(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 211 901**

(51) Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA T5

(96) Número de solicitud europea: **95913644 .1**
(96) Fecha de presentación : **09.03.1995**
(97) Número de publicación de la solicitud: **0754059**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **22.01.1997**

(54) Título: **Procedimientos y composiciones útiles para inhibición de la angiogénesis.**

(30) Prioridad: **18.03.1994 US 210715**
30.12.1994 US 366665

(45) Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.07.2004**

(45) Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **12.12.2011**

(45) Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **12.12.2011**

(73) Titular/es: **THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE**
10666 North Torrey Pines Road
La Jolla, California 92037, US

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

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

ES 2 211 901 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones útiles para inhibición de la angiogénesis

Campo técnico

La presente invención se refiere, en general, al campo de la medicina, y se refiere específicamente al uso de los antagonistas del receptor de la vitronectina $\alpha_v\beta_3$.

Antecedentes

Las integrinas son una clase de receptores celulares conocidas que unen proteínas de matriz extracelular y, por lo tanto, participan en las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, generalmente denominados acontecimientos de adhesión celular. Sin embargo, aunque en la literatura se describen muchas integrinas y los ligandos que unen una integrina, la función biológica de muchas de las integrinas permanece sin aclarar. Los receptores de las integrinas constituyen una familia de proteínas con características estructurales compartidas de complejos de glicoproteína heterodimérica no covalente formados por subunidades α y β.

El receptor de vitronectina, conocido por su característica original de unión preferencial a la vitronectina, se sabe ahora que hace referencia a tres integrinas diferentes, designadas $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.Horton, Int. J. Exp. Pathol., 71:741-759 (1990). $\alpha_v\beta_1$ une la fibronectina y la vitronectina. $\alpha_v\beta_3$ une una gran variedad de ligandos, incluidos fibrina, fibrinógeno, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de Willeband, osteospondina y sialproteína ósea I. $\alpha_v\beta_5$ se une a la vitronectina. Las funciones de adhesión celular específicas que desempeñan estas tres integrinas en las diversas interacciones celulares en los tejidos están todavía investigándose, pero es evidente que hay diferentes integrinas con diferentes funciones biológicas.

Un sitio de reconocimiento importante en el ligando para muchas integrinas es la secuencia tripeptídica de arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Se encuentra RGD en todos los ligandos identificados anteriormente para integrinas receptoras de vitronectina. Este sitio de reconocimiento de RGD se puede mimetizar mediante polipéptidos ("péptidos") que contienen la secuencia RGD, y dichos péptidos RGD son inhibidores conocidos de la función de integrina. Sin embargo, es importante tomar nota de que dependiendo de la secuencia y de la estructura del péptido RGD, la especificidad de la inhibición se puede alterar para dirigirse a integrinas específicas.

Para menciones del sitio de reconocimiento RGD, véase Pierschbacher *y col.,* Nature, 309:30-33 (1984), y Pierschbacher *y col.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5985-5988 (1984). Se han descrito también, diversos polipéptidos RGD de especificada de integrina variable por Grant *y col.,* Cell, 58:933-943 (1989), Cheresh, *y col.,* Cell, 58:945-953 (989), Aumailley *y col.,* FEBS Letts., 291-50-54 (1991), y Pfall *y col.,* J. Biol.. Chem., 269:20233-20238 (1994), y en las patentes de los Estados Unidos Números 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 procedimiento de vascularización de tejidos que implica el crecimiento de nuevo desarrollo de vasos sanguíneos en un tejido, y también se la conoce como neovascularización El procedimiento está mediado por la infiltración de células endoteliales y células de músculo liso. Se cree que el procedimiento progresa de una cualquiera de tres maneras: los vasos pueden surgir a partir de vasos preexistentes, se puede producir un desarrollo *de novo* de los vasos a partir de células precursoras (vasculogénesis) o se puede ensanchar el diámetro de los vasos pequeños existentes. Blood *et al.,* Bioch, Biophys. Acta, 1032:89-118 (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 $\alpha_v\beta_5$), el receptor de colágeno de tipo 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 ($\alpha_5\beta_1$). Davis *et al.,* J. Cell. Biochem., 51:206-218 (1993). La célula de músculo liso se conoce por contener al menos seis integrinas RGD-dependientes, incluyendo $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

La angiogénesis es un procedimiento importante en el crecimiento neonatal, pero también es importante en la cicatrización de heridas y en la patogénesis de una gran variedad de enfermedades clínicas, que incluyen inflamación de tejidos, artritis, crecimiento tumoral, retinopatía diabética, degeneración macular por neovascularización de la retina y afecciones similares. Estas manifestaciones clínicas asociadas con la angiogénesis se denominan enfermedades angiogénicas. Folkman *et al.,* Science, 235:442-447 (1987). La angiogénesis está generalmente ausente en los tejidos adultos o maduros, aunque se da en la cicatrización de heridas y en el ciclo de crecimiento de cuerpo lúteo. Véase, por ejemplo Moses *et al.,* Science, 248:1408-1410 (1990).

Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis sería una terapia útil para restringir el crecimiento tumoral. Se ha propuesto que la inhibición de la angiogénesis por (1) inhibición de la liberación de "moléculas angiogénicas" tales como βFGF (Factor de crecimiento de fibroblasto), (2) neutralización de moléculas angiogénicas, tal como por el uso de anticuerpos anti-βFGF y (3) inhibición de la respuesta de células endoteliales a estímulos angiogénicos. Esta última estrategia ha llamado la atención y Folkman *et al.,* Cancer Biology, 3:89-96 (1992) han descrito diversos inhibidores de la respuesta de células endoteliales, incluyendo el inhibidor de colagenasa, los inhibidores de la renovación de la membrana basal, esteroides angiostáticos, inhibidores de angiogénesis derivada de hongos, factor 4 plaquetario, trombospondina, fármacos contra la artritis tales como peniclilamina D y tiomalato de oro, análogos de la vitamina D_3, alfa-interferón y similares que se pueden usar para inhibir la angiogénesis. Para los inhibidores adicionales propuestos de la angiogénesis, véase Blood *et al.,* Bioch. Biophys. Acta., 1032:89-118 (1990), Moses *et al.,* Science, 248:1408-1410 (1990), Ingber *et al.,* Lab.Invest., 59:44-51 (1988), 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 se dirige a la inhibición de $\alpha_v\beta_3$.

También se han descrito péptidos que contienen RGD que inhiben el receptor de vitronectina $\alpha_v\beta_3$. Aumailley *et al.,* FEBS Letts., 291:50-54 (1991), Choi *et al.,* J. Vasc. Surg., 19:125-134 (1994), Smith *et al.,* J. Biol.. Chem.,

265:12267-12271 (1990) y Pfaff *et al.,* 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 identificad nunca hasta la presente invención.

La inhibición de la adhesión celular in vitro usando anticuerpos monoclonales inmunoespecíficos para diversas subunidades α o β de integrina han implicado a $\alpha_v\beta_3$ en la adhesión celular de diversos tipos de células, que incluyen las células endoteliales microvasculares. Davis *et al.,* J. Cell. Biol.., 51:206-218 (1993). Además, Nicosia *et al.,* AM. J. Pathol., 138:829-833 (1991), describen el uso del péptidos RGD GRGDS para inhibir *in vitro* la formación de "microvasos" a partir de la 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 porque no se ha demostrado que las estructuras de microvaso sean idénticas a los crecimientos capilares ni que la formación del microvaso en cultivo de gel de colágeno sea idéntica al crecimiento neovascular en un tejido intacto, tal como el tejido artrítico, el tejido tumoral o tejido enfermo en los que es deseable la inhibición de la angiogénesis.

Por lo tanto, aparte de los estudios mencionados en la presente memoria descriptiva, los solicitantes desconocen cualquier otra demostración de que la angiogénesis se pueda inhibir en un tejido usando inhibidores de la adhesión celular. En particular, nunca se ha demostrado con anterioridad que se requiera la función $\alpha_v\beta_3$ 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

La presente divulgación de la invención demuestra que la angiogénesis en los tejidos requiere la integrina $\alpha_v\beta_3$, que los inhibidores de $\alpha_v\beta_3$ pueden inhibir la angiogénesis. La divulgación demuestra también que los antagonistas de otras integrinas, tales como $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_v\beta_1$, no inhiben la angiogénesis, presumiblemente porque estas otras integrinas no son esenciales para que se produzca la angiogénesis.

La invención proporciona por lo tanto, el uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ en la elaboración de un medicamento para el tratamiento de la artritis, la retinopatía diabética, la degeneración macular, un hemangioma o un tumor sólido de pulmón, colon. Comprendiendo dicho medicamento una cantidad inhibitoria de angiogénesis de dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$..

El tejido a tratar puede ser cualquier tejido en el que sea deseable la inhibición de la angiogénesis, tal como tejido enfermo en el que se está produciendo la neovascularización. Los tejidos de los ejemplos incluyen tumores sólidos y tejidos similares**.**

Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ para su uso en la presente invención puede unirse a $\alpha_v\beta_3$ e inhibir competitivamente la capacidad de $\alpha_v\beta_3$ de unirse a un ligando natural. Preferiblemente, el antagonista exhibe una especificidad para $\alpha_v\beta_3$ sobre otras integrinas. En una realización particularmente preferida, el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ inhibe la unión del fibrinógeno u otros ligandos que contienen RGB a $\alpha_v\beta_3$ pero no inhibe sustancialmente la unión de la fibronectina al $\alpha_{IIb}\beta_3$. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ preferido puede ser un polipéptido o un anticuerpo monoclonal, o un fragmento funcional del mismo, que inmunoreacciona con $\alpha_v\beta_3$.

Breve descripción de los dibujos

En los dibujos que forman una parte de la presente divulgación.

Las figuras 1A-1D ilustran la distribución del tejido de las subunidades de integrina, β_3 y β_1, en la piel normal y en la piel en proceso de cicatrización de herida designada como tejido de granulación. La inmunohistoquímica con anticuerpos a β_3 y β_1 se realizó como se describe en el Ejemplo 3A. Las figuras 1A y 1B ilustran respectivamente la inmunoreactividad del anti-β_3 en la piel normal y en el tejido de granulación. Las figuras 1C y 1D ilustran respectivamente la inmunoreactividad del anti-β_1 en la piel normal y en el tejido de granulación

Las figuras 2A-D ilustran la distribución de tedio del factor de von Willebrand y los ligandos de laminina que une respectivamente las subunidades de integrina β_3 y β_1. en la piel normal y en la piel en proceso de cicatrización de herida designada tejido de granulación. La inmunohistoquímica con anticuerpos a factor de von Willebrand (Anti-vWF) y laminina (anti-laminina) se realizó como se describe en el Ejemplo 3B. Las figuras 2A y 2B ilustran respectivamente la inmunoreactividad de anti-vWF en la piel normal y en el tejido de granulación. Las figuras 2C y 2D ilustran respectivamente la inmunoreactividad de la anti-laminina en la piel normal y en el tejido de granulación.

Las figuras 3A-3D ilustran la distribución de tejido del receptor de la integrina vitronectina, $\alpha_v\beta_3$, en biopsias de tejido 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 fotomicrografía de una CAM de la invención desprovista de vasos sanguíneos en un embrión de pollo de 10 días sin tratar. La preparación se describe en el Ejemplo 5B.

Las figuras 5A-5C ilustran la distribución de tejido de las integrinas β_1 y $\alpha_v\beta_3$ en la preparación de la CAM de esta invención. La figura 5A muestra la distribución de la subunidad β_1 en una preparación de CAM de diez días sin tratar detectada por inmunoreactividad de inmunofluorescencia con CSAT, un anticuerpo anti-β_1. La figura 5B muestra la distribución del receptor de $\alpha_v\beta_3$ en una preparación de CAM de 10 días sin tratar detectada por inmunoreactividad de inmunofluorescencia con LM609, un anticuerpo anti-$\alpha_v\beta_3$. La figura 5C muestra la distribución del receptor de $\alpha_v\beta_3$ en una preparación de CAM de 10 días tratada con βFGF detectada por inmunoreactividad de 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 CAMs de 10 días tratadas con βFGF y sin tratar descritas en el Ejemplo 6A. La principal intensidad de fluorescencia se representa sobre el eje Y con los perfiles de integrina representados sobre el eje X.

Las figuras 7A-7C ilustran el aspecto de una CAM de 10 días sin tratar, una CAM tratada con $\beta_{FGF,}$ y una CAM tratada con TNFα, respectivamente, cuyos procedimientos y resultados se describen en el Ejemplo 6A.

Las figuras 8A-8E ilustran el efecto del tratamiento tópico con anticuerpo sobre angiogénesis inducida por FGF en una CAM de 10 día 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 nueva vasculatura en un área previamente desprovista de vasculatura inducida por tratamiento con βFGF. Las figuras 8C, 8D y 8E respectivamente muestran 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 sobre la angiogénesis inducida por tumores como se describe en el Ejemplo 7D2). La figura 9A muestra la falta de efecto inhibitorio del tratamiento intravenoso con un péptido de control (tumor de péptido de control) sobre la angiogénesis resultante de la inducción tumoral. La inhibición de tal angiogénesis por inyección intravenosa del péptido 66203 (Tumor RGD cíclico) se muestra en la figura 9B. La falta de efectos inhibitorios o citotoxicidad sobre los vasos preexistentes maduros que siguen a la infusión intravenosa del péptido 66203 en un área adyacente al área tratada del tumor se muestra en la figura 9C (CAM adyacente de RGD cíclico).

Las figuras 10A-10C ilustran el efecto de la aplicación intravenosa de anticuerpos monoclonales a la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento como se describe en el Ejemplo 7B1). La figura 10A muestra la angiogénesis inducida por βFGF no expuesta a tratamiento por anticuerpo (control). No se produce inhibición de la angiogénesis cuando se trata una preparación similar con el anticuerpo de $\alpha_v\beta_5$ P3G2 como se muestra en la figura 10B. La inhibición de la angiogénesis producida con el tratamiento del anticuerpo de anti-$\alpha_v\beta_3$ LM609 se muestra en la figura 10C.

Las figuras 11A-11C ilustran el efecto sobre la angiogénesis embrionaria que sigue a la aplicación tópica de anticuerpos de anti-integrina descrita en el Ejemplo 7C. La angiogénesis no se inhibió por el tratamiento de una CAM de 6 días con anticuerpos anti-β_1 y anti-$\alpha_v\beta_5$, respectivamente mostrados en las figuras 11A y 11B. En contraste con lo anterior, el tratamiento con el anticuerpo de anti-$\alpha_v\beta_3$ LM609 dio como resultado la inhibición de la formación de vasos 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 sobre el eje Y resultantes 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 con un tratamiento de 7 días y los pesos iniciales de los tumores como se describe en el Ejemplo 9A1)a. Cada barra representa el ± SE medio . de 5-10 tumores por grupo. Los tumores se derivaron de las preparaciones de CAM del melanoma humano (M21-L) (Figura 13A), carcinoma pancreático (Fg) (Figura 13B), carcinoma de pulmón (UCLAP-3) (Figura 13C), y carcinoma de laringe (Hep3) (Figura 13D) y se trataron 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 que se produce por una 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 las secciones histológicas de los tumores tratados con P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) (Figura 14A) y LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 14B), y teñidos con hematoxilina y eosina como se describe en el Ejemplo 9A1)a. Como se muestra en la figura 14A, los tumores tratados con l anticuerpo de control (P3G2) mostraron numerosas células tumorales viables y de división activa indicadas por las figuras mitóticas (puntas de flecha) así como por múltiples vasos sanguíneos (flechas) a través de todo el estroma tumoral. En contraste con lo anterior, se detectaron pocas o ninguna célula tumoral viable o vasos sanguíneo en los tumores tratados con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) en la figura 14B.

Las figuras 15A-15E corresponden a los tumores M21L tratados con los péptidos descritos en el Ejemplo 9A1)b y son los siguientes: en la figura 15A, péptido RAD cíclico de control (69601); en la figura 15B, péptido RGD cíclico (66203); en la figura 15C, tejido de CAM adyacente tomado de los mismos embriones tratados con péptidos RGD cíclico (66203) y gran ampliación (13x) de los tumores tratados con el 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 de control RAD (69601). La figura 15E describe ejemplos de vasos sanguíneos interrumpidosde tumores (flechas) tratados con el péptido RGD cíclico (66203).

Las figuras 16A-16E representan la inhibición de la angiogénesis por antagonistas de angiogénesis en el ensayo de modelo de ojo de conejo *in vivo* descrito en el Ejemplo 10. Las figuras 16A y 16B describen la angiogénesis del ojo de conejo en presencia de βFGF y mAb p1F6 (anti-$\alpha_v\beta_5$). Las figuras 16D, 16C y 16E describen la inhibición de la angiogénesis del ojo de conejo en presencia de βFGF y mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$).

La figura 17 representa un diagrama de flujo de cómo se genera el modelo *in vivo* de ratón quimérico:ratón humano descrito en el Ejemplo 11A. Una porción de piel de un ratón SCID se sustituyó 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 periodo de 4 semanas, se estableció un tumor medible que comprendió un tumor humano con crecimiento de vasculatura humana a partir de la piel humana en el tumor humano.

La figura 18 ilustra el porcentaje de células sencillas derivadas de CAM tratadas con mAb y con péptido y teñidas con Apop Tag determinadas mediante el análisis FACS y descritas en los Ejemplos 12A y 12B, respectivamente. Las barras negras y punteadas representan células de embriones tratadas 24 horas y 48 horas antes del ensayo, respectivamente. Cada barra representa el ± SE. medio de tres replicas. Las CAM se trataron con mAb LM609 (anti-

$\alpha_v\beta_3$), o CSAT (anti-β_1), o PBS como se describe en el Ejemplo 12A2). Las CAM también se trataron con el péptido cíclico 69203 (ciclo-RGDfV), indicado como Péptido 203) o el péptido cíclico de control 69601 (ciclo-RADfV, indicado como Péptido 601) como se describe en el Ejemplo 12B.

Las figuras 19A y 19B ilustran los resultados combinados de las suspensiones de células sencillas de CAM de embriones tratadas CSAT (anti-β_1) (Figura 19A) o LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 19B) teñidas con Apog Tag y yoduro de propidio, y analizadas por FACS como se describe en el Ejemplo 12C. El eje Y representa la tinción con Apop Tag de series de células (Apoptosis), el eje X representa la tinción con yoduro de propidio (Contenido de ADN). La línea horizontal representa la barrera negativa para la tinción con Apop Tag. Los paneles de la izquierda y de la derecha indican las células CAM de embriones tratados con CSAT (anti-β_1) (figura 19A) y LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (figura 19B), respectivamente El análisis de ciclo celular se llevó a cabo mediante el análisis de aproximadamente 8.000 eventos por condición.

Las figuras 20A-20C representan tejido de CAM de embriones tratados con CSAT (anti-β_1) y las figuras 20D-20F representan tejido de CAM de embriones tratados con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) preparado como de describe en el Ejemplo 12C. Las figuras 20A y 20D describen los tejidos teñidos con Apop Tag y visualizados mediante fluorescencia (FITC) superpuestos sobre una imagen D.I.C. Las figuras 20B y 20E describen los mismos tejidos teñidos con mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) y visualizados por fluorescencia. (rodamina). Las figuras 20C y 20F representan imágenes fundidas de los mismos tejidos teñidos tanto con Apop Tag como con LM609 donde la tinción amarillo representa la colocalización. La barra representa 15 y 50 µm en los paneles de la izquierda y de la derecha, respectivamente.

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 aminoácido descritos en la presente memoria descriptiva tienen preferiblemente la forma isomérica de una "L". Sin embargo, los residuos con forma isomérica de "D" e pueden sustituir por cualquier residuo aminoácido en forma de L, mientras que se retiene la propiedad funcional por el polipéptido. NH_2 se refiere al grupo amino libre presente en el término amino de un polipéptido. COOH se refiere al grupo carboxi libre presente en el término carboxi de un polipéptido. Según la nomenclatura estándar de los polipéptidos (descrita en J. Biol., Chem., 243:3552-59 (1969) adoptada en 37 CFR §1.822 (b) (2)), las abreviaturas para los residuos de aminoácido se muestran en la siguiente Tabla de Correspondencia:

TABLA DE CORRESPONDENCIA

SÍMBOLO		AMINOÁCIDO
1 Letra	3 letras	
Y	Tyr	Tirosina
G	Gly	Glicina
F	Phe	Fenilalanina
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

	(cont.)	
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutámico
Z	Glx	Glu y/o Gln
W	Trp	Triptófano
R	Arg	Arginina
D	Asp	Acido aspártico
N	Asn	Asparagina
B	Asx	Asn y/o Asp
C	Cys	Cisteína
X	Xaa	Desconocido/Otro

Además, los siguientes tienen los siguientes significados

BOC	Terc-butiloxicarbonilo
DCCI	Diciclohexilcarbodiimida
DMF	Dimetilformamida
OMe	Metoxi
HOBt	1-hidroxibenzotriazol

Se debe subrayar que todas las secuencia de residuos de aminoácido se representan en la presente memoria descriptiva mediante fórmulas cuya orientación a la izquierda y a la derecha es lo es en la dirección convencional del término amino al término carboxi. Además, se debería resaltar que un guión al principio o al final de una secuencia de residuos de aminoácido indica un enlace peptídico con una secuencia adicional de uno o ,más residuos de aminoácido.

Polipéptidos: Se refiere a una serie lineal de residuos de aminoácido conectados el uno al otro por enlaces peptídicos entre el grupo alfa-amino y el grupo carboxi de los residuos contiguos de aminoácido

Péptido: tal como se usa en la presente memoria descriptiva se refiere a una serie lineal de no más de aproximadamente 50 residuos de aminoácido conectados el uno al otro en forma de un polipéptido.

Péptido cíclico: Se deriva de un péptido lineal correspondiente y, se refiere a un péptido en el que no existen términos N o C libres, y del cual los términos N del péptido lineal correspondiente forman un enlace amido con el carboxilato de termino C del péptido lineal correspondiente.

