repitieron cuatro veces por anticuerpo, con 6 a 7 embriones por condición.

Los resultados de los efectos del tratamiento con Acm sobre la angiogénesis inducida por bFGF se muestran en las Figuras 8A-8B. En la Figura 8A se muestra una preparación de CAM desprovista de vasos sanguíneos sin tratar para proporcionar una comparación con la inducción de vasos sanguíneos con bFGF que se muestra en la Figura 8B y los efectos en la misma por los Acm en las Figuras 8C-8E. Aproximadamente el 75% de estas CAM tratadas con el Acm LM609 exhibieron > 50% de inhibición de la angiogénesis como se muestra en la Figura 8E, y muchas de estas aparecieron desprovistas de infiltración por vasos. En contraste, el control de tampón (Figura 8A) y los discos tratados con los Acm CSAT (Figura 8C) y P3G2 (Figura 8D) mostraron de manera coherente extensa vascularización.

Se obtuvieron idénticos resultados cuando se indujo la angiogénesis con TNFα. Para examinar los efectos de estos mismos anticuerpos sobre los vasos sanguíneos maduros preexistentes presentes del desarrollo de vasos normales adyacentes a las áreas desprovistas de vasos, se colocaron discos de filtro saturados con los Acm en regiones vascularizadas de las CAM de embriones de 10 días que no recibieron aplicación tópica de citocina. Ninguno de los tres Acm afectó a los vasos preexistentes, según se evaluó por medio de visualización bajo un microscopio estéreo. Por consiguiente, el Acm LM609 inhibió selectivamente sólo el crecimiento de vasos sanguíneos nuevos y no tuvo efecto en los vasos sanguíneos maduros presentes en las áreas adyacentes. Este mismo efecto se observó cuando la aplicación de los péptidos sintéticos se realizó por vía tópica o intravenosa como se describe en los Ejemplos 7A2) y 7E2), respectivamente.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

También se realizaron ensayos de CAM con péptidos sintéticos de esta invención para determinar el efecto de los péptidos cíclicos y linealizados sobre la angiogénesis inducida por factor de crecimiento. Los péptidos se prepararon como se describe en el Ejemplo 1 y se presentaron 80 µg de péptido en un volumen total de 25 de HBSS ~~estéril~~. La solución de péptido se aplicó a la preparación de CAM inmediatamente y después otra vez a las 24 y 48 horas. A las 72 horas el papel de filtro y el tejido de CAM circundante se diseccionaron y se observó como se describió anteriormente.

Los resultados de este ensayo revelados fueron similares a los que se muestran en las Figuras 9A-9C, como se describe en el Ejemplo 7E2) en el que los péptidos sintéticos se inyectaron por vía intravenosa en vasos sanguíneos inducidos por tumores. Aquí, con el péptido de control, 62186, los vasos sanguíneos inducidos por bFGF permanecieron sin cambios como se muestra en la Figura 9A. En contraste, cuando se aplicó el péptido RGD cíclico, 62814, al filtro, se inhibió la formación de vasos sanguíneos dejando un área desprovista de vasculatura nueva. Este efecto fue similar en aspecto al que se muestra en la Figura 9B como se describe en el Ejemplo 7E2) a continuación. Además, como también se muestra en la Figura 9C para los péptidos inyectados por vía intravenosa, en áreas en las que estaban presentes vasos sanguíneos maduros incluso distantes de la localización del filtro saturado con factor de crecimiento, no se observó ningún efecto con el tratamiento tópico de los péptidos sintéticos en estos vasos periféricos. La actividad inhibidora de los péptidos sobre la angiogénesis está limitada, por consiguiente, a las áreas de angiogénesis inducida por factores de crecimiento y no tiene efecto sobre los vasos maduros preexistentes adyacentes ni da lugar a citotoxicidad perjudicial en el área circundante.

Se realizaron ensayos similares con los otros péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 y que se presentan en la Tabla 1.

3) Tratamiento con fragmentos de péptido MMP-2 (no es parte de la invención)

Para demostrar los efectos biológicos de los fragmentos de péptido MMP-2 en la angiogénesis, se realizaron ensayos de CAM como se describió anteriormente con la excepción de que la angiogénesis se indujo con discos de filtro saturados durante 10

minutos con bFGF a una concentración de 1,0 ug/ml en HBS. A continuación se colocaron los discos sobre la CAM en un área con número reducido de vasos preexistentes. La proteína de fusión C terminal CTMMP-2(410-637) preparada como se describió anteriormente, o la proteína de fusión asociada al receptor de GST de control (RAP) (1,5 ug en 30 ul de HBSS) se aplicaron posteriormente por vía tópica al disco de filtro una vez por día durante un total de tres días. Al final del período de incubación, se sacrificaron los embriones y el disco de filtro y el tejido de CAM subyacente se extirparon y se analizaron para analizar la angiogénesis con un microscopio estéreo. La angiogénesis se cuantificó mediante el conteo del número de puntos de ramificación de los vasos sanguíneos que se presentaban dentro de los límites de los discos de filtro. Se considera que los vasos sanguíneos ramificados corresponden principalmente a brotes nuevos vasos sanguíneos angiogénicos.

La cuantificación se llevó a cabo de una manera de doble ciego por al menos dos observadores independientes. Los resultados se expresan como Índice Angiogénico donde el índice angiogénico es el número de puntos de ramificación (estimulado con bFGF) menos el número de puntos de ramificación (control no estimulado) por disco de filtro. Los experimentos tuvieron de rutina 6-10 embriones por condición.

Los resultados del ensayo de angiogénesis en CAM se muestran en las Figuras 25A-D, 26 y 27. En la Figuras 25, una serie de fotografías separadas en cuatro Figuras, Figuras 25A-D, ilustran la comparación de la angiogénesis inhibida en presencia de la proteína de fusión CTMMP-2 (CTMMP-2(410-637))(Figuras 25C-D) y no inhibida en presencia de la proteína de fusión con GST de control. (Figuras 25A-B). Las Figuras 26 y 27 son gráficos de barras que ilustran el índice de angiogénesis de los ensayos de angiogénesis en CAM con CTMMP-2, la misma proteína de fusión que anteriormente, comparado con los controles (bFGF solo o la proteína de fusión GST-RAP). En la Figura 27 se muestran los resultados de dos experimentos separados (#1 y #2) usando la proteína de fusión CTMMP-2(410-637).

Estos resultados demostrados en las tres Figuras indican que una proteína de fusión CTMMP-2 o un polipéptido que contiene un dominio C terminal de MMP-2 es una composición útil para inhibir la angiogénesis mediada por bFGF al inhibir $\alpha_v\beta_3$.

B. Inhibición de la angiogénesis inducida por factor de crecimiento mediante la aplicación intravenosa de inhibidores

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

- 5 También se evaluó el efecto sobre la angiogénesis inducida por factor de crecimiento con anticuerpos monoclonales inyectados por vía intravenosa en la preparación de CAM para uso en la presente invención.

10 La preparación de las CAM de embrión de pollo para inyecciones intravenosas fue esencialmente como se ha describe en el Ejemplo 7A con algunas modificaciones. Durante los procedimientos de observación al trasluz, se seleccionaron vasos sanguíneos prominentes y se realizaron marcas en la cáscara del huevo para indicar sus posiciones. Se perforaron los agujeros en la cáscara, las CAM se hicieron descender y se colocaron papeles de filtro saturados con bFGF en las CAM como se describió anteriormente. Se
15 sellaron las ventanas con cinta estéril y los embriones se volvieron a colocar en el incubador. Veinticuatro horas más tarde, se cortó cuidadosamente una segunda ventana pequeña en el lado lateral de la cáscara del huevo directamente sobre los vasos sanguíneos prominentes seleccionados previamente. Se retiró cuidadosamente el exterior de la cáscara del huevo dejando las membranas embrionarias intactas. La
20 membrana de la cáscara se hizo transparente con una pequeña gota de aceite mineral (Perkin-Elmer Corp. Norwalk, CT) que permitió que los vasos sanguíneos se visualizaran fácilmente. Se inocularon Acm estériles, o péptidos sintéticos, estos últimos se describen a continuación, directamente en los vasos sanguíneos una vez con una aguja de calibre 30 a una dosis de 200 µg de IgG por embrión en un volumen total de 100 µl de PBS
25 estéril. Se selló la venta con cinta y se dejaron incubar los embriones hasta 72 horas. Los discos de filtro y los tejidos de CAM circundantes se analizaron como se describió anteriormente.

30 Para determinar la localización del Acm LM609 en los tejidos de CAM o en los tejidos tumorales, como se muestra en el presente documento y en los siguientes Ejemplos, que se inocularon previamente por vía intravenosa con LM609, las secciones fijadas se bloquearon con BSA al 2,5% en HBSS durante 1 hora a temperatura ambiente seguido por la tinción con dilución 1:250 de anticuerpo secundario anti-ratón de cabra marcado con rodamina (Tago). A continuación se analizaron las secciones con microscopio
35 compuesto de inmunofluorescencia Zeiss.

Los resultados del tratamiento con anticuerpos por vía intravenosa a la preparación de CAM de vasos sanguíneos inducidos por bFGF se muestran en las Figuras 10A-10C. En la Figura 10A, se muestra la angiogénesis inducida como resultado del tratamiento con bFGF. No se observaron cambios en la presencia de vasculatura inducida por bFGF con la exposición intravenosa de Acm P3G2, un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$, según se muestra en la Figura 10B. En contraste, el tratamiento de la preparación de CAM con angiogénesis inducida con bFGF con LM609, un anticuerpo anti- $\alpha_v\beta_3$, dio como resultado la inhibición completa del crecimiento de vasos nuevos hacia el área del filtro, como se muestra en la Figura 10C. El efecto inhibidor sobre la angiogénesis es el resultado, por consiguiente, de la inhibición de la actividad del receptor $\alpha_v\beta_3$ por el anticuerpo LM609 específico anti- $\alpha_v\beta_3$. Puesto que el bloqueo de $\alpha_v\beta_5$ no inhibe la formación de vasculatura en el sitio del filtro de las CAM, $\alpha_v\beta_5$ no es esencial en comparación con $\alpha_v\beta_3$ para el crecimiento de vasos nuevos.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

Para las preparaciones de CAM en las que la angiogénesis se indujo con bFGF 1-2 $\mu\text{g/ml}$ como se describió anteriormente, se inyectaron por separado por vía intravenosa los péptidos sintéticos 69601 (control) y 66203 (ID. SEC. N° 5) en las preparaciones de CAM 18 horas después de la inducción de la angiogénesis con bFGF. Las preparaciones se mantuvieron durante otras 36-40 horas tras lo que se determinó el número de puntos de ramificación como se describió anteriormente.

Los resultados se muestran en la Figura 28, donde el péptido 66203 inhibió completamente la angiogénesis inducida por bFGF en contraste con la ausencia de inhibición con el péptido de control.

En otros ensayos, se evaluó el péptido 85189 (ID. SEC. N° 15) para la inhibición de la angiogénesis inducida por bFGF en el ensayo de CAM en un intervalo de dosificación de 10 $\mu\text{g/embrión}$ a 300 $\mu\text{g/embrión}$. El ensayo se realizó como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 29, donde la dosis eficaz más baja fue de 30 μg , con inhibición de la angiogénesis prácticamente completa con las dosis de 100 y 300 μg .

En aún otros ensayos, se comparó el péptido 85189 con los péptidos 69601 y 66203 para la actividad anti angiogénesis. El ensayo se realizó como se describió anteriormente con

la excepción de que se usaron 50µg de péptido. Los resultados, graficados en la Figura 30, mostraron que los péptidos 66203 (marcado 203) y 85189 (marcado 189) fueron inhibidores eficaces de la angiogénesis mediada por bFGF comparados con los controles tratados con bFGF (marcado bFGF) y tratados con 69601 (marcado con 601).

5

También se evaluó la eficacia de diferentes formulaciones salinas del péptido 85189 en ensayos de CAM inducidos con bFGF similares. Los péptidos se usaron a razón de 100 µg/embrión. La misma secuencia del péptido en HCl (péptido 85189) y en TFA (péptido 121974) inhibió la angiogénesis inducida por bFGF siendo el péptido formulado en HCl ligeramente más eficaz que el formulado en TFA (el número de puntos de ramificación respectivo para el péptido 85189 frente al 12974 es de 30 frente a 60). Las CAM sin tratar, marcadas como "sin citocina" tuvieron aproximadamente la mitad de los puntos de ramificación que los observados con el tratamiento con bFGF, respectivamente 70 frente a 190. El tratamiento con el péptido de control 69601 no tuvo efectos sobre la inhibición de la angiogénesis (230 puntos de ramificación).

10
15

Los otros péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 se inyectaron por separado por vía intravenosa en los vasos sanguíneos inducidos por factor de crecimiento en la preparación de CAM como se describió anteriormente. El efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los vasos se evalúa de manera similar.

20

3) Tratamiento con fragmento de MMP-2 (no es parte de la invención)

Con el protocolo descrito anteriormente, también se evaluó el efecto de las proteínas de fusión de MMP-2, CTMMP-2(2-4), también denominada CTMMP-2(445-637) y CTMMP-2(10-1), también denominada CTMMP-2(274-637). El ensayo se realizó como se describió anteriormente con la excepción de que se administraron 50 µg de proteína de fusión a los embriones tratados con bFGF. El efecto del tratamiento con la proteína de fusión se evaluó a las 24 horas, 48 horas y 72 horas.

25
30

Los resultados se muestran para estos períodos de tiempo seleccionados en las Figuras 31A-L, donde la angiogénesis se evaluó por medio de fotografías bajo las condiciones de ensayo de: sin tratamiento, tratamiento con bFGF, tratamiento con bFGF seguido por el CTMMP-2(2-4), marcado como bFGF + MAID (MAID = dominio de inhibición de la angiogénesis de MMP-2), y tratamiento con bFGF seguido por CTMMP-2(10-1), marcado

35

como bFGF + control. La significativa inducción de angiogénesis después de 48 y 72 horas tras el tratamiento con bFGF se inhibió casi completamente sólo con la exposición a CTMMP-2(2-4). El grado de inhibición con CTMMP-2(2-4) fue mayor que el observado con CTMMP-2(10-1), que exhibió algo de actividad anti angiogénesis in vivo.

5

Las otras composiciones de MMP-2, MMP-2 completa, fragmentos y proteínas de fusión, preparados como se describió anteriormente se inyectaron también por separado por vía intravenosa en los vasos sanguíneos inducidos por factor de crecimiento en la preparación de CAM como se describió anteriormente. El efecto de los péptidos sobre la

10

viabilidad de los vasos se evalúa de manera similar.

C. Inhibición de la angiogénesis embrionaria por aplicación tópica

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

15

Para determinar si $\alpha_v\beta_3$ participa en la angiogénesis embrionaria, se examinó el efecto LM609 en el crecimiento nuevo de vasos sanguíneos en las CAM en embriones de 6 días, un estadio marcado por neovascularización activa como se describe en el Ejemplo 5A. El ensayo de CAM se preparó como se describe en el Ejemplo 6C con la posterior

20

aplicación tópica de discos saturados con Acm colocados sobre las CAM de embriones de 6 días de edad en ausencia de citocinas. Después de 3 días, las CAM se extirparon y se fotografiaron. Cada experimento incluyó 6embriones por grupo y se repitió 2 veces.

El anticuerpo LM609 (Figura 11C), pero no CSAT (Figura 11A) ni P3G2 (Figura 11B), evitó el crecimiento vascular bajo estas condiciones; esto indica que $\alpha_v\beta_3$ desempeña una

25

función sustancial en la neovascularización embrionaria que fue independiente de factores de crecimiento añadidos para la inducción de la angiogénesis.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

30

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 se añaden por separado a la preparación de CAM de embrión de pollo preparada anteriormente y según se describe en el Ejemplo 5A2) por medio de aplicación tópica a la CAM o por aplicación intravenosa a los vasos sanguíneos. El efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los vasos se

35

evalúa de manera similar.

D. Inhibición de la angiogénesis inducida por tumores mediante aplicación tópica

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

5 Además de los ensayos de angiogénesis descritos anteriormente donde se evaluaron los efectos de antagonistas anti- $\alpha_v\beta_3$, LM609 y diversos péptidos sobre la angiogénesis embrionaria, también se investigó la función de $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis inducida por tumores. Como un inductor, se usaron fragmentos de melanoma M21-L humano negativos para $\alpha_v\beta_3$ cultivados previamente y aislados de la CAM de un embrión de pollo
10 de 17 días. Los fragmentos se prepararon como se describe en el Ejemplo 6C.

Como se describió anteriormente en el Ejemplo 7A1), los Acm se aplicaron por separado por vía tópica a los fragmentos de tumor en una concentración de 25 μg en 25 μl en HBSS y a continuación se selló la ventana con cinta. Los Acm se añadieron nuevamente
15 de la misma manera a las 24 horas y 48 horas. A las 72 horas, se analizaron los tumores y los tejidos de CAM circundantes como se describió anteriormente en el Ejemplo 7A1).

Como se describe en el Ejemplo 6C, los tumores se obtuvieron inicialmente trasplantando células M21L cultivadas, que no expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ como está descrito por
20 Felding-Habermann y col., J. Clin. Invest., 89-2018 (1992) sobre las CAM de embriones de pollo de 10 días de edad. Estos fragmentos negativos para $\alpha_v\beta_3$ indujeron extensa neovascularización en presencia de tampón solo, o en presencia de los Acm CSAT (anti- β_1) o P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_3$). En contraste, el Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) suprimió la infiltración de la mayoría de los vasos en la masa tumoral y en los tejidos circundantes de la CAM.

25 Para cuantificar el efecto de los Acm sobre la angiogénesis inducida por tumores, dos observadores contaron los vasos sanguíneos que entraban al tumor dentro del plano focal de la CAM usando un microscopio estéreo en una manera de doble ciego. Cada barra de datos presentada en la Figura 12 representa el número de vasos promedio $\pm$ EE
30 de 12 CAM en cada grupo que representan experimento por duplicado.

Este análisis cuantitativo reveló una reducción de 3 veces en el número de vasos que entraban a los tumores tratados con Acm LM609 comparado con los tumores tratados con tampón o con los otros Acm, P3G2 o CSAT ($P < 0,0001$) según se determina por la
35 prueba de sumas de categorías de Wilcoxon. El hecho de que los tumores M21-L no

expresen $\alpha_v\beta_3$ indica que el Acm LM609 inhibe la angiogénesis afectando directamente a los vasos sanguíneos más que a las células tumorales. Estos resultados corresponden con la distribución histológica de $\alpha_v\beta_3$ en las biopsias de tejido canceroso que se muestran en las Figuras 3A-3D, donde la distribución de $\alpha_v\beta_3$ estaba limitada a los vasos sanguíneos en el tumor y no a las células tumorales mismas.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1, incluidos los péptidos procedentes de MMP-2 y proteínas de fusión se aplicaron tópicamente para el sistema de ensayo de CAM angiogénica inducida por tumores como se describió anteriormente. Del mismo modo se evalúa el efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los vasos sanguíneos.

E. Inhibición de la angiogénesis inducida por tumores por aplicación por vía intravenosa

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

Los vasos sanguíneos inducidos por tumores preparados como se describe en el Ejemplo de la 7E1) también se trataron con Acm aplicados por inyección intravenosa. Los tumores se colocaron en las CAM como se describe en el Ejemplo 7D1) y las ventanas se sellaron con cinta y 24 horas más tarde, se inocularon 200 μ g de Acm purificados de una vez por vía intravenosa en los vasos sanguíneos del embrión de pollo como se describió anteriormente. A continuación los embriones de pollo se dejaron incubar durante 7 días. A continuación se observó el grado de angiogénesis como se describió anteriormente. Como se describe en el Ejemplo 8 a continuación, después de este período de tiempo, se extirparon los tumores y se analizaron por su peso para determinar el efecto de la exposición de anticuerpos en el crecimiento o la supresión tumoral.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

También se evaluó los efectos de la exposición de los péptidos a la vasculatura inducida en el tumor en el sistema de ensayo de CAM. La preparación de CAM tumoral se usó como se describió anteriormente, con la excepción de que en lugar de la inyección intravenosa de un Acm, se inyectaron péptidos sintéticos preparados como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 7A2) por separado por vía intravenosa en vasos sanguíneos

visibles.

Los resultados de los ensayos de CAM con el péptido cíclico, 66203, que contiene la sal HCl y el péptido de control, 62186, se muestran en las Figuras 9A-9C. En la Figura 9A, el tratamiento con el péptido de control no afectó los abundantes vasos sanguíneos grandes que se indujeron por el tratamiento del tumor para crecer en un área originalmente desprovista de vasos sanguíneos de la CAM. Por el contrario cuando se aplicó el péptido cíclico RGD, 66203, un antagonista de $\alpha_v\beta_3$, al filtro, la formación de vasos sanguíneos fue inhibida dejando el área desprovista de nueva vasculatura, como se muestra en la Figura 9B. El efecto inhibitor del péptido que contiene el RGD fue específico y localizado, como lo demuestra la ausencia de cualquier efecto perjudicial a los vasos sanguíneos que se encuentran adyacentes a la ubicación del tumor. Por lo tanto, en la Figura 9C, cuando se inyectan péptidos inhibidores por vía intravenosa en el sistema de ensayo de CAM, no se observó ningún efecto en los vasos maduros preexistentes presentes en la CAM en áreas adyacentes aún distantes de la ubicación del tumor. Los vasos preexistentes en esta localización no se vieron afectados por el péptido inhibidor que fluía dentro de esos vasos, a pesar de que fue inhibida la generación de nuevos vasos de estos vasos preexistentes en la masa tumoral. Por consiguiente, los péptidos sintéticos incluidos 66203 y 62184, que se mostró anteriormente en los ensayos de ligando-receptor en el Ejemplo 4 que eran antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, se ha demostrado ahora que inhiben la angiogénesis que está limitada a los vasos sanguíneos en proceso de desarrollo y no a los vasos preexistentes maduros. Además, la infusión intravenosa de péptidos no implica ninguna citotoxicidad perjudicial para el área circundante como se evidencia por la vasculatura intacta en Figura 9C.

Se llevaron a cabo ensayos similares con los otros péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 y presentados en la Tabla 1, junto con las composiciones de MMP-2 de la presente invención.

3) Tratamiento con fragmentos de MMP-2 (no es parte de la invención)

Se preparó un tumor CS-1 (β_3 -negativo) en una CAM como se describió anteriormente. Después de 24 horas de crecimiento tumoral, se administró por vía intravenosa una composición de fragmento de MMP-2, denominada CTMMP-2(2-4) y preparada como se describe en el Ejemplo 4A, a una concentración de 50 μg de fragmento en 100 μl de PBS.

Después de 6 días, se evaluó la masa tumoral. En los tumores tratados con CTMMP-2(2-4) se redujo la tasa de crecimiento en aproximadamente el 50% en comparación con la tasa de crecimiento de los tumores de control tratados con CTMMP-2(10-1) o con control de PBS. Por consiguiente, el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ inhibió el crecimiento tumoral.

- 5 8. Inhibición del crecimiento del tejido tumoral con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ según se mide en el ensayo de CAM (no es parte de la invención)

Como se describe en el Ejemplo 7E1), además de evaluar visualmente el efecto de los antagonistas anti- $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis inducida por factor de crecimiento o por
10 tumores, también se evaluó el efecto de los antagonistas mediante la medición de los cambios a la masa tumoral tras la exposición. Para este análisis, el sistema de ensayo de CAM de angiogénesis inducida por tumores se preparó como se describe en Ejemplo 6C y 7D. Al final del período de incubación de 7 días, los tumores resultantes se extirparon de las CAM y se recortaron sin ningún tejido residual de CAM, se lavaron con 1 ml de
15 disolución salina de tampón fosfato y se determinaron los pesos húmedos para cada tumor.

Además, la preparación del tumor para el análisis histológico microscópico incluyó la fijación de ejemplos representativos de los tumores en fijador Bulins durante 8 horas y se
20 incluyeron en parafina. Las secciones en serie se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H y E) para el análisis microscópico. Gladson, y col., J. Clin. Invest., 88:1924 (1991). Las secciones se fotografiaron con un microscopio compuesto Olympus a 250x.

A. Aplicación tópica

25 Los resultados de los pesos de los tumores de melanoma humano típico (M21L) como resultado de la aplicación tópica de tampón de control (HBSS), P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) se presentan en la Tabla 4. Se evaluó un número de embriones para cada tratamiento calculándose el peso promedio del tumor en miligramos (mg) de cada uno
30 junto con el EE de la media, como se muestra en la parte inferior de la tabla.

Tabla 4

Embrión N°	Tratamiento con Acm	Peso del tumor (mg)
1	HBSS	108
2		152

(c ntin a)

Embr�n N�	Tratamiento con Acm	Peso del tumor (mg)
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

Tratamiento con Acm	Peso promedio del tumor (mg)
control HBSS	172 $\pm$ 26
P3G2	171 $\pm$ 36
LM609	52 $\pm$ 13

- 5 La exposición de una masa tumoral de melanoma humano negativa para $\alpha_v\beta_3$ en el sistema de ensayo de CAM a LM609 causó la disminución del peso promedio del tumor sin tratar de 172 mg $\pm$ 26 a 52 mg $\pm$ 13. El anticuerpo P3G2 no tuvo efectos sobre la masa tumoral. Por consiguiente, el bloqueo del receptor $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación t pica del anticuerpo LM609 específico de $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de la masa
- 10 tumoral junto con una inhibición de la angi genesis como se muestra en los ejemplos

anteriores. El diámetro medido de la masa tumoral resultante de la exposición a P3G2 fue de aproximadamente 8 milímetros a 1 centímetro en promedio. En contraste, los tumores tratados con LM609 tuvieron en promedio 2 a 3 mm de diámetro.

- 5 Las secciones congeladas de estos tumores revelaron una citoarquitectura intacta del tumor para el tumor expuesto a P3G2 en contraste con una ausencia de estructura celular organizada en el tumor expuesto a LM609. La actividad del receptor $\alpha_v\beta_3$ es por consiguiente esencial para que un tumor negativo para $\alpha_v\beta_3$ mantenga su masa alimentada por el desarrollo de neovascularización con expresión de $\alpha_v\beta_3$. El bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ con los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención da como resultado la inhibición de la angiogénesis en el tumor, dando lugar en última instancia a la disminución de la masa tumoral.

B. Aplicación por vía intravenosa

- 15 Los resultados de los pesos del tumor de carcinoma típico (UCLAP-3) como resultado de la aplicación por vía intravenosa del tampón de control (PBS, disolución tamponada de fosfato), CSAT (anti- β_1) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) se presentan en la Tabla 5. Se evaluó un número de embriones para cada tratamiento calculándose el peso promedio de tumor de cada uno junto con el EE de la media como se muestra en la parte inferior de la tabla.

Tabla 5

Embrión N°	Tratamiento con Acm	Peso del tumor (mg)
1	PBS	101
2		80
3		67
4		90
1	CSAT	151
2		92
3		168
4		61
5	LM609	70
1		16
2		54

(continúa)

Embrión N°	Tratamiento con Acm	Peso del tumor (mg)
3		30
4		20
5		37
6		39
7		12

Tratamiento con Acm	Peso promedio del tumor (mg)
control HBSS	85 ± 7
CSAT	108 ± 22
LM609	30 ± 6

La exposición de una masa tumoral de carcinoma humano negativo para $\alpha_v\beta_3$ en el sistema de ensayo de CAM a LM609 causó la disminución del peso del tumor promedio sin tratar de $85 \text{ mg} \pm 7$ a $30 \text{ mg} \pm 6$. El anticuerpo CSAT no afectó de manera significativa el peso de la masa tumoral. Por consiguiente, el bloqueo del receptor $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación intravenosa del anticuerpo LM609 específico de $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de un carcinoma como lo hizo anteriormente para la masa tumoral de melanoma junto con una inhibición de la angiogénesis, como se muestra en los Ejemplos anteriores. Además, el crecimiento tumoral de melanoma humano se inhibió de manera similar por medio de inyección intravenosa de LM609.

9. Regresión del crecimiento del tejido tumoral con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ según se mide en el ensayo de CAM

Para evaluar además los efectos de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ en el crecimiento y la supervivencia tumoral, se colocaron fragmentos de melanoma humano y fragmentos de carcinomas de pulmón, páncreas y laringe en CAM de embriones de 10 días de edad, como se describe en el Ejemplo 5A.

A. Aplicación por vía intravenosa

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

a. Tratamiento con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) y CSAT (anti- β_1) (no es parte de la invención)

Veinticuatro horas después de la implantación de la CAM con fragmentos de carcinoma de melanoma humano M21-L negativo para $\alpha_v\beta_3$, carcinoma pancreático FG, carcinoma de pulmón humano UCLAP-3 o carcinoma laríngeo humano HEP3, se inyectaron los embriones por vía intravenosa con PBS sola o con una única dosis (300 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$) de Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o CSAT (anti- β_3). Se dejaron proliferar los tumores durante otros seis días. Al final del período de incubación se extirparon cuidadosamente los tumores y se recortó el tejido circundante de la CAM. Las disecciones del tumor fueron realizadas por dos investigadores independientes que sólo retiraron la masa del tumor sólido fácilmente definible. Los tumores tenían los márgenes bien definidos, por lo tanto la membrana delgada semitransparente (CAM) que es fácilmente distinguible de la masa del tumor sólido se retiró sin alterar la masa tumoral misma. Los tumores extirpados se pesaron y se examinaron morfológica e histológicamente.

Como se muestra en la Figura 13, se determinó el peso húmedo de los tumores al final de los 7 días y se comparó con el peso inicial de los tumores antes de los tratamientos. Cada barra representa la media $\pm$ EE de 5-10 tumores por grupo. El Acm LM609 inhibió el crecimiento tumoral de manera significativa ($p < 0,001$) en comparación a los controles en todos los tumores probados. Los tumores tratados con PBS o CSAT proliferaron en todos los casos. En contraste, el Acm LM609 no sólo evitó el crecimiento de estos tumores, sino también indujo una amplia regresión en la mayoría de los casos. Es importante destacar que estas células tumorales no expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$, demostrando que la inhibición del crecimiento se debió a los efectos antiangiogénicos de este anticuerpo en la vasculatura nueva, más que en las células tumorales directamente.

b. Tratamiento con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) y P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) (no es parte de la invención)

Se implantaron fragmentos de tumor de melanoma humano M21-L (50 mg) en las CAM de embriones de 10 días de edad como se describe en el Ejemplo 5A. Veinticuatro horas más tarde, los embriones se inyectaron por vía intravenosa con PBS sola o con una única dosis (300 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$) de Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$). Los tumores se dejaron proliferar como se describe en el Ejemplo 9A1a anterior y se examinaron morfológica e histológicamente como se describe en el presente documento.

Se examinaron morfológicamente ejemplos representativos de tumores M21-L tratados con Acm P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$). Los tumores tratados con P3G2 fueron grandes (8 mm de diámetro) y bien vascularizados mientras que los tratados con Acm LM609 fueron más pequeños (3 mm de diámetro) y carecían de vasos sanguíneos detectables.

Los tumores se examinaron además por la preparación de secciones histológicas y la tinción con hematoxilina y eosina como se describe en el Ejemplo 9A1)a. Como se muestra en la Figura 14 (panel superior), los tumores tratados con Acm P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) mostraron numerosas células tumorales viables y en división activa como lo indican las figuras mitóticas (puntas de flecha), así como los vasos sanguíneos múltiples (flechas) en todo el estroma tumoral. Por el contrario, se detectaron pocas, si algunas, células tumorales viables o vasos sanguíneos en los tumores tratados con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) (Figura 14, panel inferior). Estos resultados demuestran que los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ inhiben la angiogénesis inducida por tumores, dando lugar a la interrupción del crecimiento y a la regresión de una diversidad de tumores humanos in vivo. Es importante señalar que los embriones examinados después de siete días de crecimiento tumoral (día embrionario 17) parecían normales tras el examen grosero habiéndose tratado o no con un antagonista de $\alpha_v\beta_3$. Estos hallazgos indican que los antagonistas de esta integrina parecen no ser tóxicos para los embriones en desarrollo.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

Se implantaron fragmentos de tumor de melanoma humano M21-L (50 mg) en las CAM de embriones de 10 días de edad tal como se describe en el Ejemplo 5A. Veinticuatro horas más tarde, los embriones recibieron una inyección intravenosa de 300 $\mu\text{g}/100\text{ }\mu\text{l}$ de ciclo-RADfV (69601) y/o ciclo-RGDfV (66203). Después de un total de 72 horas, se extirparon los tumores, se examinaron morfológicamente y se fotografiaron con un microscopio estéreo, como se describe en el Ejemplo 9A1).

Los paneles que se muestran en las Figuras 15A a 15E corresponden a lo siguiente: Figura 15A, muestras tratadas con péptido ciclo-RADfV (69601) por duplicado; Figura 15B, muestras tratadas con péptido ciclo-RGDfV (66203) por duplicado; Figura 15C, tejido de CAM adyacente tomado de los mismos embriones tratados con péptido ciclo-RGDfV (66203) y las Figuras 15D y 15E, gran aumento (13 x) de los tumores tratados

con los péptidos. La Figura 15D representa los vasos sanguíneos normales de tumor tratado con péptido de control (69601). La Figura 15E representa ejemplos de vasos sanguíneos alterados de tumores tratados con péptido ciclo-RGDfV (66203) (flechas).