Proteína: se refiere a una serie lineal superior a 50 residuos de aminoácido conectados el uno al otro en forma de un polipéptido.

Péptido sintético: se refiere a una cadena producida químicamente de residuos de aminoácido enlazados juntos por enlaces peptídicos que está libre de proteínas obtenidas de manera natural y fragmentos de las mismas.

B. Consideraciones generales

La presente invención se refiere generalmente al descubrimiento de que la angiogénesis se induce mediante el receptor específico de vitronectina $\alpha_v\beta_3$, y que la inhibición de la función $\alpha_v\beta_3$ inhibe la angiogénesis. Este descubrimiento es importante a causa de la función que desempeña la angiogénesis en una diversidad de procesos de enfermedad. Mediante la inhibición de la angiogénesis, se puede intervenir en la enfermedad, mejorar los síntomas, y en algunos casos curar la enfermedad.

Allí donde el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos es la causa de, o contribuye a, la patología asociada a una enfermedad, la inhibición de la angiogénesis reducirá los efectos deletéreos de la enfermedad. Los ejemplos

incluyen la artritis reumatoide, la retinopatía diabética y similares. Allí donde se requiere el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos para soportar el creciiento de un tejido deletéreo, la inhibición de la angiogénesis reducirá el aporte de sangre al tejido y por lo tanto contribuirá a la reducción de la masa del tejido basada en los requisitos de aporte de sangre. Los ejemplo incluyen el crecimiento de tumores donde la neovascularización es un requisito continuo para que el tumor crezca más allá de unos pocos milímetros de espesor, y para el establecimiento de la metástasis sólida del tumor.

Los usos de 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, sólo el nuevo crecimiento de vasos contiene $\alpha_v\beta_3$ sustancia, y por lo tanto los procedimientos terapéuticos no efectúan de manera perjudicial a los vasos maduros. Además, $\alpha_v\beta_3$ no se distribuye en gran medida en los tejidos normales, pero se encuentra selectivamente en los nuevos vasos, con lo que se garantiza que la terapia puede dirigirse selectivamente al nuevo crecimiento de vasos.

El descubrimiento de que la inhibición de $\alpha_v\beta_3$ sólo, inhibirá eficazmente la angiogénesis permite el desarrollo de las composiciones terapéuticas con una especificidad potencialmente elevada, y por lo tanto una toxicidad relativamente baja. De este modo, aunque la invención describe el uso de reactivos basados en péptidos que tienen la capacidad de inhibir una o más integrinas, se pueden diseñar otros reactivos que inhiban más selectivamente $\alpha_v\beta_3$, y por lo tanto no tengan el efecto secundario de inhibir otros procesos biológicos distintos de los inducidos por $\alpha_v\beta_3$.

Por ejemplo, como se muestra mediante las presentes enseñanzas, es posible preparar anticuerpos monoclonales altamente selectivos para la inmunoreacción de $\alpha_v\beta_3$, que son selectivos de manera similar para la inhibición de la función $\alpha_v\beta_3$. Además, los péptidos que contienen RGD se pueden diseñar para que sean selectivos para la inhibición de $\alpha_v\beta_3$, como se describe , además, en la presente descripción descriptiva.

Antes de producirse los descubrimiento de la presente invención, no se conocía que la angiogénesis, y ninguno de los procesos dependientes de la angiogénesis, se pudiese inhibir *in vivo* mediante el uso de los reactivos que antagonizan la función biológica $\alpha_v\beta_3$.

C. Procedimiento para la inhibición de la angiogénesis.

La invención proporciona un procedimiento para la inhibición de la angiogénesis en un tejido, y por lo tanto para inhibir eventos en el tejido que dependen de la angiogénesis. Generalmente, el procedimiento comprende administrar al tejido una composición que comprende una cantidad que inhibe la angiogénesis de un antagonista $\alpha_v\beta_3$.

Como se ha descrito anteriormente, la angiogénesis incluye una diversidad de procesos que implican la vascularización de un tejido que incluye “el crecimiento rápido”, la vasculogénesis o el ensanchamiento de vasos, todos los cuales son procesos de angiogénesis inducidos por y dependientes de la expresión de $\alpha_v\beta_3$. Se cree que, con la excepción de la cicatrización de herida traumática, la formación de cuerpo lúteo y la embriogénesis, la mayoría de los procesos de angiogénesis se asocian con procesos de enfermedad y por lo tanto el uso de los presentes procedimientos terapéuticos son selectivos para la enfermedad y no tienen efectos secundariosperjudiciales.

Hay una diversidad de enfermedades en las que se cree que la angiogénesis es importante, conocidas como enfermedad angiogénicas, que incluyen pero no se limitan a, los trastornos inflamatorios tales como la inflamación inmune y no-inmune, el reutamismo articular crónico y la soriasis. Los trastornos asociados con la invasión inapropiada o inoportuna de los vasos tales como la retinopatía diabética, el glaucoma neovascular, la restenosis, la proliferación capilar en las placas ateroscleróticas y la osteoporosis, y los trastornos asociados con el cáncer, tales como los tumores sólidos, las metástasis de tumores sólidos, los angiofibromas, la fibroplasia retrolental, los angiomas, el sarcoma de Kaposi y los cánceres similares que requieren la neovascularización para soportar el crecimiento tumoral.

No obstante, la presente invención sólo se refiere al tratamiento de las afecciones citadas en la reivindicación 1.

De este modo, los procedimientos que inhiben la angiogénesis en un tejido enfermo mejoran los síntomas de la enfermedad, y que dependen de la enfermedad, pueden contribuir a curar la enfermedad. El alcance de la angiogénesis en un tejido, y por lo tanto el alcance de la inhibición realizada por los presentes procedimientos, se puede evaluar por una diversidad de procedimientos, tales como se describen en los Ejemplos para detectar las estructuras de vasos $\alpha_v\beta_3$-inmunopositivos inmaduros y nacientes por inmunohistoquímica.

Como se describe en la presente memoria descriptiva, cualquiera de una diversidad de tejidos u órganos constituidos por tejidos organizados, puede soportar la angiogénesis en las afecciones de enfermedad que incluyen la piel, el músculo, el intestino, el tejido conectivo, las articulaciones, los huesos y los tejidos similares los cuales los vasos sanguíneos se pueden invadir al producirse estímulos angiogénicos.

El paciente tratado en la presente invención, en sus diversas realizaciones es deseablemente un paciente humano, aunque se ha de entender que los principios de la invención indican que la invención es efectiva en lo relativo a todos los mamíferos, que están destinados a incluirse en el término “paciente”. En este contexto, se entiende que un mamífero incluye cualquier especie mamífera en la que es deseable, el tratamiento de las enfermedades asociadas con la angiogénesis particularmente especies de mamíferos de la cabaña ganadera y domésticos.

En otra realización relacionada, un tejido a tratar es un tejido retinal de un paciente con retinopatía diabética, degeneración macular o glaucoma neovascular y la angiogénesis a inhibir es angiogénesis de tejido retinal donde hay neovascularización de tejido retinal.

En una realización relacionada adicional, un tejido a tratar es un tejido tumoral de un paciente con un tumor sólido, un hemangioma y la angiogénesis a inhibir es una angiogénesis de tejido tumoral en la que hay neovascularización de un tejido tumoral. Los tejidos tumorales sólidos típicos tratables por los presentes procedimientos son de mama, o colon. En los Ejemplos se describe la angiogénesis de tejido tumorales ejemplares y la inhibición de la misma.

La inhibición de la angiogénesis de tejidos tumorales es una realización particularmente preferida debido a la importante función de neovascularización que desempeña en el crecimiento tumoral. En ausencia de neovascularización del tejido tumoral, el tejido tumoral no consigue los nutrientes requeridos, ralentiza su crecimiento, detiene el crecimiento adicional, retrocede y por último se necrosa dando como resultado la muerte del tumor.

En una realización relacionada, la invención contempla la puesta en práctica del procedimiento junto con otras terapias tales como la quimioterapia convencional dirigida contra los tumores sólidos y para controlar el establecimiento de las metástasis. La administración del inhibidor de angiogénesis se lleva a cabo típicamente durante o después de la quimioterapia, aunque es preferible inhibir la angiogénesis después de un régimen de quimioterapia en los momentos en los que los tejidos tumorales respondan al ataque tóxico por la inducción de la angiogénesis para recuperarse mediante el suministro de un aporte de sangre y nutriente al tejido tumoral. Además, se prefiere administrar los procedimientos de inhibición de la angiogénesis después de la cirugía en la que se han retirado los tumores sólidos en forma de una profilaxis contra metástasis.

En la medida en que los presentes procedimientos se aplican a la inhibición de la neovascularización de tumores, los procedimientos también se pueden aplicar a la inhibición del crecimiento de tejido tumoral, a la inhibición de formación de metástasis tumoral, y a la regresión de los tumores establecidos. Los Ejemplos demuestran la regresión de un tumor establecido después de una única administración intravenosa de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención.

Los intervalos de dosificación para la administración del antagonista de $\alpha_v\beta_3$ dependen de la forma del antagonista, y su potencia, como se describe más adelante en la presente memoria descriptiva, y son grandes cantidades suficientes para producir el efecto deseado consiguiendo que la angiogénesis y los síntomas de enfermedad inducidos por angiogénesis mejoren. La dosificación no debería ser tan elevada como para causar efectos secundarios adversos, tales como los síndromes de hiperviscosidad, el edema pulmonar, el fallo cardiaco congestivo, y similares. Generalmente, la dosificación variará con la edad, la condición, el sexo y el alcance de la enfermedad en el paciente y se puede determinar por un experto en la técnica. La dosificación también se puede ajustar por un médico particular en caso de darse alguna complicación.

La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de antagonista de $\alpha_v\beta_3$ suficiente para producir una inhibición medible de angiogénesis en el tejido que se está tratando, es decir, una cantidad de inhibición de la angiogénesis. La inhibición de la angiogénesis se puede medir *in situ* por inmunohistoquímica, como se describe en la presente memoria descriptiva, o por otros procedimientos conocidos por un experto en la técnica.

En la medida en que el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ puede adoptar la forma de un mimético de $\alpha_v\beta_3$; un péptido que contienen RGD, un anticuerpo monoclonal anti-$\alpha_v\beta_3$, o un fragmento de los mismos, se ha de entender que la potencia, y por lo tanto una expresión de una cantidad "terapéuticamente eficaz" pueden variar. Sin embargo, como se muestra en los presentes procedimentos de ensayo, un experto en la técnica puede evaluar fácilmente la potencia de un antagonista candidato de $\alpha_v\beta_3$ de la invención.

La potencia de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se puede medir mediante una diversidad de medios que incluyen la inhibición de la angiogénesis en el ensayo de CAM, en el ensayo *in vivo* de ojo de conejo, en el ensayo *in vivo* ratón químerico:ratón humano, y midiendo la inhibición de la unión de ligando natural a $\alpha_v\beta_3$, todos descritos en la presente memoria descriptiva, y los ensayos similares.

Un antagonista preferido de $\alpha_v\beta_3$ tiene la capacidad de inhibir sustancialmente la unión de un ligando natural tal como el fibrinógeno o la vitronectina a $\alpha_v\beta_3$ disuelto en concentraciones de antagonista inferiores a 0,5 micromolares (um), preferiblemente inferior a 0,1 um, y más preferiblemente inferior a 0,05 um. Por "sustancialmente" se entiende que se observa al menos una reducción del 50% en la unión del fibrinógeno mediante la inhibición en la presencia del antagonista de $\alpha_v\beta_3$, y al 50% la inhibición se refiere en la presente memoria descriptiva como un valor CI_{50}.

Un antagonista más preferido de $\alpha_v\beta_3$ exhibe selectividad para $\alpha_v\beta_3$ sobre otras integrinas. De este modo, un antagonista preferido de $\alpha_v\beta_3$ inhibe sustancialmente la unión de fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ pero no inhibe sustancialmente la unión del fibrinógeno a otras integrinas, tales como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ o $\alpha_{IIb}\beta_3$. Particularmente preferido es un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ que exhibe una actividad de IC_{50} de 10 a 100 veces inferior en la inhibición de la unión del fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ comparado con la actividad de IC_{50} en la inhibición de la unión del fibrinógeno a otra integrina. Los ensayos ejemplares para medir la actividad de IC_{50} en la inhibición de la unión de fibrinógeno a una integrina se describen en los Ejemplos.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la invención en forma de un anticuerpo monoclonal es típicamente una cantidad tal que cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para llevar a cabo una concentración de plasma de aproximadamente 0,01 microgramo (ug) por mililitro (ml) a aproximadamente 190 ug/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 ug/ml a aproximadamente 5 ug/ml, y normalmente aproximadamente 5 ug/ml. Por el contrario, la dosificación puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, más preferiblemente de aproximadamente 0,5 mg/kg a aproximadamente 20 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

Cuando el antagonista está en forma de un fragmento de un anticuerpo monoclonal, la cantidad se puede ajustar fácilmente sobre la base de la masa del fragmento respecto de la masa de todo el anticuerpo. Una concentración de

plasma preferida en molaridad es de aproximadamente 2 micromolares (uM) a aproximadamente 5 milimolares (mM) y de manera preferible aproximadamente 100 uM a 1 mM de antagonista de anticuerpo.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la invención en forma de un polipéptido, u otro mimético de $\alpha_v\beta_3$ de pequeñas molécula de idénticas dimensiones, es típicamente una cantidad de polipéptido talque cuando se administra en una composición fisiológicamente tolerable es suficiente para llevar a cabo una concentración de plasma de aproximadamente 0,1 microgramo (ug) por mililitro (ml) a aproximadamente 200 ug/ml, preferiblemente de aproximadamente 1 ug/ml a aproximadamente 150 ug/ml, Basado en un polipéptido que tienen una masa de aproximadamente 500 gramos por mol, la concentración preferida en molaridad es de aproximadamente 2 micromolares (uM) a aproximadamente 5 milimolares (mM) y de manera preferible aproximadamente 100 uM a 1 mM de antagonista de polipéptido. Por el contrario, la dosificación por peso corporal puede variar de aproximadamente 0,1 mg/kg a aproximadamente 300 mg/kg, y preferiblemente de aproximadamente 0,2 mg/kg a aproximadamente 200 mg/kg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días.

Los anticuerpos monoclonales o polipéptidos de la invención se pueden administrar por vía parenteral mediante inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. Aunque, típicamente se puede acceder al tejido a tratar en el cuerpo por administración sistémica y por lo tanto tratar más a menudo por administración intravenosa de composiciones terapéuticas, se contemplan otros tejidos y medios de distribución en los que hay una probabilidad de que el tejido apuntado contenga la molécula diana. De este modo los anticuerpos monoclonales o polipéptidos de la invención se pueden administrar por vía intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intracavital , transdérmica y se puede distribuir por medios peristálticos.

Las composiciones terapéuticas que contienen un anticuerpo monoclonal o un polipéptido de la invención se administran convencionalmente por vía intravenosa, como por ejemplo una inyección de una dosis unitaria. El término “dosis unitaria” cuando se usa en referencia a una composición terapéutica de la presente invención se refiere a unidades físicamente discretas apropiadas como dosificación unitaria para el sujeto, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de material activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el diluyente requerido; es decir, un excipiente o un vehículo.

En una realización preferida como se muestra en los Ejemplos, el antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se administra en una única dosificación por vía intravenosa.

Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar y su programación temporal depende del sujeto a tratar, la capacidad del sistema del sujeto para utilizar el ingrediente activo, y el grado del efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo deseado a administrar dependen del juicio del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, las gamas apropiadas de dosificación para la aplicación sistémica se describen en la presente memoria descriptiva y dependen de la vía de administración. Los regímenes apropiados para la administración también son variables, pero se tipifican mediante una administración inicial seguida de repetidas dosis a intervalos de una o más horas por una inyección posterior u otra administración. Alternativamente, también se contempla la infusión intravenosa continua suficiente para mantener concentraciones en sangre del orden de los valores especificados para terapias *in vivo*.

Como se demuestra mediante los presentes Ejemplos, la inhibición de la angiogénesis y la regresión tumoral se produce como muy pronto 7 días después de la inicial toma de contacto con el antagonista. Se prefiere una exposición adicional o prolongada al antagonista durante 7 días a 6 semanas, preferiblemente aproximadamente 14 a 28 días.

En una 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 neovasculatura que llevan $\alpha_v\beta_3$. 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 manifiesta más lentamente, tal como se describe en la presente memoria descriptiva. La diferencia afecta al régimen terapéutico en términos del tiempo de administración, y del efecto deseado. Típicamente, la administración para la apoptosis de neovasculatura se puede realizar durante 24 horas a aproximadamente 4 semanas, aunque se prefiere el intervalo de 48 horas a 7 días.

D. Composiciones terapéuticas

Las composiciones terapéuticas de la presente invención contiene un excipiente fisiológicamente tolerable junto con un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ como se describe en la presente memoria descriptiva, disuelto o disperso en éstas últimas en forma de un ingrediente activo. En una realización preferida, la composición terapéutica del antagonista de $\alpha_v\beta_3$ no es inmunogénica cuando se administra a un paciente mamífero o humano con fines terapéuticos.

Tal como se usa en la presente memoria descriptiva, los términos “farmacéuticamente aceptable”, “fisiológicamente tolerable” y sus variaciones gramaticales cuando se refieren a las composiciones, los excipientes, los diluyentes y los reactivos, se usan de manera intercambiable y representan que los materiales pueden administrarse a un mamífero sin producir efectos fisiológicos adversos tal como nauseas, mareos, malestar gástrico y similares.

La preparación de una composición que contiene los ingredientes activos disueltos o dispersos en esta última se conoce bien en la técnica y no necesita limitación sobre la base de su formulación. Típicamente tales composiciones se preparan en forma de inyectables, bien como soluciones líquidas o suspensiones, aunque se pueden preparar formas sólidas para una solución o suspensiones, en líquido antes de su uso. La preparación también se puede emulsionar.

El ingrediente activo se puede mezclar con excipientes que son farmacéuticamente aceptable y compatibles con el ingrediente activo y en cantidades apropiadas para su uso en los procedimientos terapéuticos descritos en la

presente memoria descriptiva. Los excipientes apropiados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, o similar y las combinaciones de los mismos. Además si se desea, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes de taponamiento de pH y similares que mejoran la eficacia del ingrediente activo.

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

Particularmente se prefieren las sales de TFA y HCl, cuando se usan en la preparación de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ de polipéptidos cíclicos. En los Ejemplos se describen las sales representativas de los péptidos.

Los excipientes fisiológicamente tolerables son bien conocidos en la técnica. Un ejemplo de los excipientes líquidos son las soluciones acuosas estériles que no contienen ningún material además de los ingredientes activos y el agua, o contienen un tampón tal como el fosfato de sodio con un valor de pH fisiológico, una solución salina fisiológica o ambos, tal como fosfato-solución salina tamponada. Además, los excipientes acuosos pueden contener más de una sal de tampón, así como sales tales como cloruros de sodio y potasio, dextrosa, polietilenglicol y otros solutos.

Las composiciones líquidas también pueden contener fases líquidas además de y con la exclusión de agua . Un ejemplo de dichas fases líquidas adicionales son la glicerina, los aceites vegetales tales como aceite de semilla de algodón y emulsiones de agua-aceite.

Una composición terapéutica contiene una cantidad de inhibición de la angiogénesis de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la presente invención, típicamente formulada para contener una cantidad de al menos un 0,1 % en peso del antagonista por peso de la composición terapéutica total. Un porcentaje en peso es una relación por peso del inhibidor respecto de la composición total. De este modo, por ejemplo, el 0,1% en peso es 0,1 gramo de inhibidor por 100 gramos de composición total.

E. Antagonistas de Integrina $\alpha_v\beta_3$

Los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ se usan en los presentes procedimientos para inhibir la angiogénesis en los tejidos, y pueden adoptar una diversidad de formas que incluyen los compuestos que interactúan con $\alpha_v\beta_3$ de manera que se interfieren las interacciones funcionales con ligandos naturales de $\alpha_v\beta_3$. Los antagonistas de los ejemplos incluyen los análogos de $\alpha_v\beta_3$ derivados del sitio de unión de ligandos sobre $\alpha_v\beta_3$, miméticos de $\alpha_v\beta_3$ o un ligando natural de $\alpha_v\beta_3$ que mimetizan la región estructural implicada en las interacciones de unión de $\alpha_v\beta_3$-ligando, polipéptidos que tienen una secuencia que corresponde a un dominio de unión funcional del ligando natural específico para $\alpha_v\beta_3$, que corresponde particularmente al dominio que contiene RGD de un ligando natural de $\alpha_v\beta_3$, y los anticuerpos que se hacen inmunoreaccionar con $\alpha_v\beta_3$ o el ligando natural, todos los cuales exhiben actividad antagonista como se define en la presente memoria descriptiva.

1. Polipéptidos

En una realización, la invención contempla antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ en forma de polipéptidos. Un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de polipéptido (péptido) puede tener las características de secuencia del ligando natural del $\alpha_v\beta_3$ p del propio $\alpha_v\beta_3$ en la región implicada en la interacción $\alpha_v\beta_3$-ligando y exhibe actividad antagonista de $\alpha_v\beta_3$ tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Un péptido antagonista de $\alpha_v\beta_3$ preferido contienen el tripéptido RGD y corresponde en secuencia al ligando natural en la región que contienen RGD.

Los polipéptidos preferidos que contienen RGD tienen una secuencia que corresponde a la secuencia de residuos de aminoácido de la región que contiene RGD de un ligando natural de $\alpha_v\beta_3$ como fibrinógeno, vitronectina, factor de von Willebrand, laminina, trombospondina y ligandos similares. La secuencia de estos ligandos de $\alpha_v\beta_3$ son bien conocidos. De este modo, un péptido antagonista de $\alpha_v\beta_3$ se puede derivar de cualquiera de los ligandos naturales, aunque se prefiere el fibrinógeno y la vitronectina.

Un péptido antagonista de $\alpha_v\beta_3$ particularmente preferido inhibe preferiblemente la unión de $\alpha_v\beta_3$ a su(s) ligando(s) cuando se compara con otras integrinas, tal como se ha descrito anteriormente. Se prefieren particularmente los péptidos específicos de $\alpha_v\beta_3$ al menos porque la especificidad para $\alpha_v\beta_3$ reduce la incidencia de efectos secundarios indeseables tal como la inhibición de otras integrinas. La identificación de los péptidos antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ preferidos que tienen selectividad para $\alpha_v\beta_3$ se pueden identificar fácilmente en una inhibición típica del ensayo de unión, tal como el ensayo ELISA descrito en los Ejemplos.

En una realización, un polipéptido de la presente invención no comprende más de aproximadamente 100 residuos de aminoácido, preferiblemente no más de aproximadamente 60 residuos, más preferiblemente no más de aproximadamente 30 residuos. Los péptidos pueden ser lineales o cíclicos, aunque particularmente los péptidos preferidos son cíclicos.

Los péptidos cíclicos y lineales preferidos y sus designaciones se muestran en la Tabla 1 en los Ejemplos.

Se debería entender que un polipéptido sujeto no necesita ser idéntico a la secuencia de residuos de aminoácido de un ligando natural de $\alpha_v\beta_3$, siempre que incluya la secuencia requerida y pueda funcionar como un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ en un ensayo tal como los descritos en la presente memoria descriptiva.

Un polipéptido objeto incluye cualquier análogo, fragmento o derivado químico de un polipéptido cuya secuencia de residuos de aminoácido se muestra en la presente memoria descriptiva, siempre que el polipéptido sea un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ Por lo tanto, un polipéptido actual se puede someter a diversos cambios, sustituciones, inserciones y deleciones donde tales cambios proporcionan determinadas ventajas en su uso. A este efecto, el polipéptido antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de la invención corresponde a un péptido mencionado donde se hacen uno o más cambios y retiene la capacidad de funcionar como un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ en uno o más de los ensayos tal como se definen en la presente memoria.

De este modo, un polipéptido puede estar en una diversidad de formas de derivados de péptido, que incluyen amidas, conjugados con proteínas, péptidos ciclados , péptidos polimerizados, análogos, fragmentos, péptidos químicamente modificados y derivados similares.

El término “análogo” incluye cualquier polipéptido que tiene una secuencia de residuos de aminoácido sustancialmente idéntica a una secuencia específicamente mostrada en la presente memoria descriptiva en la que se han sustituido de manera conservadora uno o más residuos con un residuo funcionalmente similar y que muestra la actividad antagonista de $\alpha_v\beta_3$ tal como se describe en la presente memoria descriptiva. Los ejemplos de sustitución conservadora incluyen la sustitución de un residuo (hidrófobo) no-polar tal como la isoleucina, valina, leucina o metionina por otro, la sustitución de un residuo (hidrófobo) polar por otro tal como entre la arginina y la lisina, entre la glutamina y la aspararagina, entre la glicina y la serina, la sustitución de un residuo básico tal como la lisina, la asparagina o la histidina por otro, o la sustitución de un residuo ácido, tal como ácido aspártico o ácido glutámico por otro.

La expresión “sustitución conservadora” también incluye el uso de un residuo químicamente derivado en lugar de un residuo no derivado siempre que dicho polipéptido muestre la actividad de inhibición requerida.

“Derivado químico” se refiere a un polipéptido sujeto que tiene uno o más residuos químicamente derivados por reacción de un grupo lateral funcional. Tales moléculas derivadas incluyen por ejemplo, las moléculas en las que los grupos amino libres se han derivado para formar clorhidratos de amina, grupos *p*-tolueno sulfonilo, grupos carbobenzoxi, grupos *t*-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo o grupos formilo. Los grupos carboxilo libres se pueden derivar para formar sales, ésteres de metilo y etilo u otros tipos de ésteres o hidrácidas. Los grupos hidroxilo libres se pueden derivar para formar derivados O-acilo u O-alquilo. El imidazol nitrógeno de histidina se puede derivar para formar N-imbencilhistidina. También incluidos como derivados químicos se encuentran los péptidos que contienen uno o más derivados de aminoácido producidos naturalmente de los veinte amino ácidos estándares. Por ejemplo: la 4-hidroxyprolina se puede sustituir por prolina; la 5-hidroxilisina se puede sustituir por lisina, la 3-metilhistidina se puede sustituir por histidina; la homoserina se puede sustituir por serina; y la ornitina se puede sustituir por lisina. – los polipéptidos de la presente invención también incluyen cualquier polipétido que tenga una o más adiciones y/o deleciones o residuos relativos a la secuencia de un polipéptido cuya secuencia se muestra en la presente memoria descriptiva; siempre que se mantenga la actividad requerida.

El término “fragmento” se refiere a cualquier polipétido sujeto que tenga una secuencia de residuos de aminoácido más corta que la de un polipéptido cuya secuencia de residuos de aminoácido se muestra en la presente memoria descriptiva.

Cuando un polipéptido de la presente invención tiene una secuencia que no es idéntica a la secuencia de un ligando natural de $\alpha_v\beta_3$, es típicamente porque se han hecho una o más sustituciones conservadoras o no conservadoras, normalmente no más de aproximadamente un 30%, y preferiblemente no más de un 10% de los residuos de aminoácido se sustituyen. Los residuos adicionales también se pueden añadir a uno de los dos términos de un polipéptido para con el fin de proporcionar un “enlazador” mediante el cual los polipéptidos de la invención se pueden fijar adecuadamente a un marcador o matriz sólida , o excipiente.

Los marcadores, las matrices sólidas y los excipientes que se pueden usar con los polipéptidos de la invención se describen más adelante en la presente memoria descriptiva.

Los enlazadores de residuos de aminoácido son normalmente al menos un residuo y pueden ser 40 o más residuos, más a menudos de 1 a 10 residuos, pero no forman epitopes de ligando de $\alpha_v\beta_3$. Los residuos de aminoácido típicos usados para enlazar son la tirosina, cisteína, lisina, ácido glutámico y ácido aspártico, o similares. Además, un polipéptido sujeto puede diferir, a menos que se especifique otra cosa, de la secuencia natural de un ligando de $\alpha_v\beta_3$ mediante la secuencia que se está modificando por la acilación de NH_2 terminal, por ejemplo acetilación o la amidación de ácido tioglicólico, por la carboxilamidación terminal, por ejemplo con amoníaco, metilamina y codificaciones terminales similares. Las modificaciones terminales son útiles, como es bien sabido, para reducir la susceptibilidad a la digestión de proteinasa, y por lo tanto sirven para prolongar media vida de los péptidos en soluciones, particularmente fluidos biológicos donde las proteasas pueden estar presentes. Con este fin, la ciclización de polipéptidos también es una modificación terminal útil, y se prefiere particularmente a causa de las estructuras estables formadas por ciclización y en vista de las actividades biológicas observadas de dichos péptidos cíclicos descritos en la presente memoria descriptiva.

Cualquier péptido de la presente invención se puede usar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ácidos apropiados que pueden formar sales con los péptidos de la presente invención incluyen ácidos inorgánicos tales como ácido trifluoroacético TFA, ácido clorhídrico HCl, ácido bromhídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociánico, ácido sulfúrico, ácido fosforícoacético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maléico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinámico, ácido naftalenosulfónico, ácido sulfanílico o similares. Se prefieren particularmente las sales de HCl y TFA.

Las bases apropiadas capaces de formar sales con los péptidos de la presente invención incluyen bases inorgánicas tales como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y similares; y bases orgánicas

tales como mono-, di- y tri-alquil y aril aminas (por ejemplo trietilamina, diisopropilamina, metilamina, dimetilamina y similares) y etanolaminas opcionalmente sustituidas (por ejemplo etanolamina, dietanolamina y similares).

Un péptido de la presente invención se refiere también a un polipéptido sujeto, se puede sintetizar mediante cualquiera de las técnicas conocidas por los expertos en la técnica de los polipéptidos, incluyendo técnicas de ADN recombinante. Se prefieren las técnicas de química sintética, tales como una síntesis de tipo Merrifield de fase sólida, por razones de pureza, especificidad antigénica, libertada de productos laterales indeseados, facilidad de producción y similares. Se puede encontrar un excelente sumario de las muchas técnicas disponibles en Steward *et al.,* "Solid Phase Peptide Síntesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, *et al.,* "Peptide Síntesis", John Wiley & Sons, Segunda edición, 1976; J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (Nueva York), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, 1969; Fields *et al.,* Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, 1990; y la patente de los Estados Unidos número 4.244.946 para la síntesis de péptidos de fase sólida, y Schoder *et al.,* "The Peptides", Vol.1; Academic Press (Nueva York), 1965 para la síntesis de solución clásica. Se describen los grupos protectores apropiados utilizable en dicha síntesis en los anteriores textos y en J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nueva York, 1973.

En general, los procedimientos de síntesis de fase sólida contemplados comprenden la adición secuencia de uno o más residuos de aminoácido o los residuos de aminoácido apropiadamente protegidos a una cadena peptídica creciente. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer residuo de aminoácido está protegido por un grupo protector selectivamente eliminable. Se utiliza un grupo protector selectivamente eliminable, diferente para los aminoácidos que contienen un grupo lateral reactivo tal como la lisina.

Al usar por ejemplo una síntesis de fase sólida, el aminoácido protegido o derivado se fija a un soporte sólido inerte a través de su grupo carboxilo o amino desprotegido. El grupo protector del grupo amino o carboxilo se elimina entonces selectivamente y el siguiente aminoácido de la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxi) adecuadamente protegido se mezcla y se hace reaccionar en condiciones apropiadas para formar el enlace amida con el residuo ya fijado al soporte sólido. El grupo protector del grupo amino o carboxilo se elimina entonces del residuo de aminoácido recientemente añadido, y entonces se añade el siguiente aminoácido (apropiadamente protegido) y así sucesivamente. Después de haber enlazado todos los aminoácidos deseados en la propia secuencia, se elimina secuencialmente o concurrentemente cualquier grupo terminal o lateral restante (y soporte sólido) para obtener el polipéptido lineal final.

Los polipéptidos lineales resultantes preparados por ejemplo como se describe anteriormente se pueden hacer reaccionar para formar sus péptidos cíclicos correspondientes. Se describe un ejemplo de un procedimiento para ciclizar péptidos en Zimmer *et al.,* Péptidos 1992, pp. 393-394. EXCMO. Science Publishers, B.V., 1993. Típicamente el éster de metilo de péptido protegido de tercbutoxicarbonilo se disuelve en metanol y se añaden soluciones de hidróxido de sodio y la mezcla se hace reaccionar a 20ºC (20C) para eliminar hidrolíticamente el grupo protector de éster de metilo. Después de evaporar el solvente, el péptido protegido de tercbutoxicarbonilo se extrae con acetato de etilo del solvente acuoso acidificado. El grupo protector tercbutoxicarbonilo se elimina entonces en condiciones suavemente ácidas en un cosolvente de dioxano. El péptido lineal desprotegido con los términos amino y carboxi libres así obtenidos se convierte en su péptido cíclico correspondiente haciendo reaccionar una solución diluida del péptido lineal en una mezcla de diclorometano y dimetilformamida, con diciclohexilcarbodiimida en presencia de 1-hidroxibenzotriazol y N-metilmorfolina. El péptido cíclico resultante se purifica entonces por cromatografía.

Se describe un procedimiento particularmente preferido de síntesis de péptido cíclico en Gurrath *et al.,* Eur. J. Biochem., 210:911-921 (1992), y se describe en los Ejemplos. Particularmente los péptidos preferidos para su utilización en los presentes procedimientos son c-(GrGDFV) (SEQ ID NO 4), c-(RGDFv) (SEQ ID NO 5), c-(RADFv) (SEQ ID NO 6), c-(RGDFv) (SEQ ID NO 7) y el péptido lineal YTAECKPQVTRGDVF (SEQ ID NO 8), donde "c-" indica un péptido cíclico, las letras mayúsculas son un simple código de letras para un aminoácido L y las letras minúsculas son un simple código de letras para el aminoácido D- La secuencia de residuos de aminoácido de estos péptidos también se conoce en SEQ ID NO 4, 5, 6, 7 y 8, respectivamente.

2, Anticuerpos monoclonales

La presente invención describe, en una realización, antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ en forma de anticuerpos monoclonales que se hacen inmunoreaccionar con $\alpha_v\beta_3$ e inhiben la unión de $\alpha_v\beta_3$ a su ligando natural tal como se describe en la presente memoria descriptiva. También se describen en la presente memoria descriptiva líneas de células que producen los anticuerpos, procedimientos para producir las líneas de células, y procedimientos para producir los anticuerpos monoclonales.

Un anticuerpo monoclonal de la invención comprende moléculas de anticuerpos que 1) se hacen inmunoreaccionar con $\alpha_v\beta_3$ aislado, y 2) inhibir la unión de fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$. Los anticuerpos monoclonales preferidos que se unen preferiblemente a $\alpha_v\beta_3$ incluyen un anticuerpo monoclonal que tiene las características de inmunorreacción de mAb LM609, segregadas por la línea de células de hibridona ATCC HB 9537. La línea de células de hibridoma ATCC HB 9537 se depositó de acuerdo con los requisitos del Tratado de Budapest en La Colección de cultivo tipo americano (ATCC), 1301 Parklawn Drive, Rockville, MD, USA, el 15 de septiembre de 1987.

El término "anticuerpo o molécula de anticuerpo" en las diversas formas gramaticales se usa en la presente memoria descriptiva como un nombre colectivo que se refiere a una población de moléculas de inmunoglobulina y/o porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir, moléculas que contienen un sitio de combinación de anticuerpos o paratope.

Un "sitio de combinación de anticuerpos" es la porción estructural de una molécula de anticuerpo constituida por regiones variables e hipervariable de cadena pesada y ligera que se une específicamente al antígeno.

Los anticuerpos de ejemplo para su uso en la presente invención son moléculas de inmunoglobulina intactas, moléculas de inmunoglobulina sustancialmente intactas y las porciones de una molécula de inmunoglobulina que contienen el paratope, incluyendo las porciones conocidas en la técnica como Fab, Fab', $(F(ab)'_2$ y F(v) y también se refieren a fragmentos de anticuerpo.

En otra realización preferida, la invención contempla una molécula de inmunoglobulina truncada que comprende un fragmento Fab derivado de un anticuerpo monoclonal de la invención. El fragmento Fab, que carece del receptor Fc, es soluble, y consigue ventajas terapéuticas en media vida de suero, y ventajas de diagnóstico en modos de uso del fragmento Fab soluble. La preparación de un fragmento Fab soluble se conoce generalmente en las técnicas inmunológicas y se puede conseguir mediante una diversidad de procedimientos.

Por ejemplo, las porciones (fragmentos) Fab y $F(ab')_2$ de anticuerpos se preparan mediante la reacción proteolítica de papaína y pepsina, respectivamente, sobre los anticuerpos sustancialmente intactos mediante procedimientos bien conocidos. Véase por ejemplo, la patente de los Estados Unidos número 4.342.566 de Theofilopolous y Dixon. Las porciones de anticuerpo Fab también son bien conocidas y se producen a partir de las porciones $F(ab')_2$ seguidas de la reducción de los enlaces de disulfuro que unen las dos porciones de cadena pesada como con mercaptoetanol, y seguidas por la alquilación del mercaptano de proteína resultante con un reactivo tal como la yodoacetamida. Se prefiere un anticuerpo que contiene moléculas de inmunoglobulina intactas , y se utiliza como se ilustra en la presente memoria descriptiva.

La expresión "anticuerpo monoclonal" en sus diversas formas gramaticales se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen sólo una especie de sitio de combinación de anticuerpo capaz de inmunoreaccionar con un epítope particular. Un anticuerpo monoclonal muestra típicamente de este modo una afinidad de única unión para cualquier epítope con el que se hace inmunoreaccionar. Un anticuerpo monoclonal puede, por lo tanto contener una molécula de anticuerpo que tiene una pluralidad de sitios de combinación de anticuerpo, cada uno inmunoespecífico para un epítope diferente, por ejemplo un anticuerpo monoclonal biespecífico.

Un anticuerpo monoclonal está típicamente compuesto por anticuerpos producidos por clones de una única célula llamada hibridoma que segrega (produce) sólo un tipo de molécula de anticuerpo. La célula hibridoma se forma condensando una célula productora de anticuerpos y un mieloma u otra línea de células autoperpetuadoras. La preparación de tales anticuerpos se describió en primer lugar por Kohler y Milestein, Nature 256:495-497 (1975). Los procedimientos adicionales se describen por Zola, Monoclonal Antibodies: A manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987). El sobrenadante así preparado se puede filtrar para la presencia de moléculas de anticuerpo que se hacen inmunorreaccionar con $\alpha_v\beta_3$ y para la inhibición de la unión de $\alpha_v\beta_3$ a ligandos naturales.

En resumen, para formar el hibridoma a partir del cual se produce la composición de anticuerpo monoclonal, se condensa un mieloma u otra línea de células autoperpetuadoras con linfocitos obtenidos a partir del bazo de un mamífero hiperinmunizado con una fuente de $\alpha_v\beta_3$ tal como $\alpha_v\beta_3$ aislado de las células de melanoma humano M21 tal como se describe en Cheresh *et al.,* J. Biol.. Chem., 262:17703-17711 (1987).

Se prefiere que la línea de células de mieloma usada para preparar un hibridoma se haga a partir de la misma especie que los linfocitos- Típicamente, un ratón de cepa 129 GLX^+ es el mamífero preferido. Los mielomas de ratón adecuados para su uso en la presente invención incluyen las líneas de células sensibles a la hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT) P3X63-Ag8.653, y Sp2/0-Ag14 que están disponible en la Colección de cultivos tipo americano, Rockville, MD, bajo las designaciones CRL 1580 y CRL 1581, respectivamente.

Los esplenocitos se condensan típicamente con las células de mieloma que usan polietilenglicol (PEG) 1500. Los híbridos condensados se seleccionan por su sensibilidad a HAT. Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal de la invención se identifican usando el ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) descrito en los Ejemplos.

Un anticuerpo monoclonal de la presente invención también se puede producir iniciando un cultivo de hibridoma monoclonal que comprende un medio de nutrientes que contiene un hibridoma que segrega moléculas de anticuerpo de especificidad apropiada. El cultivo se mantiene en condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente para que el hibridoma segregue las moléculas de anticuerpo en el medio. A continuación se recoge el medio que contiene anticuerpos. A continuación, las moléculas de anticuerpo se pueden, además, aislar mediante técnicas bien conocidas.

Los medios útiles para la preparación de las composiciones son bien conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles e incluyen medios de cultivo sintético, ratones consanguíneos y similares. Un ejemplo de medio sintético es el medio esencial mínimo de Dulbecco (DMEM; Dulbecco *et al.,* Virol. 8:396, 1959) suplementado con 4,5 g/l de glucosa, 20 mM de glutamina, y suero 20% fetal de ternero. Un ejemplo de cepa de ratón consanguíneo es el Balb/c.

Otros procedimientos para producir un anticuerpo monoclonal, una célula de hibridoma o un cultivo de células de hibridoma también son conocidos. Véase, por ejemplo, el procedimiento para aislar anticuerpos monoclonales a partir de un repertorio inmunológico tal como se describe en Sastry, *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5728-5732 (1989); y Huse *et al.,* Science, 24:1275-1281 (1989).

También se contempla por esta invención la célula de hibridoma y los cultivos que contienen una célula de hibridoma que producen un anticuerpo monoclonal de la invención. E prefiere particularmente la línea de células de hibridoma que segrega el anticuerpo monoclonal mAb LM609 designado ATCC HB 9537. El mAb LM609 se preparó como se describe en Cheresh *et al.,* J. Biol.. Chem. 262:17703-1711 (1987), y su preparación también se describe en los Ejemplos.

La invención contempla, en una realización, un anticuerpo monoclonal que tiene las características de inmunoreación de mAb LM609.

También es posible determinar, sin experimentación indebida, si un anticuerpo monoclonal tiene la misma (por ejemplo equivalente) especificidad (características de inmunoreacción) como un anticuerpo monoclonal de la invención determinando si el anterior previene que este último se una a una molécula diana preseleccionada. Si el anticuerpo monoclonal que se están ensayando compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra mediante una reducción de la unión por parte del anticuerpo monoclonal de la invención en los ensayos de competición estándares para unirse a la molécula diana cuando ésta presente en la fase sólida, a continuación es probable que los dos anticuerpos monoclonales se unan al mismo epítope o a un epítope estrechamente relacionado.

Otra manera de determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal de la invención es preincubar el anticuerpo monoclonal de la invención con la molécula diana con la que es normalmente reactivo, y a continuación se añade el anticuerpo monoclonal que se está ensayando para determinar si el anticuerpo que se está ensayando se inhibe en su capacidad para unir la molécula diana. Si el anticuerpo monoclonal que se están ensayando se inhibe, entonces con toda probabilidad, tiene la misma o funcionalmente equivalente, especificidad epitópica que el anticuerpo monoclonal de la invención.

Una manera adicional de determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de un anticuerpo monoclonal de la invención es determinar la secuencia de residuos de amioácido de las regiones CDR de los anticuerpos en cuestión. Las moléculas de anticuerpo que tienen secuencias de residuo de aminoácido idénticas o funcionalmente equivalentes en sus regiones CDR tienen la misma especificidad de unión. Los procedimientos para secuenciar polipéptidos es bien conocida en la técnica.

La inmunoespecificidad de un anticuerpo, su capacidad de unión de molécula diana, y la afinidad correspondiente que exhibe el anticuerpo para el epítope, se definen por el epítope con el que se hace reaccionar el anticuerpo. La especificidad del epítope se define al menos en parte por la secuencia de residuos de aminoácido de la región variable de la cadena pesada de la inmunoglobulina, el anticuerpo, y en parte por la secuencia de residuos de aminoácido de región variable de cadena ligera.