- 5 Los resultados ilustran que sólo el péptido 66203, en contraste con el péptido de control 69601, inhibió la formación de vasos y además los vasos en el tejido de la CAM adyacente al tumor no se vieron afectados.

10 Se realizaron otros ensayos de regresión tumoral con el péptido reactivo con $\alpha_v\beta_3$ 85189 (ID. SEC. N° 15) frente al 69601 como control. Los ensayos se realizaron como se describió anteriormente con la excepción de que se inyectaron 100 μ g de péptido por vía intravenosa en la CAM a las 18 horas después de la implantación. Después de otras 48 horas, los tumores se extirparon y se obtuvieron los pesos húmedos.

15 Las Figuras 32, 33 y 34 muestran respectivamente la reducción en el peso del tumor para los tumores UCLAP-3, M21-L y FgM después de la exposición por vía intravenosa al péptido 85189 en contraste con la ausencia de efecto con PBS o con péptido 69601.

20 10. Regresión del crecimiento de tejido tumoral con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ según se mide por el ensayo del modelo de ojo de conejo in vivo

El efecto de los antagonistas anti- $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis inducida por factor de crecimiento puede observarse en las estructuras naturalmente transparentes como por ejemplo la córnea del ojo. Nuevos vasos sanguíneos crecen desde el borde de la córnea, que tiene un rico suministro de sangre, hacia el centro de la córnea, que normalmente no tiene suministro de sangre. Los estimuladores de la angiogénesis, tales como bFGF, cuando se aplican a la córnea inducen el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desde el borde de la córnea. Los antagonistas de la angiogénesis, aplicados a la córnea, inhiben el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos desde el borde de la córnea. Por consiguiente, la córnea sufre angiogénesis a través de una invasión de células endoteliales desde el borde de la córnea hacia el tejido corneal duro rico en colágeno, que es fácilmente visible. El ensayo del modelo de ojo de conejo proporciona, por consiguiente un modelo in vivo para la observación directa de la estimulación y la inhibición de la angiogénesis tras la implantación de compuestos directamente en la córnea del ojo.

A. Ensayo del modelo de ojo de conejo in vivo

1) Angiogénesis inducida por factores de crecimiento

5 La angiogénesis se indujo en el ensayo del modelo de ojo de conejo in vivo con el factor de crecimiento bFGF y se describe en las secciones siguientes.

a. Preparación de pellas de Hydrón que contienen factor de crecimiento y anticuerpos monoclonales

10

Las pellas de polímero de Hydrón que contienen el factor de crecimiento y los Acm se prepararon como está descrito por D'Amato, y col., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:4082-4085 (1994). Las pellas individuales contenían 650 ng del factor de crecimiento bFGF unido a sucralfato (Carafet, Marion Merrell Dow Corporation) para estabilizar el bFGF y asegurar su liberación lenta en el tejido circundante. Además, se prepararon pellas de hydrón que contenían 40 µg del Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o del Acm P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$) en PBS. Las pellas se fundieron en clavijas de Teflón especialmente preparadas que tienen un núcleo de 2,5 mm perforado en sus superficies. Se colocaron aproximadamente 12 µl de material de fusión en cada clavija y se polimerizó durante la noche en una campana
15
20 estéril. A continuación, se esterilizaron las pellas por irradiación ultravioleta.

b. Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

Cada experimento estaba constituido por tres conejos en los que un ojo recibió una pella que comprendía bFGF y LM609 y el otro ojo recibió una pella que comprendía bFGF y un
25 Acm P1F6 de ratón (anti- $\alpha_v\beta_5$). El uso de la prueba de ojos emparejados para comparar LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) con otros Acm y controles de PBS proporciona un medio de prueba riguroso para demostrar diferencias significativas entre los Acm probados.

30 El Acm P1F6 inmunorreacciona con la integrina $\alpha_v\beta_5$ que se encuentra sobre la superficie de las células endoteliales vasculares pero es presumible que no esté implicado en la angiogénesis. Para determinar si el Acm P1F6 estuvo implicado en la angiogénesis, se prepararon pellas que contenían únicamente este Acm y se ensayó como se describe a continuación para confirmar que el Acm no inducía la angiogénesis..

35

Todos los Acm probados se purificaron a partir de líquido de ascitis usando cromatografía en columna de afinidad Proteína-Sefarosa A CL-4B según procedimientos bien conocidos. La inmunoglobulina eluida se sometió a continuación a diálisis contra PBS y se trató con gel Detoxi (Pierce Chemicals) para eliminar la endotoxina. Se ha mostrado
5 que la endotoxina es un potente estimulante angiogénico e inflamatorio. Se probaron por consiguiente, Acm para detectar la presencia de endotoxina con el ensayo de lisado de amebocito de Limulus cromogénico (Bio-Whittaker) y se usaron únicamente los Acm sin endotoxinas detectables en el ensayo del modelo de ojo de conejo.

- 10 Se insertó una pella de hydon que comprende bFGF y Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o P1F6 anti- $\alpha_v\beta_5$) en una bolsa corneal formada en el ojo de los conejos. La pella de hydon también contenía sucralfato para estabilizar el bFGF durante el ensayo. Se implantaron sedimentos individuales en “bolsas” creadas quirúrgicamente en el estroma medio de la córnea de los conejos. El procedimiento quirúrgico se realizó con una técnica estéril
15 usando un microscopio de operación Wild modelo M691 equipado con un separador de haces al que se montó una cámara para grabar fotográficamente las córneas individuales. Se creó una “bolsa” de 3 mm por 5 mm en el estroma corneal haciendo una incisión de 3 mm en la mitad del espesor corneal con una cuchilla 69 Beaver. El estroma se sometió a disección periférica usando una espátula de iris y la pella se implanto con su
20 margen periférico a 2 mm del limbo.

Durante los 14 días siguientes, el bFGF y el Acm difundieron desde la pella implantada en el tejido circundante y con ello se efectuó la angiogénesis desde el borde de la córnea. Los resultados representativos de cada tratamiento se representan en las Figuras 16A a
25 16E. La cantidad de vasos presentes se cuantifica y se describe en término de horas de reloj que se definen como sigue. El ojo se divide en 12 secciones iguales de la misma manera que un reloj se divide en horas. “Una hora de reloj de vasos” se refiere a la cantidad de vasos que llenan un área del ojo equivalente a una hora en un reloj. Los cinco conejos que recibieron sólo bFGF exhibieron angiogénesis florida en la que los
30 nuevos vasos sanguíneos habían crecido desde el borde de la córnea hacia el centro de la córnea, que normalmente no tiene vasos sanguíneos. Uno de estos conejos tenía sólo 1 hora de reloj de vasos a la pella. Dos de los conejos que recibieron tanto bFGF como el Acm LM609 no tuvieron en absoluto angiogénesis detectable hasta 14 días después de la cirugía. Uno de estos conejos tuvo 3 focos de vasos hemorrágicos y en ciernes después
35 del día 14. Dos de los conejos que recibieron bFGF y Acm P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) mostraron

extensa vascularización en la que habían crecido nuevos vasos sanguíneos desde el borde de la córnea hacia el centro de la córnea. Una de estos conejos sólo tenía 1 a 2 horas de vasos a la pella.

- 5 Como se puso en evidencia en el ensayo del modelo de ojo de conejo, no se observó ningún efecto angiogénico sobre los vasos paralimbales en presencia del factor de crecimiento bFGF en los conejos que recibieron Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$). En contraste con lo anterior, se observó angiogénesis en los vasos paralimbales en presencia del factor de crecimiento bFGF en los conejos que recibieron Acm P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$). La total inhibición
10 de la angiogénesis corneal por Acm LM609 es sustancialmente mayor que con cualquier reactivo anti-angiogénico previamente informado.

c. Tratamiento con polipéptidos (no es parte de la invención)

- 15 Cada experimento estaba constituido por ocho conejos en los que un ojo recibió una pella que comprendía 100 nanogramos (ng) de bFGF y el otro ojo recibió una pella que comprendía 1 microgramo (μ g) de VEGF. Las pellas se insertaron en la bolsa corneal, como se describió anteriormente, y posteriormente las citocinas estimularon el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la córnea. Los péptidos se administraron por
20 vía subcutánea (s.c.) en 1 ml de PBS en una dosis inicial de 50 μ g por kg de conejo el día de la inserción de la pella, y se administraron dosis diarias s.c. a 20 μ g/kg a partir de entonces. Después de siete días, se evaluó la córnea como se describió anteriormente.

- Los conejos que recibieron el péptido de control 69601 mostraron sustancial crecimiento
25 de los vasos sanguíneos de la córnea a los 7 días, tanto en los ojos estimulados con vFGF y VEGF. Los conejos que recibieron el péptido 85189 mostraron menos del 50% de la cantidad de crecimiento de vasos sanguíneos de la cornea en comparación con los controles en ojos estimulados con vFGF y casi el 100% de inhibición en los ojos estimulados con VEGF.

30

11. Regresión in vivo de crecimiento de tejidos tumorales con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ según se mide mediante el ensayo de ratón quimérico:ser humano

- Se generó un modelo de ratón quimérico:ser humano in vivo reemplazando una porción
35 de piel de un ratón SCID con prepucio neonatal humano (Figura 17). Una vez establecido

el injerto de piel, se inoculó el prepucio humano con células de carcinoma. Una vez establecido un tumor medible, se inyectó Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o PBS en la vena de la cola del ratón. Tras un período de 2-3 semanas se extirpó el tumor y se analizó el peso y la histología.

5

A. Ensayo de ratón quimérico: ser humano in vivo

Se preparó un modelo de ratón quimérico: ser humano in vivo esencialmente como se describe en Yan, y col., J. Clin. Invest., 91: 986-996 (1993). En resumen, se retiró un área de 2 cm² de piel quirúrgicamente de un ratón SCID (6-8 semanas de edad) y se reemplazó con un prepucio humano. El ratón se anestesió y se retiró el pelo de un área de 5 cm² en cada lado de la región abdominal lateral mediante afeitado. Se prepararon dos estratos de injerto circular de 2 cm² retirando el espesor completo de piel debajo de la fascia. Se colocaron injertos de piel humana gruesos del mismo tamaño derivado de prepucio neonatal humano en los estratos de la herida y se suturaron en el lugar. El injerto se cubrió con una venda que se suturó a la piel. También se aplicó cinta de tela para cubrir la herida.

La línea celular de melanoma humano M21L o la línea celular de carcinoma de mama MDA 23.1 (ATCC HTB 26; negativa para $\alpha_v\beta_3$ por inmunorreactividad de secciones de tejido con Acm LM609), se usaron para formar los tumores humanos sólidos en los injertos de piel humana en los ratones SCID. Se inyectó una suspensión de células individuales de 5×10^6 células M21-L o MDA 23.1 por vía intradérmica en el injerto de piel humana. A continuación se observaron los ratones durante 2 a 4 semanas para permitir el crecimiento de tumores humanos medibles.

B. Aplicación intravenosa

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

30

Tras el crecimiento de tumores medibles, los ratones SCID, a los que se había administrado inyecciones con células tumorales M21L, recibieron inyecciones por vía intravenosa en la vena de cola con 250 μ g del Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o PBS dos veces por semana durante 2 a 3 semanas. Después de este tiempo, los tumores se extirparon de la piel y recortó el tejido circundante. Se evaluaron varios ratones para cada

35

tratamiento calculándose el peso promedio del tumor de cada tratamiento, que se muestra al final de la Tabla 6.

Tabla 6

Número de tumor M21L	Tratamiento	Peso del tumor (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

Tratamiento	Peso promedio del tumor (mg)
PBS	198
LM609	113

5

La exposición de la masa tumoral de carcinoma humano M21L negativo para $\alpha_v\beta_3$ en el sistema de ensayo de ratón quimérico:ser humano al LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) causó la disminución desde el peso de tumor promedio tratado con PBS de 198 mg a 113 mg.

- 10 Se examinaron morfológicamente ejemplos representativos de los tumores M21L tratados con el Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) y con PBS. Los tumores tratados con PBS eran más grandes (8 a 10 mm de diámetro) y estaban bien vascularizados, mientras que los tratados con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) eran mucho más pequeños (3 a 4 mm de diámetro) y carecían de vasos sanguíneos detectables.

15

En otros experimentos con células tumorales de melanoma M21-L en el sistema de ensayo de ratón quimérico:ser humano, se comparó la respuesta con Acm LM609 con la respuesta obtenida con el péptido sintético 85189 (ID. SEC. Nº 15), en comparación con el péptido sintético de control 69601 (ID. SEC. Nº 6). Los ensayos se realizaron como se

describió anteriormente. Los resultados, que se muestran en la Figura 35, demuestran que el péptido sintético 85189 redujo el volumen del tumor por debajo de 25 mm³ comparado con el péptido de control donde el volumen de tumor era de aproximadamente 360 mm³. El Acn LM609 también redujo significativamente el volumen del tumor hasta aproximadamente 60 mm³.

Los tumores formados en injertos de piel, que se habían inyectado con células de MDA 23.1 eran detectables y medibles. El examen morfológico de los tumores establecidos reveló que se había producido neovascularización desde el tejido humano injertado hacia las células tumorales MDA 23.1.

Por consiguiente, el bloqueo del receptor $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación intravenosa de anticuerpos LM609 y péptidos específicos para $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de un carcinoma en este sistema de modelo de la misma manera que en los sistemas de modelo de CAM y de ojo de conejo, como se describe en los Ejemplos 9 y 10, respectivamente.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

En un procedimiento similar al descrito anteriormente para anticuerpos monoclonales, se inyectaron antagonistas peptídicos de $\alpha_v\beta_3$ por vía intravenosa en la vena de la cola de los ratones SCID que tenían tumores M21-L medibles. En un análisis preliminar, se realizó una curva de respuesta a la dosis para los péptidos 69601 (control) y 85189 (prueba) inyectados en un intervalo de concentraciones de 10 a 250 ug/ml. Se determinó el volumen y el peso promedio de los tumores extirpados después del tratamiento y los resultados se muestran respectivamente en las Figuras 36A y 36B. El péptido 85189 fue eficaz para inhibir el crecimiento del tumor M21-L en el intervalo de concentraciones probado para el tratamiento con el péptido de control, siendo la dosis más eficaz 250 ug/ml.

Para analizar la eficacia del tratamiento con el péptido 85189 en el transcurso del tiempo, se evaluaron dos regímenes de tratamiento en el mismo modelo de tumor de SCID. En un ensayo, el tratamiento con cualquiera de los péptidos, 85189 ó 69601, se inició el día 6, siendo el día 0 el día de la inyección de 3×10^6 células tumorales M21-L por vía subcutánea en piel de ratón, con inyecciones intraperitoneales de 250 ug/ml de péptido

85189 o de control 69601 todos los días hasta el día 29. El otro ensayo se realizó de manera idéntica con la excepción de que el tratamiento se inició el día 20. Al final de los ensayos, se extirparon los tumores y se determinó el volumen promedio del tumor en mm³. Los datos se graficaron como este valor +/- el error estándar de la media.

5

Los resultados de estos ensayos, que se muestran respectivamente en las Figuras 37A y 37B, indican que el péptido 85189, pero no el 69601, inhibió el crecimiento del tumor varios días después de iniciado el tratamiento, dependiendo del régimen de tratamiento en particular. Por consiguiente, el péptido 85189 es un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ eficaz tanto de la angiogénesis como del crecimiento tumoral.

10

12. Estimulación de las células vasculares para entrar en el ciclo celular y sufrir apoptosis en presencia de antagonistas de integrina $\alpha_v\beta_3$ según se mide en los ensayos de CAM

15

El proceso angiogénico depende claramente de la capacidad de las citocinas tales como bFGF y VEGF para estimular la proliferación de células vasculares. Mignatti y col., J. Cell. Biochem., 471: 201 (1991); Takeshita y col., J. Clin. Invest., 93: 662 (1994); y Koyama y col., J. Cell. Physiol., 158: 1 (1994). Sin embargo, también es evidente que diversas señales pueden regular la diferenciación de estas células vasculares en vasos sanguíneos maduros. Por consiguiente, es razonable pensar que la interferencia con las señales relacionadas con el crecimiento o la diferenciación de las células vasculares sometidas a nuevo crecimiento o angiogénesis pueda dar como resultado la perturbación de la angiogénesis.

20

25

Se ha mostrado que los episodios de unión de integrinas participan tanto en la proliferación celular como en la apoptosis o muerte celular programada in vitro. Schwartz, Cancer Res., 51: 1503 (1993); Meredith y col., Mol. Biol. Cell., 4: 953 (1993); Frisch y col., J. Cell Biol., 124: 619 (1994); y Ruoslahti y col., Cell, 77: 477 (1994). El examen detenido de los efectos de los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis revela la presencia de vasos sanguíneos discontinuos e interrumpidos asociados a tumores. Por consiguiente, es posible que la pérdida de continuidad de los vasos sanguíneos pueda deberse a la necrosis selectiva o apoptosis de las células vasculares.

30

35

Para explorar esta posibilidad, se examinaron las CAM después de la inducción de la angiogénesis con el factor de crecimiento bFGF y el tratamiento con el Acm y los

péptidos cíclicos de la presente invención.

A. Tratamiento con anticuerpos monoclonales (no es parte de la invención)

- 5 La apoptosis puede detectarse por una diversidad de procedimientos, que incluyen el examen directo del ADN aislado de tejidos para detectar la fragmentación del ADN y la detección de grupos 3'OH en tejido intacto con un anticuerpo que detecte específicamente los grupos 3'OH libres del ADN fragmentado .

10 1) Análisis de fragmentación de ADN

La angiogénesis se indujo mediante la colocación de discos de filtro saturados con bFGF en las CAM de embriones de 10 días de edad, como se describe en el Ejemplo 6A. El análisis inmunohistológico de las CAM con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) reveló expresión máxima de $\alpha_v\beta_3$ en los vasos sanguíneos de 12 a 24 horas después del inicio de la angiogénesis con bFGF. Por consiguiente, 24 horas después de la estimulación con bFGF, los embriones se inoculaban por vía intravenosa con 100 μ l de PBS sola o PBS que contenía 300 μ g de Acm CSAT (anti- β_1) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$).

20 La fragmentación del ADN se detectó extirpando el tejido de la CAM directamente debajo de los discos de filtro saturados con bFGF 24 ó 48 horas después de las inoculaciones intravenosas con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti- β_1) o PBS. Los tejidos de CAM extirpados se lavaron tres veces con PBS estéril y finalmente se picaron, se resuspendieron en colagenasa bacteriana al 0,25% (Worthington Biochemical; Freehold, NJ) y se incubaron durante 90 minutos a 37 °C con ocasional agitación con vórtice. Se extrajo ADN de igual cantidad de células de CAM de suspensiones de células individuales como se describió anteriormente. Bissonette, y col., Nature. 359: 552 (1992). Brevemente, se lisaron igual cantidad de células de CAM en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 10 mM en Triton X-100 al 0,5% (v/v) (Sigma, St. Louis, Missouri). Los lisados celulares se centrifugaron a 16.000 x g durante 15 minutos a 4 °C para separar el ADN fragmentado soluble del sedimento de cromatina intacta. El ADN fragmentado se lavó, se precipitó y se analizó en un gel de agarosa al 1,2% (p/v).

Se aisló ADN fragmentado soluble de una cantidad igual de las células de CAM de cada tratamiento, se separó por medio de electroforesis sobre un gel de agarosa y se visualizó

por tinción con bromuro de etidio. No se detectaron diferencias en la cantidad relativa de fragmentación del ADN resultante de los tres diferentes tratamientos 24 horas después del tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas después del tratamiento con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), se observó un aumento significativo de fragmentación del ADN cuando se comparó con los embriones tratados con Acm CSAT (anti- β_1) o PBS sola.

2) Estimulación de las células vasculares para entrar en el ciclo celular

Para examinar de manera experimental la función de $\alpha_v\beta_3$ en estos procesos, las células obtenidas de CAM tratada con o sin bFGF se tiñeron con yoduro de propidio y se realizó la inmunorreacción con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$).

Las CAM aisladas de embriones a las 24 y 48 horas después del tratamiento con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti- β_1) o PBS se disociaron en suspensiones de células individuales por incubación con colagenasa bacteriana como se describió anteriormente. Las células individuales, a continuación, se permeabilizaron y se tiñeron con el Kit de detección in situ Apop Tag según las instrucciones del fabricante (Oncor, Gaithersburg, MD). APOP Tag es un anticuerpo que detecta específicamente grupos 3' OH libres de ADN fragmentado. La detección de tales grupos 3'OH libres es un procedimiento establecido para la detección de células apoptóticas. Gavrieli y col., J. Cell Biol., 119: 493 (1992).

A continuación se aclararon las células teñidas con APOP Tag en Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS y se resuspendieron en tampón FACS que contenía BSA al 0,5% (p/v), azida sódica al 0,02% (p/v) y RNasa A 200 ug/ml en PBS. Las células se incubaron durante 1,5 horas, se lavaron y se analizaron por clasificación de células activadas por fluorescencia. La fluorescencia de las células se midió utilizando un citómetro de flujo FACScan y los datos se analizaron como se describe a continuación.

La fluorescencia de las células se midió con un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California). La dispersión lateral (SSC) y la dispersión frontal (FSC) se determinaron simultáneamente y todos los datos se recogieron con un ordenador Hewlet Packard (HP9000) equipado con el programa informático de investigación FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California). Los datos se analizaron con el programa informático P.C Lysis version I (Becton Dickinson, Mountain

View, California). Las regiones de control negativo se establecieron usando suspensiones celulares sin la adición de anticuerpos primarios del kit de Apop Tag. Se aplicaron regiones idénticas a ambas poblaciones de células dando como resultado el análisis de aproximadamente 8.000 células por diferente tratamiento celular.

5

El porcentaje de células individuales obtenidas de las CAM tratadas con Acm y teñidas con Apop Tag según se determinó por el análisis FACS se muestra en la Figura 18. La barra negra representa las células de embriones tratados 24 horas antes del análisis. La barra punteada representa las células de embriones tratados 48 horas antes del análisis.

10 Cada barra representa la media $\pm$ E.E. de tres repeticiones.

Como se muestra en la Figura 18, las CAM tratadas dos días antes con el Acm (anti- $\alpha_v\beta_3$) mostraron un aumento de 3 a 4 veces en la tinción de Apop Tag en comparación con las CAM tratadas con PBS sola o CSAT (anti- β_1).

15

B. Tratamiento con péptidos sintéticos (no es parte de la invención)

Los ensayos de CAM con angiogénesis inducida por factor de crecimiento, como se describe en el Ejemplo 6A, también se realizaron con los péptidos sintéticos de la presente invención para determinar el efecto de péptidos cíclicos en la apoptosis. Se prepararon los péptidos ciclo-RGDfV (66203) y ciclo-RADfV (69601) como se describe en el Ejemplo 1. Se inyectaron las disoluciones de péptido o PBS en la preparación de CAM en una concentración de 300 ug/ml. A las 24 y 48 horas, el papel de filtro y los tejidos de CAM circundantes se diseccionaron y se tiñeron con Apop Tag para detectar la apoptosis, como se describió anteriormente en el Ejemplo de la 12A2).

20

25

Como se muestra en la Figura 18, las CAM tratadas dos días antes con el péptido 69203 (ciclo-RGDfV) mostraron un aumento de 3 a 4 veces en la tinción Apop Tag en comparación con las CAM tratadas con PBS sola o con el péptido cíclico 69601 (ciclo-RADfV) de control.

30

C. Efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales en la apoptosis y el ciclo celular (no es parte de la invención)

35 Las suspensiones de células individuales también se examinaron para evaluar el número

de copias de ADN cromosómico por tinción con yoduro de propidio para determinar el efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales en el ciclo celular y para la apoptosis por tinción con Apop Tag.

- 5 Las suspensiones de células individuales de CAM tratadas 24 ó 48 horas antes con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o CSAT (anti- β_1) o con PBS se prepararon como se describe en el Ejemplo 12A1).

10 Para la tinción de las células con Apop Tag, se lavaron las suspensiones celulares tres veces con tampón que contenía BSA al 2,5% (p/v) y azida de sodio al 0,25% (p/v) en PBS. A continuación se fijaron las células en paraformaldehído al 1% (p/v) en PBS durante 15 minutos, seguido por tres lavados, como se describió anteriormente. Para evitar la unión inespecífica, las suspensiones de células individuales se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en PBS durante la noche a 4 °C. A continuación se lavaron las células
15 como antes, se tiñeron con Apop Tag y se midió la fluorescencia de las células con un FACScan como se describió anteriormente en el Ejemplo 12A.

Las células de cada condición experimental se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma, St. Louis, Missouri) a 10 ug/ml en PBS durante 1 hora, se lavaron dos veces con PBS y se
20 analizaron las características nucleares típicas de la apoptosis, incluyendo la condensación de la cromatina y la segmentación. El porcentaje de células apoptóticas se estimó por medio del análisis morfológico de las células de al menos 10 a 15 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

25 Los resultados combinados de las suspensiones de células individuales de CAM de embriones tratadas con CSAT (anti- β_1) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), teñidas con Apop Tag y yoduro de propidio y analizadas por FACS se presentan en la Figura 19. El eje Y representa la tinción con Apop Tag (apoptosis), el eje X representa la tinción con yoduro de propidio (contenido de ADN). La línea horizontal representa la región negativa para la
30 tinción Apop Tag. Los paneles de la izquierda y de la derecha indican las células de CAM de embriones tratados con CSAT y LM609, respectivamente. El análisis del ciclo celular se realizó por medio del análisis de aproximadamente 8.000 episodios por condición y los datos se representan en un trazado de contornos.

35 Las muestras de células individuales teñidas con la tinción para ADN, yoduro de propidio,

reveló que el 25-30% de las células de CAM tratadas con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) 48 horas después del tratamiento mostraban pruebas de condensación nuclear y/o segmentación. Estos procesos son característicos de las células que están sufriendo apoptosis. Esto contrasta con las CAM tratadas con CSAT (anti- β_1) en las que el 90-95% de las células mostraron una tinción nuclear normal.

Como se muestra en la Figura 19, de manera coherente con la inducción de la apoptosis por LM609, se observó un número significativo de células en un pico que contenía menos de una copia de ADN (AO). Este pico se ha mostrado previamente para representar el ADN fragmentado en la etapa tardía de las células apoptóticas. Telford y col., Cytometry, 13: 137 (1992). Por otra parte, estas células AO se tiñen fácilmente con Apop Tag, confirmando la capacidad de este reactivo para detectar las células apoptóticas. Sin embargo, además de la tinción de células en AO, también se tiñó un número significativo de células que contenían más de una copia de ADN con Apop Tag (Figura 19). Estos resultados demuestran que LM609 tiene la capacidad de promover la apoptosis entre las células vasculares que ya habían entrado en el ciclo celular. Por el contrario, las células obtenidas de las CAM de control que habían entrado en el ciclo celular mostraron una mínima tinción Apop Tag, coherente con las pocas células apoptóticas detectadas en las CAM tratadas de control.

Entre las células en las CAM estimuladas con bFGF que habían entrado en el ciclo celular (fase S y G2/M), el 70% mostraron tinción positiva con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$). Esto se compara con el 10% de tinción con LM609 observado entre las células en el ciclo de las CAM no tratadas con bFGF. Estos hallazgos indican que después de la estimulación con bFGF, la mayoría de las células que tienen $\alpha_v\beta_3$ muestran proliferación activa.

Tomados juntos, estos hallazgos indican que la inyección intravenosa del Acm LM609 o del péptido cíclico antagonista de $\alpha_v\beta_3$ promueve la apoptosis dentro de la CAM de pollo después de la inducción de la angiogénesis.

También se realizó el examen histológico de las CAM para verificar la expresión de $\alpha_v\beta_3$ por inmunorreactividad con LM609 y para las células que estaban sufriendo apoptosis por inmunorreactividad con Apop Tag. Las secciones de CAM extirpadas de embriones tratadas 48 horas antes con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti- β_1) o PBS preparadas en el Ejemplo 5A se lavaron, se incluyeron en OTC (Baxter) y se congelaron rápidamente en

nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de seis micrómetros de los tejidos de CAM, se fijaron en acetona durante 30 segundos y se almacenaron a -70 °C hasta el uso. Las secciones de tejido se prepararon para la tinción por un breve aclarado en etanol (ETOH) al 70% (v/v) seguido por el lavado tres veces en PBS. A continuación, se bloquearon las secciones con BSA al 5% (p/v) en PBS durante 2 horas, seguido por la incubación con el Acm LM609 en una concentración de 10 ug/ml 2 horas. A continuación, se lavaron las secciones y se incubaron con una dilución 1:50 de IgG anti-ratón de conejo conjugada con rodamina (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) durante 2 horas. Por último, las mismas secciones se lavaron y se tiñeron con Apop Tag como se describe en el Ejemplo 12A2). Las secciones de tejido teñidas se montaron y se analizaron por microscopía confocal de inmunofluorescencia.

En la Figura 20, los paneles A a C representan tejido de CAM de embriones tratados con CSAT (anti- β_1) y los paneles D a F representan tejido de CAM de embriones tratados con LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$). Los paneles A y D representan los tejidos teñidos con Apop Tag y visualizados por fluorescencia (FITC) superpuestos en una imagen de contraste de interferencia diferencial. Los paneles B y E representan los mismos tejidos teñidos con Acm LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) y visualizados por fluorescencia (rodamina). Los paneles C y F representan imágenes combinadas de los mismos tejidos teñidos con Apop Tag y LM609, donde la tinción amarilla representa colocalización. La barra representa 15 y 50 μ m en los paneles izquierdo y derecho, respectivamente.

Como se muestra en la Figura 20 (A-C), tras la inyección intravenosa de CSAT o control PBS, la tinción con Apop Tag apareció mínimamente y de forma aleatoria, indicando un nivel mínimo de apoptosis dentro del tejido. Por el contrario, las CAM de embriones previamente tratados con LM609 o péptido cíclico 203 mostraron la mayoría de los vasos intensamente teñidos con Apop Tag, mientras que se observó reactividad mínima entre las células no vasculares circundantes (Figura 20 D-F). Por otra parte, cuando se usaron Apop Tag y LM609 para teñir estos tejidos (19 C y 19F) sólo se observó colocalización significativa entre estos marcadores en las CAM procedentes de embriones tratados con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ (Figura 20F). Estos hallazgos demuestran que después de la inducción de la angiogénesis *in vivo*, los inhibidores de integrina $\alpha_v\beta_3$ promueven selectivamente la apoptosis de los vasos sanguíneos que tienen $\alpha_v\beta_3$.

Si bien la angiogénesis es un proceso complejo en el que participan muchos

acontecimientos moleculares y biológicos celulares, varias líneas de pruebas sugieren que la integrina de células vasculares $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función relativamente tardía en este proceso. En primer lugar, el análisis de inmunohistológico revela que la expresión de $\alpha_v\beta_3$ en las células vasculares alcanzó un máximo de 12 a 24 horas después de la inducción de la angiogénesis con bFGF. En segundo lugar, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ perturbaban la angiogénesis inducida por múltiples activadores, sugiriendo que este receptor está implicado en una vía común posterior quizás a todas las señales primarias que dan lugar a la angiogénesis. En tercer lugar, las CAM tratadas con Acm LM609 o péptido cíclico no mostraron un aumento significativo en la apoptosis, según se mide por el aumento de fragmentación del ADN hasta 48 horas después del tratamiento con estos antagonistas. Por último, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ promueven la apoptosis de las células vasculares que ya han sido inducidas a entrar en el ciclo celular.

Los resultados presentados en el presente documento proporcionan la primera evidencia directa de que los episodios de unión de integrinas pueden regular la supervivencia de las células in vivo. Por consiguiente, se presenta la hipótesis de que, una vez que comienza la angiogénesis, las células vasculares individuales se dividen y comienzan a avanzar hacia la fuente de angiogénesis, tras lo que, la unión $\alpha_v\beta_3$ proporciona una señal que permite la supervivencia celular continua que da lugar a la diferenciación y la formación de los vasos sanguíneos maduros. Sin embargo, si se impide la unión $\alpha_v\beta_3$, entonces las células dejan de recibir esta señal molecular y las células entran en apoptosis por defecto. Esta hipótesis también podría predecir que, después de producida la diferenciación, los vasos sanguíneos maduros ya no requieren las señales de $\alpha_v\beta_3$ para la supervivencia y por consiguiente son refractarios a los antagonistas de esta integrina.

Por último, los resultados presentados en el presente documento proporcionan pruebas de que los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ pueden proporcionar un poderoso enfoque terapéutico para el tratamiento de neoplasias u otras enfermedades que se caracterizan por la angiogénesis. En primer lugar, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ interrumpen los vasos sanguíneos de nueva formación sin afectar a la vasculatura preexistente. En segundo lugar, estos antagonistas no tuvieron efectos significativos sobre la viabilidad del embrión de pollo, sugiriendo que no son tóxicos. En tercer lugar, la angiogénesis se bloqueó significativamente independientemente de los estímulos angiogénicos. Por último, la administración sistémica de los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ causa una dramática regresión de diversos tumores humanos histológicamente diferentes.