El uso de la expresión “tener la especificidad de unión de” indica que los anticuerpos monoclonales equivalentes exhiben la mismas o similares características de inmunoreacción (unión) y compiten para unirse a una molécula diana preseleccionada.

Los anticuerpos monoclonales humanizados ofrecen ventajas particulares sobre los anticuerpos monoclonales murinos, particularmente en la medida en que se pueden usar terapéuticamente en los seres humanos. Específicamente los anticuerpos humanos no se retiran de la circulación tan rápidamente como los antígenos “foráneos”, y no activan el sistema inmune de la misma manera que los antígenos foráneos y los anticuerpos foráneos. Los procedimientos para preparar anticuerpos “humanizados” son bien conocidos en la técnica, y se pueden aplicar fácilmente a los anticuerpos de la presente invención.

De este modo, la invención contempla, en una realización, un anticuerpo monoclonal de la invención que se humaniza por injerto para producir componentes del sistema inmune humano sin interferir sustancialmente con la capacidad del anticuerpo para unirse al antígeno.

3.- Miméticos específicos de $\alpha_v\beta_3$

La presente invención demuestra que los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ generalmente se pueden usar en la presente invención, dichos antagonistas pueden incluir polipéptidos, anticuerpos y otras moléculas, designadas “miméticos”, que tienen la capacidad de interferir con la función de $\alpha_v\beta_3$. Particularmente, se prefieren los antagonistas que interfieren específicamente con la función de $\alpha_v\beta_3$, y no interfieren con la función de otras integrinas.

En este contexto, se aprecia que una diversidad de reactivos pueden ser apropiados para su uso en los actuales procedimientos, en la medida en que estos reactivos poseen la actividad biológica requerida. Los reactivos se refieren genéricamente a unos miméticos porque poseen la capacidad de “mimetizar” un dominio de unión sobre $\alpha_v\beta_3$ o el ligando de $\alpha_v\beta_3$ implicado en la interacción funcional del receptor y del ligando, y por lo tanto interfieren con (es decir, inhiben) la función normal.

Un mimético de $\alpha_v\beta_3$ es cualquier molécula, distinta de un péptido de derivado de un ligando o un anticuerpo, que exhibe las propiedades anteriormente mencionadas. Puede ser un análogo sintético de un péptidos, un compuesto que se conforma como la bolsa de unión del dominio de unión anteriormente descrito, u otra molécula.

El diseño de un mimético de $\alpha_v\beta_3$ se puede realizar por uno cualquiera de los diversos procedimientos de análisis estructurales para el diseño de fármacos conocido en la técnica, incluyendo la modelización molecular, la resonancia magnética nuclear bidimensional (RMN 2D), cristalografía de rayos X, detección aleatoria de bibliotecas de péptidos, análogos de péptidos u otros polímeros químicos y las metodologías similares de diseño de fármacos.

En vista de la amplia evidencia estructural presentada en la presente especificación que muestra que un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ puede ser un pequeño polipéptido o un anticuerpo monoclonal, dos estructuras químicas diversamente diferentes que comparten la propiedad funcional de la inhibición selectiva de $\alpha_v\beta_3$, la estructura de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ sujeto útil en los presente procedimientos no necesita tener limitaciones, pero incluye cualquier mimético de $\alpha_v\beta_3$, tal como se define en la presente memoria

F. Procedimientos para identificar antagonistas de $\alpha_v\beta_3$

También se describen en la presente memoria descriptiva, procedimientos de ensayo para identificar los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ candidatos para su uso según los actuales procedimientos. En estos procedimientos de ensayos las moléculas candidatas se evalúan por su potencia en la inhibición de la unión de $\alpha_v\beta_3$ a ligandos naturales, y además se evalúan por su potencia en la inhibición de la angiogénesis en un tejido.

El primer ensayo mide la inhibición de la unión directa del ligando natural a $\alpha_v\beta_3$, y se describe en detalle una realización preferida en los Ejemplos. El ensayo mide típicamente 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.

El ensayo se puede usar también para identificar los compuestos que exhiben especificidad para $\alpha_v\beta_3$ y no inhiben los ligandos naturales de unirse a otras integrinas. El ensayo de especificidad se realiza ejecutando ensayos de ELISA en paralelo en los que tanto $\alpha_v\beta_3$ como otras integrinas se detectan concurrentemente en cámaras de ensayo separadas por sus respectivas capacidades de unirse a un ligando natural y por l compuesto candidato para inhibir las respectivas capacidades de las integrinas para unirse a un ligando preseleccionado. Se describen formatos preferidos de ensayo de detección en los Ejemplos.

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

El ensayo de CAM es un modelo de ensayo bien reconocido para la angiogénesis *in* vivo porque se está realizando la neovascularización de todo el tejido, y los actuales vasos sanguíneos de embrión de pollo están creciendo en la CAM o en el tejido crecido sobre la CAM.

Como se demuestra en la presente memoria descriptiva, el ensayo de CAM ilustra la inhibición de la neovascularización basada tanto en la cantidad como en el alcance del crecimiento de los nuevos vasos. Además, es fácil controlar el crecimiento de cualquier tejido trasplantado sobre la CAM, tal como un tejido tumoral. Finalmente, el ensayo es particularmente útil porque hay un control interno de la toxicidad en el sistema de ensayo. El embrión de pollo se expone a cualquier reactivo de ensayo, y por lo tanto la salud del embrión es una indicación de toxicidad.

El tercer ensayo mide la angiogénesis en el modelo de ojo de conejo *in vivo* y se conoce como ensayo de ojo de conejo. El ensayo de ojo de conejo se ha descrito en detalle por otros autores, 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, *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci., 91:4082-4085 (1994).

El ensayo del ojo de conejo es un modelo de ensayo bien reconocido para la angiogénesis *in vivo* porque el proceso de neovascularización, ejemplificado por los vasos sanguíneos de conejo que crecen desde el borde de la córnea dentro de la córnea, se observa fácilmente a través de la córnea naturalmente transparente del ojo. Además, tanto el alcance como la cantidad de estimulación o inhibición de la neovascularización o la regresión de la neovascularización se puede controlar fácilmente en el tiempo.

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

El cuarto ensayo mide la angiogénesis en el modelo de ratón quimérico:ratón humano y se conoce como el ensayo de ratón quimérico. Se ha descrito en ensayo en detalle por otros autores, y además se ha descrito en la presente memoria descriptiva para medir la angiogénesis, la neovascularización, y la regresión de los tejidos tumorales. Véase Yan, *et al.,* J. Clin Invest., 91:896-996 (1993). El ensayo de ratón quimérico es un modelo de ensayo útil para la angiogénesis *in vivo* porque los injertos de piel transplantada se parecen mucho a la piel humana normal desde el punto de vista histológico y la neovascularización de todo el tejido se produce cuando los vasos sanguíneos humanos actuales están creciendo desde la piel humana injertada en el tejido tumoral humano sobre la superficie de la piel humana injertada. El origen de la neovascularización en el injerto humano se puede demostrar por teñido inmunohistoquímico de la neovasculatura con marcadores de células endoteliales específicas humanas.

Como se demuestra en la presente memoria descriptiva, el ensayo de ratón quimérico demuestra la regresión de la neovascularización basada tanto en la cantidad como en el alcance de la regresión del crecimiento de nuevos vasos. Además, es fácil controlar los efectos sobre el crecimiento de cualquier tejido trasplantado sobre la piel injertada, tal como un tejido tumoral. Finalmente, el ensayo es útil porque hay un control interno de la toxicidad en el sistema de ensayo. El ratón quimérico se expone a cualquier reactivo de ensayo, y por lo tanto la salud del ratón es una indicación de la toxicidad.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos que se refieren a la invención son ilustrativos y no deberían, por supuesto, interpretarse específicamente como limitativos de la invención. Además, dichas variaciones de la invención, actualmente conocidas o desarrolladas más adelante, que estarían dentro del ámbito de un experto en la técnica, han de considerarse que caen dentro del alcance de la presente invención que se reivindica más adelante.

Los Ejemplos describen, entre otros, el tratamiento de los melanomas, dicho tratamiento no se reivindica, y se describe únicamente con fines ilustrativos.

1.- Preparación de los péptidos sintéticos

Los polipéptidos lineales y cíclicos expuestos en la Tabla 1 se sintetizaron usando técnicas estándares de síntesis de fase sólida, como, por ejemplo, se describe en Merrifield, Adv Enzymol., 32:221-96, (1969), y Fields, G.B. y Noble, R,L., Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, (1990).

Se disolvieron en primer lugar dos gramos (g) de BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe (SEQ ID NO 1) en 60 mililitros (ml) de metanol al que se añadió 1,5 ml de una solución de hidróxido de sodio 2N para formar una mezcla. La mezcla se agito a continuación durante 3 horas a 20 grados centígrados (20ºC). Después de la evaporación, el

residuo se absorbió en agua, se acidifico con un pH 3 con HCl diluido y se extrajo con acetato de etilo. El extracto se seco sobre Na_2SO_4, se evaporó de nuevo y el BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH (SEQ ID NO 2) se agitó a 20ºC durante 2 horas con 20 ml de HCl 2N en dioxano. La mezcla resultante se evaporó de nuevo para obtener H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH (SEQ ID NO 3) que se disolvió posteriormente en una mezcla de 1.800 ml de diclorometano y 200 ml de dimetilformamida (DMF) seguido de une enfriamiento a 0ºC. Después, se añadieron sucesivamente con agitación 0,5 g de diciclohexilcarbodiimida (DCCI), 0,3 g de 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) y 0,23 ml de N-metilmorfolina.

La mezcla resultante se agitó durante 24 horas adicionales a 0ºC y a continuación a 20ºC durante otras 48 horas más. La solución se concentró y se trató con un cambiador de iones de lecho mixto para liberarla de sus sales. Después de retirar la resina resultante por filtración, la solución clarificada se evaporó y el residuo se purificó por cromatografía dando como resultado la recuperación de ciclo(-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO 4). Los siguientes péptidos, expuestos en la Tabla 1 que usan abreviaturas para los residuos de aminoácido con un código de una única letra y se identifican mediante una designación de número de péptido, se obtuvieron de manera análoga: ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO 5); ciclo(Arg-ala-Asp-D-Phe-Val) (SEQ ID NO 6); ciclo(Arg-D-Ala-Asp-Phe-Val) (SEQ ID NO 9); ciclo(Arg-Gly-Asp-Phe-D-Val) (SEQ ID NO 7). Una secuencia designada como 66203, que tiene una secuencia idéntica a la del péptido 62184, que sólo difería de la última porque contiene la sal HCl en lugar de la Sal Tfa presente en 62184. En la inhibición de la angiogénesis se describen los ensayos descritos en el Ejemplo 7 donde se usaron los péptidos sintéticos, el péptidos 66203 que tiene HCl fue ligeramente más eficaz en la inhibición de la angiogénesis que el péptido idéntico en TFA.

Tabla 1

Número de péptido	Secuencia de aminoácido*	SEC ID NO
62181	ciclo(GrGDFV)	4
62184	ciclo(RGDFV)	5
62185	ciclo(RADFV)	6
62187	ciclo(RGDFv)	7
62880	YTAECKPQVTRGDVF	8
92186	ciclo(RaDFV)	9
62175	ciclo(ARGDfL)	10
62179	ciclo(GRGDfL)	11
62411	TRQVVCDLGNPM	12
62503	GVVRNNEALARLS	13
62502	TDVNGDGRHDL	14

* Las letras minúsculas indican un aminoácido D; las letras mayúsculas indican un aminoácido L.

Un péptido designado 69601, que tiene una secuencia idéntica a la del péptido 62185, que sólo difería de la última por contener la sal de HCl en lugar de la sal de TFA presente en 62184.

Se ha mostrado el péptido cíclico c-RADfV (69601) para inhibir la unión del fibrinógeno a la integrina $\alpha_v\beta_3$ y no inhibir la unión del fibrinógeno a las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_5\beta_1$ (Pfaff, *et al.,* J. Biol.. Chem., 269:20233-20238, 1994). De este modo el péptido c-RADfV es específico para $\alpha_v\beta_3$.

2.-Anticuerpos monoclonales

El anticuerpo monoclonal LM609 segregado por el hibridoma ATCC HC 9537 se produjo usando los procedimientos estándares de hibridoma por inmunización con $\alpha_v\beta_3$ aislado absorbido sobre esferas de lentil lectina Sefarosa. La $\alpha_v\beta_3$ se aisló a partir de células de melanoma humano designadas M21, y el anticuerpo se produjo como se describe en Cheresh *et al.,* J. Biol.. Chem., 262:17703-17111 (1987). Se proporcionaron las células M21 por parte de Dr. D.L. ;Morton (Universidad de California, Los Ángeles, CA) y crecieron en cultivos de suspensión en un medio de cultivo RPMI 1640 que contiene 2 mM de L-glutamina, 50 mg/ml de sulfato de gentamicina y suero fetal de ternero al 10%.

Se ha demostrado que el anticuerpo monoclonal LM609 inmunoreacciona específicamente con el complejo de $\alpha_v\beta_3$, y no inmunoreacciona con la subunidad α_v, con la subunidad β_3 o con otras integrinas.

3.- Características de la distribución de tejido de la expresión de $\alpha_v\beta_3$

A. Inmunofluorescencia con anticuerpos de receptores de anti-integtrina

Durante la cicatrización de una herida, las membranas del basamento de los vasos sanguíneos expresan diversas proteínas adhesivas, incluyendo el factor de von Willebrand, la fibronectina y la fibrina. Además diversos miembros de la familia de las integrinas de los receptores de adhesión se expresan sobre la superficie de las células cultivadas endoteliales y del músculo liso. Véase, Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471 (1987); Janat *et al.,* J. Cell Physiol., 151:558 (1992); y Cheng *et al.,* J. Cell Physiol., 139:275 (1989). Entre las integrinas esta la $\alpha_v\beta_3$, el receptor de células endoteliales para el factor de von Willebrand, el fibrinógeno (fibrina), y la fibronectina como se describe en Cheresh Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471 (1987). Esta integrina inicia una vía de señalización dependiente del calcio que conduce a la migración de las células endoteliales, y por lo tanto parece desempeñar una función fundamental en la biología de células vasculares; como se describe en Leavelsey *et al.,* J. Cell Biol.., 121:163 (1993).

Para investigar la expresión de $\alpha_v\beta_3$ durante la angiogénesis, el tejido humano de granulación de herida o la piel normal adyacente se obtuvo a partir de pacientes consentidores, se lavó con 1 ml de solución salina tamponada con fosfato y se inserta en el medio O.T.C (Tejido Tek). Los tejidos insertados se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido durante aproximadamente 30 a 40 segundos. Se cortaron secciones de un espesor de 6 micrómetros a partir de los bloques congelados sobre un micrótomo de criostato para un posterior teñido de inmunoperoxidasa con anticuerpos específicos para las integrinas β_3 ($\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_{IIb}\beta_3$) o la subafimili β_1 de integrinas.

Se muestran los resultados de la tinción de la piel humana normal y el tejido de granulación de herida en las figuras 1A-1D. Se usaron los anticuerpos monoclonales AP3 y LM534, dirigido a las integrinas β_3 y β_1, respectivamente para análisis inmunohistoquímicos de secciones congeladas. Los experimentos con tejido de cuatro diferentes donantes humanos produjeron idénticos resultados. Se muestran las fotomicrografías con una ampliación de 300x.

La integrina $\alpha_v\beta_3$ se expresaron abundantemente sobre los vasos sanguíneos en el tejido de granulación (figura 1B) pero no se pudieron detectar en la dermis y el epitelio de la piel normal del mismo donante (figura 1A). en contraste con lo anterior, las integrinas β_1 se expresaron abundantemente sobre los vasos sanguíneos y las células normales tanto en la piel normal (figura 1C) como en el tejido de granulación (figura 1D), y como se ha mostrado anteriormente y descrito por Admas *et al.,* Cell, 63:425 (1991), sobre las células basales dentro del epitelio.

B.- Inmunofluorescencia con anticuerpos anti-ligando

Las secciones adicionales de la piel normal humana y los tejidos de granulación preparados anteriormente también se examinaron por la presencia de los ligandos, por las integrinas β_3 y β_1, el factor de von Willebrandd y la laminina, respectivamente. El factor de von Willebrand se localizó en los vasos sanguíneos en la piel normal (figura 2A) y el tejido de granulación(figura 2B), mientras que la laminina se localizó en todos los vasos sanguíneos así como la membrana del basamento epitelial en ambas preparaciones de tejido (Figura 2C y 2D).

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

Además de los anteriores análisis, también se examinaron las biopsias de los tejidos cancerosos de los pacientes humanos también por la presencia y distribución de $\alpha_v\beta_3$. Los tejidos se prepararon como se describe en el Ejemplo 1A con la excepción de que se tiñeron con el anticuerpo monoclonal LM609 preparado en el Ejemplo 2 que es específico para el complejo receptor de integrina, $\alpha_v\beta_3$. Además se prepararon también tumores para su análisis histológico microscópico fijando los ejemplos representativos de los tumores en fijador Bulins durante 8 horas y se cortaron secciones en serie y se tiñó con H y E.

Los resultados de la tinción de inmunoperoxidasa de los tejidos cancerosos de la vejiga, el colon, el mama y el pulmón se muestran en las figuras 3A-3D, respectivamente. $\alpha_v\beta_3$ se expresa abundantemente sólo sobre los vasos sanguíneos presentes en las cuatro biopsias de cáncer analizadas y no sobre una cualquiera de las otras células presentes en el tejido.

Los resultados descritos en la presente memoria descriptiva muestran de este modo que el receptor de integrina de $\alpha_v\beta_3$ se expresa selectivamente en tipos específicos de tejido, concretamente tejidos metastáticos, granulados y otros tejidos en los que la angiogénesis se produce y tejido no normal donde se ha detenido la formación de nuevos vasos sanguíneos. Estos tejidos proporcionan por lo tanto un objetivo ideal para aspectos terapéuticos de la invención

4. Identificación de los péptidos sintéticos específicos de $\alpha_v\beta_3$ detectados por un ensayo de unión de ligando-receptor.

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 se detectaron midiendo su capacidad para antagonizar la actividad de unión de receptores de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_5$ en ensayos de unión de ligando-receptor. El procedimiento para estos estudios de unión se ha descrito por Barbas *et al.,*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:10003-10007 (1993), Smith *et al.,* J. Biol.. Chem. 265:11008-11013 (1990), y Plaff *et al.,* J. Biol.. Chem. 269:20233-20238 (1994).

En la presente memoria descriptiva se describe un procedimiento de identificación de antagonistas en un ensayo de unión de ligando- receptor en el que el receptor se inmoviliza en un soporte sólido y el ligando y el antagonista son solubles. También se describe un ensayo de unión de ligando-receptor en el que el ligando se inmoviliza en un soporte sólido y el receptor y el antagonista son solubles.

En resumen, las integrinas purificadas seleccionadas se inmovilizaron por separado en pocillos de microtitración Titertek con una concentración de revestimiento de 50 nanogramos (ng) por pocillo. La purificación de los receptores se usa en los ensayos de unión ligando receptor son bien conocidos en la técnica y se pueden obtener fácilmente con procedimientos familiares a los expertos en la técnica. Después de la incubación durante 18 horas a 4ºC, se bloquearon sitios no específicos de unión sobre la placa con 10 miligramos / mililitro (mg/ml) de albúmina de suero bovino (BSA) en solución salina tris-tamponada. Para los estudios de inhibición, se ensayaron diversas concentraciones de péptidos seleccionados de la Tabla 1 para la capacidad para bloquear la unión de vitronectina ^{125}I o fibrinógeno ^{125}I a los receptores de integrina, $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$. Aunque los ligandos exhiben la unión óptima para una integrina particular, la vitronectina para $\alpha_v\beta_3$ y el fibrinógeno para $\alpha_{IIb}\beta_3$, los estudios de la inhibición de la unión usando péptidos para bloquear la unión del fibrinógeno a uno de los dos receptores permitidos para la determinación precisa de la cantidad de micromoles (uM) de péptido necesario para inhibir medianamente la unión del receptor al ligando. Los ligandos radiomarcados se usaron con concentraciones de 1 nM y la unión se provocó por separado con péptidos sintéticos no marcados.