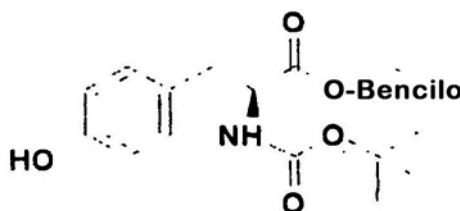
13. Preparación de moléculas orgánicas de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$

La síntesis de los antagonistas orgánicos de $\alpha_v\beta_3$, Compuestos 7 (96112), 9 (99799), 10 (96229), 12 (112854), 14 (96113), 15 (79959)*, 16 (81218)*, 17 (87292)* y 18 (87293)* se describe a continuación y también se muestra en las figuras indicadas. Los antagonistas orgánicos también se denominan por los números entre paréntesis. Las moléculas orgánicas resultantes, denominadas miméticos orgánicos de la presente invención como se ha definido anteriormente, se utilizan a continuación en los procedimientos para inhibir la angiogénesis mediada por $\alpha_v\beta_3$ como se describe en Ejemplo 11.

*(no es parte de la invención)

Para cada una de las síntesis que se describen a continuación, las rotaciones ópticas se midieron en un espectrofotómetro UV Perkin-Elmer 241 y los espectros visibles se registraron en un espectrómetro Beckmann DU-70. Los espectros de RMN de ^1H y ^{13}C se registraron a 400 y 500 MHz en espectrómetros Bruker AMX-400 y AMX-500. La espectrometría de masas de alta resolución (EMAR) se registró en un espectrómetro de masas VG ZAB-ZSE bajo condiciones de bombardeo de átomos rápidos (BAR). La cromatografía en columna se llevó a cabo con gel de sílice de malla 70-230. La TLC preparativa se llevó a cabo en Merck Art. 5744 (0,5 mm). Los puntos de fusión se tomaron en un aparato de Thomas Hoover.

A. Compuesto 1: benciléster de t-Boc-L-tirosina según se ilustra en la Figura 38

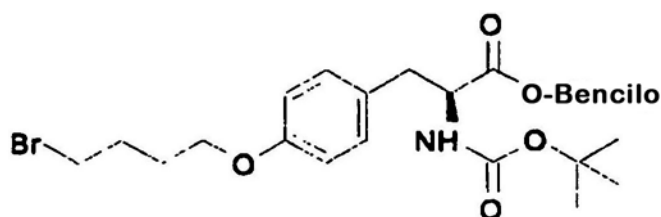


COMPUESTO 1

A una disolución de N-(terc-butxicarbonil)-L-tirosina (t-Boc-L-tirosina) (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno 0,10 M (M) se le añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1,5 equivalentes) a 25 °C y se dejó en agitación durante 1 hora. A continuación, se añadieron 1,5 equivalentes de alcohol bencilico y la mezcla se agitó durante otras 12 horas a 25 °C. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó dos veces (2X) con agua, una vez (1X) con salmuera y se secó sobre sulfato

de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice. El Compuesto **1**, benciléster de t-Boc-L-tirosina también puede adquirirse en el comercio de Sigma.

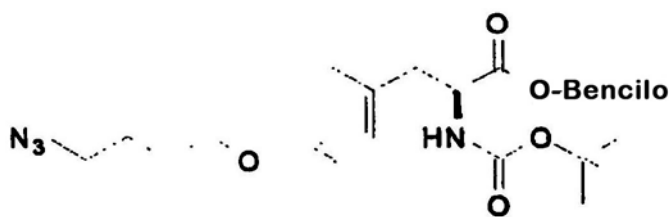
B. Compuesto 2: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(4-bromobutiloxi)fenil-2-N-terc-butiloxicarbonil-propiónico según se ilustra en la etapa i de la Figura 38



COMPUESTO 2

Se calentó una mezcla de benciléster de t-Boc-L-tirosina (2 gramos, 5,38 mmol; sintetizado como se describió anteriormente), 1,4-dibromobutano (1,9 ml, 16,2 mmol; Aldrich), carbonato de potasio (5 g) y 18-corona-6 (0,1 g; Aldrich), a 80 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se filtró el precipitado y la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad en vacío. A continuación se purificó el producto bruto por medio de cristalización usando hexanos al 100% dando 2,5 g (92%) del Compuesto **2**.

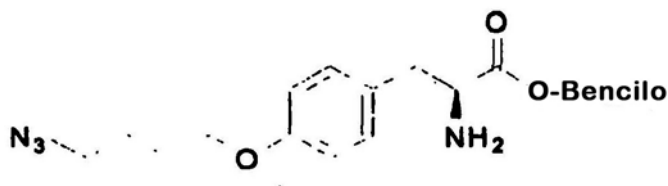
C. Compuesto 3: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil-2-N-terc-butiloxicarbonil-propiónico según se ilustra en la etapa ii de la Figura 38



COMPUESTO 3

El Compuesto **2** (2,5 g, 4,9 mmol) se agitó con azida sódica (1,6 g, 25 mmol) en dimetilformamida (DMF) (20 ml) a 25 °C durante 12 horas. A continuación se evaporó el disolvente y el residuo se trató con agua (aproximadamente 10 ml) y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secó por medio de sulfato de magnesio y se evaporó dando 2,0 gramos (90%) del Compuesto **3** como un jarabe incoloro (EM-BAR: 469 (M+H⁺)).

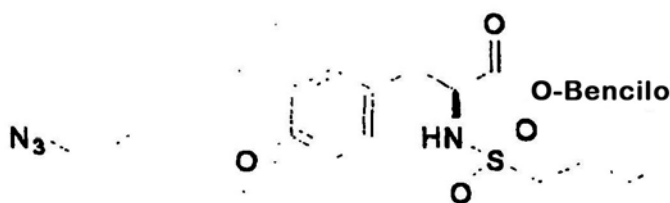
D. Compuesto 4: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil)-2-amino-propiónico según se ilustra en la etapa iii de la Figura 38



COMPUESTO 4

El Compuesto **3** (2,0 g (4,4 mmol)) se disolvió en ácido trifluoroacético (TFA; 2 ml) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La evaporación en vacío dio 1,6 gramos (cuantitativo) del Compuesto **4** como un jarabe transparente que se usó sin otra purificación para la siguiente etapa. EM-BAR: 369 (M+H+).

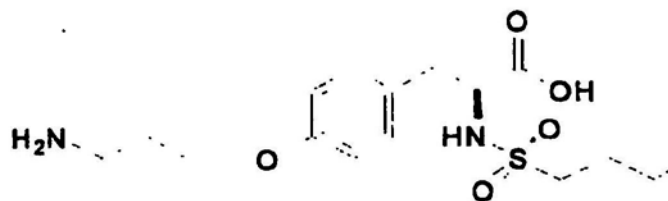
E. Compuesto 5: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil)-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa iv de la Figura 38



COMPUESTO 5

Una mezcla de Compuesto **4** (1,6 g; 4,3 mmol), cloruro del ácido butansulfónico (0,84 ml; 6,6 mmol) y trietilamina (1,5 equivalentes) se agitó en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se evaporó a continuación y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad, se purificó el producto bruto por medio de cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) dando 1,4 gramos (67%) de Compuesto **5** como un sólido amorfo.

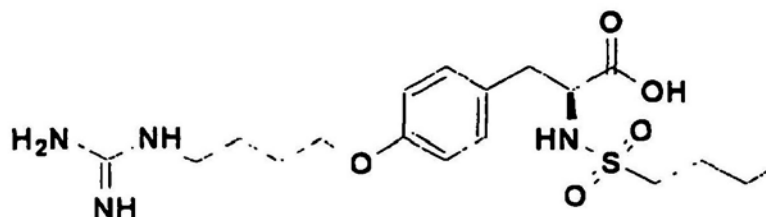
F. Compuesto 6: Ácido (S)-3-(4-(4-aminobutiloxi)fenil)-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa v de la Figura 38



5 COMPUESTO 6

El Compuesto **5** (1,3 g (2,6 mmol) se disolvió en 20 ml de acetato de etilo/metanol/agua 5/3/1 y 0,2 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y se sometió a hidrogenación bajo hidrógeno (1 atmósfera; aparato de Parr Shaker) a 25 °C en presencia de 100 mg de paladio (al 10% sobre carbón vegetal). Tras 3 horas, se extrajo el catalizador por filtración y el disolvente se evaporó para dar el Compuesto 6 como un residuo aceitoso. Tras liofilizar a partir de agua, se obtuvo 1,0 gramo (cuantitativo) del Compuesto **6** como un polvo blanco. EM-BAR: 373 (M^+H^+).

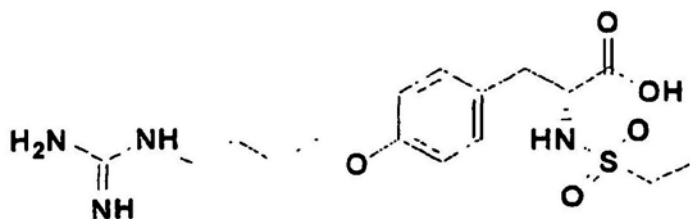
15 G. Compuesto 7: Ácido (S)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa vi de la Figura 38



20 COMPUESTO 7

Se calentó el Compuesto **6** (200 mg; 0,5 mmol), nitrato de 3,5-dimetilpirazol-1-carboxamidina (DPFN) (170 mg; 0,8 mmol; Aldrich Chemical Company) y trietilamina (0,15 ml, 1,0 mmol) en dimetilformamida (DMF; 5 ml) a 60 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se evaporó el disolvente en vacío, y el residuo se purificó por medio de HPLC (Lichrocart RP-18, gradiente de acetonitrilo/agua + TFA al 0,3% 99:1 hasta 1:99) dando 50 mg (25%) del Compuesto **7** como un polvo blanco, amorfo, tras la liofilización. EM-BAR: 415 (M^+H^+), p.f.: 70 °C.

35 H. Compuesto 8: Ácido (S)-3-(4-(4-aminobutiloxi)fenil-2-N-terc.butiloxycarbonil-propiónico según se ilustra en la etapa iii de la Figura 39

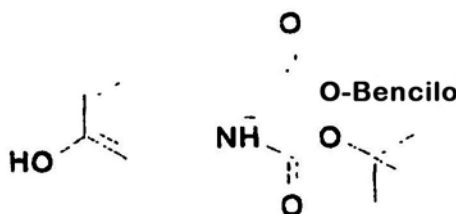


5 COMPUESTO 10

Para preparar el análogo de D-tirosina **10** se usó la secuencia de reacciones idéntica usada para sintetizar el Compuesto **7**. Se obtuvieron 205 mg del análogo como un material blanco, amorfo, EM-BAR: 415 (M^+H^+) de la siguiente manera usando los

10 Compuestos intermedios **100-600** para formar el Compuesto **10**:

1) Compuesto 100: benciléster de t-Boc-D-tirosina según se ilustra en la Figura 40



15

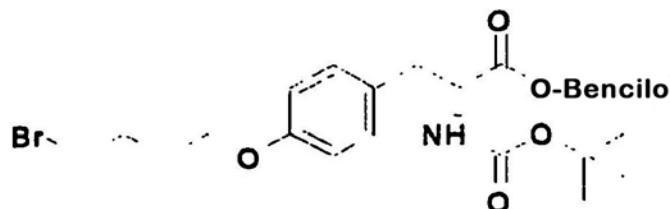
COMPUESTO 100

A una disolución de N-(terc-butxicarbonil)D-tirosina (t-Boc-L-tirosina) (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno 0,10 M se le añadió diciclohexilcarbodiimida (DCC) (1,5 equivalentes) a 25 °C y se dejó en agitación durante 1 hora. A continuación, se añadieron

20 1,5 equivalentes de alcohol bencilico y la mezcla se agitó durante otras 12 horas a 25 °C. La mezcla de reacción se diluyó a continuación con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de

25 cromatografía en columna en gel de sílice.

2) Compuesto 200: Benciléster del ácido (R)-3-(4-(4-bromobutiloxi)fenil-2-N-terc-butiloxicarbonil-propiónico según se ilustra en la etapa i de la Figura 40



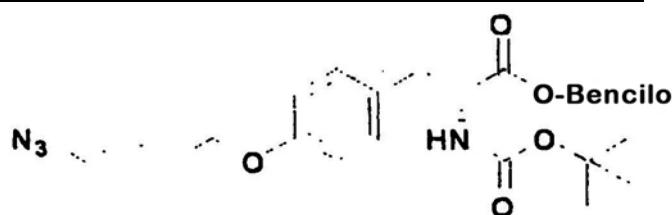
30

COMPUESTO 200

35 Se calentó una mezcla de benciléster de t-Boc-D-tirosina (2 gramos, 5,38 mmol;

sintetizado como se describió anteriormente), 1,4-dibromobutano (1,9 ml, 16,2 mmol; Aldrich), carbonato de potasio (5 g) y 18-corona-6 (0,1 g; Aldrich), a 80 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se filtró el precipitado y la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad en vacío. A continuación se purificó el producto bruto por medio de
 5 cristalización usando hexanos al 100% dando 2,5 g (92%) de Compuesto **200**.

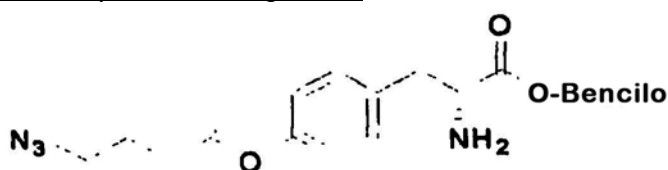
3) Compuesto **300**: Benciléster del ácido (R)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil-2-N-terc-butiloxicarbonil-propiónico según se ilustra en la etapa ii de la Figura 40



COMPUESTO 300

Se agitó el Compuesto **200** (2,5 g, 4,9 mmol) con azida sódica (1,6 g, 25 mmol) en dimetilformamida (DMF) (20 ml) a 25 °C durante 12 horas. A continuación se evaporó el disolvente y el residuo se trató con agua (aproximadamente 10 ml) y se extrajo dos veces con acetato de etilo. Las fases orgánicas se combinaron, se secó por medio de sulfato de magnesio y se evaporó dando 2,0 gramos (90%) del Compuesto **300** como un jarabe
 20 incoloro. EM-BAR: 469 (M+H⁺).

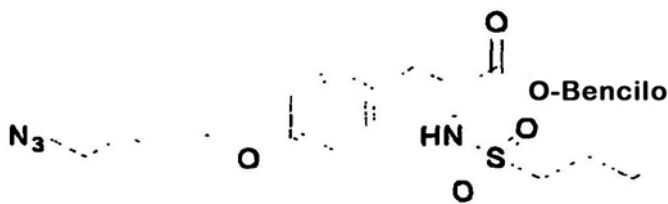
4) Compuesto **400**: Benciléster del ácido (R)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil-2-amino-propiónico según se ilustra en la etapa iii de la Figura 40



COMPUESTO 400

Se disolvió el Compuesto **300** (2,0 g (4,4 mmol)) en ácido trifluoroacético (TFA; 2 ml) y se agitó durante 3 horas a temperatura ambiente. La evaporación en vacío dio 1,6 gramos (cuantitativo) del Compuesto **400** como un jarabe incoloro que se usó sin otra purificación para la siguiente etapa. EM-BAR: 369 (M⁺H⁺).

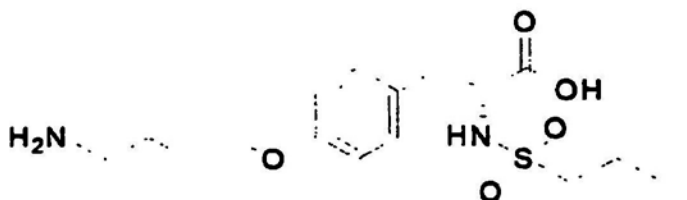
5) Compuesto **500**: Benciléster del ácido (R)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa iv de la Figura 40



COMPUESTO 500

Se agitó una mezcla de Compuesto **400** (1,6 g; 4,3 mmol), cloruro del ácido butanosulfónico (0,84 ml; 6,6 mmol) y trietilamina (1,5 equivalentes) en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación se evaporó la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad se purificó el producto bruto por medio de cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) dando 1,4 gramos (67%) del Compuesto **500** como un sólido amorfo.

6) Compuesto **600**: Ácido (R)-3-(4-(4-aminobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa v de la Figura 40



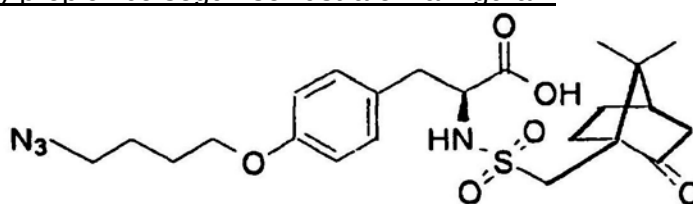
COMPUESTO 600

Se disolvió el Compuesto **500** (1,3 g (2,6 mmol) en 20 ml de acetato de etilo/metanol/agua 5/3/1 y 0,2 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y se sometió a hidrogenación bajo hidrógeno (1 atmósfera; aparato de Parr Shaker) a 25 °C en presencia de 100 mg de paladio (al 10% sobre carbón vegetal). Tras 3 horas, se extrajo el catalizador por filtración y el disolvente se evaporó para dar el Compuesto 600 como un residuo aceitoso. Tras liofilizar a partir de agua se obtuvo 1,0 gramo (cuantitativo) del Compuesto **600** como un polvo blanco. EM-BAR: 373 (M^+H^+).

7) Compuesto **10**: Ácido (R)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en la etapa vi de la Figura 40

Se calentó el Compuesto **600** (200 mg; 0,5 mmol), nitrato de 3,5-dimetilpirazol-1-carboxamidina (DPFN) (170 mg; 0,8 mmol; Aldrich Chemical Company) y trietilamina (0,15 ml, 1,0 mmol) en dimetilformamida (DMF; 5 ml), a 60 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se evaporó el disolvente en vacío, y el residuo se purificó por medio de HPLC (Lichrocart RP-18, gradiente de acetonitrilo/agua + TFA al 0,3% 99:1 hasta 1:99) dando 50 mg (25%) del Compuesto **10** como un polvo blanco, amorfo, tras la liofilización. EM-BAR: 415 (M^+H^+), p.f.: 70 °C.

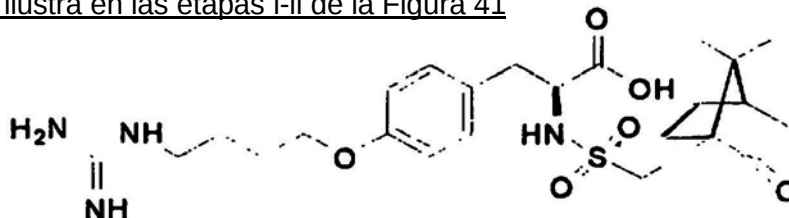
K. Compuesto 11: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(4-azidobutiloxi)fenil-2-(10-canforsulfonamido)-propiónico según se ilustra en la Figura 4



COMPUESTO 11

Se agitó una mezcla de compuesto 4 (1,0 g; 2,7 mmol), cloruro del ácido 10-canforsulfónico (6,6 mmol; Aldrich Chemical Company) y trietilamina (1,5 equivalentes) en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación se evaporó la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad el producto bruto se purificó por medio de cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) dando 1,4 gramos (67%) del compuesto 11 como un sólido amorfo.

L. Compuesto 12: Ácido (S)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-(10-canforsulfonamido)-propiónico según se ilustra en las etapas i-ii de la Figura 41



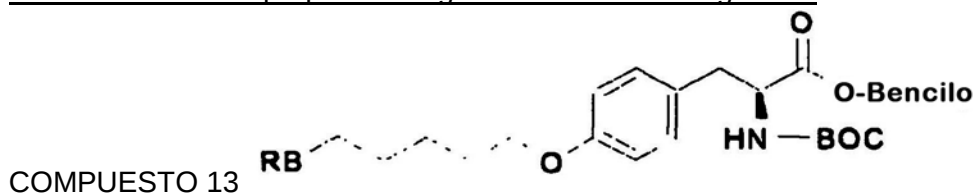
COMPUESTO 12

El Compuesto **12** se obtuvo tras la hidrogenación y guanilación del Compuesto **11** según las siguientes condiciones:

Etapa i: el Compuesto **11** (1,3 g; 2,6 mmol) se disolvió en 20 ml de acetato de etilo/metanol/agua 5/3/1 y 0,2 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y se sometió a hidrogenación bajo hidrógeno (1 atmósfera; aparato de Parr Shaker) a 25 °C en presencia de 100 mg de paladio (al 10% sobre carbón vegetal). Tras 3 horas, se extrajo el catalizador por filtración y el disolvente se evaporó para dar la amina intermedia como un residuo aceitoso. Tras liofilizar a partir de agua se obtuvo 1,0 gramo (cuantitativo) de la amina intermedia como un polvo blanco, el que se utilizó de la siguiente manera:

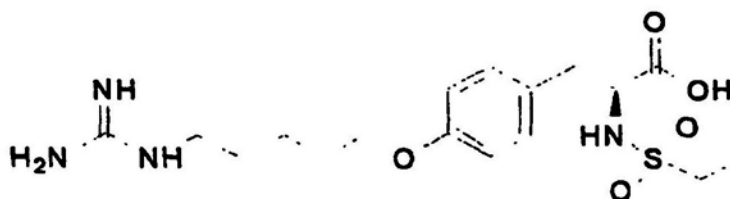
Etapa ii: se calentó el compuesto amina intermedio formado anteriormente (200 mg; 0,5 mmol), nitrato de 3,5-dimetilpirazol-1-carboxamida (DPFN) (170 mg; 0,8 mmol; Aldrich Chemical Company) y trietilamina (0,15 ml, 1,0 mmol) en dimetilformamida (DMF; 5 ml), a 60 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se evaporó el disolvente en vacío, y el residuo se purificó por medio de HPLC (Lichrocart RP-18, gradiente de acetonitrilo/agua + TFA al 0,3% 99:1 hasta 1:99) dando 50 mg (25%) del Compuesto **12** como un polvo blanco, amorfo, tras la liofilización. EM-BAR: 509,6 (M^+H^+).

M. Compuesto **13**: Benciléster del ácido (S)-3-(4-(5-bromopentiloxi)fenil-2-N-tert.butiloxycarbonil-propiónico según se ilustra en la Figura 41



Se calentó una mezcla de benciléster de t-Boc-L-tirosina (4,5 gramos, 12,1 mmol; el Compuesto **1** sintetizado como se describió anteriormente), 1,5-dibromopentano (5 ml, 36,7 mmol; Aldrich), carbonato de potasio (10 g) y 18-corona-6 (0,25 g; Aldrich) a 80 °C durante 12 horas. Tras enfriar, se filtró el precipitado y la mezcla de reacción se evaporó hasta sequedad en vacío. A continuación se purificó el producto bruto por medio de cristalización usando hexanos al 100% dando 5,35 g (85%) del Compuesto **13**.

N. Compuesto **14**: Ácido (S)-3-(4-(5-guanidinopentiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico según se ilustra en las etapas i-v de la Figura 41

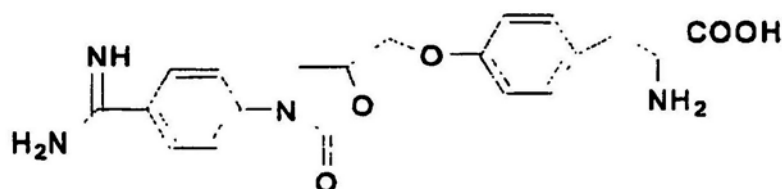


COMPUESTO 14

La secuencia de reacciones de 5 etapas de intercambio bromuro-azida, escisión de Boc, sulfonilación con cloruro de ácido butanosulfónico, hidrogenación y guanilación con DPFN se llevó a cabo de manera idéntica a los procedimientos anteriores usando los Compuestos intermedios **1-6** para formar el Compuesto **7** o los procedimientos usando los Compuestos 100-600 para formar el Compuesto **10**, como se dio a conocer anteriormente. El Compuesto **14** se obtuvo como un polvo blanco EM-BAR: 429 (M^+H^+).

- O. Compuesto **15**: Diclorhidrato de 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-amino-etil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona, según se muestra en la Figura 42

1) Síntesis del material de partida 2-N-BOC-amino-3(4-hidroxi-fenil)propionato para el Compuesto **15**



COMPUESTO 15

- El material de partida 2-N-BOC-amino-3-(4-hidroxifenil)propionato se obtuvo por medio de la esterificación de (D o L), N-(terc-butoxicarbonil)-L(D)-tirosina (t-Boc-L(D)-tirosina) (1,0 equivalente; Sigma) en metanol 0,10 M y HCl diluido al 1%. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 12 horas y a continuación se neutralizó por medio de carbonato de potasio y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 2-N-BOC-amino-3-(4-hidroxifenil)propionato.

- 2) Síntesis del material de partida 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona para el Compuesto **15**: procedimiento de 3 etapas de la siguiente manera:

Se agitó p-amino-benzonitrilo (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) con 2,3-epoxipropanol (1,0 equivalente; Aldrich) durante 12 horas a 25 °C. A continuación, se eliminó el disolvente en vacío y el 4-(2,3-

dihidroxipropilamino)benzonitrilo bruto se llevó a la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en dimetilformamida (0,10 M), a 25 °C, con carbonato de dietilo (1,1 equivalente; Aldrich) y terc-butilato de potasio (1,1 equivalentes; Aldrich) a 110 °C durante 6 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina y se llevó a la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C con 1,1 equivalentes de sulfuro de hidrógeno, 1,1 equivalentes de yoduro de metilo y 1,1 equivalentes de acetato de amonio. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y a continuación se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación, se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la amidina que se llevó a la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se protegió 1,0 equivalente de la amidina, sintetizada como se describió anteriormente, con 1,1 equivalentes de BOC-ON (2-(BOC-oxiimino)-2-fenilacetoneitrilo; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C y se agitó durante 6 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se esterificó posteriormente en cloruro de metileno 0,10 M y 1,1 equivalentes de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 6 horas y a continuación se extinguió con agua (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona.

3) Acoplamiento del intermedio 2-N-BOC-amino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato con 3-p-N-BOC-amidinofenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona para formar la forma protegida del Compuesto 15, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2N-BOC-aminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona

5

Se agitó una mezcla de 1,9 gramos de 2-N-BOC-amino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato (como se describió anteriormente), 20 ml de dimetilformamida (DMF) y NaH (1,0 equivalente), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la agitación, se añadieron 1,8 gramos de 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona (como se describió anteriormente) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se agitó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la forma protegida del Compuesto 15, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2N-BOC-aminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona, que se llevó a la siguiente etapa.

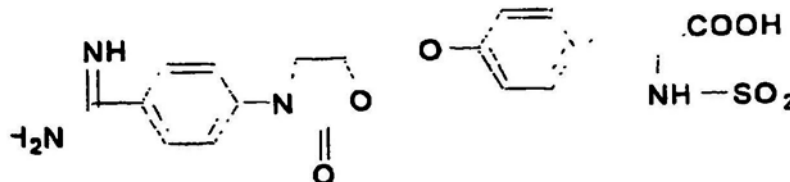
4) Desprotección de la forma protegida del Compuesto 15 para formar el Compuesto 15: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-amino-etil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona, diclorhidrato, Figura 42

Se realizó el tratamiento de la forma protegida del Compuesto 15, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2N-BOC-aminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona (1,0 equivalente; sintetizado como se describió anteriormente), con 4 ml de NaOH 2N durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación, la mezcla se trató añadiendo gota a gota 40 ml de disolución de HCl 2N en dioxano a 0 °C hasta 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se extinguió posteriormente con bicarbonato de sodio (5 equivalentes) y a continuación se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el Compuesto 15: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-amino-etil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona, diclorhidrato; p.f. 165 °C(d).

35

P. Compuesto 16: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-butilsulfonilaminoetil)fenoxi)-metil-2-oxazolidinona según se muestra en la Figura X (antigua 14)

1) Síntesis del material de partida 2-N butilsulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato para el Compuesto 16



COMPUESTO 16

El material de partida 2-N-butilsulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato se obtuvo por medio de la esterificación de ((D o L) tirosina) (1,0 equivalente; Sigma) en metanol 0,10 M y HCl diluido al 1%. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 12 horas y a continuación se neutralizó por medio de carbonato de potasio y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se utilizó posteriormente de la siguiente manera:

Se agitó una mezcla del compuesto anterior (4,3 mmol), cloruro del ácido butanosulfónico (6,6 mmol) y trietilamina (1,5 equivalentes) en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación, se evaporó la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad el producto bruto se purificó por medio de cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) para dar el compuesto del título.

2) Síntesis del material de partida 3-p-N-BOC-amidinofenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona para el Compuesto 16: procedimiento de 3 etapas de la siguiente manera:

Se agitó p-amino-benzonitrilo (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) con 2,3-epoxipropanol (1,0 equivalente; Aldrich) durante 12 horas a 25 °C. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo bruto se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 4-(2,3-dihidroxiopropilamino)benzonitrilo (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en dimetilformamida (0,10 M), a 25 °C, con carbonato de dietilo (1,1 equivalentes; Aldrich) y terc-butilato de potasio (1,1 equivalentes; Aldrich) a 110 °C durante 6 horas. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina y utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C con 1,1 equivalentes de sulfuro de hidrógeno, 1,1 equivalentes de yoduro de metilo, y 1,1 equivalentes de acetato de amonio. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y a continuación se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la amidina que se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se protegió 1,0 equivalente de la amidina, sintetizada como se describió anteriormente, con 1,1 equivalentes de BOC-ON (2-(BOC-oxiimino)-2-fenilacetoneitrilo; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C y se agitó durante 6 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se esterificó posteriormente en 0,10 M cloruro de metileno y 1,1 equivalentes de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 6 horas y a continuación se extinguió con agua (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona.

3) Acoplamiento de intermedio 2-N-butilsulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato con 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona para formar la forma protegida del Compuesto 16. 3-(4-BOC-amidinofenil)-5(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-

butilsulfonilaminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona

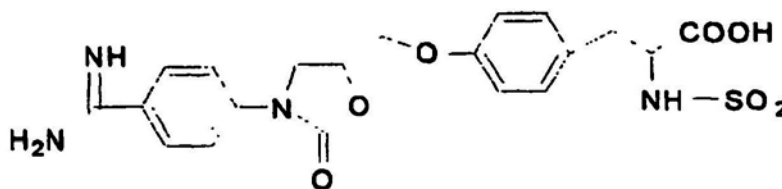
Se agitó una mezcla de 1,9 gramos de 2-N-butilsulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato (como se describió anteriormente), 20 ml de dimetilformamida (DMF) y NaH (1,0 equivalente), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras agitar, se añadieron 1,8 gramos de 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona (como se describió anteriormente) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se agitó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la forma protegida del Compuesto 16, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-butilsulfonilaminoetil)-fenioxilmetil-2-oxazolidinona que se utilizó en la siguiente etapa.

4) Desprotección de la forma protegida del Compuesto 16 para formar el Compuesto 16: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-butilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona, Figura 42

Se realizó el tratamiento de la forma protegida del Compuesto 16, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-butilsulfonilaminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona (1,0 equivalente; sintetizado como se describió anteriormente), con 4 ml de NaOH 2N durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se trató añadiendo gota a gota 40 ml de disolución de HCl 2N en dioxano a 0 °C hasta 25 °C durante 3 horas. A continuación se extinguió la mezcla de reacción con bicarbonato de sodio (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el Compuesto 16: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-butilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona; p.f. 236-237 °C.

Q. Compuesto 17: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-propil-sulfonilaminoetil)-fenoxi)metil-2-oxazolidinona según se muestra en la Figura 42

1) Síntesis del material de partida 2-N-propil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato para el Compuesto 17:



COMPUESTO 17

El material de partida 2-N-propil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato se obtuvo por medio de la esterificación de ((D o L) tirosina) (1,0 equivalente; Sigma) en metanol 0,10 M y HCl diluido al 1%. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 12 horas y a continuación se neutralizó por medio de carbonato de potasio y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se utilizó posteriormente de la siguiente manera:

Se agitó una mezcla del compuesto anterior (4,3 mmol), cloruro del ácido propilsulfónico (6,6 mmol; Aldrich) y trietilamina (1,5 equivalentes) en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación se evaporó la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad el producto bruto se purificó por medio de cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) para dar el compuesto del título.

2) Síntesis del material de partida 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona para el Compuesto 17: procedimiento de 3 etapas de la siguiente manera:

Se agitó p-amino-benzonitrilo (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) con 2,3-epoxipropanol (1,0 equivalentes; Aldrich) durante 12 horas a 25 °C. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo bruto se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en dimetilformamida (0,10 M), a 25 °C, con carbonato de dietilo (1,1 equivalentes; Aldrich) y terc-butilato de potasio (1,1 equivalentes; Aldrich) a 110 °C

durante 6 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina y utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se agitó 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C con 1,1 equivalentes de sulfuro de hidrógeno, 1,1 equivalentes de yoduro de metilo y 1,1 equivalentes de acetato de amonio. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y a continuación se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la amidina que se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

Se protegió 1,0 equivalente de la amidina, sintetizada como se describió anteriormente, con 1,1 equivalentes de BOC-ON (2-(BOC-oxiimino)-2-fenilacetoniitrilo; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C y se agitó durante 6 horas. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se esterificó a continuación en cloruro de metileno 0,10 M y 1,1 equivalentes de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 6 horas y a continuación se extinguió con agua (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona.

3) Acoplamiento del intermedio 2-N-propil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato con 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona para formar la forma protegida del Compuesto 17, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-propil-sulfonilaminoetil)-feniloxilmetil-2-oxazolidinona

Se agitó una mezcla de 1,9 gramos de 2-N-propil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-

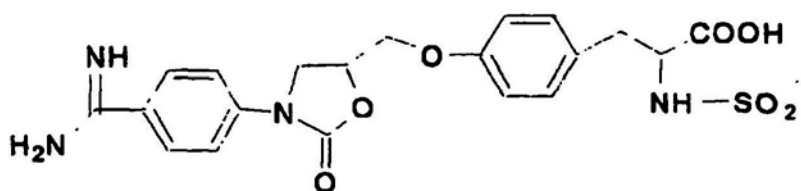
fenil)propionato (como se describió anteriormente), 20 ml de dimetilformamida (DMF) y NaH (1,0 equivalente), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la agitación, se añadieron 1,8 gramos de 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona (como se describió anteriormente) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se agitó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la forma protegida del Compuesto 17, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-propilsulfonilaminoetil)-fenoxilmetil-2-oxazolidinona que se utilizó en la siguiente etapa.

4) Desprotección de la forma protegida del Compuesto 17 para formar el Compuesto 17: 3-(4-aminofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-propilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona,
Figura 42

Se realizó el tratamiento de la forma protegida del Compuesto 17, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-propilsulfonilaminoetil)fenoxilmetil-2-oxazolidinona (1,0 equivalentes; sintetizado como se describió anteriormente), con 4 ml de NaOH 2N durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se trató añadiendo gota a gota 40 ml de disolución de HCl 2N en dioxano a 0 °C hasta 25 °C durante 3 horas. A continuación, la mezcla de reacción se extinguió con bicarbonato de sodio (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el Compuesto 17: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-propilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona; p.f. 200 °C (d).

R. Compuesto 18: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-etil-sulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona según se muestra en la Figura 42

1) Síntesis del material de partida 2-N-etil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato para el Compuesto 18:



5 COMPUESTO 18

El material de partida 2-N-etil-sulfonilamino-3 (4-hidroxi-fenil)propionato se obtuvo por medio de la esterificación de ((D o L) tirosina) (1,0 equivalente; Sigma) en 0,10 M metanol y HCl diluido al 1%. La mezcla de reacción se agitó a 25 °C durante 12 horas y a
 10 continuación se neutralizó por medio de carbonato de potasio y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto posteriormente se utilizó de la siguiente manera:

15 Se agitó una mezcla del compuesto anterior (4,3 mmol), cloruro del ácido etilsulfónico (6,6 mmol; Aldrich) y trietilamina (1,5 equivalentes) en cloruro de metileno (20 ml) durante 12 horas a temperatura ambiente. A continuación se evaporó la mezcla de reacción y el residuo se disolvió en acetato de etilo, se lavó con HCl diluido, bicarbonato de sodio acuoso y agua. Tras evaporar hasta sequedad el producto bruto se purificó por medio de
 20 cromatografía de resolución rápida (gel de sílice, tolueno/acetato de etilo 15:1) para dar el compuesto del título.

2) Síntesis del material de partida 3-p-N-BOC-amidinofenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona para el Compuesto 18: procedimiento de 3 etapas de la siguiente manera:

25

Se agitó p-amino-benzonitrilo (1,0 equivalente; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) con 2,3-epoxipropanol (1,0 equivalente; Aldrich) durante 12 horas a 25 °C. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo bruto se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

30

Se agitó 4-(2,3-dihidroxipropilamino)benzonitrilo (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en dimetilformamida (0,10 M), a 25 °C, con carbonato de dietilo (1,1 equivalentes; Aldrich) y terc-butilato de potasio (1,1 equivalentes; Aldrich) a 110 °C durante 6 horas. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo
 35 (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A

continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina y se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

5

Se agitó 3-(4-cianofenil)-5-hidroximetil-2-oxazolidina (1,0 equivalente; como se describió anteriormente), en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C con 1,1 equivalentes de sulfuro de hidrógeno, 1,1 equivalentes de yoduro de metilo y 1,1 equivalentes de acetato de amonio. La mezcla de reacción se agitó durante 6 horas y a continuación se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la amidina que se utilizó en la siguiente etapa de la siguiente manera:

10

15

Se protegió 1,0 equivalente de la amidina, sintetizada como se describió anteriormente, con 1,1 equivalentes de BOC-ON (2-(BOC-oxiimino)-2-fenilacetoniitrilo; Aldrich) en cloruro de metileno (0,10 M) a 25 °C y se agitó durante 6 horas. A continuación, la mezcla de reacción se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se esterificó el producto bruto en cloruro de metileno 0,10 M y 1,1 equivalentes de cloruro de metanosulfonilo. La mezcla de reacción se agitó a 0 °C durante 6 horas y a continuación se extinguió con agua (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y el producto bruto se purificó posteriormente por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener 3-p-N BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona.

20

25

30

3) Acoplamiento del intermedio 2-N-etil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato con 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfonilo-metil-2-oxazolidinona para formar la forma protegida del Compuesto 18. 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-etil-sulfonilaminoetil)-fenioxilmetil-2-oxazolidinona

Se agitó una mezcla de 1,9 gramos de 2-N-etil-sulfonilamino-3-(4-hidroxi-fenil)propionato (como se describió anteriormente), 20 ml de dimetilformamida (DMF) y NaH (1,0 equivalente), durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras agitar, se añadieron 1,8

35

gramos de 3-p-N-BOC-amidino-fenil-5-metanosulfoniloxi-metil-2-oxazolidinona (como se describió anteriormente) en 10 ml de dimetilformamida (DMF) y se agitó nuevamente durante 15 minutos a temperatura ambiente. A continuación se diluyó la mezcla de reacción con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener la forma protegida del Compuesto 18, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-etilsulfonilaminoetil)-fenioxilmetil-2-oxazolidinona que se utilizó en la siguiente etapa.

4) Desprotección de la forma protegida del Compuesto 18 para formar el Compuesto 18: 3-(4-amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-etilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona
Figura 42

Se realizó el tratamiento de la forma protegida del Compuesto 18, 3-(4-BOC-amidinofenil)-5-(4-(2-metoxi-carbonil-2-N-etilsulfonilaminoetil)fenioxilmetil-2-oxazolidinona (1,0 equivalente; sintetizado como se describió anteriormente), con 4 ml de NaOH 2N durante 4 horas a temperatura ambiente. A continuación la mezcla se trató añadiendo gota a gota 40 ml de disolución de HCl 2N en dioxano a 0 °C hasta 25 °C durante 3 horas. La mezcla de reacción se extinguió a continuación con bicarbonato de sodio (5 equivalentes) y posteriormente se diluyó con acetato de etilo (0,10 M) y se lavó 2X con agua, 1X con salmuera y se secó sobre sulfato de magnesio. A continuación se eliminó el disolvente en vacío y posteriormente se purificó el producto bruto por medio de cromatografía en columna en gel de sílice para obtener el Compuesto 18: 3-(4amidinofenil)-5-(4-(2-carboxi-2-N-etilsulfonilaminoetil)fenoxi)metil-2-oxazolidinona; p.f. 212 °C (d).

14. Inhibición de la angiogénesis inducida por factores de crecimiento según se mide en el ensayo de CAM por medio de la aplicación intravenosa de miméticos orgánicos del ligando de $\alpha_v\beta_3$

También se evaluó el efecto sobre la angiogénesis inducida por factores de crecimiento con miméticos orgánicos de un ligando ~~de~~ β_3 inyectado por vía intravenosa en la preparación de CAM para uso en esta invención.

Se usó la preparación de CAM de 10 días como se describió previamente en el Ejemplo 5A. Veinticuatro horas después de iniciada la angiogénesis inducida por bFGF, se inyectaron los miméticos orgánicos denominados compuestos 16 (81218), 17 (87292) y 18 (87293) por vía intravenosa por separado en la preparación de CAM en un volumen de 100 μ l a una concentración de 1 mg/ml (100 μ g/embrión) en tetraglicol al 20% en PBS a pH 7,0. En ensayos en paralelo, se evaluaron de manera similar los compuestos 7 (96112), 9 (99799), 10 (96229), 12 (112854) y 14 (96113). Los efectos de los miméticos orgánicos se analizaron 48 horas más tarde, donde se realizó la cuantificación mediante el recuento del número de puntos de ramificación de los capilares sanguíneos en el área del disco del filtro en un enfoque doble ciego.

Los resultados se muestran respectivamente en las Figuras 43 y 44. En la Figura 43, los compuestos 14 (96113), 10 (96229), 9 (99799) y 12 (112854), en orden decreciente de inhibición, fueron eficaces en la reducción del número de puntos de ramificación de los capilares sanguíneos nuevos comparados con el control de inducción por bFGF y comparados con el compuesto 7 (96112). En la Figura 44, los compuestos 17 (87292) y 18 (87293) exhibieron propiedades antiangiogénicas comparados con el control bFGF sin tratamiento y con tratamiento con el compuesto 16 (81218).

En un tercer ensayo, los compuestos orgánicos 7 (96112), 10 (96229) y 14 (96113) se evaluaron como inhibidores de la angiogénesis inducida por bFGF junto con los péptidos 69601 y 66203. Para este ensayo, se administraron 250 μ g/ml de los compuestos orgánicos 18 horas después del tratamiento con bFGF como se describió en el Ejemplo 7B. Los resultados se muestran en la Figura 28, donde como anteriormente, los compuestos 14 (96113) y 10 (96229) inhibieron casi completamente la formación de nuevos capilares sanguíneos inducidos por bFGF.

Por consiguiente, los Ejemplos mencionados anteriormente demuestran que la integrina $\alpha_v\beta_3$ desempeña un papel fundamental en la angiogénesis inducida por una diversidad de estímulos y, como tal, $\alpha_v\beta_3$ es una diana terapéutica valiosa con los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención para enfermedades caracterizadas por la neovascularización.

Se considera que la memoria descriptiva anterior es suficiente para permitir a un experto en la técnica poner en práctica la invención. La presente invención no debe estar limitada en su alcance por la línea celular depositada, dado que la forma de realización

depositada está pensada como una única ilustración de un aspecto de la invención y cualquier línea celular que sea funcionalmente equivalente está dentro del ámbito de esta invención. El depósito de material no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en el presente documento sea inadecuada para permitir la puesta en
5 práctica de cualquier aspecto de la invención, incluido el mejor modo de la misma, ni deberá interpretarse como limitante del alcance de las reivindicaciones a la ilustración específica que representa.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

(1) INFORMACIÓN GENERAL:

(i) SOLICITANTE:

15

(A) NOMBRE: THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE

(B) CALLE: 10550 North Torrey Pines Road

(C) CIUDAD: La Jolla

(D) ESTADO: California

(E) PAÍS: EEUU

(F) CÓDIGO POSTAL: 92037

20

(G) TELÉFONO: (619) 784-2937

(H) TELEFAX: (619) 784-9399

(ii) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES
ÚTILES PARA LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

25

(iii) NÚMERO DE SECUENCIAS: 45

(iv) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR:

30

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible con IBM

(C) SISTEMA OPERATIVO: PC-DOS/MS-DOS

(D) PROGRAMA INFORMÁTICO: PatentIn Release N° 1.0, Version N°
1.25

35

(v) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US97/

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 30 de mayo de 1997

5

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/210.715

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 18 de marzo de 1994

10

(vi) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/366.665

(B) FECHA DE PRESENTACIÓN: 30 de diciembre de 1994

15

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 1:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

30

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = BOC-GRGDFV-OMe /nota- "BOC significa el extremo N terminal que protege el grupo butiloxycarbonilo; OMe significa un metiléster en el extremo C terminal; arginina en la segunda posición".

35

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..6
 (D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = O-Me /nota = "OMe significa el grupo metiléster que protege el extremo C terminal".

5

(ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..6
 (D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = D-Arg /nota= "Un prefijo "D" en D-Arg significa que la arginina en posición 2 es un aminoácido D".

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 1:

15

Gly Arg Gly Asp Phe Val
 1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 2:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (ix) CARACTERÍSTICA:

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 (B) LOCALIZACIÓN: 1..6
 (D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = BOC /nota= "BOC significa el grupo terc-butiloxycarbonilo que bloquea el extremo N terminal"

30

(ix) CARACTERÍSTICA:

35

- (A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = OH /nota = "OH significa un ácido carboxílico libre en el extremo C terminal".

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = D-Arg /nota= "Un prefijo "D" en D-Arg significa que la arginina en posición 2 es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. N° 2:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(D) TOPOLOGIA: lineal

(ix) CARACTERÍSTICA:

30

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = OH /nota = "OH significa un ácido carboxílico libre en el extremo C terminal"

(ix) CARACTERÍSTICA:

5

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: /marca = D-Arg /nota= "Un prefijo "D" en D-Arg en la posición 2, significa que la arginina es un aminoácido D".

10

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 3:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

15

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 4:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

20

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

25

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 2

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Arg es un aminoácido D".

30

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 4:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

35

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 5:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: circular
 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (ix) CARACTERÍSTICA:
- 10 (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 (B) LOCALIZACIÓN: 4
 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Arg es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 5:

15

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 6:

20 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: circular

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (ix) CARACTERÍSTICA:

- 30 (A) NOMBRE/CLAVE: péptido
 (B) LOCALIZACIÓN: 4
 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota – "Phe es un aminoácido D"

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 6:

35

Arg Ala Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 7:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: circular

10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

15 (B) LOCALIZACIÓN: 5

(D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Val es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 7:

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 8:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 8:

Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe
1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 9:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- 10 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 2

- 15 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Ala es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 9:

Arg Ala Asp Phe Val
1 5

20

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 10:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 25 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

- 30 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
 (ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 5

- 35 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Phe es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 10:

	Ala	Arg	Gly	Asp	Phe	Leu
5						
	1				5	

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 11:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10 (A) LONGITUD: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
15 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno
(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido
(B) LOCALIZACIÓN: 5
20 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "Phe es un aminoácido D".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 11:

	Gly	Arg	Gly	Asp	Phe	Leu
25						
	1				5	

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 12:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

30 (A) LONGITUD: 12 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido
35 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 12:

Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met
1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 13:

5

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

10

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 13:

15

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

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 14:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

25

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 14:

30

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

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 15:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

35

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

5 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 5

10 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "La metilación está en el amino (NH₂) terminal del residuo valina".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 15:

15 **Arg Gly Asp Phe Val**
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 16:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20 (A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

25 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 5

30 (D) OTRA INFORMACIÓN: /nota = "La metilación está en el amino (NH₂) terminal del residuo valina".

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 16:

35 **Arg Gly Glu Phe Val**
1 5

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 17:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 222 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
10 (v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 17:

Lys Gly Ile Gln Glu Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Asp Ile Asp Leu Gly
1 5 10 15

15

20

25

30

35

	Thr Gly Pro Thr Pro Thr Leu Gly Pro Val Thr Pro Glu Ile Cys Lys	
	20	25 30
5	Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ile Phe	
	35	40 45
	Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val Thr Pro Arg Asp Lys	
	50	55 60
10	Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Glu Leu Pro Glu	
	65	70 75 80
	Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu Glu Lys Ala Val Phe	
	85	90 95
15	Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Glu Arg	
	100	105 110
	Gly Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln	
	115	120 125
20	Arg Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ile	
	130	135 140
	Phe Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu Val Lys Lys Lys Met	
	145	150 155 160
25	Asp Pro Gly Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp Ala Trp Asn Ala Ile Pro	
	165	170 175
	Asp Asn Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly Gly Gly His Ser Tyr	
30	180	185 190
	Phe Phe Lys Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu Asn Gln Ser Leu Lys	
	195	200 205
35	Ser Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp Trp Leu Gly Cys	
	210	215 220

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 18:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 193 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
10 (v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 18:

15

20

25

30

35

35

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 19:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 74 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

- 10 (v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 19:

Ile Cys Lys Gln Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile Arg Gly
 1 5 10 15

15 Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val Thr Pro
 20 25 30

Arg Asp Lys Pro Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Glu
 35 40 45

20 Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu Glu Lys
 50 55 60

Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp
 65 70

25 (2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 20:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 108 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

- 35 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 20:

	Ile	Cys	Lys	Gln	Asp	Ile	Val	Phe	Asp	Gly	Ile	Ala	Gln	Ile	Arg	Gly	
	1				5					10					15		
5	Glu	Ile	Phe	Phe	Phe	Lys	Asp	Arg	Phe	Ile	Trp	Arg	Thr	Val	Thr	Pro	
				20					25					30			
	Arg	Asp	Lys	Pro	Met	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Phe	Trp	Pro	Glu	
			35					40					45				
10	Leu	Pro	Glu	Lys	Ile	Asp	Ala	Val	Tyr	Glu	Ala	Pro	Gln	Glu	Glu	Lys	
		50				55					60						
	Ala	Val	Phe	Phe	Ala	Gly	Asn	Glu	Tyr	Trp	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	
	65					70				75					80		
15	Leu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	
				85					90					95			
	Asp	Val	Gln	Arg	Val	Asp	Ala	Ala	Phe	Asn	Trp	Ser					
				100					105								

20 (2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 21:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25 (A) LONGITUD: 122 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal

30 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 21:

	Glu	Tyr	Trp	Ile	Tyr	Ser	Ala	Ser	Thr	Leu	Glu	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys
	1				5					10					15	
5	Pro	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Asp	Val	Gln	Arg	Val	Asp	Ala
				20					25					30		
	Ala	Phe	Asn	Trp	Ser	Lys	Asn	Lys	Lys	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ala	Gly	Asp
			35					40					45			
10	Lys	Phe	Trp	Arg	Tyr	Asn	Glu	Val	Lys	Lys	Lys	Met	Asp	Pro	Gly	Phe
		50					55					60				
	Pro	Lys	Leu	Ile	Ala	Asp	Ala	Trp	Asn	Ala	Ile	Pro	Asp	Asn	Leu	Asp
	65					70					75					80
15	Ala	Val	Val	Asp	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	His	Ser	Tyr	Phe	Phe	Lys	Gly
					85					90					95	
	Ala	Tyr	Tyr	Leu	Lys	Leu	Glu	Asn	Gln	Ser	Leu	Lys	Ser	Val	Lys	Phe
				100					105					110		
20	Gly	Ser	Ile	Lys	Ser	Asp	Trp	Leu	Gly	Cys						
				115					120							

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 22:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 89 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 22:

35

Phe Asn Trp Ser Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ala Gly Asp Lys
 1 5 10 15
 Phe Trp Arg Tyr Asn Glu Val Lys Lys Lys Met Asp Pro Gly Phe Pro
 5 20 25 30
 Lys Leu Ile Ala Asp Ala Trp Asn Ala Ile Pro Asp Asn Leu Asp Ala
 35 40 45
 Val Val Asp Leu Gln Gly Gly Gly His Ser Tyr Phe Phe Lys Gly Ala
 10 50 55 60
 Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu Asn Gln Ser Leu Lys Ser Val Lys Phe Gly
 65 70 75 80
 Ser Ile Lys Ser Asp Trp Leu Gly Cys
 15 85

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 23:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 228 aminoácidos
- (B) TIPO: aminoácido
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
- (v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal
- (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 23:

30

35

35

Trp Leu Gly Cys

225

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 24:

5 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 193 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

10

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 24:

15 Leu Cys Lys His Asp Ile Val Phe Asp Gly Val Ala Gln Ile Arg Gly
1 5 10 15

Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Met Trp Arg Thr Val Asn Pro
20 25 30

20 Arg Gly Lys Pro Thr Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Asp
35 40 45

Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ser Pro Gln Asp Glu Lys
50 55 60

25 Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Val Tyr Thr Ala Ser Asn
65 70 75 80

Leu Asp Arg Gly Tyr Pro Lys Lys Leu Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro
85 90 95

30 Asp Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Phe Asn Trp Gly Arg Asn Lys Lys
100 105 110

35 Thr Tyr Ile Phe Ser Gly Asp Arg Tyr Trp Lys Tyr Asn Glu Glu Lys
115 120 125

Lys Lys Met Glu Leu Ala Thr Pro Lys Phe Ile Ala Asp Ser Trp Asn
 130 135 140

5 Gly Val Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Leu Gly Leu Thr Asp Ser Gly
 145 150 155 160

Tyr Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Tyr Tyr Leu Gln Met Glu Asp Lys
 165 170 175

10 Ser Leu Lys Ile Val Lys Ile Gly Lys Ile Ser Ser Asp Trp Leu Gly
 180 185 190

Cys

2) INFORMACION PARA ID. SEC. Nº 25:

15 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 74 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

20

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 25:

25

30

35

Leu Cys Lys His Asp Ile Val Phe Asp Gly Val Ala Gln Ile Arg Gly
 1 5 10 15

Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Met Trp Arg Thr Val Asn Pro
 20 25 30

Arg Gly Lys Pro Thr Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Asp
 35 40 45

Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ser Pro Gln Asp Glu Lys
 50 55 60

Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp
 65 70

15 (2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 26:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 108 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 26:

30

35

Leu Cys Lys His Asp Ile Val Phe Asp Gly Val Ala Gln Ile Arg Gly
1 5 10 15

Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Met Trp Arg Thr Val Asn Pro
20 25 30

Arg Gly Lys Pro Thr Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Asp
35 40 45

Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ser Pro Gln Asp Glu Lys
50 55 60

Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Val Tyr Thr Ala Ser Asn
65 70 75 80

Leu Asp Arg Gly Tyr Pro Lys Lys Leu Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro
85 90 95

Asp Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Phe Asn Trp Gly
100 105

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 27:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 122 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

(v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 27:

20

25

30

- 35

Phe Asn Trp Gly Arg Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ser Gly Asp Arg
 1 5 10 15
 Tyr Trp Lys Tyr Asn Glu Glu Lys Lys Lys Met Glu Leu Ala Thr Pro
 5 20 25 30
 Lys Phe Ile Ala Asp Ser Trp Asn Gly Val Pro Asp Asn Leu Asp Ala
 35 40 45
 Val Leu Gly Leu Thr Asp Ser Gly Tyr Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln
 10 50 55 60
 Tyr Tyr Leu Gln Met Glu Asp Lys Ser Leu Lys Ile Val Lys Ile Gly
 65 70 75 80
 Lys Ile Ser Ser Asp Trp Leu Gly Cys
 15 85

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 29:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

20

- (A) LONGITUD: 2123 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: doble
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

25

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
- (iii) HIPOTÉTICO: NO
- (iv) ANTISENTIDO: NO
- (ix) CARACTERÍSTICA:

30

- (A) NOMBRE/CLAVE: CDS
- (B) LOCALIZACIÓN: 132..2123

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 29:

35

	AATTCGGGCA AAAGAGAAAA CGGTGCAGAG AGTTAAGATG TGCAGATAAG CAACTAGTGC	60
	ACTGTGCAGC CAAAGTAACT GACAGTCAGT CAGAGAAATC TTTTAAACAG GATTGCAAAA	120
5	ATATAGGCAG A ATG AAG ACT CAC AGT GTT TTT GGC TTC TTT TTT AAA GTA Met Lys Thr His Ser Val Phe Gly Phe Phe Phe Lys Val 1 5 10	170
10	CTA TTA ATC CAA GTG TAT CTT TTT AAC AAA ACT TTA GCT GCA CCG TCA Leu Leu Ile Gln Val Tyr Leu Phe Asn Lys Thr Leu Ala Ala Pro Ser 15 20 25	218
	CCA ATC ATT AAG TTC CCT GGA GAC AGC ACT CCA AAA ACA GAC AAA GAG Pro Ile Ile Lys Phe Pro Gly Asp Ser Thr Pro Lys Thr Asp Lys Glu 30 35 40 45	266
15	CTA GCA GTG CAA TAC CTG AAT AAA TAT TAT GGA TGC CCA AAA GAC AAT Leu Ala Val Gln Tyr Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly Cys Pro Lys Asp Asn 50 55 60	314
20	TGC AAC TTA TTT GTA TTG AAA GAT ACT TTG AAG AAA ATG CAG AAA TTT Cys Asn Leu Phe Val Leu Lys Asp Thr Leu Lys Lys Met Gln Lys Phe 65 70 75	362
	TTT GGG CTG CCT GAA ACA GGA GAT TTG GAT CAA AAC ACA ATT GAG ACA Phe Gly Leu Pro Glu Thr Gly Asp Leu Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr 80 85 90	410
25	ATG AAG AAA CCC CGC TGT GGT AAC CCC GAT GTG GCC AAT TAC AAC TTC Met Lys Lys Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala Asn Tyr Asn Phe	458

30

35

	95	100	105	
5	TTT CCA AGA AAG CCA AAA TGG GAA AAG AAT CAT ATA ACA TAC AGG ATT Phe Pro Arg Lys Pro Lys Trp Glu Lys Asn His Ile Thr Tyr Arg Ile 110 115 120 125	506		
	ATA GGC TAT ACC CCG GAT TTG GAT CCT GAG ACA GTA GAT GAT GCC TTT Ile Gly Tyr Thr Pro Asp Leu Asp Pro Glu Thr Val Asp Asp Ala Phe 130 135 140	554		
10	GCC CGA GCC TTT AAA GTC TGG AGT GAT GTC ACG CCA CTG AGA TTT AAC Ala Arg Ala Phe Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Arg Phe Asn 145 150 155	602		
15	CGA ATA AAT GAT GGA GAG GCA GAC ATT ATG ATT AAT TTT GGC CGA TGG Arg Ile Asn Asp Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Asn Phe Gly Arg Trp 160 165 170	650		
	GAA CAT GGT GAT GGC TAT CCA TTT GAT GGC AAA GAT GGT CTC CTG GCT Glu His Gly Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala 175 180 185	698		
20	CAC GCC TTT GCA CCG GGG CCA GGA ATT GGA GGA GAC TCC CAT TTT GAT His Ala Phe Ala Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Ser His Phe Asp 190 195 200 205	746		
25	GAT GAT GAA CTG TGG ACT CTT GGA GAA GGG CAA GTG GTT AGA GTA AAG Asp Asp Glu Leu Trp Thr Leu Gly Glu Gly Gln Val Val Arg Val Lys 210 215 220	794		
	TAT GGA AAT GCA GAT GGT GAA TAC TGC AAA TTT CCC TTC TGG TTC AAT Tyr Gly Asn Ala Asp Gly Glu Tyr Cys Lys Phe Pro Phe Trp Phe Asn 225 230 235	842		
30	GGT AAG GAA TAC AAC AGC TGC ACA GAT GCA GGA CGT AAT GAT GGA TTC Gly Lys Glu Tyr Asn Ser Cys Thr Asp Ala Gly Arg Asn Asp Gly Phe 240 245 250	890		
35	CTC TGG TGT TCC ACA ACC AAA GAC TTT GAT GCA GAT GGC AAA TAT GGC Leu Trp Cys Ser Thr Thr Lys Asp Phe Asp Ala Asp Gly Lys Tyr Gly 255 260 265	938		

	TTT TGT CCC CAT GAG TCA CTT TTT ACA ATG GGT GGC AAT GGT GAT GGA	986
	Phe Cys Pro His Glu Ser Leu Phe Thr Met Gly Gly Asn Gly Asp Gly	
	270 275 280 285	
5	CAG CCC TGC AAG TTT CCC TTT AAA TTT CAA GGC CAG TCC TAT GAC CAG	1034
	Gln Pro Cys Lys Phe Pro Phe Lys Phe Gln Gly Gln Ser Tyr Asp Gln	
	290 295 300	
	TGT ACA ACA GAA GGC AGG ACA GAT GGA TAC AGA TGG TGT GGA ACC ACT	1082
	Cys Thr Thr Glu Gly Arg Thr Asp Gly Tyr Arg Trp Cys Gly Thr Thr	
10	305 310 315	
	GAA GAC TAT GAT AGA GAT AAG AAA TAC GGA TTC TGC CCA GAA ACT GCC	1130
	Glu Asp Tyr Asp Arg Asp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Glu Thr Ala	
	320 325 330	
15	ATG TCA ACA GTT GGT GGA AAT TCA GAA GGA GCT CCT TGT GTA TTC CCC	1178
	Met Ser Thr Val Gly Gly Asn Ser Glu Gly Ala Pro Cys Val Phe Pro	
	335 340 345	
	TTC ATC TTC CTT GGG AAT AAA TAC GAC TCC TGT ACA AGT GCA GGT CGC	1226
	Phe Ile Phe Leu Gly Asn Lys Tyr Asp Ser Cys Thr Ser Ala Gly Arg	
20	350 355 360 365	
	AAT GAT GGC AAG CTG TGG TGT GCT TCT ACC AGC AGC TAT GAT GAT GAC	1274
	Asn Asp Gly Lys Leu Trp Cys Ala Ser Thr Ser Ser Tyr Asp Asp Asp	
	370 375 380	
25	CGC AAG TGG GGC TTT TGT CCA GAT CAA GGA TAC AGT CTC TTC TTG GTT	1322
	Arg Lys Trp Gly Phe Cys Pro Asp Gln Gly Tyr Ser Leu Phe Leu Val	
	385 390 395	
	GCT GCC CAC GAA TTT GGC CAT GCG ATG GGA TTA GAG CAC TCC GAG GAC	1370
	Ala Ala His Glu Phe Gly His Ala Met Gly Leu Glu His Ser Glu Asp	
30	400 405 410	
	CCA GGA GCT CTC ATG GCC CCG ATC TAC ACC TAC ACC AAG AAC TTC CGC	1418
	Pro Gly Ala Leu Met Ala Pro Ile Tyr Thr Tyr Thr Lys Asn Phe Arg	
	415 420 425	
35	CTT TCT CAG GAT GAC ATT AAG GGG ATT CAG GAG CTA TAT GAA GTA TCA	1466

	Leu	Ser	Gln	Asp	Asp	Ile	Lys	Gly	Ile	Gln	Glu	Leu	Tyr	Glu	Val	Ser	
	430					435					440					445	
5	CCT	GAT	GTG	GAA	CCT	GGA	CCA	GGG	CCA	GGA	CCA	GGG	CCA	GGA	CCA	CGT	1514
	Pro	Asp	Val	Glu	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Gly	Pro	Arg	
					450				455						460		
	CCT	ACC	CTT	GGA	CCT	GTC	ACT	CCA	GAG	CTC	TGC	AAG	CAC	GAC	ATT	GTA	1562
	Pro	Thr	Leu	Gly	Pro	Val	Thr	Pro	Glu	Leu	Cys	Lys	His	Asp	Ile	Val	
				465				470					475				
10	TTT	GAT	GGA	GTT	GCA	CAA	ATT	AGA	GGA	GAA	ATA	TTT	TTC	TTC	AAA	GAC	1610
	Phe	Asp	Gly	Val	Ala	Gln	Ile	Arg	Gly	Glu	Ile	Phe	Phe	Phe	Lys	Asp	
			480					485					490				
	AGA	TTC	ATG	TGG	AGG	ACT	GTA	AAC	CCT	CGA	GGA	AAA	CCC	ACA	GGT	CCT	1658
15	Arg	Phe	Met	Trp	Arg	Thr	Val	Asn	Pro	Arg	Gly	Lys	Pro	Thr	Gly	Pro	
		495					500					505					
	CTT	CTC	GTT	GCT	ACA	TTC	TGG	CCT	GAT	CTG	CCA	GAG	AAA	ATC	GAT	GCT	1706
	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Phe	Trp	Pro	Asp	Leu	Pro	Glu	Lys	Ile	Asp	Ala	
20	510					515				520					525		
	GTC	TAC	GAG	TCC	CCT	CAG	GAT	GAG	AAG	GCT	GTA	TTT	TTT	GCA	GGA	AAT	1754
	Val	Tyr	Glu	Ser	Pro	Gln	Asp	Glu	Lys	Ala	Val	Phe	Phe	Ala	Gly	Asn	
					530					535					540		
	GAG	TAC	TGG	GTT	TAT	ACA	GCC	AGC	AAC	CTG	GAT	AGG	GGC	TAT	CCA	AAG	1802
25	Glu	Tyr	Trp	Val	Tyr	Thr	Ala	Ser	Asn	Leu	Asp	Arg	Gly	Tyr	Pro	Lys	
				545					550				555				
	AAA	CTC	ACC	AGC	CTG	GGA	CTA	CCC	CCT	GAT	GTG	CAA	CGC	ATT	GAT	GCA	1850
	Lys	Leu	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Pro	Asp	Val	Gln	Arg	Ile	Asp	Ala	
30			560					565					570				
	GCC	TTC	AAC	TGG	GGC	AGA	AAC	AAG	AAG	ACA	TAT	ATT	TTC	TCT	GGA	GAC	1898
	Ala	Phe	Asn	Trp	Gly	Arg	Asn	Lys	Lys	Thr	Tyr	Ile	Phe	Ser	Gly	Asp	
		575					580					585					
	AGA	TAC	TGG	AAG	TAC	AAT	GAA	GAA	AAG	AAA	AAA	ATG	GAG	CTT	GCA	ACC	1946
35	Arg	Tyr	Trp	Lys	Tyr	Asn	Glu	Glu	Lys	Lys	Lys	Met	Glu	Leu	Ala	Thr	