Después de una incubación de tres horas, se retiró el ligando libre mediante un lavado y el ligando unido se detectó por recuento gamma. Los datos de los ensayos donde los péptidos cíclicos seleccionados mencionados en la Tabla 1 se usaron para inhibir la unión de los receptores y el fibrinógeno radiomarcado $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_{IIb}\beta_3$ inmovilizados por separado, los receptores se pudieron reproducir con el error entre los puntos de datos, típicamente por debajo del 11%. Los datos de CI_{50} en micromoles (IC_{50} uM) se expresaron como la media de los puntos de datos duplicados ± la desviación estándar como se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2

Número de péptidos	$\alpha_v\beta_3$ (IC_{50} uM)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC_{50} uM)
62181	1,96 ± 0,62	14,95 ± 7,84
62184	0,05 ± 0,001	0,525 ± 0,10
62185	0,886 ± 0,16	100 ± 0,001
62187	0,05 ± 0,001	0,26 ± 0,056
62186	57,45 ± 7,84	100 ± 0,001
62175	1,05 ± 0,07	0,63 ± 0,18
62179	0,395 ± 0,21	0,055 ± 0,007

De este modo, los péptidos ciclizados que contienen RGD y derivados de RGD 62181, 62184, 62185 y 62187, teniendo cada uno un residuo de aminoácido D, exhibieron una inhibición preferente de la unión de fibrinógeno al receptor de $\alpha_v\beta_3$ medida por la menor concentración de péptido requerida para la inhibición media comparada con la del receptor de $\alpha_{IIb}\beta_3$. en contraste con lo anterior, los otros péptidos cíclicos que contienen RGD o derivados de RGD, 62186, 62175 y 62179, o no fueron tan eficaces en el bloqueo de la unión del fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ o exhibieron una inhibición preferente de la unión del fibrinógeno a $\alpha_{IIb}\beta_3$ comparado con $\alpha_v\beta_3$. Los resultados son consistentes con los recientemente publicados por Pfaff, *et al.,* J. Biol.. Chem., 26920233-20238 (1994) en el que el péptido cíclico RGDFV (en el que F indica un residuo de amino ácido D) inhibió específicamente la unión del fibrinógeno a la integrina $\alpha_v\beta_3$ y no a las integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$. Los ensayos similares de inhibición de unión se llevaron a cabo con péptidos linealizados que tienen o carecen de un motivo RGD, cuyas secuencia se derivaron de la subunidad de receptor de α_v, la subunidad de receptor α_{IIb} o las secuencias de residuos de aminoácido d ligando de vitronectina. Las secuencias de los péptidos lineales, 62880 (residuos de aminoácido derivados de VN 35-49), 62411 (residuos de aminoácido derivados de α_v 676-687); 62503 (residuos de aminoácido derivados de α_v 655-667); 62 502 (residuos de aminoácido derivados de α_{IIb} 296-3006) se exponen en la Tabla 1. Cada uno de los péptidos se usó e n ensayos separados para inhibir la unión de la vitronectina (VN) o el fibrinógeno (FG) a $\alpha_{IIb}\beta_3$ o $\alpha_v\beta_3$. Los datos de IC_{50} en micromoles (IC_{50} uM) de un ensayo individual para cada experimento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3

Número de péptido	$\alpha_v\beta_3$ IC_{50} (uM)		$\alpha_v\beta_3$ IC_{50} (uM)	
	FG	VN	FG	VN
62880	4,2	0,98	<0,1	0,5
62411	>100	>100	>100	>100

62503	>100	>100	>100	>100
62502	90	5	>100	>100

Los resultados de la inhibición de los ensayos de unión de ligandos para seleccionar los receptores de integrina con péptidos linealizados muestran que sólo el péptido 62880 fue eficaz en la inhibición de la unión media de FG o VN a $\alpha_v\beta_3$ medido por la menor concentración de péptidos requerida para la inhibición media comparada con el receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Ninguno de los otros péptidos linealizados fue eficaz en el bloqueo de la unión de ligandos a $\alpha_v\beta_3$ aunque el péptidos 62502 sea eficaz en el bloqueo de la unión de VN a $\alpha_{IIb}\beta_3$.

De este modo el ensayo ligando-receptor descrito en la presente memoria descriptiva se puede usar para detectar tanto los péptidos sintéticos circulares como los linealizadores que exhiben una especificidad selectiva para un receptor particular de integrina, específicamente $\alpha_v\beta_3$, usados como antagonistas ($\alpha_v\beta_3$) de receptor de vitronectina en la práctica de la invención.

5.Caracterización de la membrana corioalantóica de pollo (CAM) sin tratar.

A. Preparación de la CAM

La angiogénesis se puede inducir en la membrana corialantóica de pollo (CAM) después de que la angiogénesis embrionaria normal haya dado como resultado la formación de vasos sanguíneos maduros. La angiogénesis ha demostrado ser inducida en respuesta a citoquinas específicas o fragmentos tumorales descritos por Leibovich *et al.,* Nature, 329:630 (1987) y Ausprunk *et al.,* Am. J. Pathol., 79:597 (1975). Las CAM se prepararon a partir de embriones de pollo para la posterior inducción de angiogénesis y la inhibición de los mismos como se describe en los Ejemplos 6 y 7, respectivamente. Los embriones de pollo de 10 días se obtuvieron en McIntyre Poultry (Lakeside, CA) y se incubaron a 37ºC con un 60% de humedad. Se hizo un pequeño agujero a través de la cáscara en el extremo del huevo directamente sobre la bolsa de aire con el uso de un pequeño taladro (Dremel, división de Emerson Electric Co. Racine WI). Se taladró un segundo orificio en el lado ancho del huevo en una región carente de vasos sanguíneos embrionarios anteriormente determinada iluminando el huevo. La presión negativa se aplicó al agujero original, que dio como resultado que la CAM (membrana corioalantóica) se separase de la membrana de la cáscara y crease una falsa bolsa de aire sobre la CAM. Se cortó una ventana cuadrada de 1,0 centímetro (cm) x 1,0 cm a través de la cáscara sobre la CAM caída con el uso de un pequeño modelo de muela (Dremel). La pecunia ventana permitió un acceso directo a la CAM subyacente.

La preparación de CAM resultante se usó a continuación a 6 días de la embriogénesis de, una etapa marcada por la neovascularización activa, sin tratamiento adicional a la CAM que refleja el modelo usado para evaluar los efectos sobre la neovascularización embrionaria o usada a 10 días de la embriogénesis cuando la angiogénesis se subdivide. Esta última preparación se uso de este modo en la invención para inducir la angiogénesis renovada en respuesta al tratamiento con citoquinas o al contacto del tumor descrita en el Ejemplo 6.

B. Histología de la CAM

Para analizar la estructura microscópica de las CAM de embrión de pollo y/o los tumores humanos que se resecaron a partir de los embriones de pollo descrita en el Ejemplo 8, las CAM y los tumores se prepararon para cortar secciones congeladas. Como se describe en el Ejemplo 3A. Se cortaron secciones con un espesor de seis micrómetros partir de bloques congelados sobre un micrótomo de criostato para el análisis de inmunofluorescencia.

La figura 4 muestra una fotomicrografía típica de un área desprovista de vasos sanguíneos en una CAM de 10 días sin tratar. Al subdividirse la angiogénesis en el sistema de CAM mediante la etapa de embriogénesis, el sistema es útil en la invención para estimular la producción de la nueva vasculatura de los vasos existentes de las áreas adyacentes en las áreas de la CAM que carecen concurrentemente de vasos.

C. Perfiles de integrina en la CAM detectados por inmunofluorescencia

Para ver la distribución de tejido de los receptores de integrina presentes en los tejidos de CAM, se fijaron secciones congeladas de 6 micrómetros um) de espesor tanto de los tejidos tumorales como de los tejidos de CAM de embriones de pollo en acetona durante 30 segundos y se tiñeron mediante inmunofluorescencia con 10 micrógramos/milílitros (ug/ml) mAb CSAT, un anticuerpo monoclonal específico para la subunidad de integrina β_1 descrita por Buck *et al.,* J. Cell Biol.., 107:2351 (1988) y de este modo se uso para los controles, o LM609 preparado en el Ejemplo 2. Al teñido primario le siguió un teñido con una dilución del 1:250 de anticuerpo secundario marcado de rodamina antiratón de cabra (TAGO) para permitir la detección del producto de inmunoreación primaria. Las secciones se analizaron a continuación con un microscopio con compuesto de inmunofluorescencia Zeiss. .

Los resultados del análisis de inmunofluorescencia muestran que los vasos sanguíneos maduros presentes en un embrión de pollo de 10 días sin tratar expresan la subunidad integrina β_1 (figura 5A). En contraste con lo anterior, en una sección en serie del tejido mostrada en la figura 5A no se detecto inmunoreactividad con LM609 (figura 5B). De este modo 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 sin tratar de 10 días. Como se muestra en el modelo de CAM y en los siguientes Ejemplos, mientras los vasos sanguíneos experimenta un nuevo crecimiento en una embriogénesois normal o inducida por citoquinas o tumores, los vasos sanguíneos expresan $\alpha_v\beta_3$. Sin embargo, después de la neovascularización activa, una vez que los vasos han dejado de desarrollarse, la expresión de $\alpha_v\beta_3$ se reduce a niveles no detectables por el análisis de inmunofluorescencia. La regulación de la expresión de $\alpha_v\beta_3$ en los vasos sanguíneos que experimentan la angiogénesis una vez contrastada con la carencia de expresión en los

vasos maduros proporciona la única capacidad de la invención para controlar e inhibir la angiogénesis como se muestra en los siguientes Ejemplos modelizados usando el sistema de ensayo de angiogénesis de CAM.

6. Ensayo de angiogénesis de CAM

A. Angiogéneis inducida por factores de crecimiento

Se ha demostrado que la angiogénesis se induce por citoquinas o factores de creciiento con se referencia en el Ejemplo 5A. En los experimentos descritos en la presente memoria descriptiva, la angiogénesis en la preparación de CAM descrita en el Ejemplo 5 se indujo por factores de crecimiento que se encontraron tópicamente sobre los vasos sanguíneos de la CAM tal como se describe en la presente memoria descriptiva.

La angiogénesis se indujo colocando un disco de filtro Whatman de 5 milímetros (mm) x 5 mm (Papel filtrante Whatman nº 1) saturado con Una Solución salina equilibrada de Hanks (HBSS, GIBCO, Grand Island , NY) o HBSS que contenía 150 nanogramos(mililitro (ng/ml) de factor de crecimiento de fibroblasto básico recombinante (βFGF) (Genzyma, Cambridge, MA) sobre la CAM de un embrión de pollo de 10 días en una región desprovista de vasos sanguíneos y las ventanas se sellaron más tarde con cinta. En otros ensayos, 125 ng/ml de βFGF fue también eficaz para inducir el crecimiento de los vasos sanguíneos. La angiogénesis se controló por fotomicrografía después de 72 horas. Las CAM se congelaron rápidamente, y se fijaron unas secciones de criostato de 6 um con acetona y se tiñeron con inmunofluorescencia tal como se describe en el Ejemplo 5c con 10 ug/ml de anticuerpo monoclonal anti-β_1 CSAT o LM609

La fotomicrografía de inmunofluorescencia de la figura 5C muestra la expresión mejorada de $\alpha_v\beta_3$ durante la angiogénesis inducida por βFGF sobre la CAM de pollo en contraste con la ausencia de expresión de $\alpha_v\beta_3$ en una CAM de pollo sin tratar como se muestra en la figura 5B. $\alpha_v\beta_3$ se pudo detectar fácilmente sobre muchos (75% a 80%) de los vasos sobre las CAM tratada con βFGF. Además, la expresión de la integrina β_1 se mantuvo sin cambio respecto de la vista en una CAM sin tratar ya que β_1 también se pudo detectar fácilmente sobre los vasos sanguíneos simulados.

A continuación, se cuantifico la expresión relativa de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y β_1 durante la angiogénesis inducida por βFGF por análisis de imagen confocal por láser de las secciones de criostato de CAM. Las secciones teñidas se analizaron a continuación con un microscopio confocal láser Zeiss. Se seleccionaron 25 vasos teñidos con LM609 y 15 vasos teñidos con CSAT (tamaño medio de aproximadamente 1200 mm^2, gama de 350 a 3.500 mm^2) a partir de campos aleatorios y la media de fluorescencia de rodamina para cada vaso por área de unidad se midió en unidades arbitrarias por análisis de imagen confocal láser. Los datos se expresaron como la intensidad de fluorescencia media en unidades arbitrarias de vasos ± error estándar (ES).

Los resultados representados en la Figura 6 muestran que el teñido de $\alpha_v\beta_3$ se mejoró significativamente (cuatro veces más) sobre las CAM tratadas con βFGF como se determina mediante el Ensayo de Suma Wilcoxon Rank ($P<0,0001$), mientras que la tinción con β_1 no fue significativamente diferente con el tratamiento con βFGF.

El ensayo de CAM se uso además para examinar el efecto de otro potente inductor de angiogénesis, el factor alfa de necrosis tumoral (TNFα), sobre la expresión de las integrinas β_1 y β_3. Se descubrió que los discos filtrantes impregnados con βFGF o TNFα y colocados sobre las CAM de embriones de diez días promovían la angiogénesis local después de 72 horas.

Los resultados se muestran en las fotomicrografías de las CAM sin tratar (figura 7A), tratadas con βFGF (figura 7B) o tratadas con TNFα (figura 7C). Los vasos sanguíneos se observan fácilmente tanto en las preparaciones tratadas con βFGF como con TNFα pero no están presentes en la CAM sin tratar. De este modo, la aplicación tópica de factor de crecimiento/citoquina dio como resultado la inducción de angiogénesis de vasos maduros en un área adyacente dentro del área originalmente desprovista de vasos sanguíneos. A la vista de los vasos sanguíneos inducidos por βFGF y la expresión concomitante de $\alpha_v\beta_3$ como se muestra en la figura 5C, el tratamiento de TNFα da como resultado actividades comparables.

Estos descubrimientos indican que tanto en los seres humaos como en los pollos, los vasos sanguíneos implicados en angiogénesis muestran una expresión mejorada de $\alpha_v\beta_3$. Según esto, la expresión de $\alpha_v\beta_3$ en células endoteliales cultivadas se puede inducir por diversas citoquinas *in vitro* como se describe en Janat *et al.,* J. Cell Physiol., 151:588 (1992); Einstein *et al.,* Exp. Cell Res., 203:499 (1992) y Swerlick *et al.,*J. Invest. Derm., 99:715 (1993).

El efecto sobre la angiogénesis inducida por factor de crecimiento por los inhibidores de anticuerpos y péptidos se presenta en los Ejemplos 7A y 7B.

B. Angiogénesis embrionaria

La preparación de CAM para evaluar el efecto de los inhibidores de angiogénesis sobre la formación natural de neovasculatura embrionaria fue el embrión de pollo de 6 días anteriormente descrito. En esta etapa de desarrollo, los vasos sanguíneos se someten de nuevo a crecimiento y de este modo proporcionan un sistema útil para determinar si $\alpha_v\beta_3$ participa en la angiogénesis. El sistema de CAM se preparó tal como se describe anteriormente con la excepción de que el ensayo se realizó en un embrión de 6 días en lugar de 10 días. El efecto sobre la angiogénesis embrionaria por tratamiento con los anticuerpos y los péptidos de la invención se presentan 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 de $\alpha_v\beta_3$ negativo en el ensayo de CAM que previamente se hicieron crecer y se

aislaron de la CAM de un embrión de pollo de 17 días como se describe en Brooks *et al.,* J. Cell Biol., 122:1351 (1993) y como se describe en la presente memoria descriptiva. Los fragmentos indujeron una neovascularización extensiva en presencia sólo tampón.

La angiogénesis se indujo en el sistema de ensayo de CAM por la 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 filtrante de papel, se colocó un fragmento de 50 miligramos (mg) a 55 mg de peso de un tumor de melanoma humano M21L, un tumor de carcinoma de pulmón humano UCLAP-3, una línea celular de carcinoma pancreático humano FG (Cheresh *et al.,* Cell 58:945-953, 1989), o una línea celular de carcinoma de laringe humana HEp3, todos los cuales son tumores de $\alpha_v\beta_3$ negativo, sobre la CAM en un área originalmente desprovista de vasos sanguíneos.

La línea celular de melanoma humano M21L, la línea celular de carcinoma de pulmón humano UCLAP-3, la línea celular de carcinoma pancreático FG, o la línea celular de carcinoma de laringe humana HEp3, todas de $\alpha_v\beta_3$ negativo, se usaron para hacer crecer los tumores humanos sólidos sobre las CAM de los embriones de pollo. Una suspensión de células simples de 8×10^6 M21-L, UCLAP-3, y FB o células de 5×10^5 Hep3 se aplicaron en primer lugar a las CAM en un volumen total de 30 micrólitros (ul) 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 término de los 7 días, se tenía un embrión de 17 días, y los tumores se resecaron a partir de las CAM y se cortaron libres de tejido de CAM circundante. Los tumores se cortaron en fragmento de 50 mg a 55 mg para su uso en ensayos de angiogénesis o de crecimiento tumoral. Los fragmentos tumor se colocaron sobre 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 cultivados *in vivo* sobre las CAM de embriones de pollo se tiñeron para la expresión de $\alpha_v\beta_3$ con mAb LM609 como se describe en el Ejemplo 3A. No se observó ningún teñido específico de las células tumorales que indicasen una carencia de expresión de $\alpha_v\beta_3$.

Estas preparaciones de tumor de CAM se trataron a continuación como se describe en los Ejemplos 7D y 7E para medir los efectos de los anticuerpos y los péptidos sobre la angiogénesis inducida por tumores. Las preparaciones de tumor de CAM también se trataron 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 la apoptosis de vasos sanguíneos angiogénicos y células vasculares.

7. Inhibición de la angiogénesis medida en el ensayo de CAM

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

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

Para determinar si $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función activa en la angiogénesis, se colocaron discos filtrantes saturados con βFGF o TNFα sobre las CAM, a continuación se añadieron los anticuerpos monoclonales (también denominados mAb), LM609 (específico para $\alpha_v\beta_3$), CSAT (específico para β_1), o P3G2 (específico para $\alpha_v\beta_5$) a la preparación.

La angiogénesis se indujo sobre la CAM a partir de embriones de pollo de 10 días mediante discos filtrantes saturados con βFGF, Los discos se trataron a continuación con 50 ml de HBSS que contenía 25 mg de mAb en un volumen total de 25 ul de HBSS estéril en intervalos de 0, 24 y 48 horas. Al cabo de 78 horas, las CAM se recogieron y se colocaron en una placa de Petri y se lavaron una vez con 1 ml de solución salina tamponada de fosfato. Se analizó el lado inferior del papel filtrante y el tejido de CAM bajo un microscopio estéreo Olympus, con dos observadores de un modo doble ciego. La inhibición de la angiogénesis se consideró significativa cuando las CAM exhibieron una reducción de más del 50% en la infiltración de los vasos sanguíneos de la CAM directamente bajo el disco. Los experimentos se repitieron cuatro veces por anticuerpo, con 6 o 7 embriones por caso.

Los resultados de los efectos del tratamiento con mAb sobre la angiogénesis inducida por βFGF se muestran en las Figuras 8A-8B. Una preparación de CAM sin tratar desprovista de vasos sanguíneos se muestra en la figura 8A para proporcionar una comparación con la inducción de vasos sanguíneos de βFGF mostrada en la figura 8B y los efectos sobre ésta mediante mAb en las figuras 8C-8E. Aproximadamente el 75% de la CAM tratadas con mAb LM609 exhibieron una inhibición de angiogénesis superior al 50% como se muestra en la figura 8E, y muchas de éstas parecen desprovistas de infiltración de vasos. En contraste con lo anterior, el control de tampón (figura 8A) y los discos tratados con mAb CSAT (figura 8C) y P3G2 (figura 8D) mostraron consistentemente una vascularización extensa.

Se obtuvieron resultados idénticos cuando se indujo la angiogénesis con TNFα. Para examinar los efectos de estos mismos anticuerpos sobre vasos sanguíneos maduros preexistentes presentes a partir de un desarrollo normal de los vasos adyacentes a las áreas desprovistas de vasos, se colocaron discos filtrantes saturados con mAb sobre las regiones vascularizadas de las CAM de embriones de 10 días que no recibieron aplicación tópica de citoquina. Ninguno de los tres mAb afectó a los vasos preexistente como se determinó mediante visualización bajo un microscopio estéreo. De este modo mAb LM609 inhibió selectivamente únicamente el nuevo creciiento de vasos sanguíneos y no afecto a los vasos sanguíneos maduros presentes en las áreas adyacentes. Este mismo efecto se observó con la aplicación de péptidos sintéticos aplicados tópicamente o por vía intravenosa como se describe en los Ejemplos 7A2) y 7E2), respectivamente.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos

Los ensayos de CAM también se llevaron a cabo con los péptidos sintéticos de la 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 presento 80 ug de péptido en un volumen total de 25 ul de HBSS estéril. La solución de péptidos se aplicó inmediatamente a la preparación de CAM y a continuación de

nuevo a las 24 y 48 horas. A las 72 horas el papel filtrante y el tejido de CAM circundante se sometió a disección y se observó como se ha descrito anteriormente.

Los resultados de este ensayo mostraron ser similares a los mostrados en las figuras 9A-9C como se describe en el Ejemplo 7E2) donde los péptidos sintéticos se inyectaron por vía intravenosa en los vasos sanguíneos inducidos por tumor. En este punto, con el péptido de control, 62186, los vasos sanguíneos inducidos por βFGF permanecieron sin cambios, como se muestra en la figura 9A. En contraste con lo anterior, cuando el péptido de RGD cíclico, 62814, se aplicó al filtro, la formación de vasos sanguíneos se inhibió dejando el área desprovista de nueva vasculatura. Este efecto fue similar en apariencia al mostrado en la figura 9B como se describe en el Ejemplo 7E2) más adelante. Además, también como se muestra en la figura 9C para los péptidos inyectados por vía intravenosa, en áreas en las que los vasos sanguíneos maduros estaban presentes e incluso distantes de la colocación del filtro saturado de factor de crecimiento, no se observo ningún efecto con el tratamiento tópico de los péptidos sintéticos sobre los vasos subyacentes. La actividad inhibitoria de los péptidos sobre la angiogénesis se limita de este modo a las áreas de angiogénesis inducidas por factores de creciiento y no afecta a los vasos maduros preexistentes adyacentes o dan como resultado cualquier citotoxicidad deletérea al área circundante.

Se llevaron a cabo ensayos similares con los otros péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 y los representados en la Tabla 1.

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

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales.

El efecto sobre la angiogénesis inducidas por factores de crecimiento con anticuerpos monoclonales inyectados por vía intravenosa en la preparación de CAM también se evaluó para su uso en la presente invención.

La preparación de las CAM de embrión de pollo para inyecciones intravenosas tenían esencialmente como se describe en el Ejemplo 7A algunas modificaciones. Durante los procedimientos de iluminación los vasos sanguíneos prominentes se seleccionaron y se hicieron marcas sobre las cáscara del huevo para indicar sus posiciones. Los agujeros se taladraron en la cáscara y las CAM se cayeron y los papeles filtrantes saturados de βFGF se colocaron sobre las CAM como se ha descrito anteriormente. Las ventanas se sellaron con cinta estéril y los embriones se volvieron a colocar en la incubadora. 24 horas más tarde, se cortó cuidadosamente una segunda ventanita sobre el lateral de la cáscara de huevo directamente sobre los vasos sanguíneos prominentes previamente seleccionados. Se retiró cuidadosamente a cáscara de huevo exterior dejando intactas las membranas embrionarias. La membrana de la cáscara se volvió transparente con una pecunia gota de aceite mineral (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT) que permitió que los vasos sanguíneos se viesen fácilmente. Los mAb estériles, o los péptidos sintéticos, siendo descritos estos últimos más adelante, se inoculan directamente en los vasos sanguíneos una vez con una aguja de calibre 30 con una dosis de 200 ug de IgG por embrión en un volumen total de 100 ul de PBS estéril. Las ventanas se sellaron con cinta y los embriones estuvieron incubándose durante 72 horas. Los discos filtrantes y los tejidos de CAM circundantes se analizaron tal como se ha descrito anteriormente.

Para determinar la localización de LM609 mAb en los tejidos de CAM o en tejidos tumorales, como se muestra en la presente memoria descriptiva y en los siguientes Ejemplos, que se inocularon previamente con LM609, se bloquearon las secciones con MSA al 2,5% en HBSS durante 1 hora a temperatura ambiente seguido de la tinción con una dilución al 1:250 de anticuerpo secundario marcado de rodamina antiratón de cabra (Tago). Las secciones se analizaron a continuación con un microscopio de componente de inmunofluorescencia Zeiss.

Los resultados del tratamiento intravenosos con anticuerpos de la preparación CAM de vasos sanguíneos inducida por βFGF se muestran en las figuras 10A-10C. En la figura 10A, se muestra la angiogénesis inducida como una resultado del tratamiento con βFGF. No se observó ningún cambio en la presencia de la vasculatura inducida por βFGF con exposición intravenosa a mAb P3G2. , un anticuerpo anti-$\alpha_v\beta_5$ como se muestra en la figura 10B. En contrate con lo anterior, el tratamiento de la preparación CAM de angiogénesis inducida por βFGF con LM609, un anticuerpo anti-$\alpha_v\beta_3$, dio como resultado la completa inhibición del crecimiento de nuevos vasos en el área del filtro con se muestra en la figura 10C. El efecto inhibitorio sobre la angiogénesis es de este modo el resultado de la inhibición de la actividad de receptor de $\alpha_v\beta_3$ por el anticuerpo específico anti- $\alpha_v\beta_3$ LM609. Puesto que el bloqueo de $\alpha_v\beta_5$ no inhibe la formación de neovasculatura en el lugar filtrante de las CAM, de este modo $\alpha_v\beta_5$ no es esencial, si se compara con $\alpha_v\beta_3$ para el crecimiento de nuevos vasos.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos.

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

C. Inhibición de la angiogénesis embrionaria por aplicación tópica.

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

Para determinar si $\alpha_v\beta_3$ participa en la angiogénesis embrionaria, el efecto de LM609 sobre nuevo crecimiento de los vasos sanguíneos sobre las CAMs se examinó en embriones de 6 días, una etapa marcada por la neovascularización activa tal como se describe en el Ejemplo 5A. El ensayo de CAM se preparó como se describe en el Ejemplo 6C con la posterior aplicación tópica de discos saturados con mAb colocados sobre las CAM de los embriones de 6 días en ausencia de citoquinas. Después de 3 días, las CAM se resecaron y se fotografiaron. Cada experimento incluyó 6 embriones por grupo y se repitió 2 veces.

El anticuerpo LM609 (figura 11C), pero no CSAT (figura 11A) o P3G2 (figura 11B), previno el crecimiento vascular en estas condiciones; esto indica que $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función sustancial en la neovascularización embrionaria que es independiente de la adición de factores de crecimiento para la inducción de la angiogénesis.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 se añaden a la preparación CAM embrionaria preparada anteriormente y como se describe en el Ejemplo 5A2) por aplicación tópica a la CAM o aplicación intravenosa a los vasos sanguíneos. El efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los vasos se evalúa de manera similar.

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

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

Además de los ensayos de angiogénesis descritos anteriormente en los que se evaluaron los efectos de los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, LM609 y los péptidos 62181, 62184, 62185, 62187 y 62880, sobre la angiogénesis embrionaria, también se investigó la función de $\alpha_v\beta_3$ en la angiogénesis inducida por tumores. Como inductores, se usaron fragmentos de melanoma M21-L humano $\alpha_v\beta_3$ negativo previamente cultivados y aislados a partir de la CAM de un embrión de pollo de 17 días. Los fragmentos se prepararon como se describe en el Ejemplo 6C.

Como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7A1), se aplicaron por separado mAb de manera tópica a los fragmentos de tumo con una concentración de 25 ug en 25 ul de HBSS y las ventanas se sellaron con cinta. Se añadieron mAb de nuevo de la misma manera a las 24 horas y a las 48 horas. Después de 78 horas, los tumores y los tejidos de CAM circundantes se analizaron como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 7A1).

Como se ha descrito en el Ejemplo 6C, los tumores se derivaron inicialmente transplantando células M21-L cultivadas, las cuales no expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$, como se describe en Felding-Habermann *et al.,* J. Clin. Invest., 89:2018 (1992) sobre las CAM de embriones de pollo de 10 días. Estos fragmentos negativos de $\alpha_v\beta_3$ indujeron la neovascularización extensiva en presencia de sólo tampón, o mAb CSAT (anti- β_1) o P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) En contraste con lo anterior, mAb LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) suprime la infiltración de la mayoría de los vasos en la masa tumoral y la CAM circundante.

Para cuantificar el efecto de mAb sobre la angiogénesis inducida por tumores, los vasos sanguíneos que entran en el tumo en el interior del plano focal de la CAM se contaron bajo un microscopio estéreo por dos observadores en de una manera doble-ciego. Cada barra de datos presentada en la figura 12 representa el número medio de vasos ± SE de 12 CAM en cada grupo que representa experimentos duplicados.

Este análisis cuantitativo revela una reducción de tres veces en el número de vasos que entran en los tumores tratados con mAb LM609 comparado con los tumores tratados con tampón o los otros mAb, P3G2 o CSAT ($P < 0,0001$) como se determina por el en ensayo de suma de Wilcoxon Rank El hecho de que los tumores M21-L no expresen $\alpha_v\beta_3$ indica que mAb LM609 inhibe la angiogénesis afectando directamente los vasos sanguíneos en lugar de las células tumorales. Estos resultados corresponden a la distribución histológica de $\alpha_v\beta_3$ en las biopsias de tejidos cancerosos mostradas en las Figuras 3A-3D donde la distribución de $\alpha_v\beta_3$ se limitó a los vasos sanguíneos en el tumor y no a las células tumorales en sí.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos

Los péptidos sintéticos preparados en el Ejemplo 1 se aplican tópicamente al sistema de ensayo de CAM angiogénico inducido por tumores como se describe anteriormente. El efecto de los péptidos sobre la viabilidad de los vasos se evalúa de manera similar.

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

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

Los vasos sanguíneos inducidos por tumores preparados como se describe en el Ejemplo 7D1) también se trataron con mAb aplicados por inyección intravenosa. Los tumores se colocaron sobre las CAM como se describe en el Ejemplo 7D1) y las ventanas se sellaron con cinta y 24 horas más tarde, se inocularon 200 ug de mAb purificados, una vez, de manera intravenosa en los vasos sanguíneos del embrión de polo como se ha descrito anteriormente. Los embriones de pollo se incubaron durante 7 días. El alcance de la angiogénesis se observó a continuación como se ha descrito anteriormente. Como se describe en el Ejemplo 8 más adelante, después de este periodo de tiempo, los tumores se resecaron y se analizaron por su peso para determinar el efecto de la exposición al anticuerpo respecto del crecimiento o supresión del tumor.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos

Se evaluaron también los efectos de la exposición a péptidos respecto de la vasculatura inducida por tumores en el sistema de ensayo CAM. La preparación de tumor-CAM se uso como se ha descrito anteriormente con la excepción de que en lugar de una inyección intravenosa de un mAb, se inyectaron por separado péptidos sintéticos preparados como se describe en el Ejemplo 1 y el Ejemplo 7A2), en vasos sanguíneos visibles.

Los resultados de los ensayos de CAM con el péptido cíclico, 66203 que contiene sal de 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 afecta a los abundantes y grandes vasos sanguíneos que se indujeron por tratamiento con tumores para crecer en un área originalmente desprovista de vasos sanguíneos de la CAM. En contraste con lo anterior, cuando el péptido RGD cíclico, 66203, un antagonista a $\alpha_v\beta_3$, se aplicó al filtro, la formación de vasos sanguíneos se inhibió dejando el área desprovista de nueva vasculatura como se muestra en la figura 9B. El efecto inhibitorio del péptido que contiene

RGD fue específico y se localizo como se pone en evidencia por una ausencia de cualquier efecto deletéreo sobre los vasos adyacentes al emplazamiento del tumor. De este modo, en la figura 9C, cuando los péptidos inhibitorios se inyectan por vía intravenosa en el interior del sistema de ensayos de CAM, no se observó ningún efecto sobre los vasos maduros preexistentes presentes en la CAM en las áreas adyacentes aunque distantes del emplazamiento del tumo. Los vasos preexistentes en este lugar no e vieron afectado por el péptido inhibitorio que fluía dentro de los vasos, aunque se inhibió la generación de nuevos vasos a partir de los vasos preexistentes en la masa tumoral. De este modo los péptidos sintéticos incluyendo 66203 y 62184, previamente mostrados en los ensayos de ligando-receptor en el Ejemplo 4 para ser antagonistas de $\alpha_v\beta_3$, no han demostrado inhibir la angiogénesis que se limita a los vasos que experimentan un desarrollo y no a los vasos preexistentes maduros. Además, la infusión intravenosa de los péptidos no da como resultado ninguna citotoxicidad deletérea respecto del área circundante como se pone en evidencia por la vasculatura intacta en la Figura 9C.

Se realizan ensayos similares con los otros péptidos sintéticos preparados en El Ejemplo 1 y expuestos en la Tabla 1.

8. Inhibición del crecimiento de tejido tumoral con antagonistas αvβ3 como los medidos en el ensayo de CAM

Como se ha descrito en el Ejemplo 7D1, además de evaluar visualmente el efecto de los antagonistas de anti-$\alpha_v\beta_3$ sobre la angiogénesis inducida por factores de crecimiento o tumores, el efecto de los antagonistas también se evaluó midiendo cualquier cambio respecto de la masa tumoral que sigue a la exposición. Para este análisis, se preparó el sistema de ensayos de CAM de angiogénesis inducida por tumores como se describe en los Ejemplos 6C y 7D. Al final del periodo de 7 días de incubación, los tumores resultantes se resecaron a partir de las CAM y se cortaron permaneciendo libres de cualquier tejido residual de CAM, se lavaron con 1 ml de solución salina tamponada de fosfato y se determinaron los pesos húmedos para cada tumor.

Además, la preparación del tumor para el análisis histológico microscópico incluyó la fijación de los ejemplos representativas de los tumores en Fijador Bulins durante 8 horas y se inserto en parafina. Las secciones en serie se cortaron y se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para sus análisis. Gladson, *et al.*, J. Clin. Invest., 88:1924 (1991). Las secciones se fotografiaron con un microscopio de compuestos Olympus de 250X.

A. Aplicación tópica

Los resultados de los pesos típicos de los tumores de melanoma humano (M21l) que dieron como resultado la aplicación típica del tampón de control (HBSS), P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$) o LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) se exponen en la Tabla 4. Se evaluó una serie de embriones para cada tratamiento, siendo calculado el peso de tumor medio en miligramos (mg) junto con el SE de la media como se muestra en la parte baja de la tabla.

Tabla 4

Número de embrión (mg)	Tratamiento con mAb	Peso de tumor
1	HBSS	108
2		152
3		216
4		270
5		109
6		174
1	P3G2	134
2		144
3		408
4		157
5		198
6		102
7		124
8		99

1	LM609	24
2		135
3		17
4		27
5		35
6		68
7		48
8		59

Tratamiento con mAb	Peso medio de tumor (mg)
Control de HBSS	172 ± 26
P3G2	171 ± 36
LM609	52 ± 13

La exposición de una masa tumoral de melanoma humano de $\alpha_v\beta_3$ negativo en el sistema de ensayo CAM a LM609 causó la reducción del peso medio de tumor sin tratar de 172 mg ± 26 a 52 mg ± 13. El anticuerpo P3G2 no tuvo ningún efecto sobre la masa tumoral. De este modo, el bloqueo del receptor de $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación tópica del anticuerpo LM609 específico de $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de la masa tumoral junto con una inhibición de la angiogénesis como se muestra en los Ejemplos anteriores. El diámetro medido de la masa tumoral resultante de la exposición a P3G2 era aproximadamente de 8 milímetros a 1 centímetro de media. En contraste con lo anterior, los tumores tratados con LM609 eran de media de 2 a 3 milímetros de diámetro.

Las secciones congeladas de los tumores revelaron una citoarquitectura tumoral intacta para el tumor expuesto a P3G2 en contraste con una carencia de estructura celular organizada en el tumor expuesto a LM609. La actividad del receptor de $\alpha_v\beta_3$ es por lo tanto esencial para que un tumor de $\alpha_v\beta_3$ negativo mantenga su masa alimentada por el desarrollo de la neovasculatura de expresión de $\alpha_v\beta_3$. El bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ con los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ de la invención da como resultado la inhibición de la angiogénesis en el tumor que finalmente da como resultado la reducción de la masa tumoral.

B. Aplicación intravenosa

Los resultados de los pesos típicos de los tumores de carcinoma (UCLAP-3) que resultan de la aplicación intravenosa de tampón control (PBS, solución salina tamponada de fosfato), CSAT (anti- β) o LNM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) se exponen en la Tabla 5. Se evaluó una serie de embriones para cada tratamiento, siendo calculado el peso de tumor medio junto con el SE de la media como se muestra en la parte baja de la tabla.

Tabla 5

Número de embrión (mg)	Tratamiento con mAb	Peso de tumor
1	PBS	101
2		80
3		67
4		90
1	CSAT	151
2		92
3		168
4		61

5		70
1	LM609	16
2		54
3		30
4		20
5		37
6		39
7		12

Tratamiento con mAb	Peso medio de tumor (mg)
Control de PBS	87 ± 7
CSAT	108 ± 22
LM609	30 ± 6

La exposición de una masa tumoral de carcinoma humano de $\alpha_v\beta_3$ negativo en el sistema de ensayo CAM a LM609 causó la reducción del peso medio de tumor sin tratar de 85 mg ± 7 a 30 mg ± 6. El anticuerpo CSAT no tuvo un efecto significativo sobre el peso de la masa tumoral. De este modo, el bloqueo del receptor de $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación intravenosa del anticuerpo LM609 específico de $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de un carcinoma como ocurrió con la masa tumoral del melanoma anteriormente junto con una inhibición de la angiogénesis como se muestra en los Ejemplos anteriores. Además el crecimiento tumoral del melanoma humano se inhibió de manera similar por la inyección intravenosa de LM609.

9. Regresión del crecimiento de tejido tumoral con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ como se ha medido en el ensayo de CAM

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

A. Aplicación intravenosa

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

a) Tratamiento con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) y CSAT (anti-β_1)

Veinte horas después de la implantación de la CAM con los fragmentos de carcinoma de melanoma humano de $\alpha_v\beta_3$ negativo M21-L, o el carcinoma pancreático FG, el carcinoma de pulmón humano UCLAP-3, o el carcinoma de laringe humano Hep3, se inyectó a los embriones PBS solo o una única dosis (300 ug/100 ul) de mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) o CSAT (anti-β_1). Los tumores se propagaron durante seis días más. Al final del periodo de incubación los tumores se resecaron cuidadosamente y se cortaron libre de tejido CAM circundante. Las resecciones de los tumores se realizaron por dos investigadores independientes retirando sólo la masa tumoral sólida fácilmente definible. Los tumores tenían márgenes bien definidos, de este modo, la membrana semitransparente y fina (CAM) que se puede distinguir fácilmente a partir de la masa tumoral sólida se retiró sin alterar la propia masa tumoral. Los tumores resecados se pesaron y se examinaron morfológicamente e histológicamente.

Como se muestra en la figura 13, los pesos húmedos de los tumores al final de los 7 días se determinaron y se compararon con los pesos iniciales de los tumores antes de los tratamientos. Cada barra representa el ± SE. medio de 5-10 tumores por grupo. mAb LM609 inhibió significativamente el crecimiento tumoral($p < 0,001$) comparado con los controles en todos los tumores sometidos a ensayo. Los tumores tratados con PBS o CSAT proliferaron en todos los casos. Por el contrario, mAb LM609 no solo previene el crecimiento de estos tumores sino que inducen la regresión extensiva en la mayoría de los casos. Es importante, resaltar que estas células tumorales no expresan la integrina $\alpha_v\beta_3$ que demuestra que la inhibición del crecimiento se debió a los efectos anti-angiogénicos de este anticuerpo sobre la neovasculatura en lugar de darse directamente sobre las células tumorales.

b) Tratamiento con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) y P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$)

Los fragmentos tumorales de melanoma M21-L humano (50 mg) se implantaron sobre las CAM de embriones de 10 días como se describe en el Ejemplo 5A. Veinte horas más tarde, se inyectó por vía intravenosa en los embriones PBS solo o una única dosis (300 ug/100 ul) de mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) o P3G2 (anti- $\alpha_v\beta_5$). Se dejó que lo tumores se propagasen como se describe en el Ejemplo 9A1) anterior y se examinaron morfológicamente e histológicamente como se describe en la presente memoria descriptiva.

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

Los tumores se examinaron, además, mediante la preparación de las 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 mAb 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 múltiples vasos sanguíneos (flechas) a través de todo el estroma tumoral. En contraste con lo anterior, no se detectó ninguna o si acaso muy pocas células tumorales viables ni vasos sanguíneos en los tumores tratados con el mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (figura 14, panel inferior) Los resultados demuestran que los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ inhiben la angiogénesis inducida por tumores, lo que conduce al cese del crecimiento y a la regresión de una diversidad de tumores humanos *in vivo*. Es importante destacar que los embriones examinados después de siete días de crecimiento tumoral (embrión de 17 días) parecían normales a simple vista, fueran tratados o no con un antagonista de $\alpha_v\beta_3$. Estos descubrimientos indican que los antagonistas de esta integrina parecen no ser tóxicos para los embriones en desarrollo.

2) Tratamiento con péptidos sintéticos

Los fragmentos tumorales del melanoma M21-L humano (50 mg) implantaron sobre las CAM de embriones de 10 días como se describe en el Ejemplo 5A. 24 horas más tarde, los embriones recibieron una única inyección intravenosa de 300 ug/100 ul de ciclo-RADfV (69601) y/o ciclo-RGDfV (66203). Después de un total de 72 horas, se extrajeron los tumores, se examinaron morfológicamente y se fotografiaron con un microscopio estéreo como se describe en el Ejemplo 9A1).

Los paneles de las figuras 15A a 15E corresponden a lo siguiente: la figura 15A corresponde a muestras duplicadas tratadas con el péptido ciclo-RADfV (69601); la figura 15B corresponde a muestras duplicadas tratadas con el péptido ciclo-RGDfV (66203); la figura 15C , el tejido de CAM adyacente tomado de los mismos embriones tratados con el péptido ciclo-RGDfV (66203) y las figuras 15D y 15E, corresponden a una gran ampliación (13x) de los rumores tratados con péptidos. La figura 15D representa vasos sanguíneos normales del tumor tratado con el péptido de control (69601). La figura 15E representa ejemplos de vasos sanguíneos interrumpidos de tumores (flechas) tratados con el péptido ciclo-RGDfV (66203).

Los resultados muestran que sólo el péptido 66203 inhibe la formación de vasos y que, además, los vasos del tejido de CAM adyacente al tumor no estaban afectados.

10. Regresión del crecimiento de tejido tumoral con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ medido por el ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo*

El efecto de los antagonistas anti- $\alpha_v\beta_3$ sobre la angiogénesis inducida por los factores de crecimiento se puede observar en estructuras transparente de forma natural como se demuestra en los ejemplos de la córnea del ojo. Los nuevos vasos sanguíneos crecen a partir del borde de la córnea, que tiene una rica alimentación en sangre, hacia el centro de la córnea, que normalmente no tiene alimentación sanguínea. Los estimuladores de la angiogénesis, tal como βFGF, 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. De este modo, la córnea experimenta angiogénesis a través de una invasión de células indoteliales desde el borde de la córnea dentro del tejido corneal recubierto de colágeno duro que es fácilmente visible. El ensayo del modelo del ojo de conejo proporciona por lo tanto un modelo *in vivo* para la observación directa de la estimulación y de la inhibición de la angiogénesis que sigue a la implantación de los compuestos directamente dentro de la córnea del ojo.

A. Ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo*

1) Angiogénesis inducida por factores de crecimiento V

La angiogénesis se indujo en el ensayo del modelo de ojo de conejo *in vivo* con el factor de crecimiento βFGF y se desribe a continuación.

a. Preparación de sedientos Hydron que contienen el factor de crecimiento y anticuerpos monoclonales.

Los sedimentos de polímero Hydron que contienen factor de creciiento y mAb se prepararon como lo describe D'AMATO, *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci., 91:4082-4085 (1994). Los sedimentos individuales contenían 650 ng del factor de crecimiento βFGF unido a sucralfato (Carafet, Marion Merrell DOW Corporation) para estabilizar el FGFβ y garantizar su liberación lenta en el tejido circundante. Además, los sedimento de hydron se prepararon conteniendo 40 µg de mAb LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o mAb P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$) en PBS. Los sedimentos se fundieron en clavijas de Teflón especialmente preparadas que tiene un núcleo de 2,5 mm perforado en sus superficies. Se colocó aproximadamente 12 µl de material de fusión en cada espiga y se polimerizo durante una noche en una campana estéril. A continuación, se esterilizaron los sedimentos por radiación ultravioleta.

2) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

d. Cada experimento consistió en tres conejos en los que un ojo recibió un sediento que comprendía βFGF y LM609 y el otro ojo recibió un sedimento que comprendía βFGF y un mAb P1F6 (anti- $\alpha_v\beta_5$) de ratón. El uso del ensayo de ojos emparejados para comparar LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) con otros controles mAb y PBs proporciona un medio de ensayo riguroso para demostrar las diferencias significativas entre los mAb ensayados.

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

Todos los mAb ensayados se purificaron a partir de fluido de ascites que usan la cromatografía de 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 demostrado que la endotoxina es una potente estimulante angiogénico e inflamatorio. Se ensayaron por lo tanto, mAb para detectar la presencia de endotoxina con el ensayo de lisado de amebocito de simulo cromogénico (Bio-Whittaker) y se usaron únicamente los mAb sin endotoxina detectable en el ensayo de modelo de ojo de conejo.

Se insertó un sedimento de hydron que comprende βFGF y mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) o P1F6 ($\alpha_v\beta_5$) en una bolsa corneal formada en el ojo de los conejos. El sedimento de hydron también contenía sucrafalto para estabilizar e βFGF 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 hizo con una técnica estéril usando un microscopio de operación Wild modelo M691 equipado con un separador de haces al cual 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 el sedimento se implanto con su margen periférico a 2 mm del limbo.

Durante los siguientes 14 días, el βFG y el mAb se difundieron a partir del sedimento implantado en el tejido circundante y por lo tanto se efectuó la angiogénesis desde el borde de la córnea.

Los resultados representativos de cada tratamiento se muestran e las figuras 16A a 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 βFGF exhiben angiogénesis florida en la que los nuevos vasos sanguíneos han crecido desde el borde de la córnea hacia el centro de la córnea, que normalmente no tiene vasos sanguíneos. Uno de los conejos tenía sólo 1 hora de reloj de vasos al sedimento. Dos de los conejos que recibieron tanto βFGF como LM609 no tenían en absoluto angiogénesis detectable hasta 14 días después de la cirugía. Uno de los conejos tuvo 3 focos de vasos hemorrágicos en ciernes después del día 14. Dos de los conejos que recibieron βFGF y mAb P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_3$) mostraron una vascularización extensiva en la que habían crecido nuevos vasos sanguíneos desde el borde de la córnea hacia el centro de la córnea. Una Uno de estos conejos sólo tenía 1 a 2 horas de vasos al sedimento.

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

11. Regresión del crecimiento de tejido tumoral *in vivo* con los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ medida por el ensayo de ratón quimérico: ensayo de seres humanos

En un modelo de ratón quimérico:ser humano i*n vivo* se generó por sustitución de una parte de la piel de un ratón SCID con prepucio neonatal humano (figura 17). Después de realizar el injerto de piel, el prepucio humano se inoculó con células de carcinoma. Después de establecer un tumor medible, se inyectó mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) o PSB en la vena de la cola del ratón. Después de un periodo de 2-3 semanas, el tumor se extirpó y se analizó desde el punto de vista del peso y de la histología.

A. Ensayo ratón quimérico : ensayo de seres humanos

El modelo ratón quimérico: ser humano *in vivo* se prepara esencialmente como se describe en Yan, *et al.,* J. Clin. Invest., 91:986-996 (1993). En breve, se retiró quirúrgicamente un área cuadrada de 2 cm^2 de piel de un ratón SCID (de 6 – 8 semanas) y se sustituyó con un prepucio humano. El ratón se anestesió y se retiro el vello de un área de 5 cm^2 de cada lado de la región abdominal lateral rasurándolo. Se prepararon dos capas de injerto circulares de 2 cm^2 retirando todo el espesor de la piel hacia abajo hacia la fascia . Todo el espesor de los injertos de piel humana del mismo tamaño derivados de prepucio neonatal humano se colocó sobre loa capas heridas y suturadas in situ. El injerto se cubrió con una tirita que se suturó a la piel. También se aplicó una tira de tejido microporoso para cubrir la herida.

La línea celular de melanoma humano M21L o la línea celular de carcinoma de mama MDA 23.1 (ATTC HTB 26; $\alpha_v\beta_3$ negativo por inmunorrreactividad de las secciones de tejido con mAb LM609), donde se usaron para formar los tumores humanos sólidos sobre los injertos de piel humana sobre los ratones SCID. Una única suspensión de células de 5 x 10^6 de células M21-L o MDA23.1 se inyectó de manera intradérmica en el injerto de piel humana. A continuación se observaron los ratones durante 2 a 4 semanas para permitir un crecimiento de los tumores humanaos medibles.

B. Aplicación intravenosa

1) Tratamiento con anticuerpos monoclonales

Después del creciiento de tumores medibles, los ratones SCID, a los que se había inyectado células tumorales M21L, se les inyectó por vía intravenosa en la vena de la cola 250 µg de mAb LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) o PSB dos veces por semana durante 2 a 3 semanas. Después de este periodo de tiempo, los tumores se resecaron a partir de la piel y se cortaron libres de tejido circundante. Se evaluaron diversos ratones para cada tratamiento, calculándose el peso medio del tumor de cada tratamiento y siendo mostrados en la parte inferior 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 medio del tumor (mg)
PBS	198
LM609	113

La exposición de la masa tumoral del carcinoma humano $\alpha_v\beta_3$ negativo en el sistema de ensayo quimérico ratón:ser humano respecto de LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) produjo la reducción de le peso medio de los tumores tratados con PBS de 198 a 113 mg.

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

Los tumores formados en los injertos de piel que se han inyectado con células MDA 23.1 se pudieron detectar y medir. El estudio morfológico de los tumores establecidos reveló que se había producido la neovascularización del tejido humano injertado en las células tumorales MDA 23.1.

De este modo, el bloqueo del receptor de $\alpha_v\beta_3$ por la aplicación intravenosa de un anticuerpo LM609 específico de $\alpha_v\beta_3$ dio como resultado una regresión de un carcinoma en este sistema modelos de la misma manera que los ensayos de modelos de la CAM y del ojo de conejo como se ha descrito en los Ejemplos 9 y 10, respectivamente.

12. Estimulación de las células vasculares para introducir el ciclo celular y experimentar la apoptosis en presencia de los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ medida en los ensayos de CAM

El proceso angiogénico depende claramente de la capacidad de las citoquinas tales como βFGF y VEGF para estimular la proliferación de las células vasculares. Mignatti *et al.,* J. Cell. Biochem., 471:201 (1991); Takeshita *et al.,* J. clin. Invest., 93:662 (1994); y Koyama *et al.,* J. Cell. Physiol., 158 :1 (1994). Sin embargo, también es evidente que los casos de señalización pueden regular la diferenciación de las células vasculares en los vasos sanguíneos maduros. De este modo, se puede concebir que la interferencia con las señales relacionadas con el crecimiento o la diferenciación de las células vasculares que experimentan un nuevo creciiento o angiogénesis puede dar como resultado la perturbación de la angiogénesis.

Se ha demostrado que los casos de unión de integrinas participan tanto en la proliferación celular como en la apoptosis o la muerte celular programada *in vitro*. Schartz, Cancer Res. 51:1503 (1993); Meredith *et al.*, Mol. Biol.. Cell., 4:953 (1993);: Frisch *et al.,* J. Cell. Biol., 124:619 (1994); y Ruoslahti *et al.*, Cell, 77:477 (1994). El estudio minucioso de los efectos de los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ sobres la angiogénesis revela la presencia de vasos sanguíneos asociados a tumores interrumpidos y discontinuos. Por lo tanto, es posible que la pérdida de la continuidad de los vasos sanguíneos se pueda deber a la apoptosis o necrosis selectiva de las células vasculares.

Para explorar esta posibilidad, Las CAM se estudiaron después de la inducción de la angiogénesis con el factor de crecimiento βFGF y el tratamiento con los péptidos mAb y cíclicos de la presente invención.

A. Tratamiento con anticuerpos monoclonales

La apoptosis se puede detectar por una diversidad de procedimientos que incluyen el estudio directo del ADN aislado del tejido para detectar la fragmentación del ADN y la detección de 3'OH en tejido intacto con un anticuerpo que detecta específicamente grupos 3'OH libres de ADN fragmentado.

1) Análisis de fragmentación de ADN

La angiogénesis se indujo colocando discos filtrantes saturados con $\alpha_v\beta_3$ con βFGF sobre las CAM de embriones de 10 días descrito en el Ejemplo 6A. Los análisis inmunohistológicos de las CAM con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) revelararon una expresión de pico de $\alpha_v\beta_3$ sobre los vasos sanguíneos 12 a 24 horas después del inicio de la angiogénesis con βFGF. De este modo, 24 horas después de la estimulación con βFGF, los embriones se inocularon por vía intravenosa con 100 µl de PBS solo o PBS que contenía 300 µg de mAb CSAT (anti-β_1) o LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$).

La fragmentación del ADN se detectó resecando el tejido de la CAM directamente por debajo de los discos filtrantes saturados de βFGF 24 horas o 48 horas después de las inoculaciones intravenosas con mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1), o PBS. Los tejidos de CAM resecados se lavaron tres veces con PBS estéril y finalmente se cortaron finos y se volvieron a suspender en colagenasa bacteriana al 0,25% (Worthington Biochemical; Freehold, NJ) y se incubaron durante 90 minutos a 37ºC con agitación de torbellino ocasional. El ADN se extrajo de números iguales de células deCAM a partir de una única suspensión celular como se ha descrito anteriormente. Bisonette, *et al.,* Nature, 359:552 (1992). En breve, los números iguales de células de CAM se lisiaron en 10 mM de tris-Cl, de pH 8,0, 10 mM de EDTA en Triton X100 al 0,5% (v/v) (Sigma, St Louis, MO). Los lisados celulares se centrifugaron a 16.000 vueltas durante 15 minutos a 4ºC para separar el ADN fragmentados soluble del sedimento de cromatina intacto. El ADN fragmentado se lavó, se precipitó y se analizó sobre gel de agarosa al 1,2% (p/v)..

El ADN fragmentado soluble se aisló partir de un número igual de células de CAM a partir de cada tratamiento, se separó por electroforesis sobre un gel de goma arábiga y se observó tiñendo con bromuro de etidio. No se detectó ninguna diferencia en la cantidad relativa de la fragmentación de ADN resultante de los tres tratamientos diferentes 24 horas después del tratamiento. Sin embargo, 48 horas después del tratamientos con mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) se observó un aumento significativo en la fragmentación del ADN comparado con los embriones tratados con mAb CSAT (anti-β_1) o PBS solo.

2) Estimulación de las células vasculares para introducir el ciclo celular

Para estudiar experimentalmente la función de $\alpha_v\beta_3$ en estos procesos, las células derivadas de CAM tratadas con o sin βFGF se tiñeron con yoduro de propidio y se hicieron inmunoreaccionar con mAb LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$).

Las CAM aisladas de los embriones 24 y 48 horas después del tratamiento con mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1), o PBS se disociaron en suspensiones de células simples por incubación con colagenasa bacteriana como se ha descrito anteriormente. A continuación, as células simples se permeabilizaron y se tiñeron con un Kit de detección in situ de Apop Tag según las instrucciones del fabricante (Oncor, Gaitherburg, MD). Apop Gag es un anticuerpo que detecta específicamente los grupos 3'OH libres de ADN fragmentado. La detección de dichos grupos 30OH libres es un procedimiento establecido para la detección de células apópticas. Gavrieli *et al.,* J. Cell. Biol.., 119: 493 (1992).

A continuación, las células teñidas con Apop Tag se aclararon en Triton X-100 al 0,1% (v/v) en PBS y se volvieron a suspender en tampón FACS que contiene BSA al 0,5% (p/v),, azida de sodio al 0,02% (p/v) y 200 µg/ml de Rnasa A en PBS. Las células se incubaron durante una hora y media, se lavaron y se analizaron por clasificación celular activada por fluorescencia. La fluorescencia celular se midió usando un citómetro de flujo FACSan y los datos se analizaron como se describe más adelante.

La fluorescencia celular se midió con un citómetro de flujo GACScan (Vetcon Dickinson, Mountain View, CA). Se determinó la dispersión lateral (SSC) y la dispersión delantera (FSC) simultáneamente y se recocieron todos los datos con un ordenador Hewlet Packard (HP9000) equipado con un software de investigación FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Los datos se analizaron con la versión I del software P.C. Lysis (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Se establecieron barreras de control negativo usando suspensiones de células sin la adición de anticuerpos primarios del kit de Apop Tag. Se aplicaron barreras idénticas a ambas poblaciones celulares que dieron como resultado el análisis de aproximadamente 8.000 células por diferente tratamiento celular.

El porcentaje de células simples derivadas de las CAM tratadas con mAb y teñidas con Apop Tag como se ha determinado por el análisis FACS se muestra en la figura 18. La barra negra representa las células de embriones tratadas 24 horas antes del análisis. La barra punteada representa células de embriones tratadas 48 horas antes del análisis. Cada barra representa el ± E.T medio de tres réplicas.

Como se muestra en la figura 18, las CAM tratadas dos días antes con mAb LM609 (anti- $\alpha_v\beta_3$) mostraron un aumento de 3 a 4 veces en el teñido con Apop Tag comparado con las CAM tratadas con PBS solo o CSAT (anti-β_1).

B. Tratamiento con péptidos sintéticos

Los ensayos de CAM con angiogénesis inducida por factores de creciiento, como se describe en el Ejemplo 6A, también se levaron a cabo con los péptidos sintéticos de la invención para determinar el efecto de los péptidos cíclicos sobre la apoptosis. Los péptidos ciclo-RGDfV (66203) y Ciclo-RADfV (69601) se prepararon como se describe en el Ejemplo 1. Se inyectaron las soluciones de péptidos o PBS en la preparación de CAM con una concentración de 300 µg(ml. A las 24 y 48 horas, el papel filtrante y el tejido de CAM circundante se diseccionó y se tiño con Apop Tag para detectar la apoptosis como se describe anteriormente en el Ejemplo 12A2).

Como se muestra en la figura 18, Las CAM tratadas dos días antes don el péptido 69203 (ciclo-RGDfV) mostró un aumento de 3 a 4 veces superior en la tinción de Apop Tag comparado con las CAM tratadas con PBS solo o el péptido cíclico de control 69601 (ciclo-RADfV).

C. Efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales sobre la apoptosis en el ciclo celular

Las suspensiones de células simples se estudiaron para el número de copias de ADN cromosómico tiñendo con yoduro de propidio para determinar el efecto del tratamiento con anticuerpos monoclonales sobre el ciclo celular y para la apoptosis tiñendo con Apop Tag.

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

Para teñir las células con Apop Tag, las suspensiones celulares se lavaron 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, las células se fijaron en paraformaldehído al 1% (p/s) en PBS durante 15 minutos seguido de tres lavados como se ha descrito anteriormente. Para prevenir la unión no específica, las suspensiones de células simples se bloquearon con BSA al 5% (p/v) en PBS durante una noche a 4ºC. A continuación, las células se lavaron como antes, se tiñeron con Apop Tag, y se midió la fluorescencia celular con un TACScan como el descrito anteriormente en el Ejemplo 12A.

Las células de cada condición experimental se tiñeron con yoduro de propidio (Sigma, St Louis, MO) con una proporción de 10 µg en PBS durante una hora, se lavaron dos veces con PBS, y se analizaron para las características nucleares típicas de la apoptosis, incluyendo la segmentación y condensación de cromatina. El porcentaje de las células apópticas se estimó por el análisis morfológico de la células a partir de al menos 10 a 15 campos microscópicos aleatoriamente seleccionados.

Se proporcionan los resultados combinados de las suspensiones de células simples de CAM de los embriones tratados con CSAT (anti-β_1) o LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), teñidas con Apop Tag y yoduro de propidio, y analizadas por FACS , en la figura 19. El eje Y representa la tinción con ApopTag (apoptosis), el eje X representa la tinción con yoduro de propidio (contenido de ADN). La línea horizontal representa la barrera negativa para la tinción con 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 llevó a cabo por el análisis de aproximadamente 8.000 casos por condición y los datos se representaron en un recuadro de contorno.

Las muestras de las células simples obtenidas con el tinte de ADN el yoduro de propidio revelaron que entre el 25 y el 30% de las células de CAM tratadas con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) 48 horas después del tratamiento evidenciaron una segmentación y/o condensación nuclear. Estos procesos son característicos de las células que experimentan apoptosis. Esto está en contraste con las CAM tratadas con CSAT (anti-β_1) donde entre el 90 y el 95 de las células mostraron un teñido nuclear normal.

Como se muestra en la figura 19, consecuentemente 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). Se mostró previamente este pico para representar el ADN fragmentado en las células apópticas de la última etapa. Telford *et al.,* Cytometry, 13:137 (1992). Además, estas células de AO se tiñen fácilmente con Apop Tag que confirma la capacidad de este reactivo para detectar las células apópticas. Sin embargo, además de la tinción de las células de AO, también se tiño con Apop Tag (figura 19) un número significativo de células que contenían más de una copia de ADN. Los resultados demuestran que LM609 tiene la capacidad de promover la apoptosis entre las células vasculares que ya se han introducido en el ciclo celular. Encontraste con lo anterior, las células derivadas de las CAM de control que se han introducido en el ciclo celular mostraron un teñido con Apop Tag mínimo consecuentemente con las pocas células apópticas detectadas en las CAM tratadas de control

Entre estas células en las CAM estimuladas con βFGF que se había introducido en el ciclo celular (fase S y G2/M), el 70% mostró un teñido positivo con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Esto se comparó con el tenido con LM609 al 10% observado entre las células cicladas de las CAM no tratadas con βFGF. Estos descubrimientos indican que después de la estimulación por βFGF, la mayoría de las células que llevan $\alpha_v\beta_3$ muestran una proliferación activa.

Tomados juntos estos descubrimientos indican que la inyección intravenosa de mAb LM609 o del péptido cíclico antagonista de $\alpha_v\beta_3$ promueven la apoptosis dentro de la CAM de pollo después de la inducción de la angiogénesis.

Las CAM también se estudiaron histológicamente para la expresión de $\alpha_v\beta_3$ por inmunoreactividad con LM609 y para las células que se sometieron a apoptosis por inmunoreactividad con Apop Tag. Las secciones de CAM resecadas de los embriones tratados 48 horas antes con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1), o PBS preparadas en el Ejemplo 5A se lavaron, insertaron en OTC (Baxter) y se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido. Se cortaron secciones de seis micrómetros de Tejido de CAM, se fijaron en acetona durante 30 segundos, y se guardaron a -70ºC hasta su uso. Las secciones de tejido se prepararon para la tinción mediante un breve aclarado en etanol al 70% (v/v) (EtOH=) seguido de tres lavados en PBS. A continuación, las secciones se bloquearon con BSAA al 5% (p/v) en PBS durante 2 horas, seguido de la incubación con 10µg/ml de mAb LM609 durante 2 horas. A continuación, las secciones se lavaron y se incubaron con una dilución al 1:50 de rodamina IgG antiratón de cabra conjugado de

rodamina (Fischer Scientific Pittsburg, PA) durante 2 horas. Finalmente, las mismas secciones se lavaron y se tiñeron con el Apop Tag como se describe en el Ejemplo 12A2). Las secciones de tejido teñido se montaron y analizaron por microscopía inmunofluorescente confocal.

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 el tejido de CAM de embriones tratados con LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Los paneles Am y D representan los tejidos teñidos con Apop Tag y se observan mediante fluorescencia (FITC) superpuesta sobre una imagen DIC. Los paneles B y E representan los mismos tejidos teñidos con mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) y se observan por fluorescencia (rodamina). Los paneles C y F representan imágenes fundidas de los mismos tejidos teñidos tanto con Apop Tag como con LM609 donde la tinción de color amarillo representa la colocalización. La barra representa 15 y 50 µm en los paneles de la izquierda y de la derecha, respectivamente.

Como se muestra en la figura 20 (A-C), después de la inyección intravenosa del control de CSAT o PBS, la tinción con Apop Tag parecía mínimo o aleatorio, indicando un nivel mínimo de apoptosis en el tejido. Encontraste con lo anterior, las CAM de los embriones previamente tratados con LM609 o péptido cíclico 203 mostró una mayoría de los vasos teñidos intensamente con Apop Tag mientras que se observó una mínima reactividad entre las células no vasculares circundantes (figura 20 D-F). Además cuando se usaron tanto Apop Tag como LM609 para teñir estos tejidos (19C y 19F) se observó una colocalización significativa sólo entre los marcadores en las CAM derivadas de los embriones tratados con antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ (figura 20F). Estos descubrimientos demuestran que después de la inducción de la angiogénesis *in vivo*, los inhibidores de la integrina $\alpha_v\beta_3$ promueven selectivamente la apoptosis de los vasos sanguíneos que llevan $\alpha_v\beta_3$.

Mientras que la angiogénesis es un proceso complejo que implica muchos casos biológicos moleculares y celulares, diversas líneas de evidencia sugieren que la integrina celular vascular $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función relativamente tardía en el proceso. En primer lugar, el análisis revela que la expresión de $\alpha_v\beta_3$ sobre las células vasculares alcanzó un máximo de 12-24 horas después de la inducción de la angiogénesis con βFGF. En segundo lugar, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ perturban la angiogénesis inducida por múltiples activadores que sugieren que este receptor está implicado en el paso común descendente del quizás todas los eventos de señalización primaria que llevan a la angiogénesis. En tercer lugar, las CAM tratadas con mAb Lm609 o péptido cíclico no muestran un aumento significativo en la apoptosis medida por escalera de ADN hasta 48 horas después del tratamiento con estos antagonistas. Finalmente, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ promueven la apoptosis de las células vasculares que ya han sido inducidas para introducirse en el ciclo celular.