	590		595		600		605	
	CCA AAA TTC ATT GCG GAT TCT TGG AAT GGA GTT CCA GAT AAC CTC GAT							1994
	Pro Lys Phe Ile Ala Asp Ser Trp Asn Gly Val Pro Asp Asn Leu Asp							
5		610		615		620		
	GCT GTC CTG GGT CTT ACT GAC AGC GGG TAC ACC TAT TTT TTC AAA GAC							2042
	Ala Val Leu Gly Leu Thr Asp Ser Gly Tyr Thr Tyr Phe Phe Lys Asp							
		625		630		635		
10	CAG TAC TAT CTA CAA ATG GAA GAC AAG AGT TTG AAG ATT GTT AAA ATT							2090
	Gln Tyr Tyr Leu Gln Met Glu Asp Lys Ser Leu Lys Ile Val Lys Ile							
		640		645		650		
	GGC AAG ATA AGT TCT GAC TGG TTG GGT TGC TG							2123
	Gly Lys Ile Ser Ser Asp Trp Leu Gly Cys							
15		655		660				

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 30:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 663 aminoácidos
 (B) TIPO: aminoácido
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína

25 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 30:

	Met Lys Thr His Ser Val Phe Gly Phe Phe Phe Lys Val Leu Leu Ile	
	1 5 10 15	
	Gln Val Tyr Leu Phe Asn Lys Thr Leu Ala Ala Pro Ser Pro Ile Ile	
30	20 25 30	
	Lys Phe Pro Gly Asp Ser Thr Pro Lys Thr Asp Lys Glu Leu Ala Val	
	35 40 45	
35	Gln Tyr Leu Asn Lys Tyr Tyr Gly Cys Pro Lys Asp Asn Cys Asn Leu	
	50 55 60	

Phe Val Leu Lys Asp Thr Leu Lys Lys Met Gln Lys Phe Phe Gly Leu
 65 70 75 80
 Pro Glu Thr Gly Asp Leu Asp Gln Asn Thr Ile Glu Thr Met Lys Lys
 85 90 95
 5 Pro Arg Cys Gly Asn Pro Asp Val Ala Asn Tyr Asn Phe Phe Pro Arg
 100 105 110
 Lys Pro Lys Trp Glu Lys Asn His Ile Thr Tyr Arg Ile Ile Gly Tyr
 115 120 125
 10 Thr Pro Asp Leu Asp Pro Glu Thr Val Asp Asp Ala Phe Ala Arg Ala
 130 135 140
 Phe Lys Val Trp Ser Asp Val Thr Pro Leu Arg Phe Asn Arg Ile Asn
 145 150 155 160
 15 Asp Gly Glu Ala Asp Ile Met Ile Asn Phe Gly Arg Trp Glu His Gly
 165 170 175
 Asp Gly Tyr Pro Phe Asp Gly Lys Asp Gly Leu Leu Ala His Ala Phe
 180 185 190
 20 Ala Pro Gly Pro Gly Ile Gly Gly Asp Ser His Phe Asp Asp Asp Glu
 195 200 205
 Leu Trp Thr Leu Gly Glu Gly Gln Val Val Arg Val Lys Tyr Gly Asn
 210 215 220
 25 Ala Asp Gly Glu Tyr Cys Lys Phe Pro Phe Trp Phe Asn Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Tyr Asn Ser Cys Thr Asp Ala Gly Arg Asn Asp Gly Phe Leu Trp Cys
 245 250 255
 30 Ser Thr Thr Lys Asp Phe Asp Ala Asp Gly Lys Tyr Gly Phe Cys.Pro
 260 265 270
 His Glu Ser Leu Phe Thr Met Gly Gly Asn Gly Asp Gly Gln Pro Cys
 275 280 285
 35

	Lys Phe Pro Phe Lys Phe Gln Gly Gln Ser Tyr Asp Gln Cys Thr Thr	
	290	295 300
5	Glu Gly Arg Thr Asp Gly Tyr Arg Trp Cys Gly Thr Thr Glu Asp Tyr	
	305	310 315 320
	Asp Arg Asp Lys Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Glu Thr Ala Met Ser Thr	
		325 330 335
10	Val Gly Gly Asn Ser Glu Gly Ala Pro Cys Val Phe Pro Phe Ile Phe	
		340 345 350
	Leu Gly Asn Lys Tyr Asp Ser Cys Thr Ser Ala Gly Arg Asn Asp Gly	
		355 360 365
15	Lys Leu Trp Cys Ala Ser Thr Ser Ser Tyr Asp Asp Asp Arg Lys Trp	
		370 375 380
	Gly Phe Cys Pro Asp Gln Gly Tyr Ser Leu Phe Leu Val Ala Ala His	
	385	390 395 400
20	Glu Phe Gly His Ala Met Gly Leu Glu His Ser Glu Asp Pro Gly Ala	
		405 410 415
	Leu Met Ala Pro Ile Tyr Thr Tyr Thr Lys Asn Phe Arg Leu Ser Gln	
		420 425 430
25	Asp Asp Ile Lys Gly Ile Gln Glu Leu Tyr Glu Val Ser Pro Asp Val	
		435 440 445
	Glu Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Gly Pro Arg Pro Thr Leu	
		450 455 460
30	Gly Pro Val Thr Pro Glu Leu Cys Lys His Asp Ile Val Phe Asp Gly	
		465 470 475 480
	Val Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ile Phe Phe Phe Lys Asp Arg Phe Met	
		485 490 495
35	Trp Arg Thr Val Asn Pro Arg Gly Lys Pro Thr Gly Pro Leu Leu Val	
		500 505 510

	Ala Thr Phe Trp Pro Asp Leu Pro Glu Lys Ile Asp Ala Val Tyr Glu
	515 520 525
5	Ser Pro Gln Asp Glu Lys Ala Val Phe Phe Ala Gly Asn Glu Tyr Trp
	530 535 540
	Val Tyr Thr Ala Ser Asn Leu Asp Arg Gly Tyr Pro Lys Lys Leu Thr
	545 550 555 560
10	Ser Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg Ile Asp Ala Ala Phe Asn
	565 570 575
	Trp Gly Arg Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe Ser Gly Asp Arg Tyr Trp
	580 585 590
15	Lys Tyr Asn Glu Glu Lys Lys Lys Met Glu Leu Ala Thr Pro Lys Phe
	595 600 605
	Ile Ala Asp Ser Trp Asn Gly Val Pro Asp Asn Leu Asp Ala Val Leu
	610 615 620
20	Gly Leu Thr Asp Ser Gly Tyr Thr Tyr Phe Phe Lys Asp Gln Tyr Tyr
	625 630 635 640
	Leu Gln Met Glu Asp Lys Ser Leu Lys Ile Val Lys Ile Gly Lys Ile
	645 650 655
25	Ser Ser Asp Trp Leu Gly Cys
	660

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 31:

30 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- (A) LONGITUD: 21 pares de bases
- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

35

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 31:
5 ATTGAATTCT TCTACAGTTC A 21

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 32:

10 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

15 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 32:
20 ATGGGATCCA CTGCAAATTT C 21

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 33:

25 (i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

(A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

30 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 33:
35 GCCGGATCCA TGACCAGTGT A 21

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 34:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 34:
GTGGGATCCC TGAAGACTAT G 21

15

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 35:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 35:
AGGGGATCCT TAAGGGGATT C 21

30

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 36:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 21 pares de bases

- (B) TIPO: ácido nucleico
- (C) HEBRA: simple
- (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 36:
 CTCGGATCCT CTGCAAGCAC G 21

10

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 37:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: simple
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
 (iii) HIPOTÉTICO: NO
 (iv) ANTISENTIDO: NO
 (xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 37:
 CTCGGATCCT CTGCAAGCAC G 21

25

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 38:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 26 pares de bases
 (B) TIPO: ácido nucleico
 (C) HEBRA: simple
 (D) TOPOLOGÍA: lineal

- 35 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 38:

GCAGGATCCG AGTGCTGGGT TTATAC 26

5

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 39:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

10

(A) LONGITUD: 27 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

15

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 39:

GCAGAATTCA ACTGTGGCAG AAACAAG 27

20

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 40:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

25

(A) LONGITUD: 26 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

30

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc

(iii) HIPOTÉTICO: NO

(iv) ANTISENTIDO: NO

(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 40:

GTAGAATTCC AGCACTCATT TCCTGC 26

35

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 41:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 5 (A) LONGITUD: 24 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 10 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 41:
TCTGAATTCT GCCACAGTTG AAGG 24

15

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 42:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 20 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal
- 25 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 42:
ATTGAATTCT TCTACAGTTC A 21

30

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 43:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 35 (A) LONGITUD: 20 pares de bases

(B) TIPO: ácido nucleico

(C) HEBRA: simple

(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 5 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 43:
GATGAATTCT ACTGCAAGTT 20

10

2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 44:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 15 (A) LONGITUD: 21 pares de bases
(B) TIPO: ácido nucleico
(C) HEBRA: simple
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- 20 (ii) TIPO DE MOLÉCULA: ADNc
(iii) HIPOTÉTICO: NO
(iv) ANTISENTIDO: NO
(xi) DESCRIPCIÓN DE LA SECUENCIA: ID. SEC. Nº 44:
CACTGAATTC ATCTGCAAAC A 21

25

(2) INFORMACIÓN PARA ID. SEC. Nº 45:

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA:

- 30 (A) LONGITUD: 429 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(D) TOPOLOGÍA: lineal

- (ii) TIPO DE MOLÉCULA: proteína
35 (v) TIPO DE FRAGMENTO: C terminal

Tyr	Cys	Lys	Phe	Pro	Phe	Leu	Phe	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Asn	Ser	Cys
1				5					10					15	
Thr	Asp	Thr	Gly	Arg	Ser	Asp	Gly	Phe	Leu	Trp	Cys	Ser	Thr	Thr	Tyr
			20					25					30		
Asn	Phe	Glu	Lys	Asp	Gly	Lys	Tyr	Gly	Phe	Cys	Pro	His	Glu	Ala	Leu
		35					40					45			

5

10

15

20

25

30

35

	Phe Thr Met Gly Gly Asn Ala Glu Gly Gln Pro Cys Lys Phe Pro Phe	
	50	55 60
5	Arg Phe Gln Gly Thr Ser Tyr Asp Ser Cys Thr Thr Glu Gly Arg Thr	
	65	70 75 80
	Asp Gly Tyr Arg Trp Cys Gly Thr Thr Glu Asp Tyr Asp Arg Asp Lys	
		85 90 95
10	Lys Tyr Gly Phe Cys Pro Glu Thr Ala Met Ser Thr Val Gly Gly Asn	
		100 105 110
	Ser Glu Gly Ala Pro Cys Val Phe Pro Phe Thr Phe Leu Gly Asn Lys	
		115 120 125
15	Tyr Glu Ser Cys Thr Ser Ala Gly Arg Ser Asp Gly Lys Met Trp Cys	
	130	135 140
	Ala Thr Thr Ala Asn Tyr Asp Asp Asp Arg Lys Trp Gly Phe Cys Pro	
	145	150 155 160
20	Asp Gln Gly Tyr Ser Leu Phe Leu Val Ala Ala His Glu Phe Gly His	
		165 170 175
	Ala Met Gly Leu Glu His Ser Gln Asp Pro Gly Ala Leu Met Ala Pro	
		180 185 190
25	Ile Tyr Thr Tyr Thr Lys Asn Phe Arg Leu Ser Gln Asp Asp Ile Lys	
	195	200 205
	Gly Ile Gln Glu Leu Tyr Gly Ala Ser Pro Asp Ile Asp Leu Gly Thr	
	210	215 220
30	Gly Pro Thr Pro Thr Leu Gly Pro Val Thr Pro Glu Ile Cys Lys Gln	
	225	230 235 240
	Asp Ile Val Phe Asp Gly Ile Ala Gln Ile Arg Gly Glu Ile Phe Phe	
		245 250 255
35	Phe Lys Asp Arg Phe Ile Trp Arg Thr Val Thr Pro Arg Asp Lys Pro	
		260 265 270

	Met Gly Pro Leu Leu Val Ala Thr Phe Trp Pro Glu Leu Pro Glu Lys	
	275	280 285
5	Ile Asp Ala Val Tyr Glu Ala Pro Gln Glu Glu Lys Ala Val Phe Phe	
	290	295 300
	Ala Gly Asn Glu Tyr Trp Ile Tyr Ser Ala Ser Thr Leu Glu Arg Gly	
	305	310 315 320
10	Tyr Pro Lys Pro Leu Thr Ser Leu Gly Leu Pro Pro Asp Val Gln Arg	
	325	330 335
	Val Asp Ala Ala Phe Asn Trp Ser Lys Asn Lys Lys Thr Tyr Ile Phe	
	340	345 350
15	Ala Gly Asp Lys Phe Trp Arg Tyr Asn Glu Val Lys Lys Lys Met Asp	
	355	360 365
	Pro Gly Phe Pro Lys Leu Ile Ala Asp Ala Trp Asn Ala Ile Pro Asp	
	370	375 380
20	Asn Leu Asp Ala Val Val Asp Leu Gln Gly Gly Gly His Ser Tyr Phe	
	385	390 395 400
	Phe Lys Gly Ala Tyr Tyr Leu Lys Leu Glu Asn Gln Ser Leu Lys Ser	
	405	410 415
25	Val Lys Phe Gly Ser Ile Lys Ser Asp Trp Leu Gly Cys	
	420	425

Reivindicaciones

1. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ para uso en la inhibición de la angiogénesis mediada por $\alpha_v\beta_3$ en un tejido, siendo dicho antagonista un compuesto mimético orgánico seleccionado de

5

ácido (S)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico,

ácido (S)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-N-t-butiloxicarbonil-propiónico,

ácido (R)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico,

ácido (S)-3-(4-(4-guanidinobutiloxi)fenil-2-(10-canforsulfonamido)-propiónico, y

10

ácido (S)-3-(4-(5-guanidinopentiloxi)fenil-2-butilsulfonamido-propiónico.

2. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es un tumor sólido y dicho antagonista es para inducir la regresión del tejido del tumor sólido.

15

3. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es un tumor sólido que experimenta neovascularización y dicho antagonista es para uso en la inhibición del crecimiento de dicho tejido tumoral.

20

4. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es tejido inflamado en el que se está produciendo neovascularización.

5. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es tejido retinal en el que se está produciendo neovascularización.

25

6. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho antagonista es para uso en el tratamiento de la reestenosis en un tejido en el que se produce migración de células de músculo liso tras la angioplastia.

30

7. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho antagonista es para uso en la reducción del suministro de sangre a un tejido necesario para apoyar el nuevo crecimiento de dicho tejido.

35

8. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho tejido es tejido humano.

9. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido está inflamado y dicha angiogénesis es angiogénesis de tejido inflamado.

5 **10.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 9, en el que dicho tejido es artrítico.

11. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 10, en el que dicho tejido artrítico está presente en un mamífero con artritis reumatoide.

10 **12.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es el tejido retinal y dicha angiogénesis es angiogénesis retinal.

13. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 12, en el que dicho tejido retinal está en un paciente con retinopatía diabética o degeneración macular.

15

14. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1, en el que dicho tejido es un tumor sólido o una metástasis de tumor sólido y dicha angiogénesis es angiogénesis tumoral.

20 **15.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 14, en el que dicho tejido es un carcinoma.

16. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 15, en el que dicho tumor sólido es un tumor de pulmón, páncreas, mama, colon, laringe u ovario.

25

17. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 14, en el que dicho antagonista es para administrar en combinación con quimioterapia.

30 **18.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho antagonista es para administrar por vía intravenosa, transdérmica, intrasinoval, intramuscular u oral.

35 **19.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho antagonista es para administrar en una cantidad comprendida desde aproximadamente 0,1 mg/kg hasta aproximadamente 300 mg/kg.

20. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho es antagonista para administrar en una única dosis por vía intravenosa.

5 **21.** Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que dicho antagonista es para administrar en una o más dosis diarias durante uno o más días.

22. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 6, en el que dicho antagonista es para administrar tras la angioplastia.

10

23. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 22, en el que dicha angioplastia es la angioplastia coronaria.

24. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ según se reivindica en la reivindicación 1 o reivindicación 6, en el que dicho antagonista es para administrar a un paciente en riesgo de sufrir reestenosis tras la angioplastia.

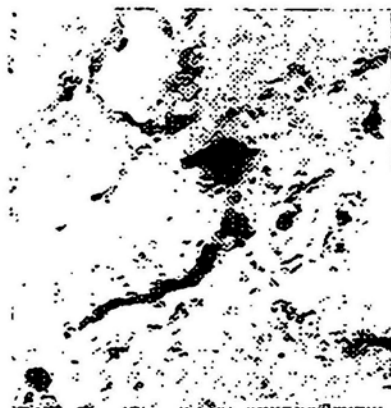
15

Anti- β 3



Piel normal

FIG. 1A



Anti- β 3

Tejido de granulación

FIG. 1B

Anti- β 1



Piel normal

FIG. 1C



Anti- β 1

Tejido de granulación

FIG. 1D

Piel normal

Anti-vWF

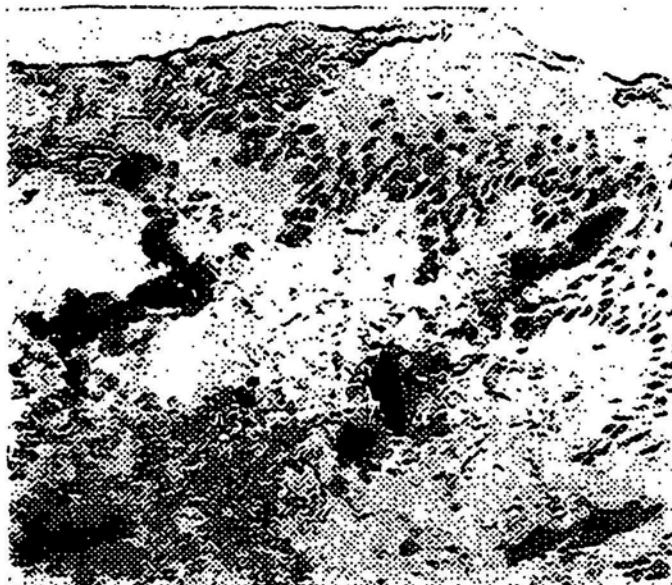


FIG. 2A

Tejido de granulaci3n

Anti-vWF

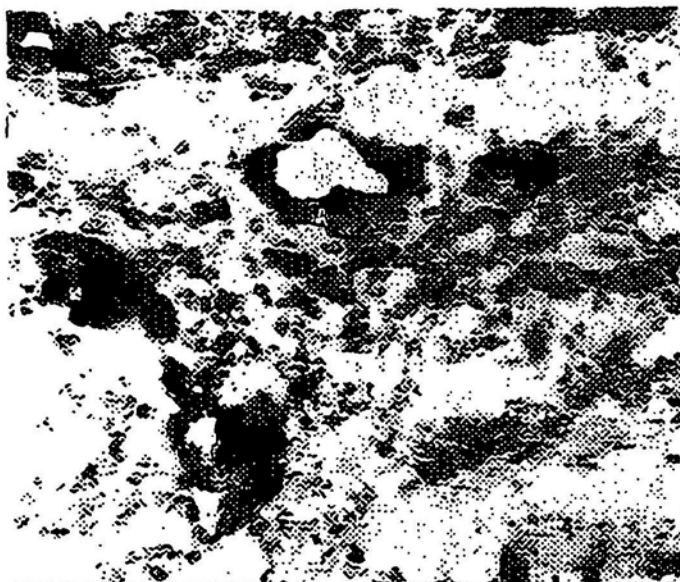


FIG. 2B

Piel normal

Anti-laminina

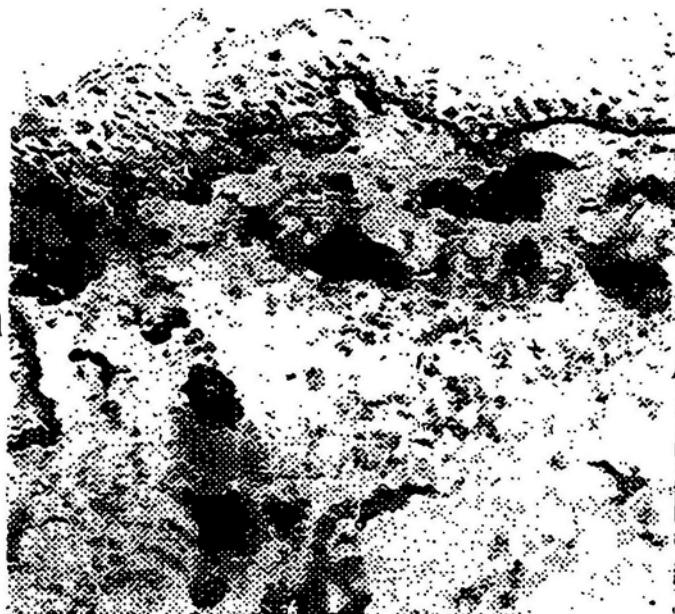


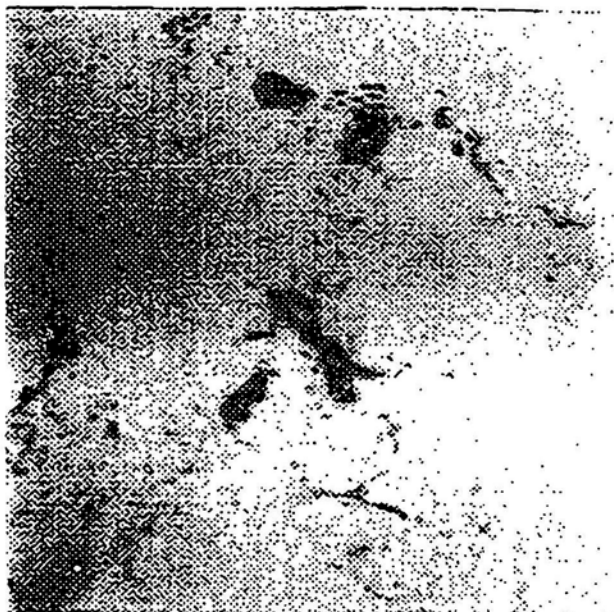
FIG. 2C

Tejido de granulación

Anti-laminina



FIG. 2D



Cáncer de vejiga

FIG. 3A



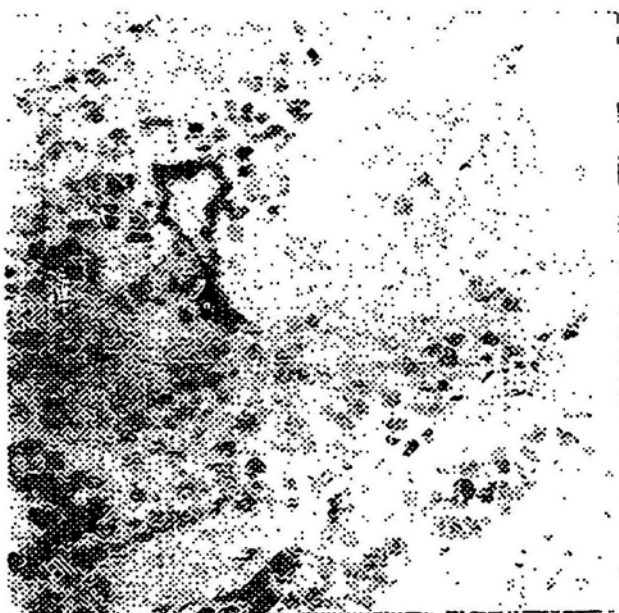
Cáncer de colon

FIG. 3B



Cáncer de mama

FIG. 3C



Cáncer de pulmón

FIG. 3D

Control

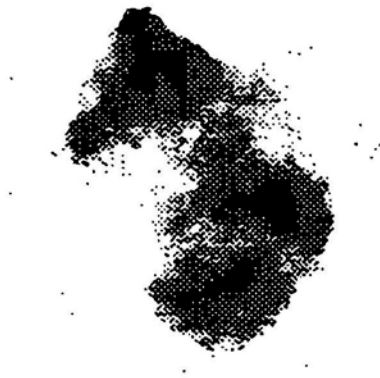
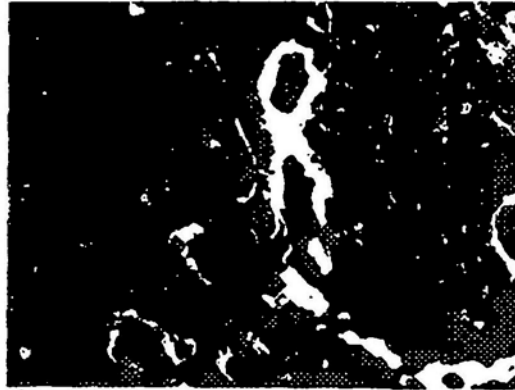


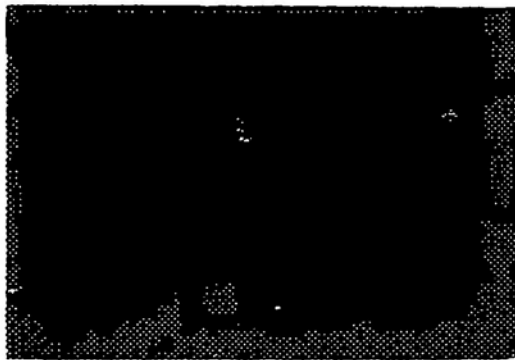
FIG. 4

FIG. 5A

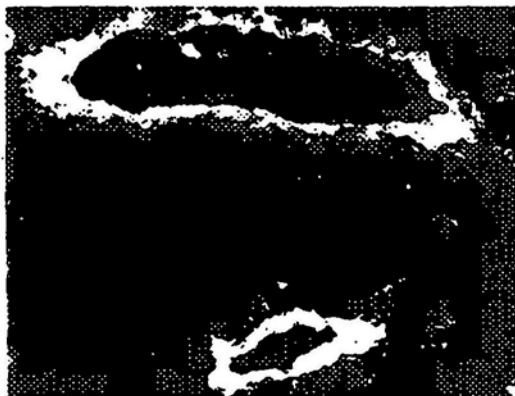
Sin tratar
Anti- β_1

**FIG. 5B**

Sin tratar
Anti- $\alpha v \beta_3$

**FIG. 5C**

tratada con bFGF
Anti- $\alpha v \beta_3$



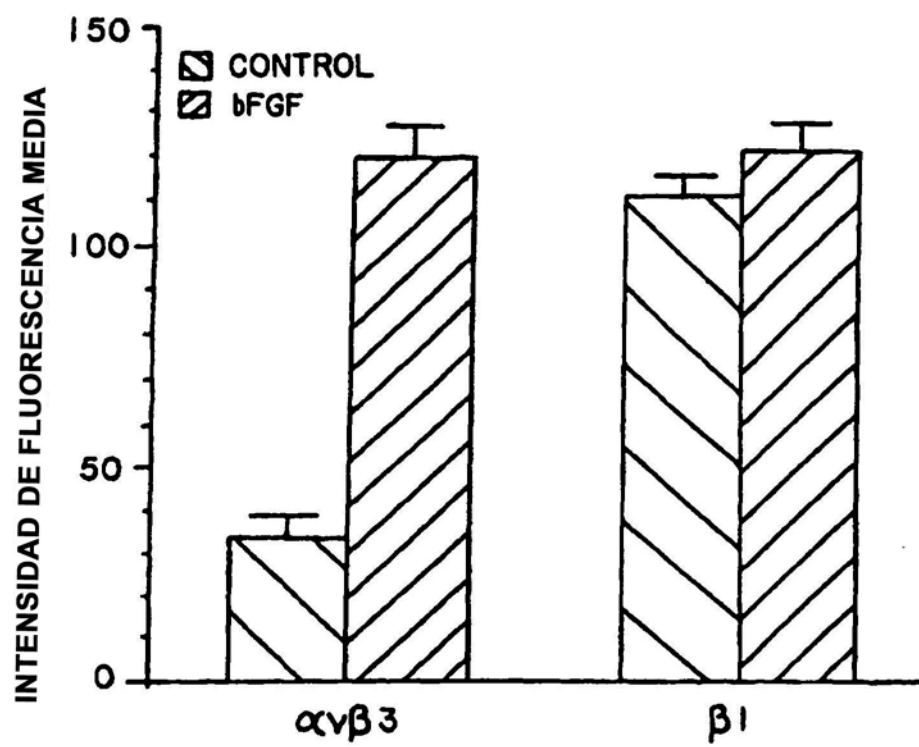
**FIG. 6**



FIG. 7A FIG. 7B FIG. 7C

FIG. 8A
Control



bFGF



FIG. 8B



FIG. 8C
Anti-β₁



FIG. 8D
Anti-α_vβ₅



FIG. 8E
Anti-α_vβ₃

FIG. 9C



FIG. 9B



FIG. 9A



Tumor tratado con RGD cíclico **CAM adyacente al tumor**
tratado con RGD cíclico

Tumor tratado con
péptido de control

FIG. 10C

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

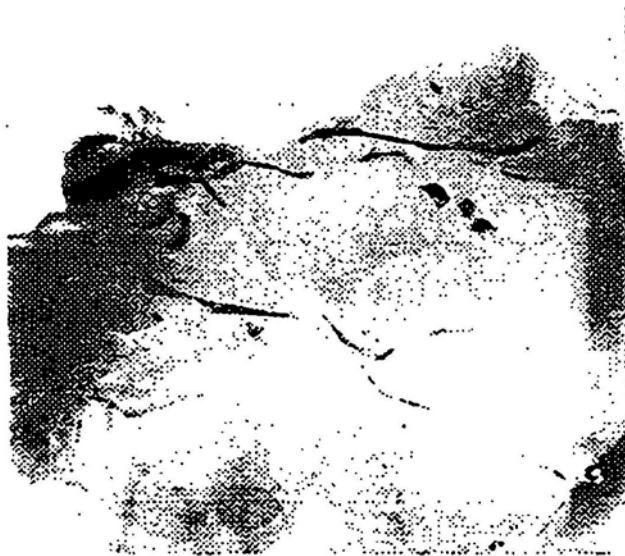


FIG. 10B

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



FIG. 10A

Control



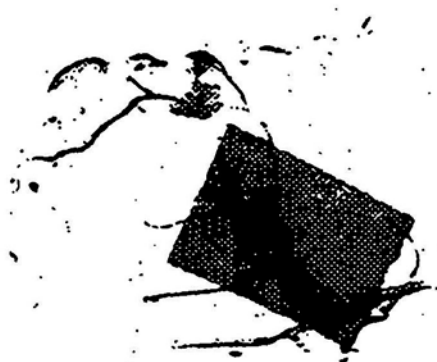


FIG. 11A

Anti- β 1



FIG. 11B

Anti- α v β 5

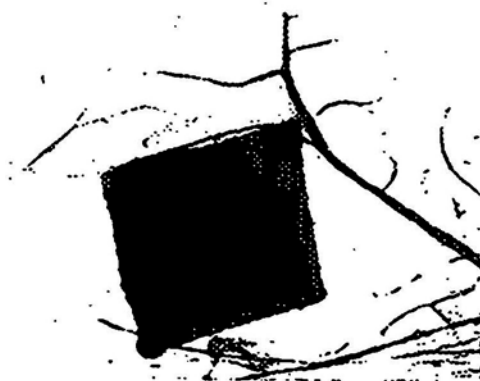
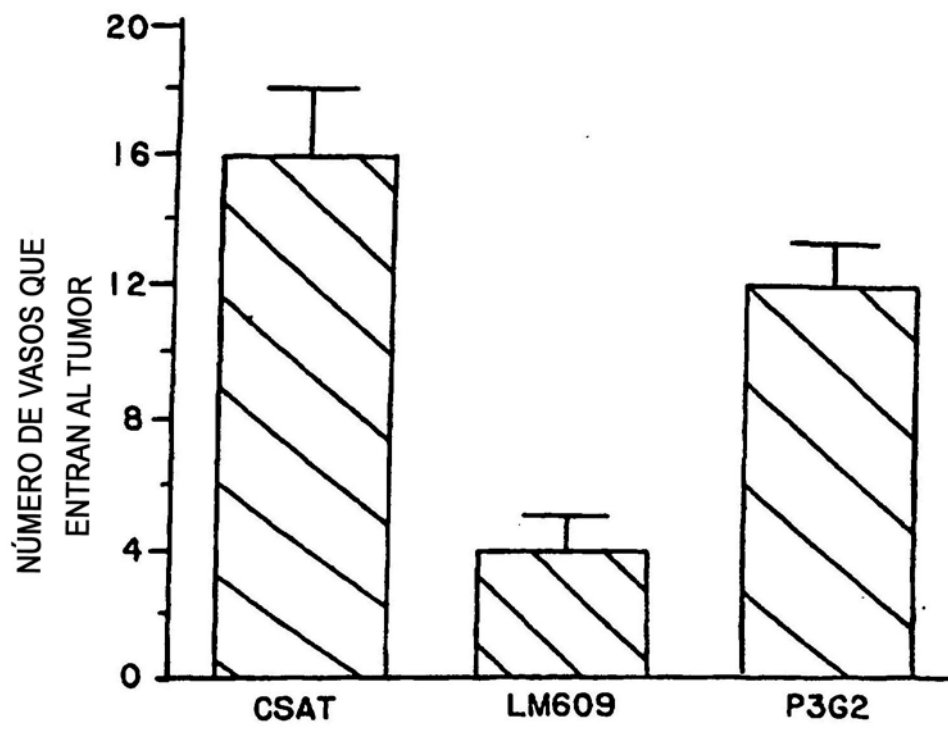


FIG. 11C

Anti- α v β 3

**FIG. 12**

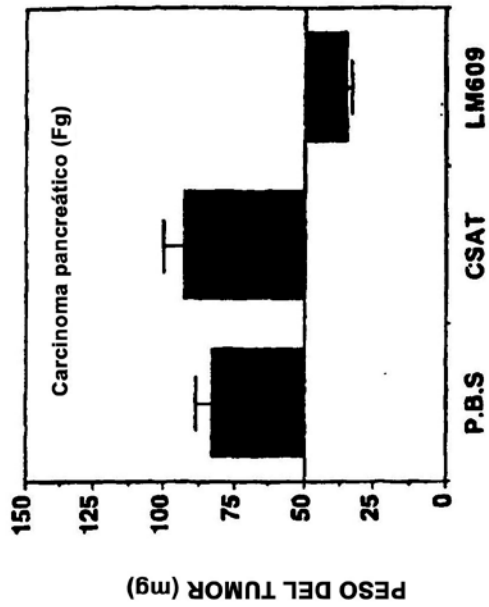


FIG. 13B

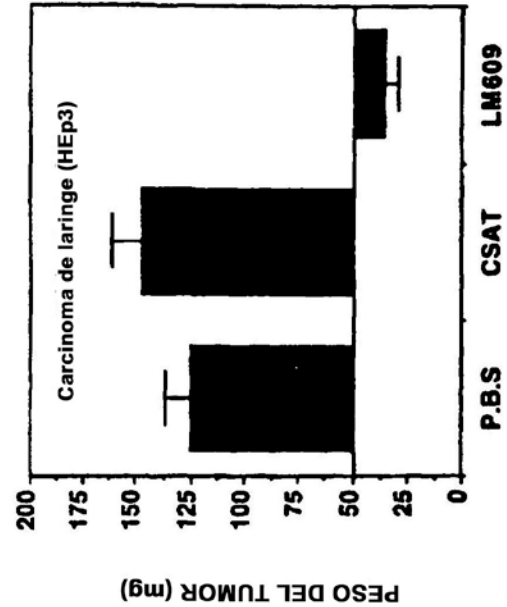


FIG. 13D

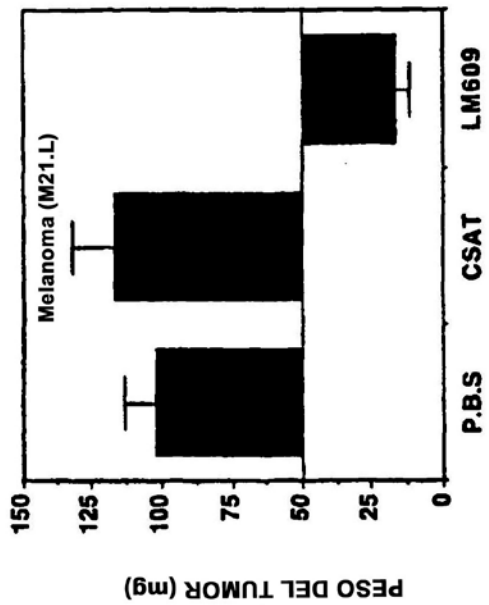


FIG. 13A

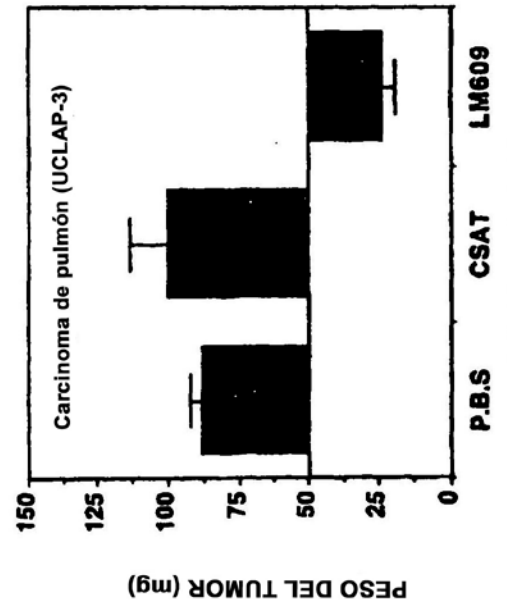
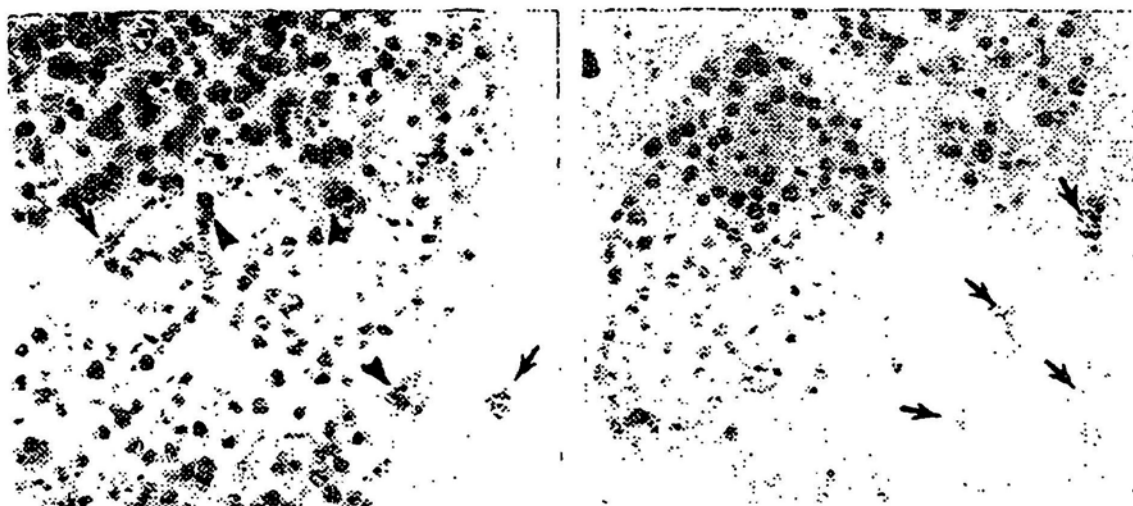


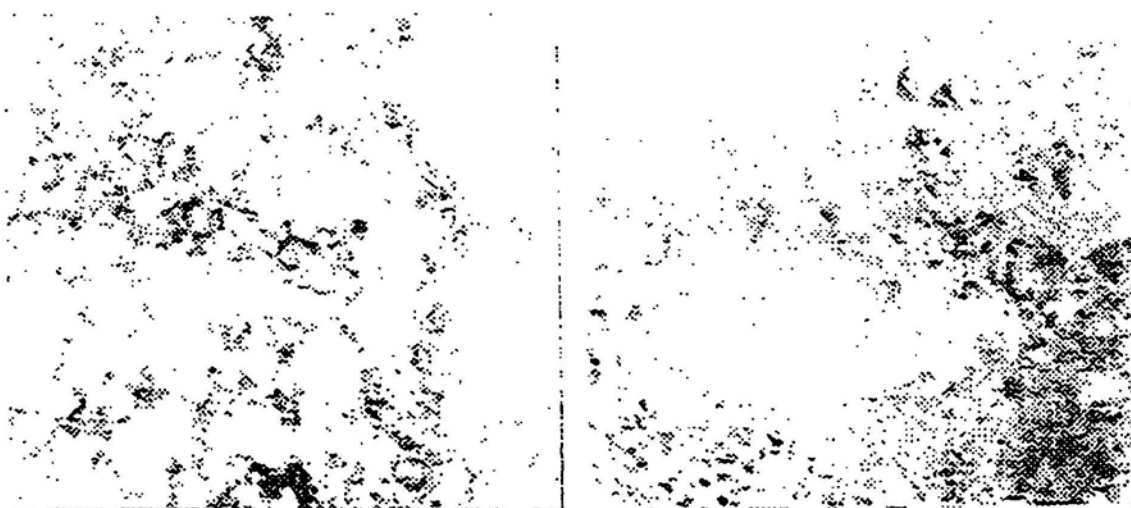
FIG. 13C

FIG. 14A



**Anti- α V β ₅
(P3G2)**

FIG. 14B



**Anti- α V β ₃
(LM609)**

FIG. 15A



**Tumor tratado
con péptido de control**

FIG. 15B



**Tumor tratado
con RGD cíclico**

FIG. 15C



**CAM adyacente al tumor
tratado con RGD cíclico**

FIG. 15D

Péptido de control

FIG. 15E

Péptido RGD cíclico



P1F6
(Anti- $\alpha_v\beta_5$)

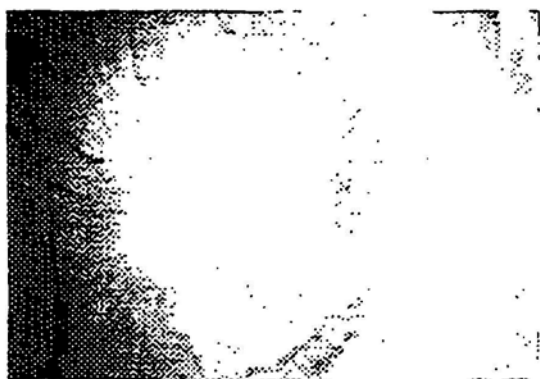


FIG. 16A

LM609
(Anti- $\alpha_v\beta_3$)

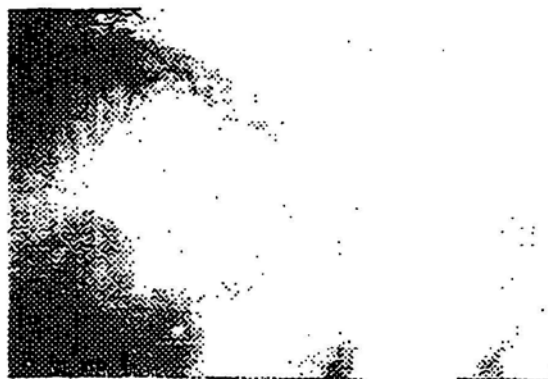


FIG. 16C

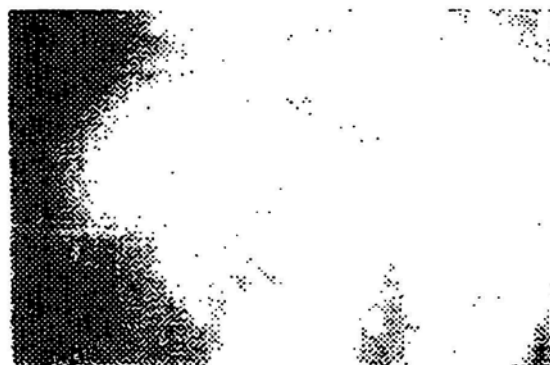


FIG. 16D

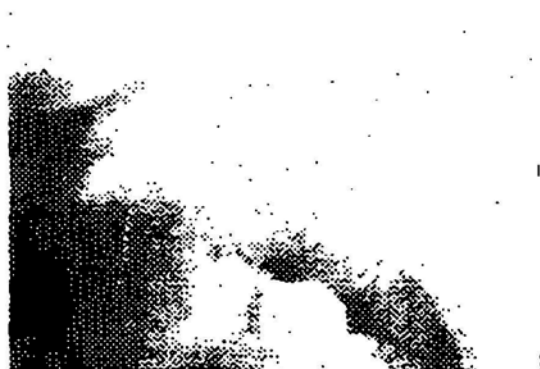


FIG. 16B



FIG. 16E

**Transplante
de piel humana**

**Inyección de
células
tumoraes
humanas**

**Cicatrización,
4 semanas**

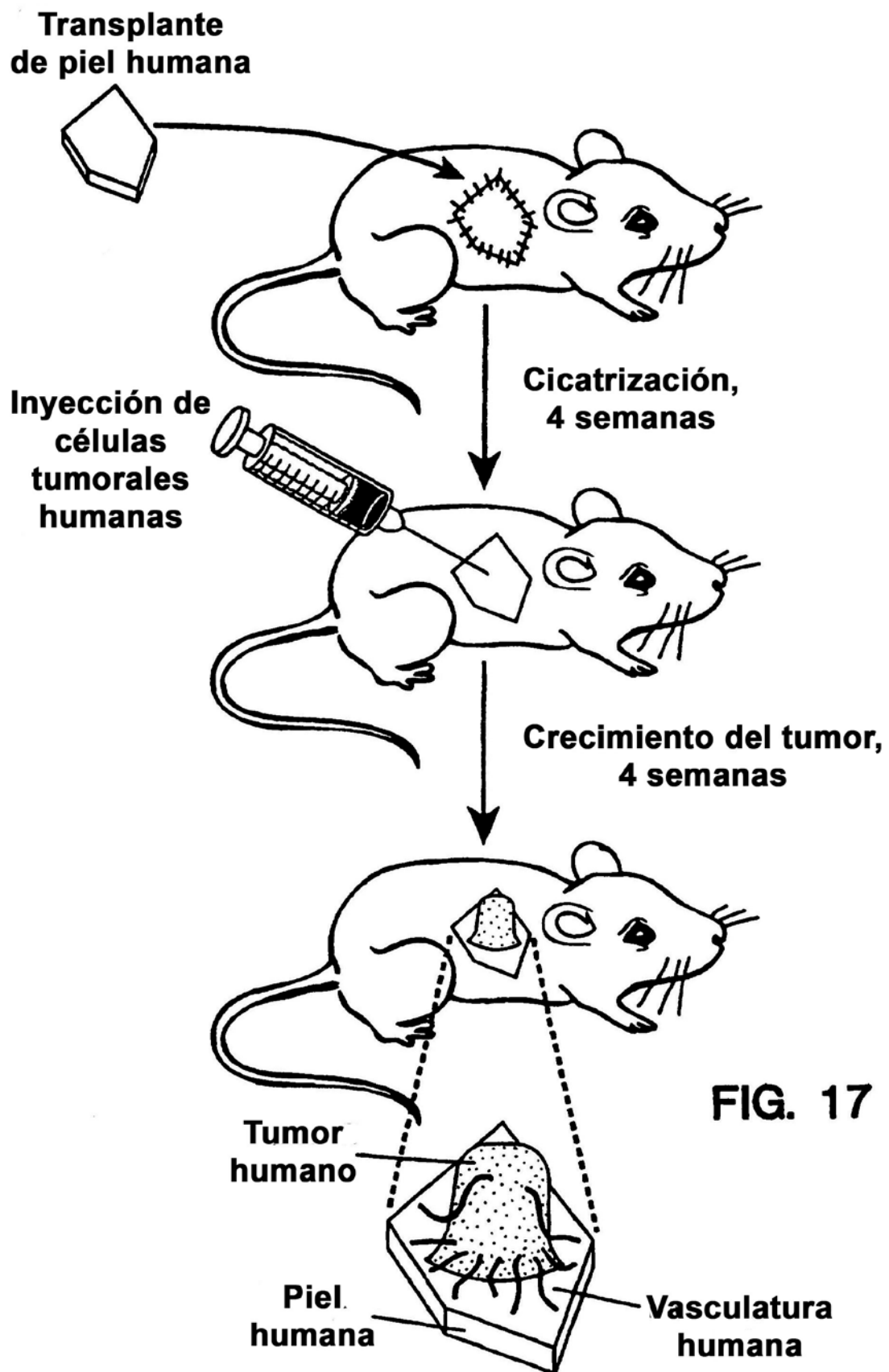
**Crecimiento del tumor,
4 semanas**

**Tumor
humano**

**Piel
humana**

**Vasculatura
humana**

FIG. 17



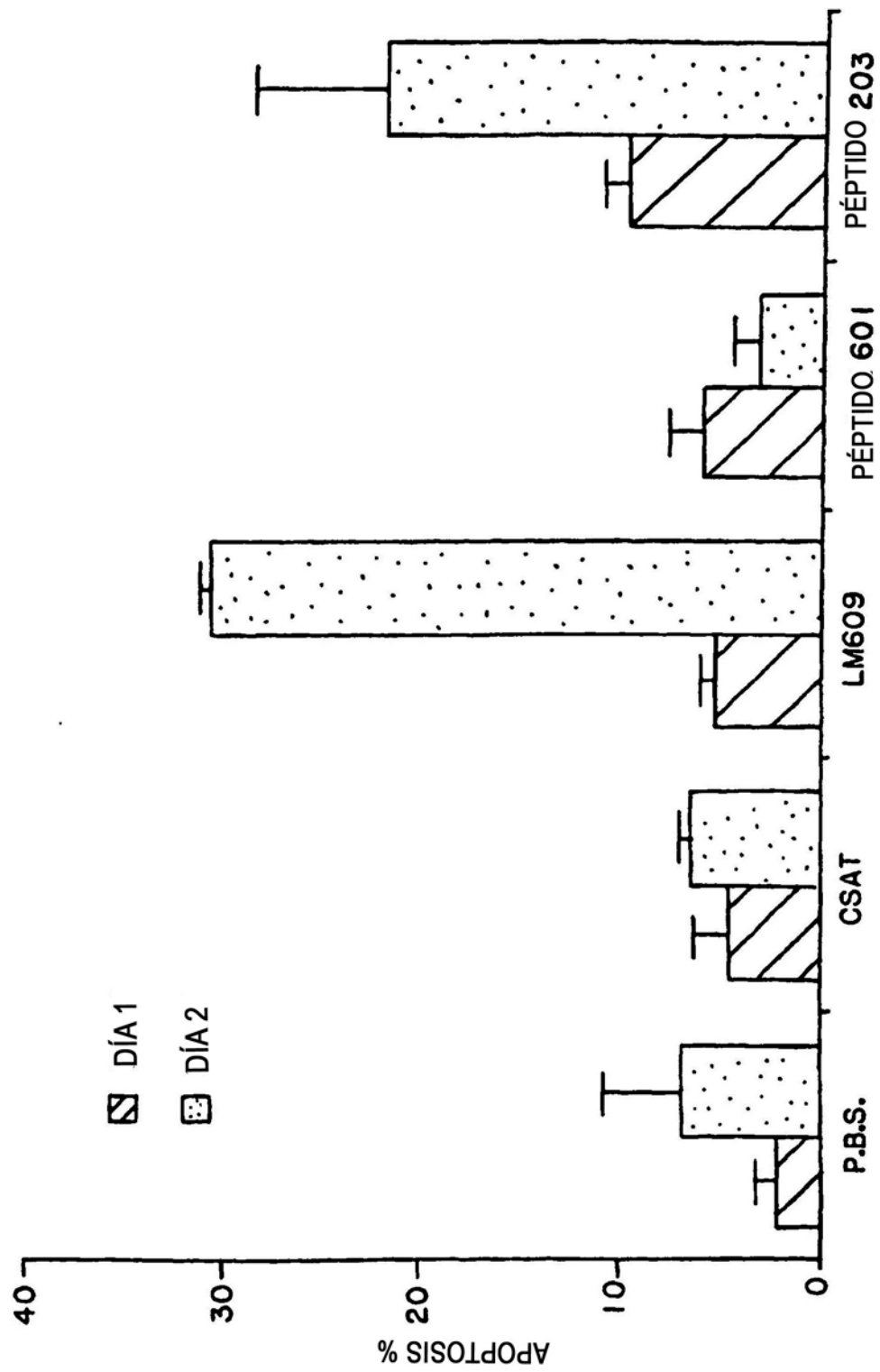


FIG. 18

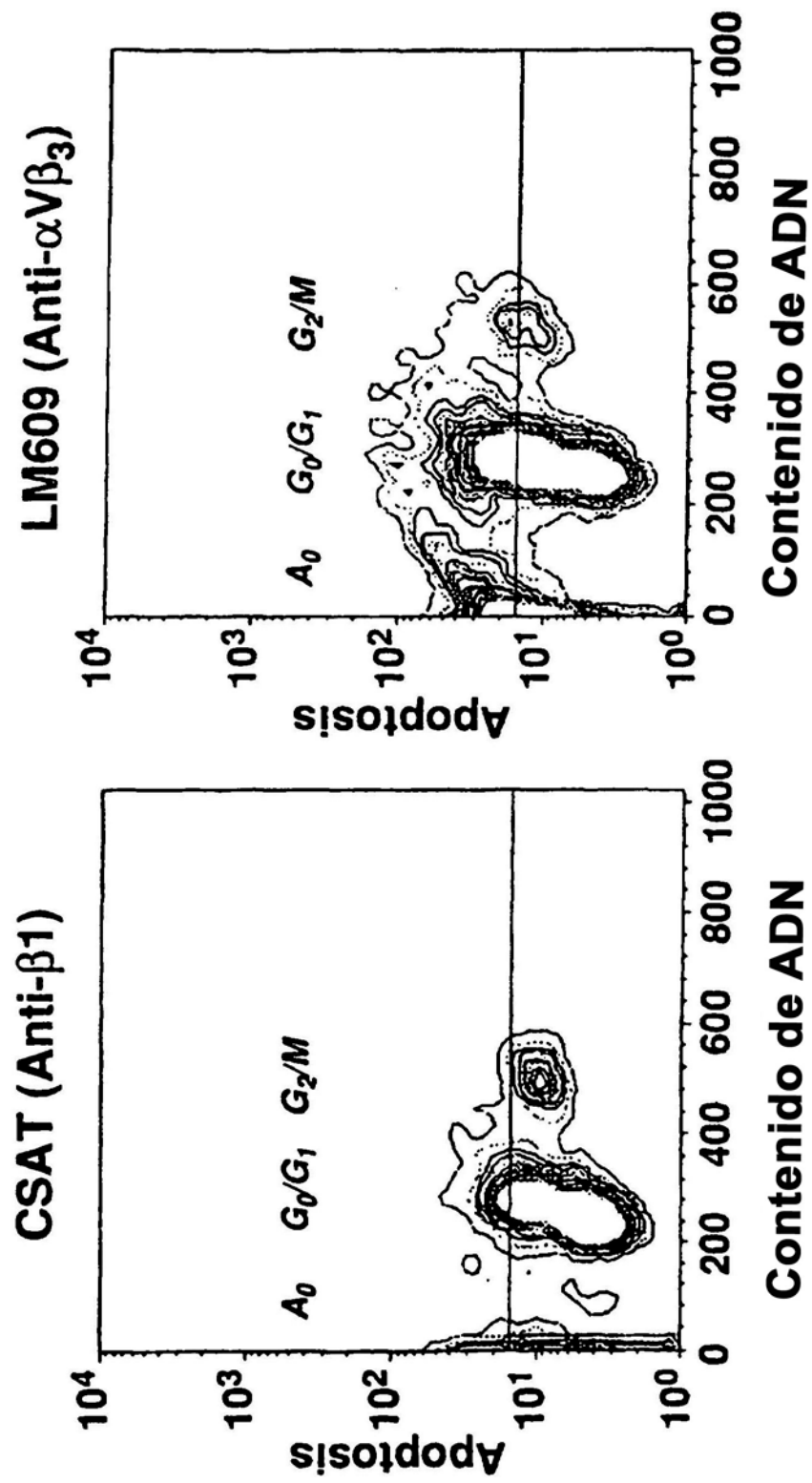


FIG. 19

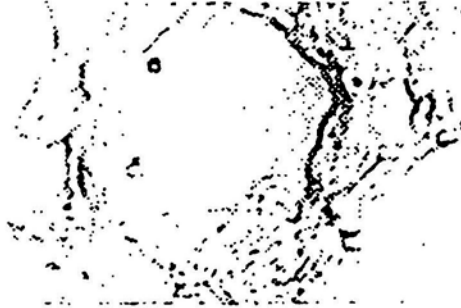


FIG. 20A



FIG. 20B



FIG. 20C



FIG. 20D

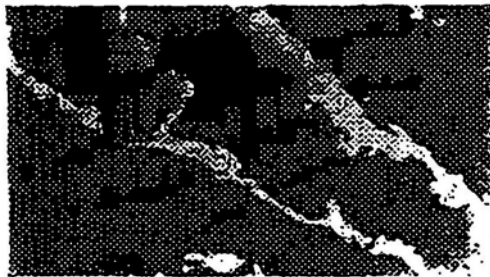


FIG. 20E

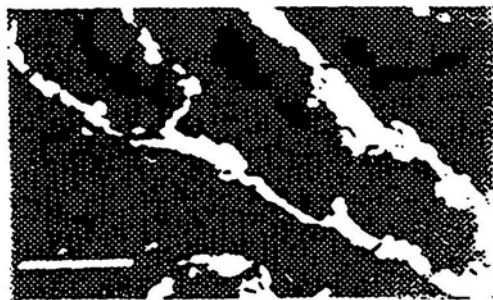


FIG. 20F

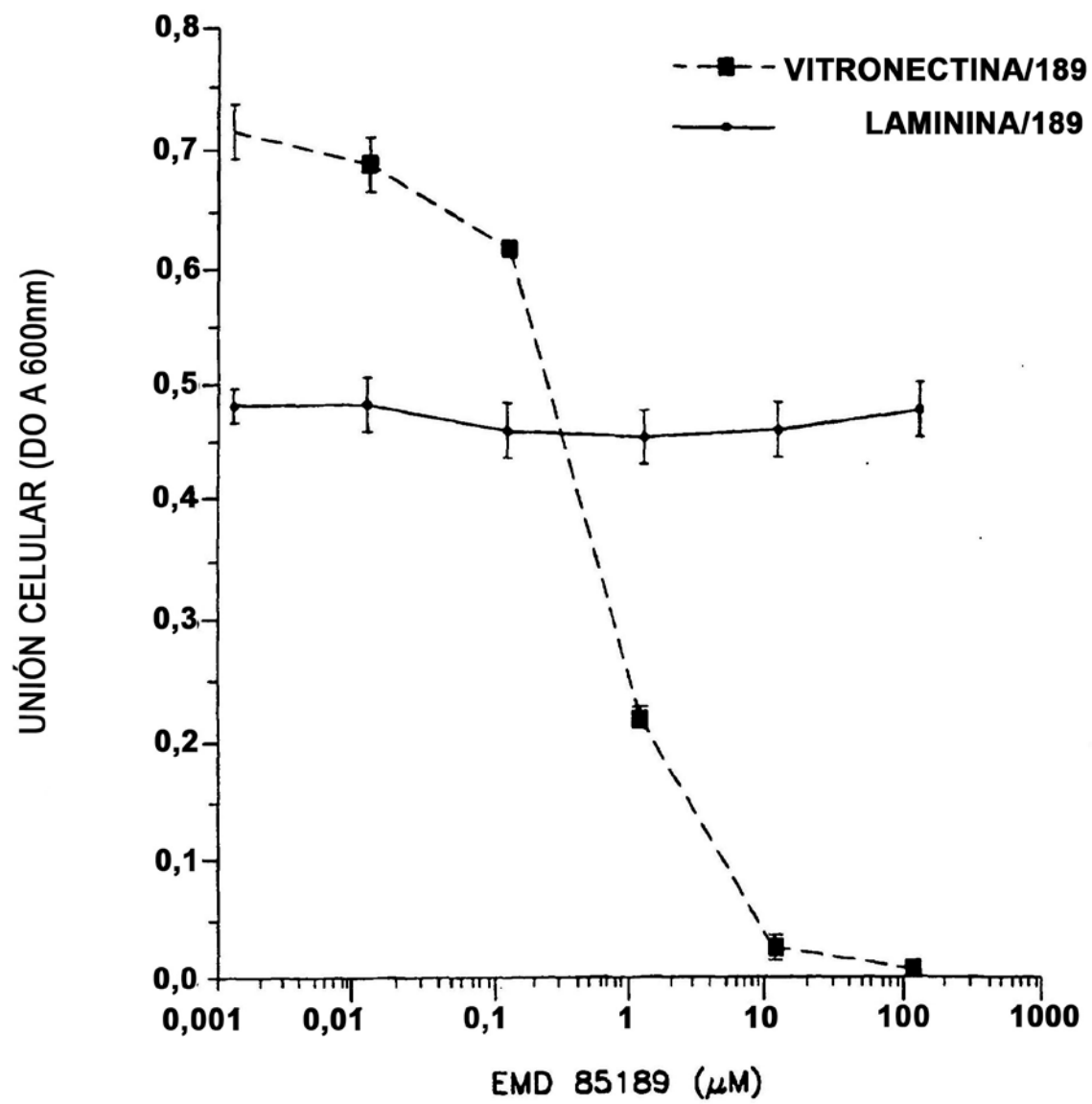


FIG. 2I

FIG. 22A

FIG. 22B

[illegible]

FIG. 22C

TCAATTACTGGACCAGTCAGGTACTGGCACCACAAACATTAAGTACCAGTACTGTACACATCIGATAATTTAAAGTGTTCCTCCTCAACATACAAAAG
 ATGTTTACGATCTATTCGGTACAATTTTTCAGTTTTTGTGCTAGTCATAGCAATGCTAGTAGCAGAACACGACGGTCTTTATTCCTCCCTGGTGCTTG
 AAGAAAGCATTGAAATCATTTGGAGACTGGACCAGACCCCTGTGTTAAATCCATCTCAATAGCCTCAAGTAAGATGTACCAGCAGTGCACTTTGAATTTT
 TTTTAAATTTTTTTTTTAAATACAACCTTTTTATAATAGATGGTTTGTGTTAATGTTTTAACCCCTCTTGGGAGTTTGTATCTACTGCCATTTTATTACA
 TAAATGATACAAAAGACIGICAAAGGCACAGGTTGCCACGGGATTTGATTTGATTTGATGCAATGGAATCATGGCAAGAACTGTATTAAAGTATTGTT
 TTAAGTACTTTTCTATTTTAAACCTTAGTTCAACTTAGCAATTTGCTCCTGCACTTTGTGTTACTCTATAACTTGTCTATACAGACAGAAATGACTCA
 GATGTTTTAAATCAATGATTTATACACAGAAGTCAAGTATTACCTGTTTACCTTGTCTTTTATTTTCTGTTCTTTATAATATTGAGTTTTTGTGTTAGG
 CTTTCTGCTTAGGCATTGGGCAACAGAAAGGTGTTCCCTTTCACATATGATGGAAATGTTCTCATTAATAAAAAAAAGGTTAAAAAATCCAGAAAAACAAT
 GTCCCAACACATGAATGCCAATGCTACAAATAAAATTAAATTACACTGTCAAAAAAAACGGTTAAC

+2091
 +2191
 +2291
 +2391
 +2491
 +2591
 +2691
 +2791
 +2864

FIG. 22D

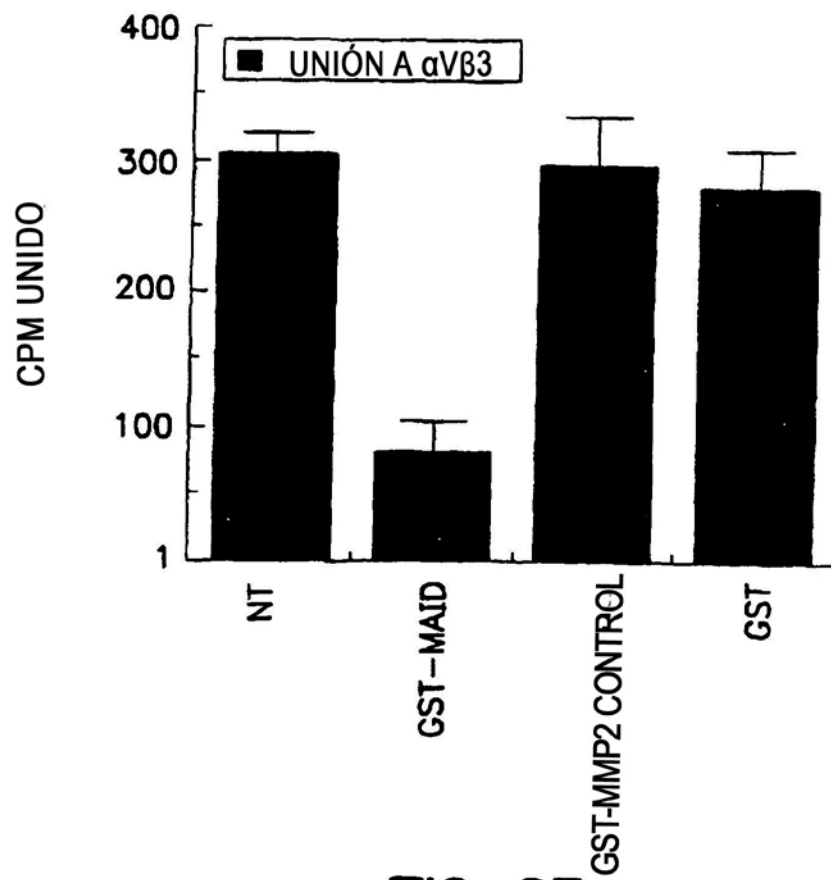


FIG. 23

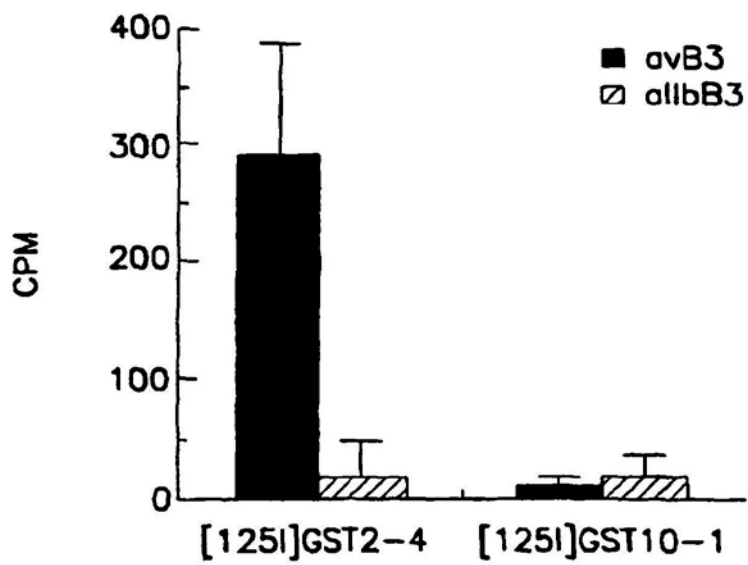


FIG. 24



FIG. 25A

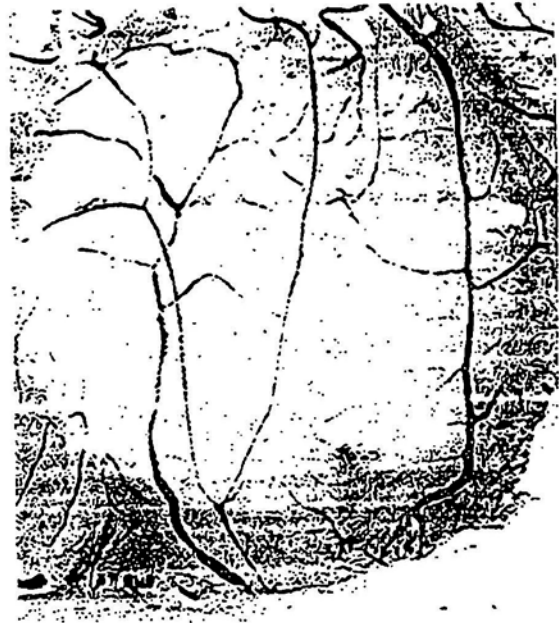


FIG. 25B



FIG. 25C



FIG. 25D

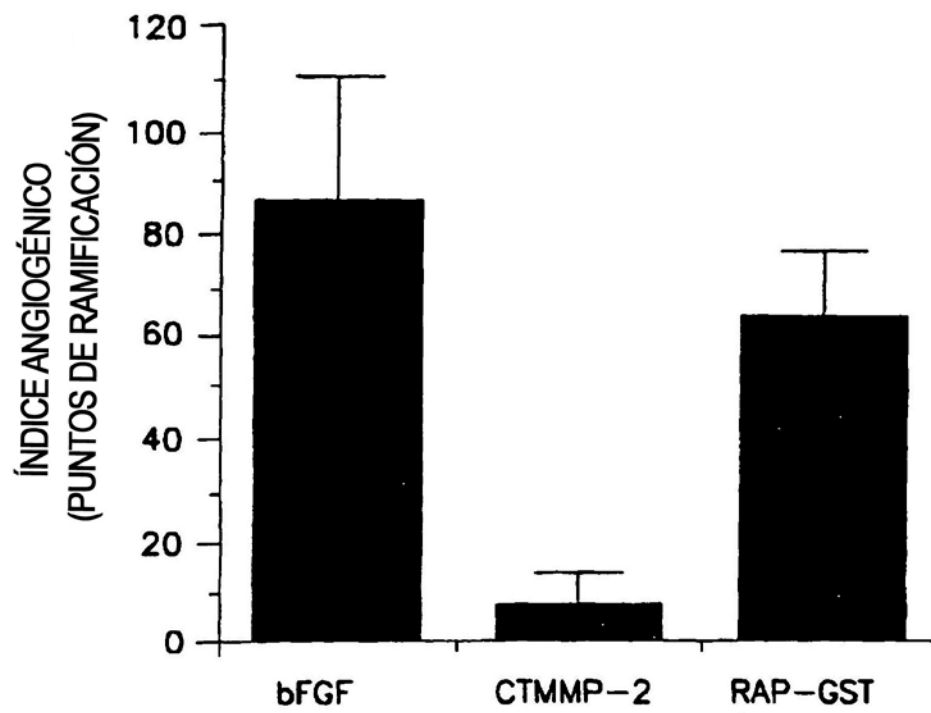


FIG. 26

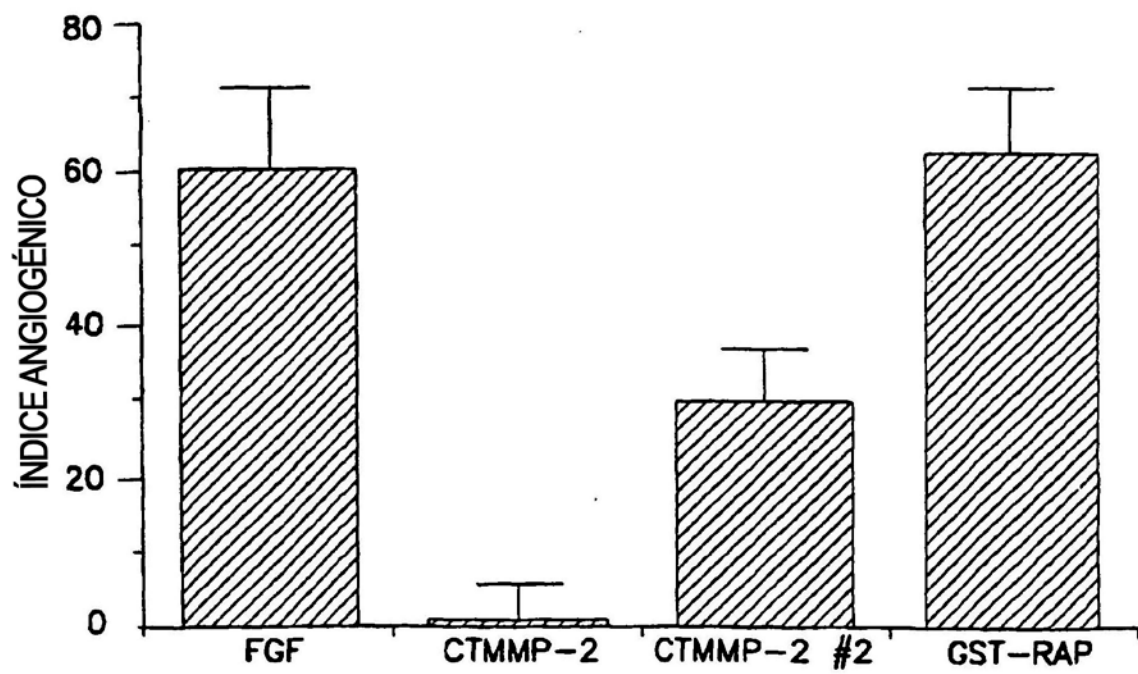
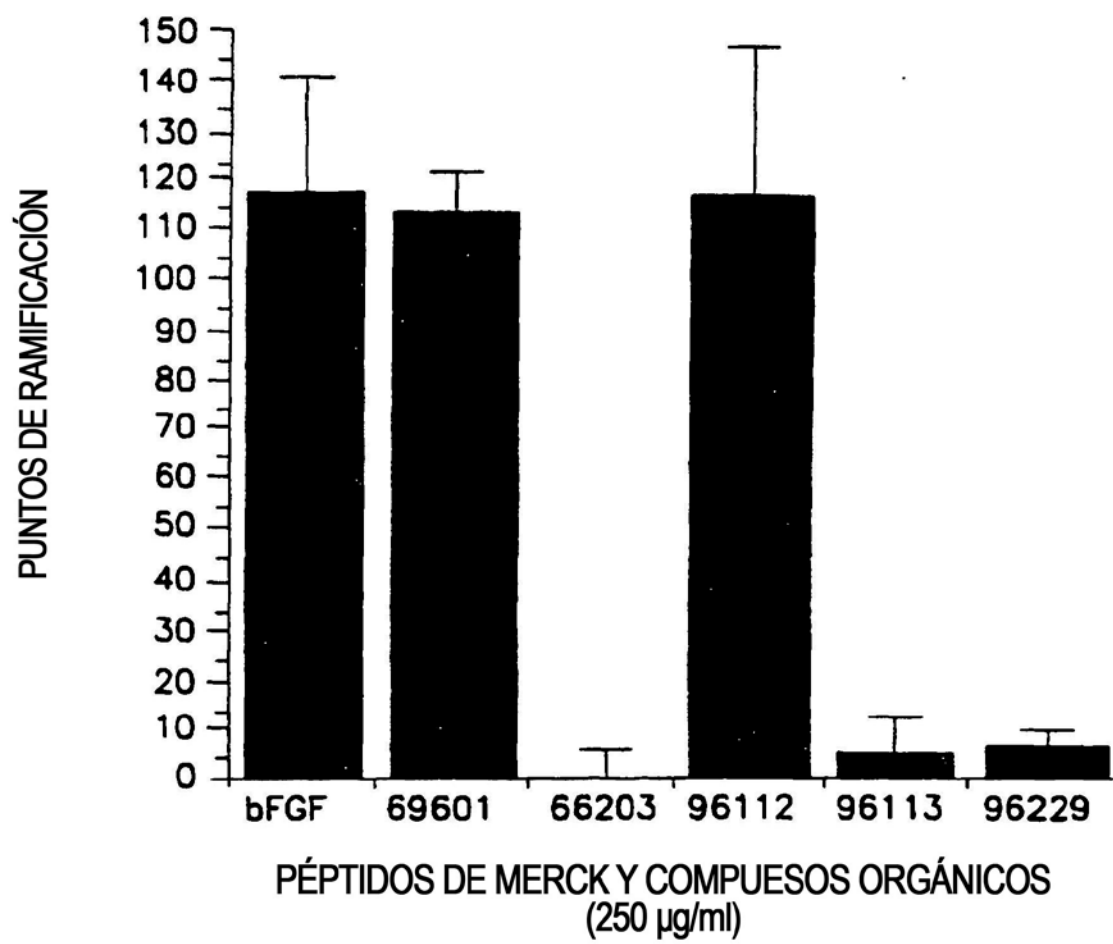
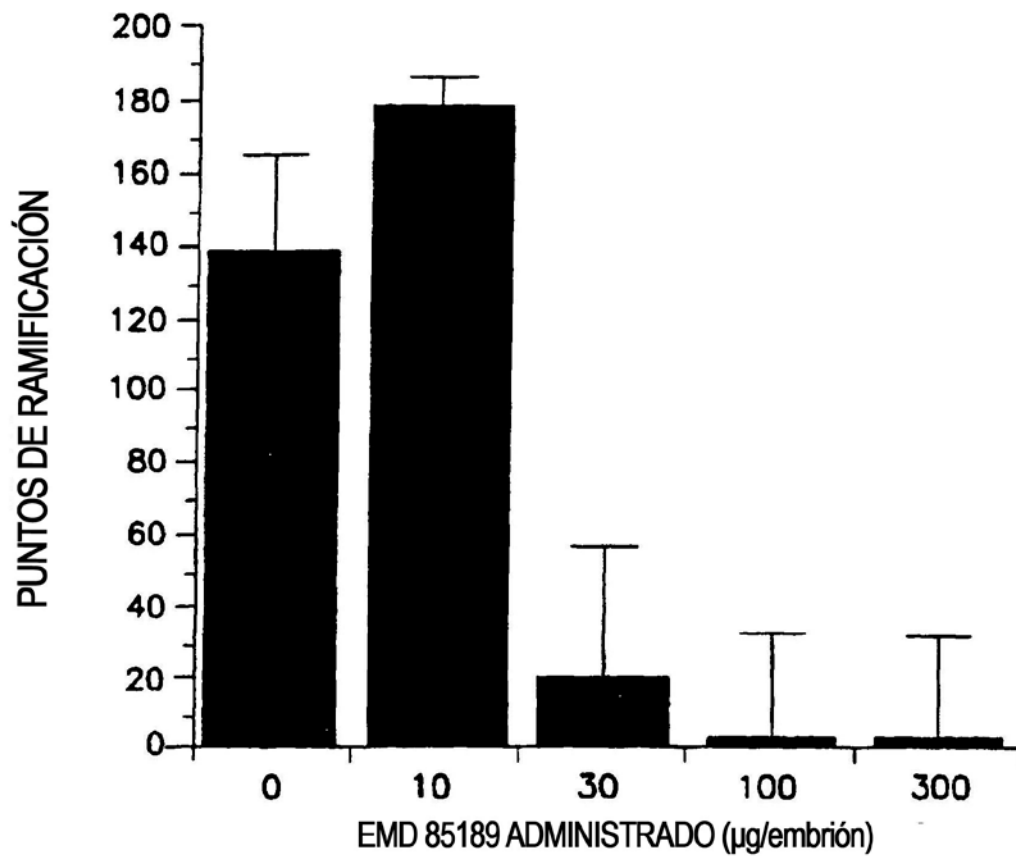
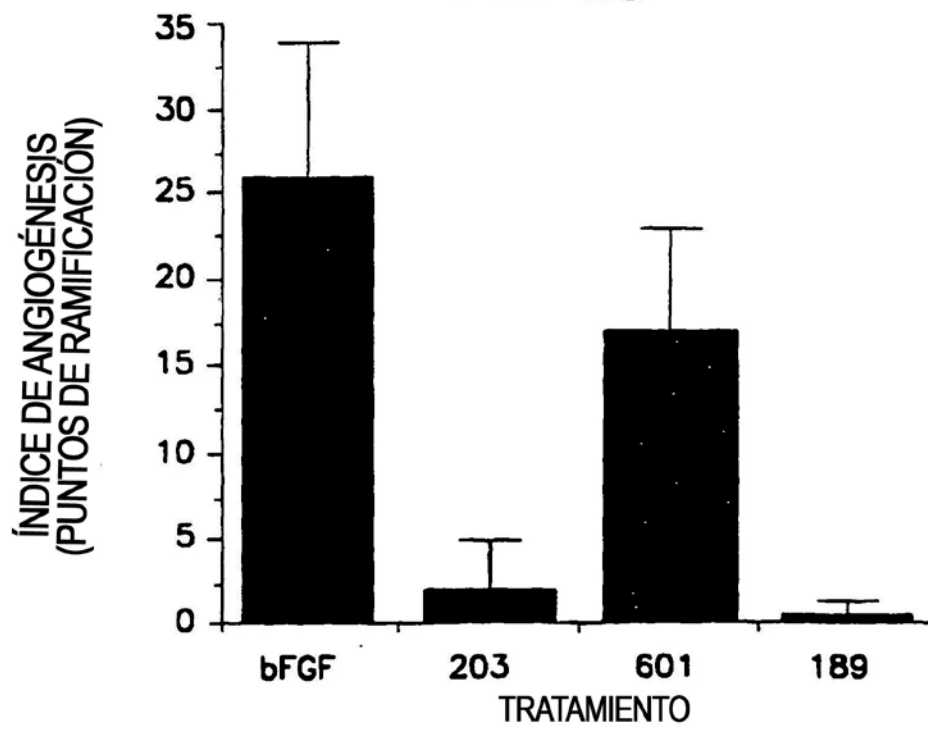
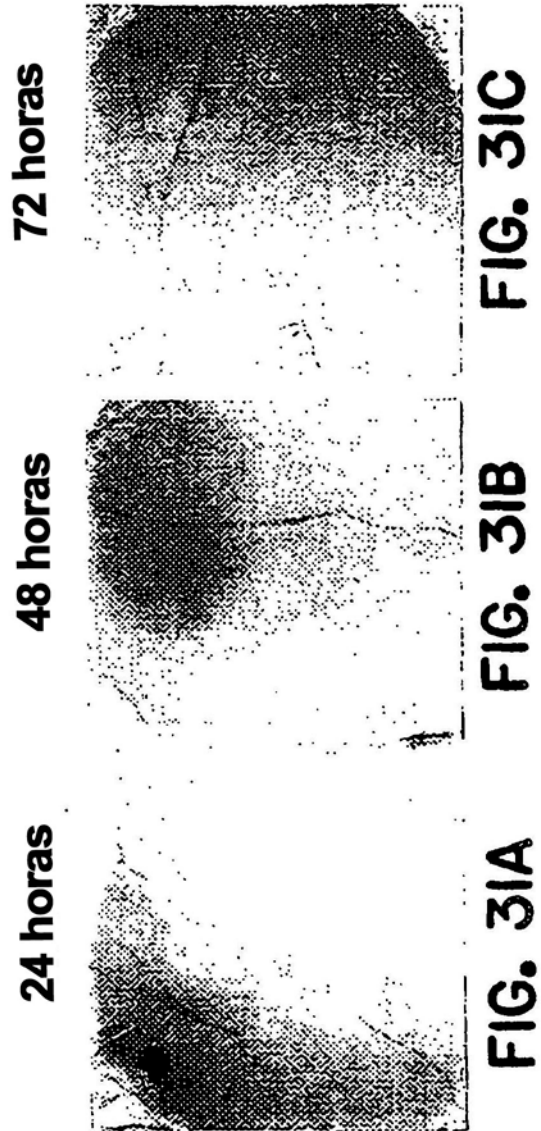


FIG. 27

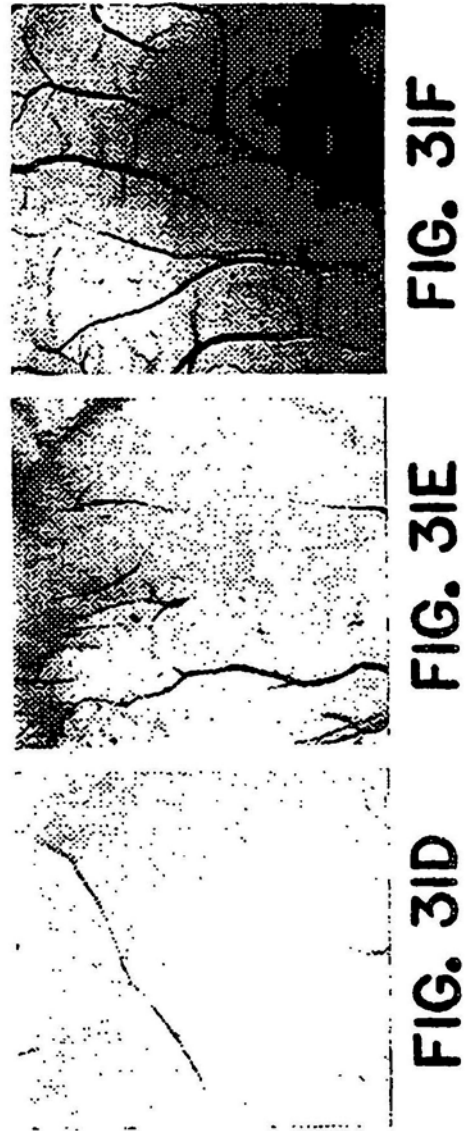
**FIG. 28**

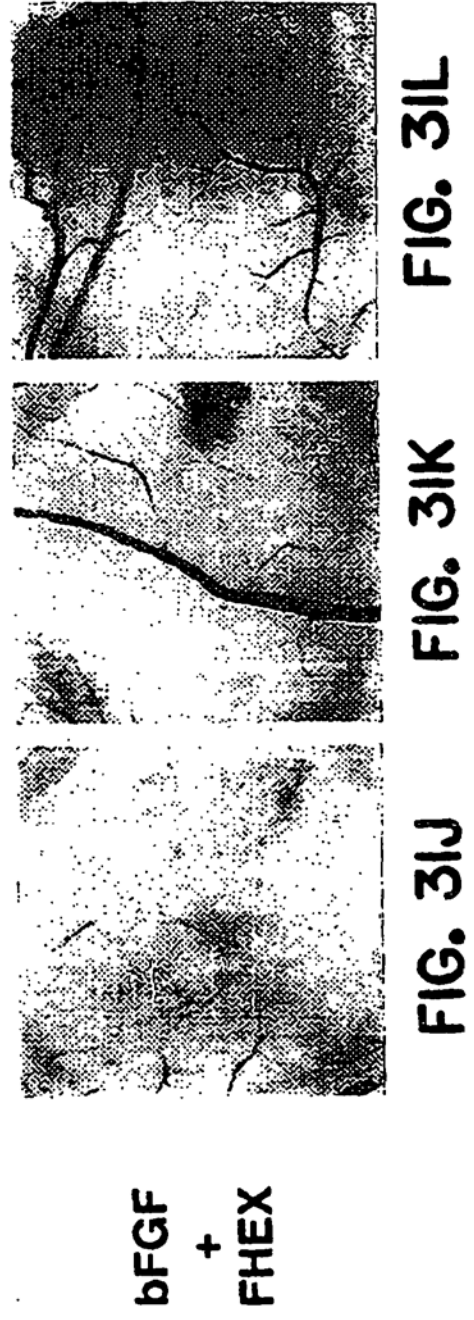
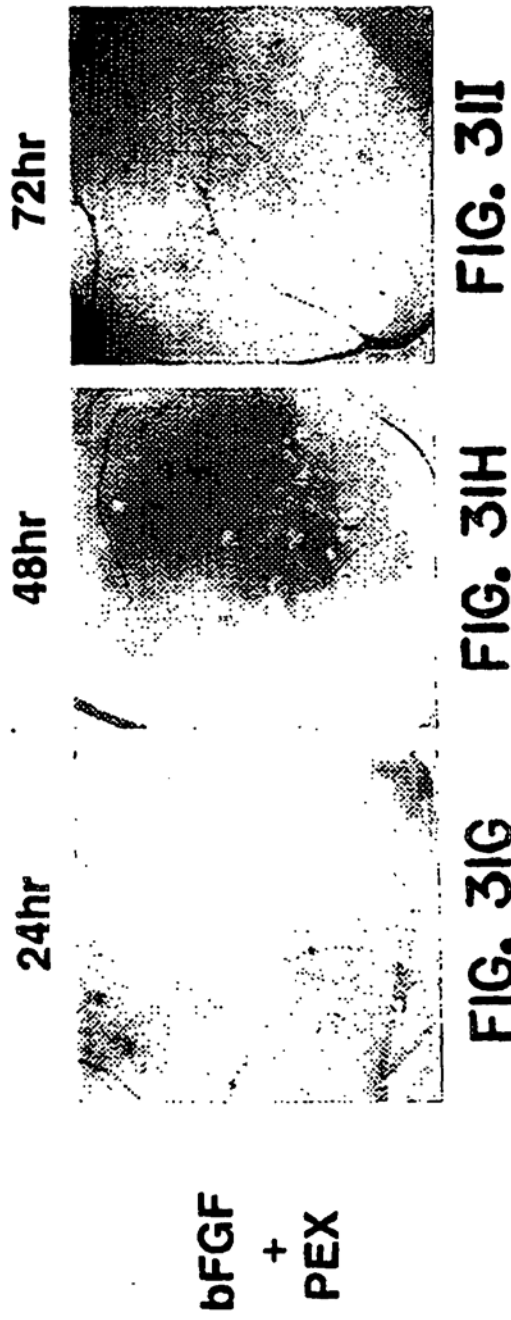
**FIG. 29****FIG. 30**

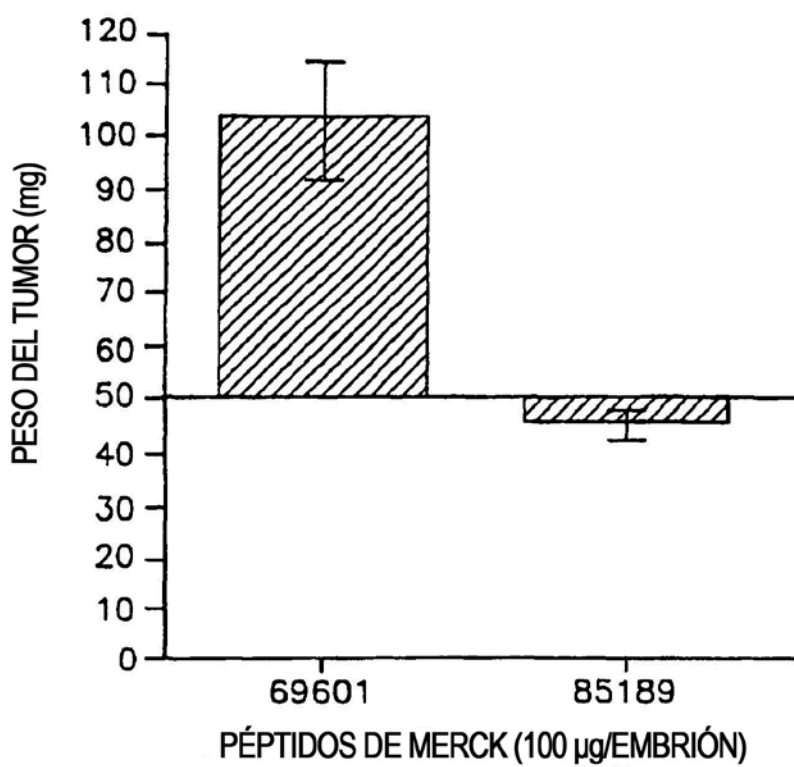
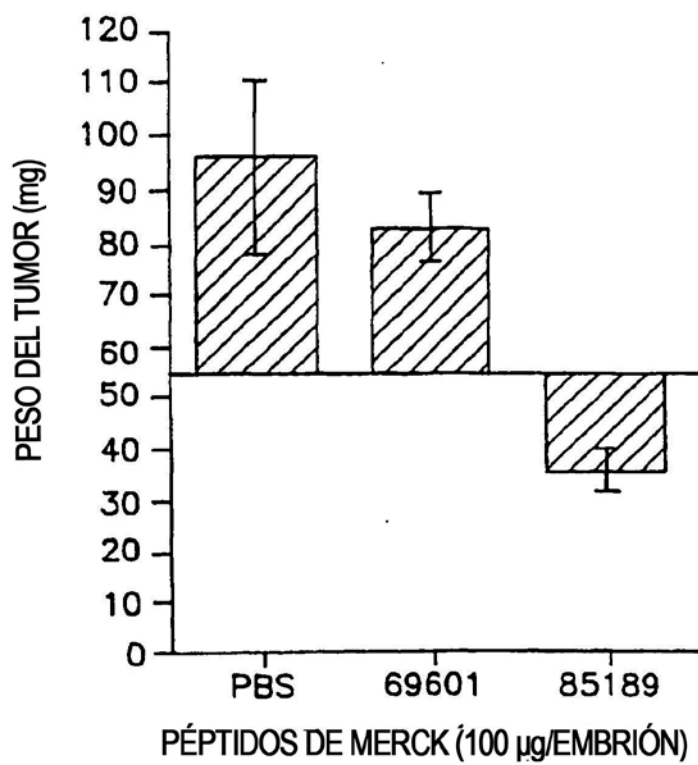
**Sin
Tratamiento**

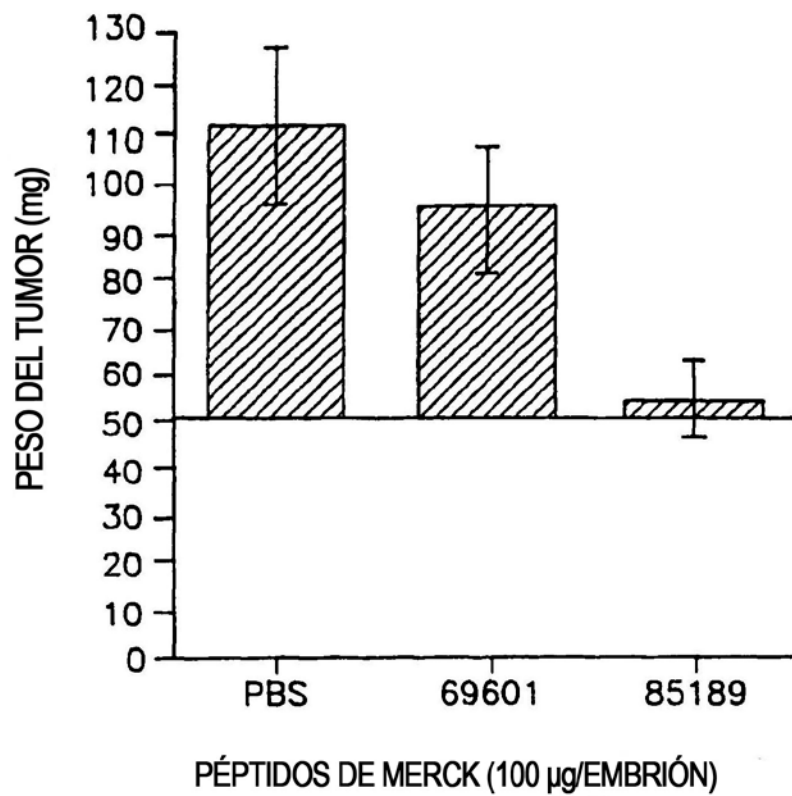
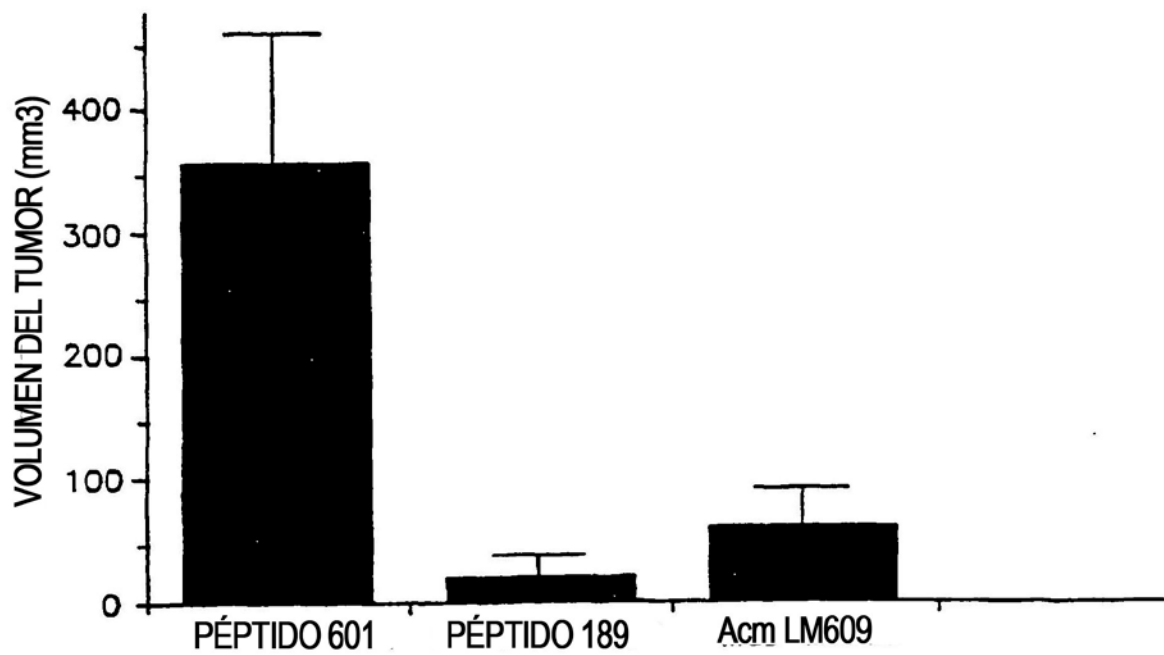


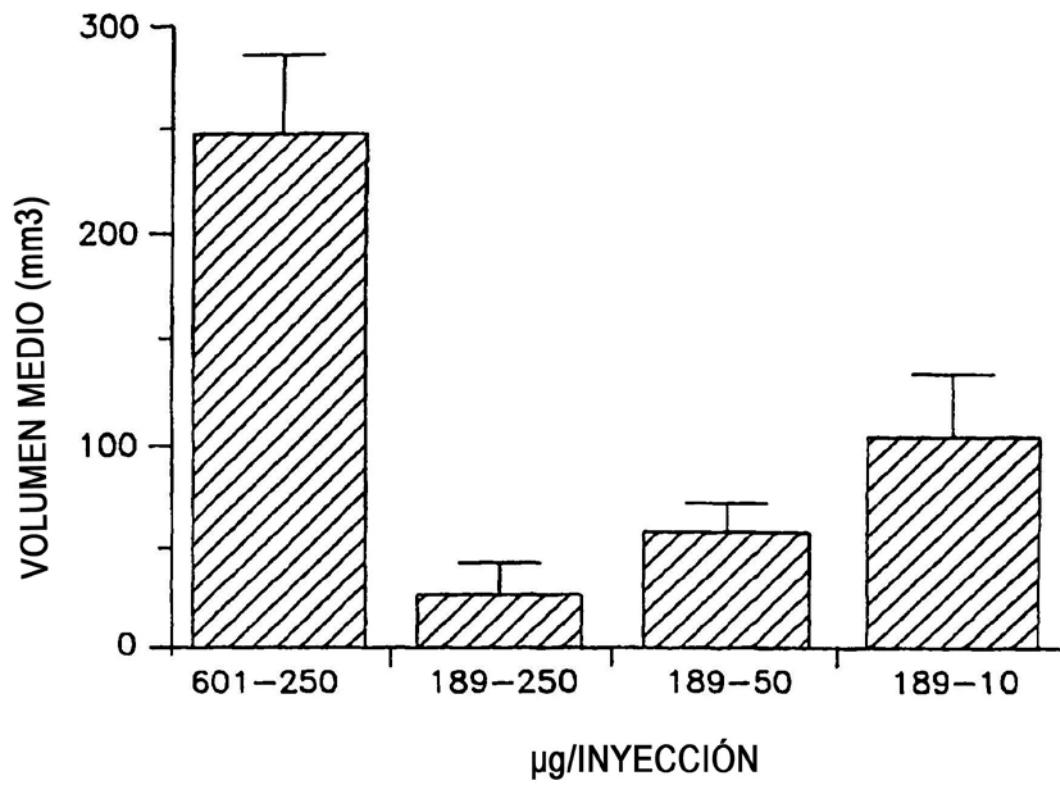
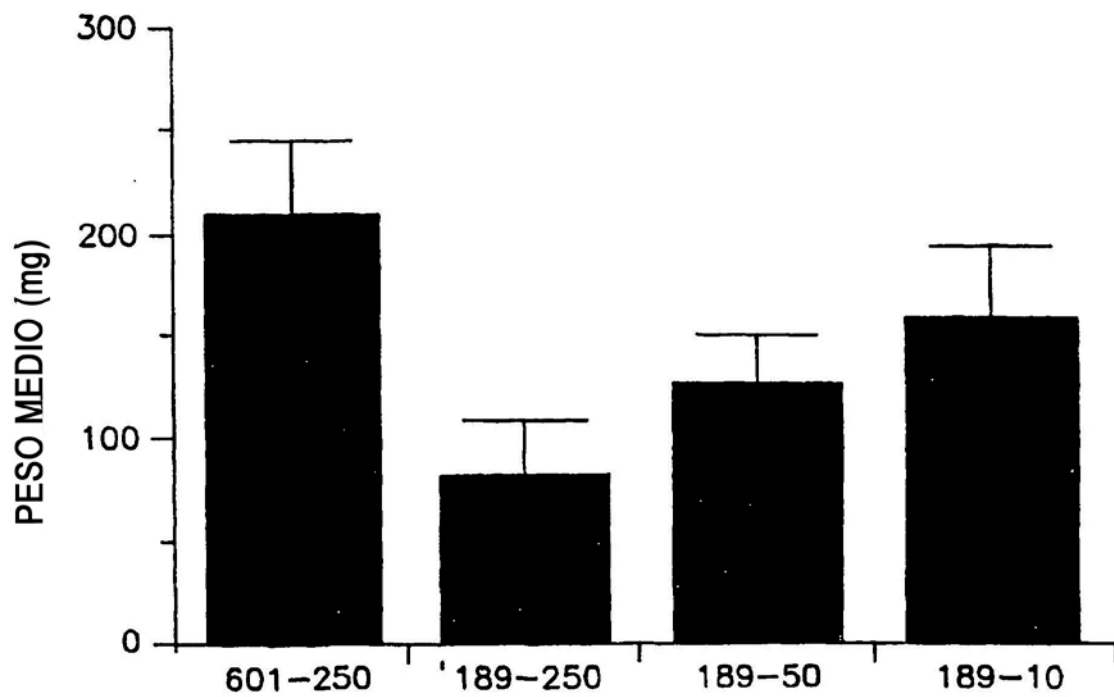
bFGF

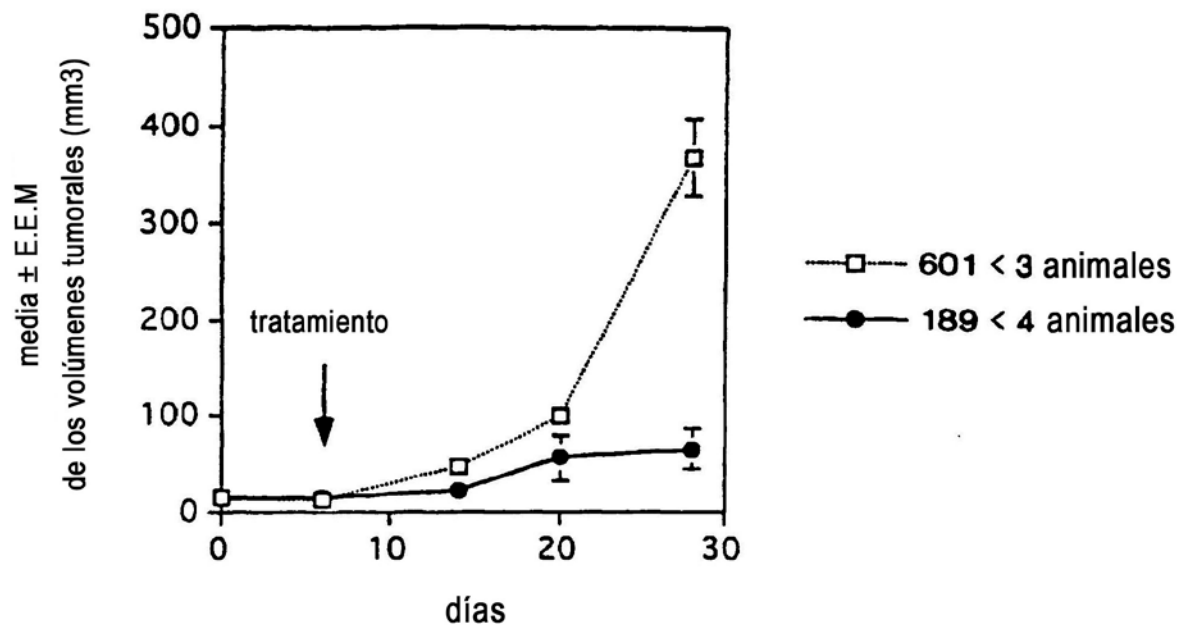
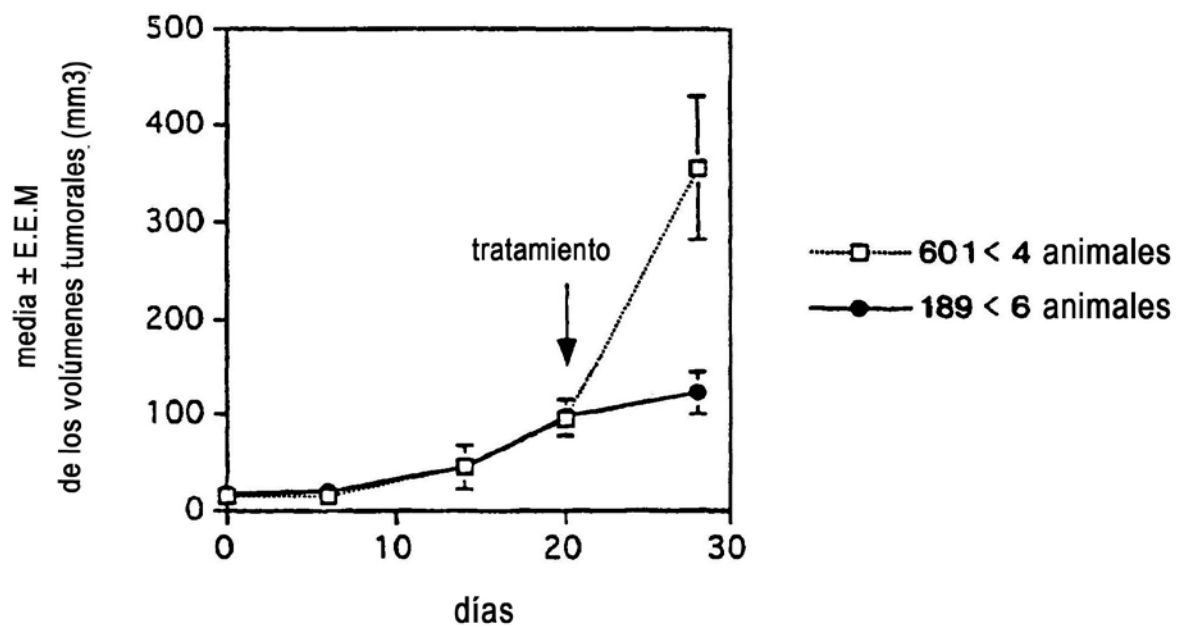




**FIG. 32****FIG. 33**

**FIG. 34****FIG. 35**

**FIG. 36A****FIG. 36B**

**FIG. 37A****FIG. 37B**

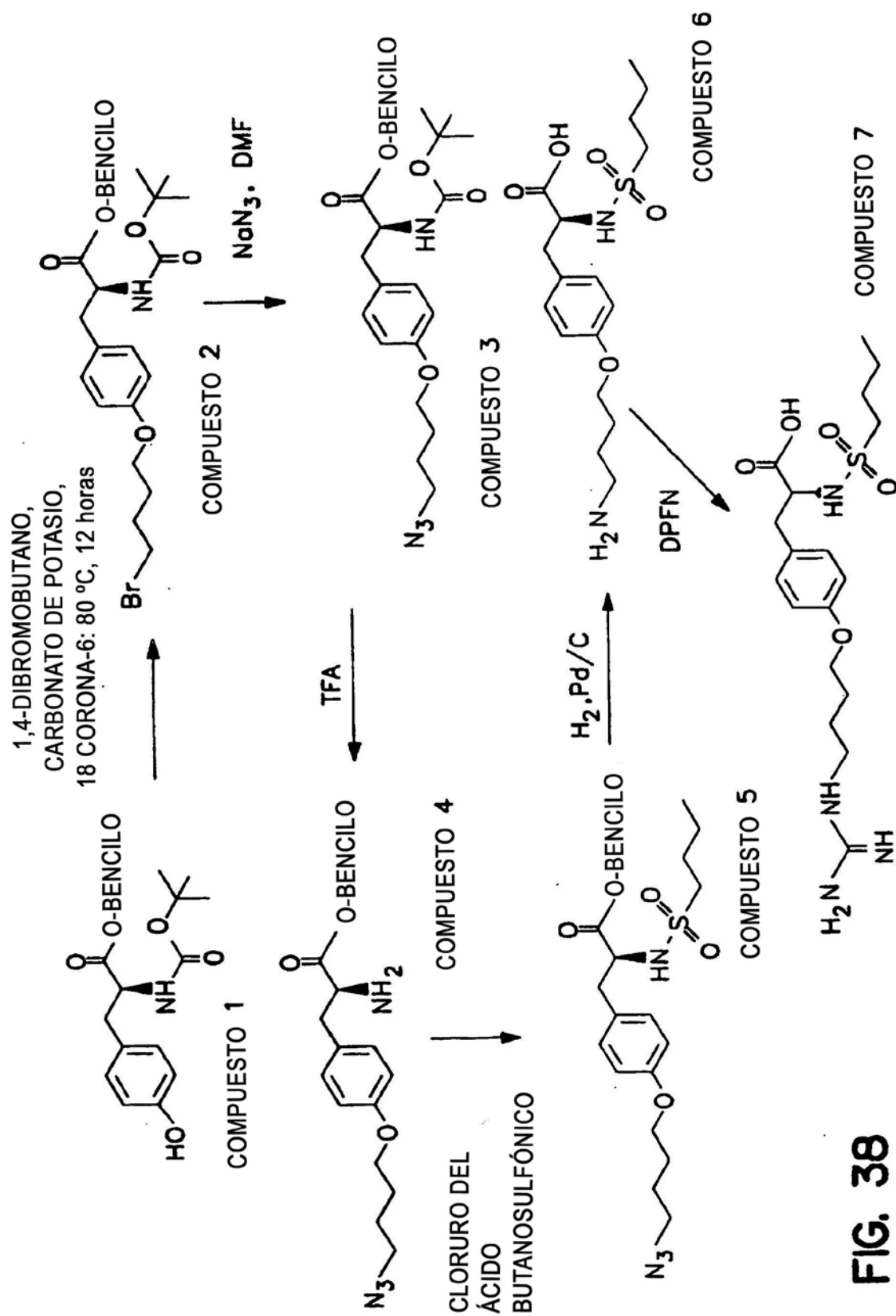


FIG. 38

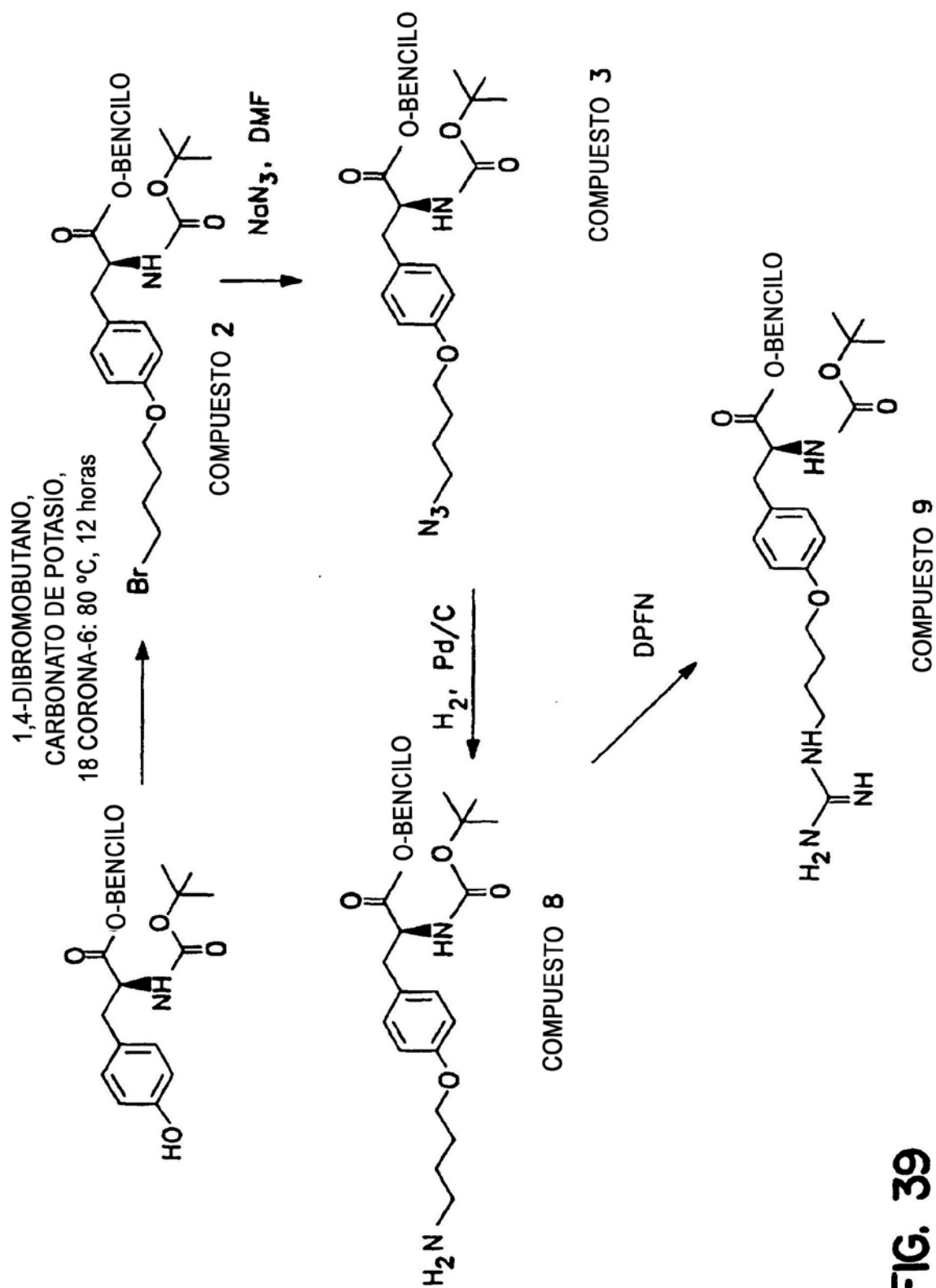


FIG. 39

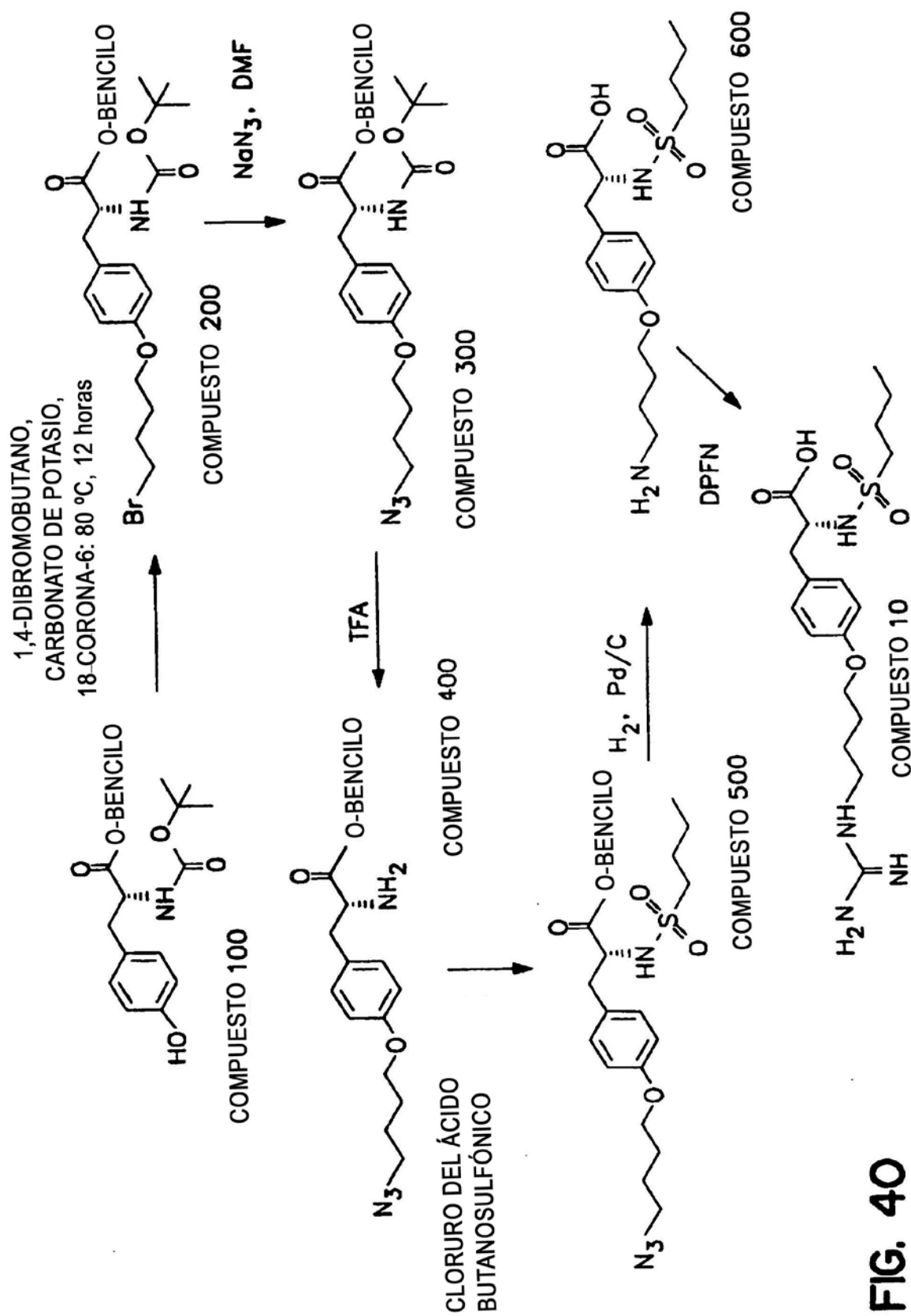


FIG. 40

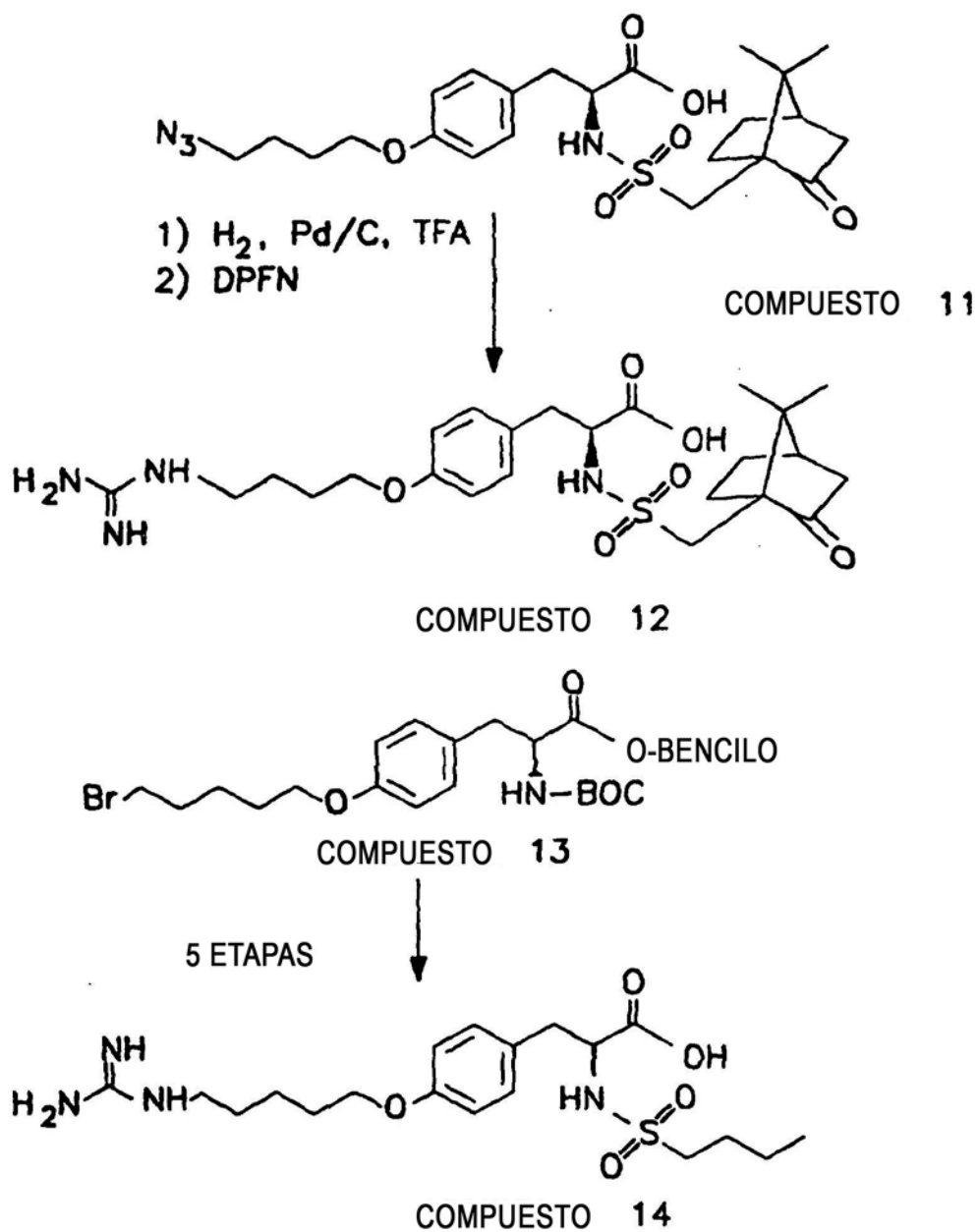
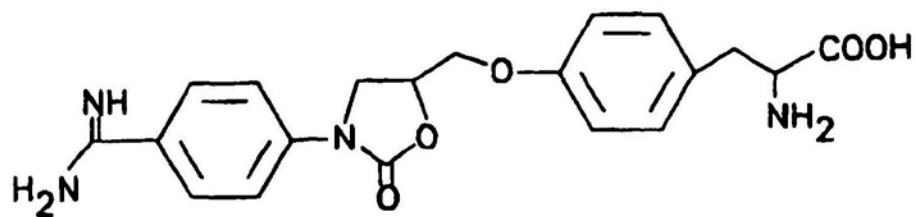
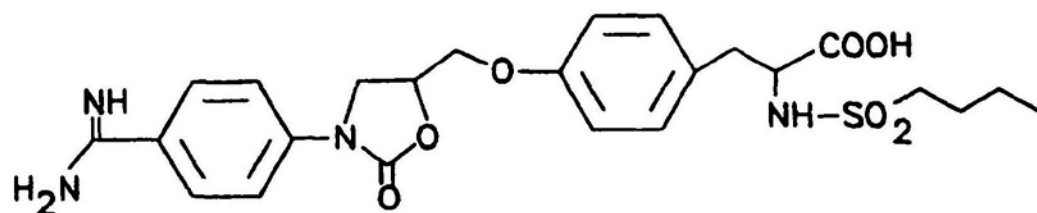


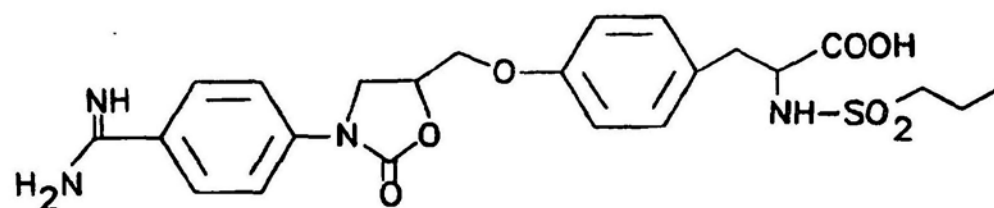
FIG. 4I



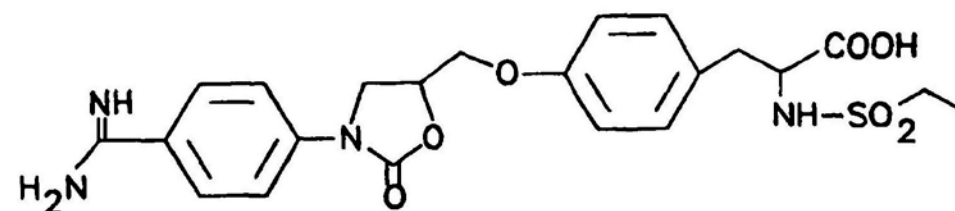
COMPUESTO 15



COMPUESTO 16

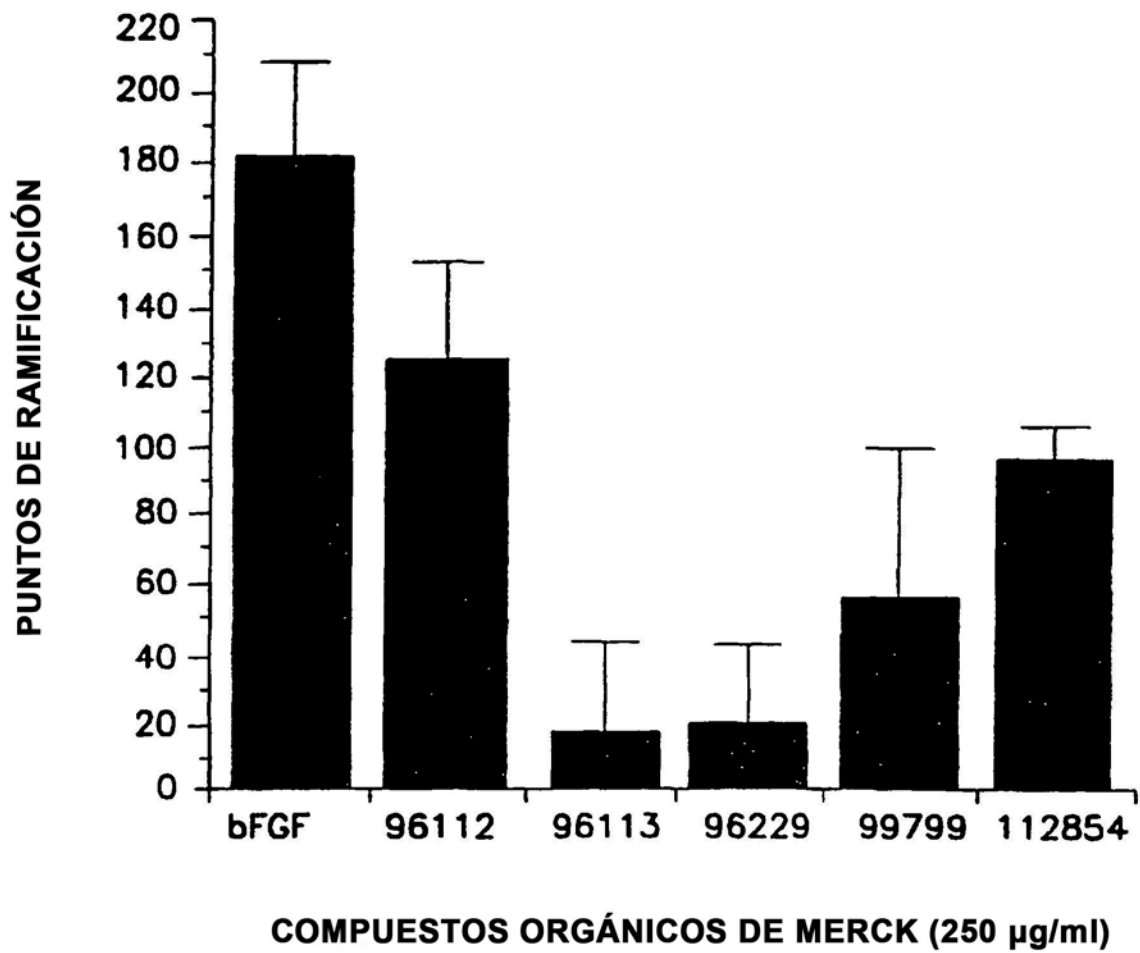


COMPUESTO 17



COMPUESTO 18

FIG. 42

**FIG. 43**

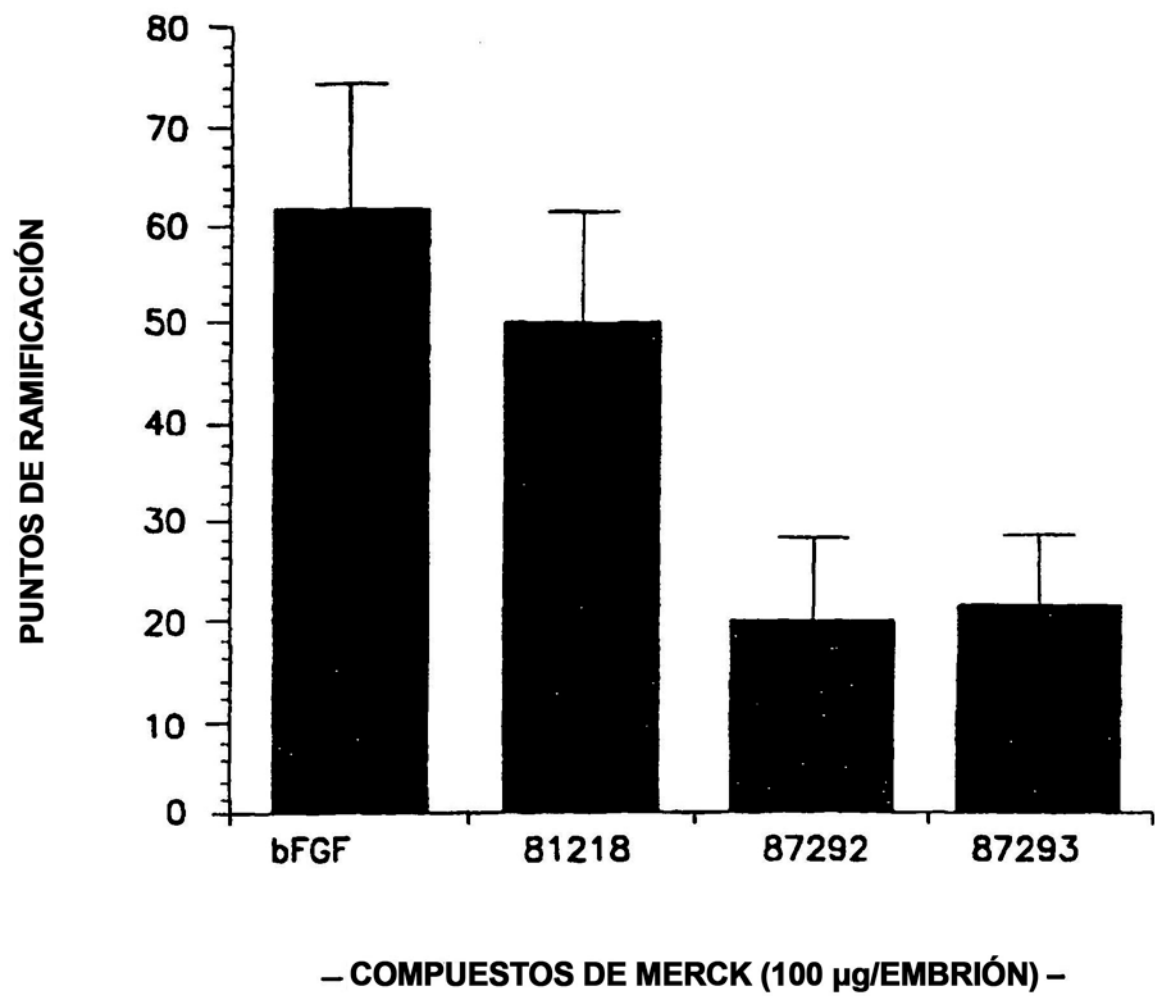


FIG. 44