Los resultados presentados en la presente memoria descriptiva proporcionan la primera evidencia directa de que los eventos de unión de integrina pueden regular la supervivencia celular *in vivo*. Por lo tanto se puede suponer que una vez que empieza la angiogénesis, las células vasculares individuales se dividen y empiezan a moverse hacia la fuente angiogénica, después de los cual, la unión de $\alpha_v\beta_3$ proporciona una señal que permite la supervivencia celular continuada la cual conduce a la diferenciación y la formación de vasos sanguíneos maduros. Sin embargo, si se previene la unión de $\alpha_v\beta_3$ entonces las células dejan de recibir esta entrada molecular y las células entran en apoptosis por defecto. Esta hipótesis también predeciría que después de producirse la diferenciación los vasos sanguíneos maduros ya no requerirían la señalización de $\alpha_v\beta_3$ para la supervivencia y de este modo son refractarios a los antagonistas de esta integrina.

Finalmente, los resultados presentados en la presente memoria descriptiva proporcionan la evidencia de que los antagonistas de la integrina $\alpha_v\beta_3$ pueden proporcionar un potente acercamiento terapéutico para el tratamiento de la neoplasia u otras enfermedades caracterizadas por la angiogénesis. En primer lugar, los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ interrumpe de nuevo la formación de vasos sanguíneos maduros sin afectar a la vasculatura preexistente. En segundo lugar, estos antagonistas no tenían ningún efecto significativo sobre la viabilidad del embrión de pollo, sugiriendo que no son tóxicos. En tercer lugar, la angiogénesis se bloqueo de manera significativa sin tener en cuenta los estímulos angiogénicos. Finalmente, la administración sistémica de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ causa la espectacular regresión de diversos tumores humanos histológicamente distintos.

De este modo, los Ejemplos anteriormente mencionados demuestran que la integrina $\alpha_v\beta_3$ desempeña una función clave en la angiogénesis inducida por una diversidad de estímulos y que $\alpha_v\beta_3$ es un valioso objetivo terapéutico con los antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ de la invención para las enfermedades caracterizadas por la neovascularización.

La anterior memoria descriptiva se considera suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. La presente invención no ha de limitarse en su alcance a la línea celular registrada, ya que la realización registrada se entiende como una simple ilustración de un aspecto de la invención y cualquier línea celular funcionalmente equivalente entra dentro del alcance de la invención. El registro del material no constituye una admisión de que la descripción escrita contenida en la presente memoria descriptiva sea inadecuada para permitir la puesta en practica de cualquier aspecto de la invención, incluyendo el mejor modo de la misma, ni tampoco ha de interpretarse como una limitación del alcance de las reivindicaciones a la ilustración específica que representa. Además, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en la presente memoria descriptiva serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la anterior descripción y entrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

LISTADO DE SECUENCIAS

(1) INFORMACIÓN GENERAL

(I) SOLICITANTE

(A) NOMBRE: The Scripps Research Institute

(B) CALLE: 10666 North Torrey Pine Road

(C) CIUDAD : La Jolla

(D) ESTADO: California

(E) PAIS: Estados Unidos

(F) CODIGO POSTAL (ZIP): 92037

(G) TELEFONO: 619-554-2937

(H) FA: 619:554:6312

(II) TÍTULO DE LA INVENCIÓN: PROCEDIMIENTOS Y COMPOSICIONES UTILES PARA LA INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

(III) NUMERO DE SECUENCIAS: 14

(IV) FORMA LEGIBLE POR ORDENADOR

(A) TIPO DE MEDIO: Disquete

(B) ORDENADOR: PC compatible IBM

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

(D) SOFTWARE: PatentIn Release 1.0, VERSIÓN 1,25 (EPO)

(V) DATOS DE LA SOLICITUD ACTUAL:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: PCT/US 95/

(B) FECHA DE SOLICITUD: 9 de mazo de 1995

(VI) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/210.715

(B) FECHA DE SOLICITUD: 18 de mazo de 1994

(VII) DATOS DE LA SOLICITUD ANTERIOR:

(A) NÚMERO DE SOLICITUD: US 08/366.665

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

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 1

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador= BOC-GRGDFV.OMe /nota= “BOC significa el grupo protector en N-terminal butiloxicarbonilo; OMe significa un éster de metilo en C-terminal; arginina en la segunda posición

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D)OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = OMe

/Nota= “OMe significa el grupo protector en C-terminal éster de metilo”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A)NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = D-Arg

/Nota= “Un prefijo “D” en D-Arg significa que la arginina en posición 2 es un D-aminoácido”

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

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 **5**

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 2

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = BOC- GRGDFV.OMe /nota= “BOC significa el grupo de bloqueo N-terminal terbutiloxicarbonilo.”

(XI) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = OH/Nota= “OH significa un ácido carboxílico C-terminal libre”.

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A)NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = D-Arg/Nota= "Un prefijo "D" en D-Arg significa que la arginina en posición 2 es un D-aminoácido;"

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 2:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 3

(i) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(II) (ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = H/nota= "H significa una mina N-terminal libre"

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A)NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B)LOCALIZACIÓN: 1..6

(D)OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = OH/Nota= "OH significa un ácido carboxílico C-terminal libre".

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = D-Arg/Nota= "Un prefijo "D" en D-Arg significa que la arginina en posición 2 es un D-aminoácido;"

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 3:

Gly Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 4

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

ONGITUD: 6 aminoácidos

(B)TIPO: aminoácido

(C)CADENA: sencilla

(D)TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 4:

GLy Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 5

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..5

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 5:

Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 6

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..5

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 6:

Arg Ala Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 7

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..5

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 7:

Arg Gly Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 8

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 8:

Tyr Thr Ala Glu Cys Lys Pro Gln Val Thr Arg Gly Asp Val Phe

1 5 10 15

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 9

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..5

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 9

Arg Ala Asp Phe Val

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 10

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 10:

Ala Arg Gly Asp Phe Leu

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 11

(VI) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: circular

(VII) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(VIII) HIPOTETICO: No

(IX) ANTI-SENTIDO: No

(X) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(IX) CARACTERÍSTICAS:

(A) NOMBRE/CLAVE: Péptido

(B) LOCALIZACIÓN: 1..6

(D) OTRA INFORMACIÓN: / Marcador = ciclo/nota= “Ciclo significa un péptido cíclico; las letras minúsculas indican un D-aminoácido; las letras mayúsculas indican un L-aminoácido”.

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 11:

Gly Arg Gly Asp Phe Leu

1 5

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 12

(I) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 12 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(II) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(III) HIPOTETICO: No

(IV) ANTI-SENTIDO: No

(V) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 12:

Thr Arg Gln Val Val Cys Asp Leu Gly Asn Pro Met

1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 13

(VI) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(VII) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(VIII) HIPOTETICO: No

(IX) ANTI-SENTIDO: No

(X) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 13:

Gly Val Val Arg Asn Asn Glu Ala Leu Ala Arg Leu Ser

1 5 10

(2) INFORMACIÓN PARA LA SEC ID Nº 14

(XI) CARACTERÍSTICAS DE LA SECUENCIA

(A) LONGITUD: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) CADENA: sencilla

(D) TOPOLOGÍA: lineal

(XII) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(XIII) HIPOTETICO: No

(XIV) ANTI-SENTIDO: No

(XV) TIPO DE FRAGMENTO: Interno

(XI) DESCRIPCIÓN DE SECUENCIA: SEC ID Nº 14:

Thr Asp Val Asn Gly Asp Gly Arg His Asp Leu

1 5 10

REIVINDICACIONES

1.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la artritis, la retinopatía diabética, la degeneración macular, un hemangioma o un tumor sólido de mama o de colon, comprendiendo dicho medicamento una cantidad inhibidora de la angiogénesis de dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$.

2.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de un tumor y dicha angiogénesis es angiogénesis tumoral.

3.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de la artritis.

4.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 3, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de la artritis reumatoide.

5.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de la retinopatía diabética o la degeneración macular, y dicha angiogénesis es angiogénesis retinal.

6.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 1 en el que dicho medicamento es para el tratamiento de un hemangioma.

7.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 2, en el que dicho medicamento se administra conjuntamente con quimioterapia.

8.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que (a) dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un anticuerpo monoclonal y dicho medicamento es para ser administrado para proporcionar una concentración en plasma de dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de 1 μg/ml a 5 μg/ml o (b) dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un polipéptido y dicho medicamento es para ser administrado para proporcionar una concentración en plasma de dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de 1 μg/ml a 150 μg/ml.

9.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un polipéptido y dicho medicamento es para ser administrado para proporcionar dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ en una cantidad de 0,1 mg por kg a 300 mg pot kg en una o más administraciones de dosis diarias durante uno o varios días.

10.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que dicho medicamento está en una forma apropiada para la administración intravenosa, transdérmica, intrasinovial, intramuscular u oral.

11.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 7 en el que dicho medicamento está en una forma apropiada para la administración por vía intravenosa.

12.. El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ inhibe la unión del fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ y presenta al menos una actividad CI_{50} de 10 veces superior en la inhibición de la unión de fibrinógeno a $\alpha_v\beta_3$ en comparación con la actividad CI_{50} en la inhibición de la unión de fibrinógeno a $\alpha_{IIb}\beta_3$ o a $\alpha_v\beta_1$.

13.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un anticuerpo monoclonal inmunoespecífico para $\alpha_v\beta_3$.

14.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo monoclonal está humanizado.

15.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 13, en el que dicho anticuerpo monoclonal es LM609 (ATCC HB 9537).

16.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que dicho antagonista de $\alpha_v\beta_3$ es un polipéptido que contiene RGD.

17.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 16, en el que dicho polipéptido es un péptido cíclico.

18.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con la reivindicación 17, en el que dicho polipéptido se selecciona del grupo que consiste en c-(GrGDFV) (SEC ID Nº 4), c-(RGDfV) (SEC ID Nº 5), c-(RGDFv) (SEC ID Nº 7) e YTAECKPQVTRGDVF (SEC ID Nº 8) y una sal de los mismos.

19.- El uso de una sal de polipéptido de acuerdo con la reivindicación 18, en el que dicha sal es un clorhidrato o trifluoroacetato.

20.- El uso de un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho medicamento es para el tratamiento de un paciente humano.

Anti-β3



Piel normal

FIG. 1A



Anti-β3

Tejido de granulación

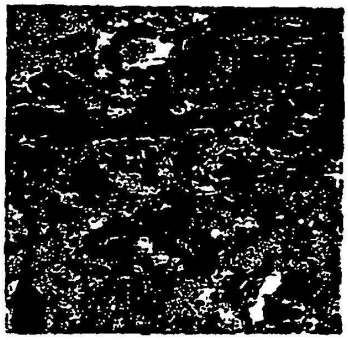
FIG. 1B

Anti-β1



Piel normal

FIG. 1C



Anti-β1

Tejido de granulación

FIG. 1D

Piel normal

Anti-vWF



FIG. 2A

Tejido de granulación

Anti-vWF

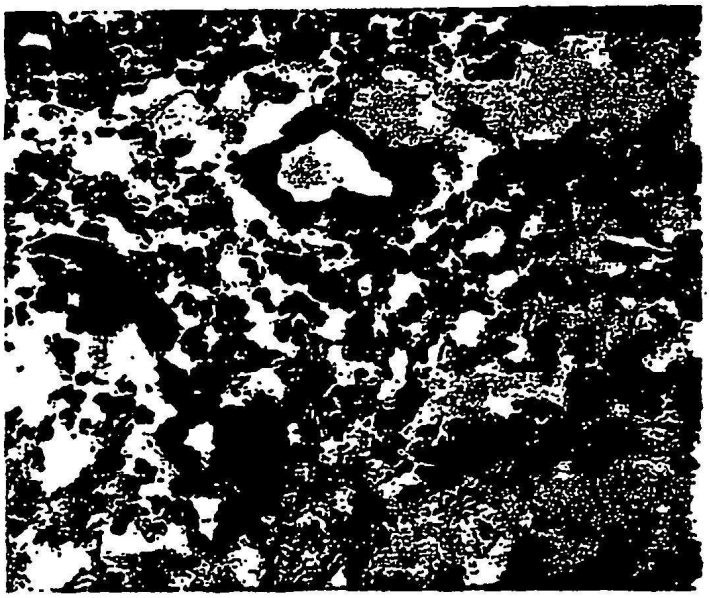


FIG. 2B

Piel normal

Anti-laminina

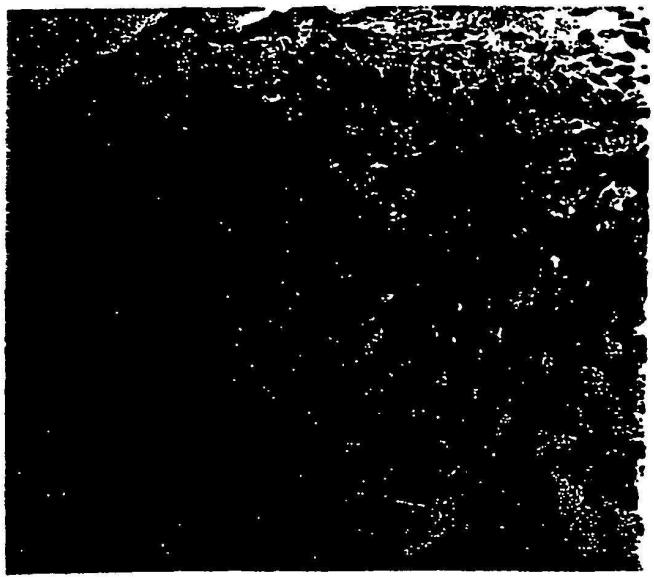


FIG. 2C

Tejido de granulación

Anti-laminina

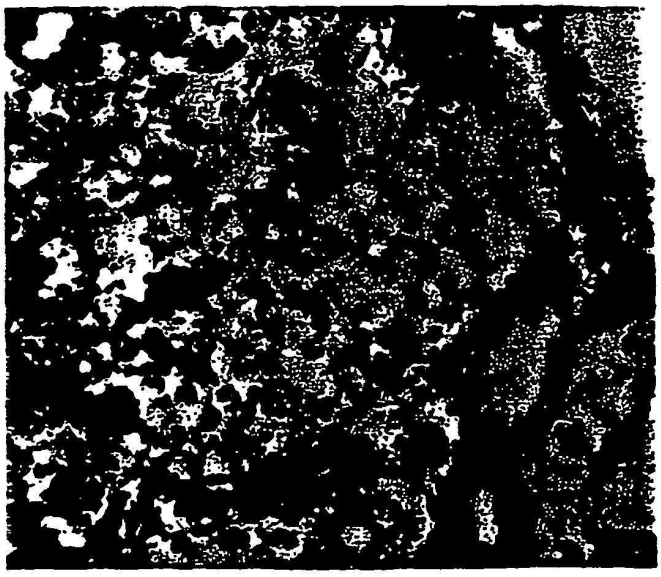
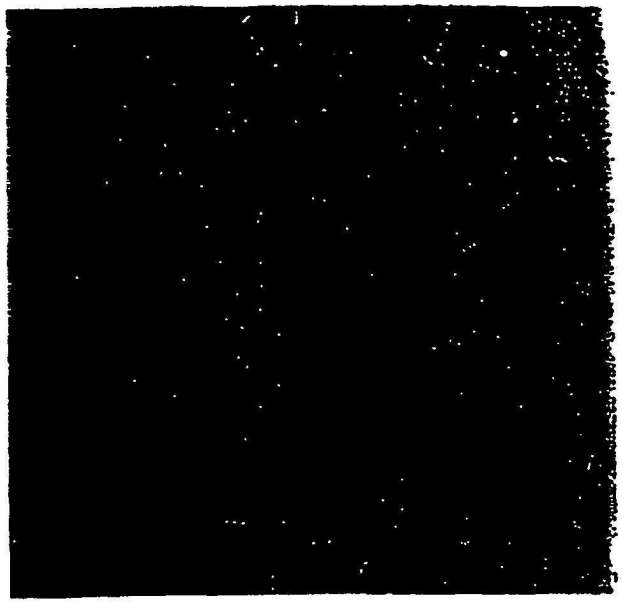
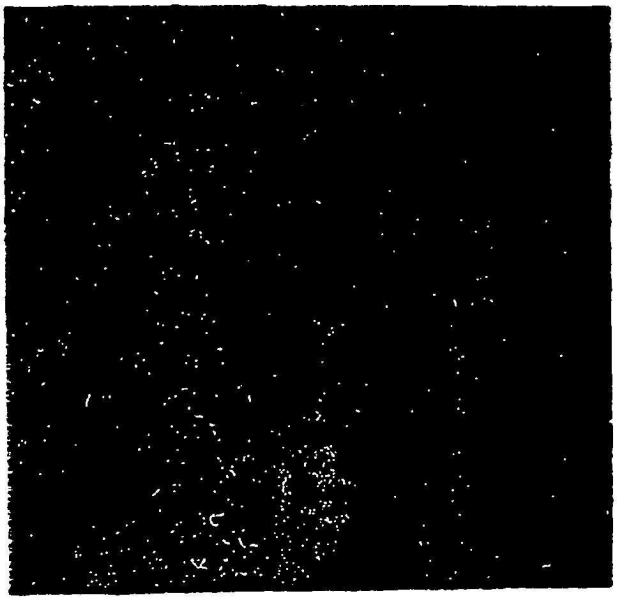


FIG. 2D



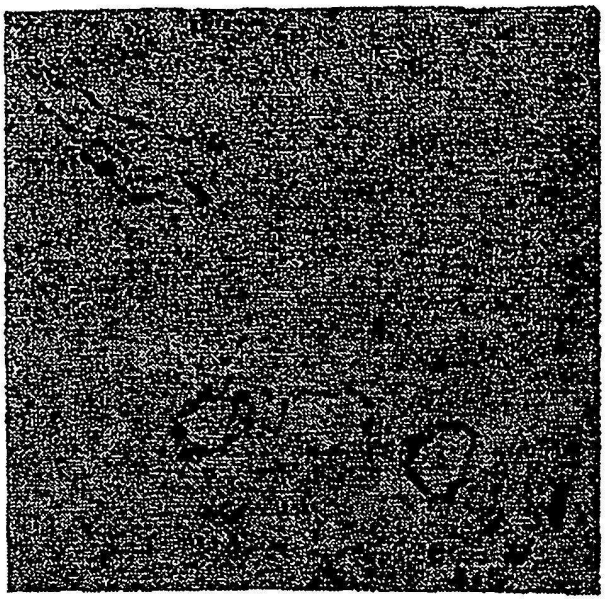
Cáncer de vejiga

FIG. 3A



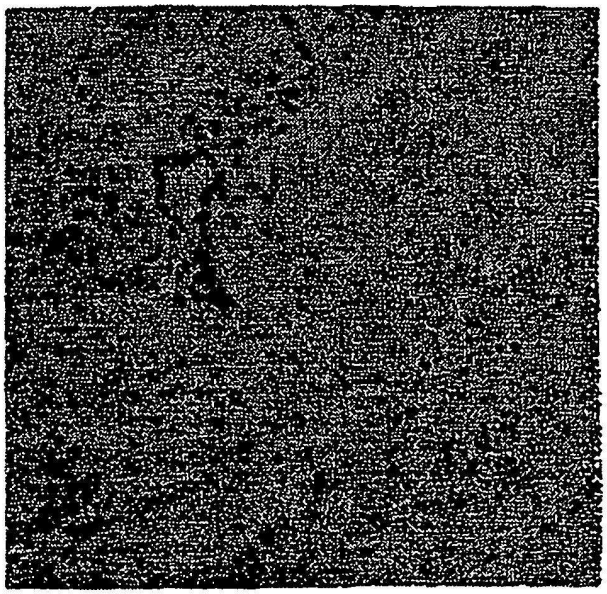
Cáncer de colon

FIG. 3B



Cáncer de mama

FIG. 3C



Cáncer de pulmón

FIG. 3D

Control



FIG. 4

FIG. 5A

Sin tratar
Anti-β_1

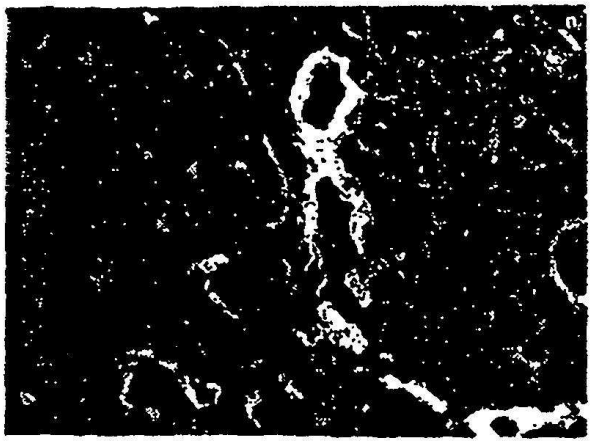


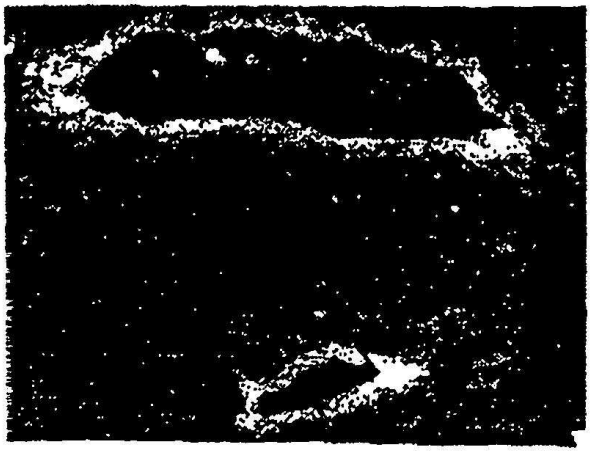
FIG. 5B

Sin tratar
Anti-$\alpha v\beta_3$



FIG. 5C

bFGF Tratado
Anti-$\alpha v\beta_3$



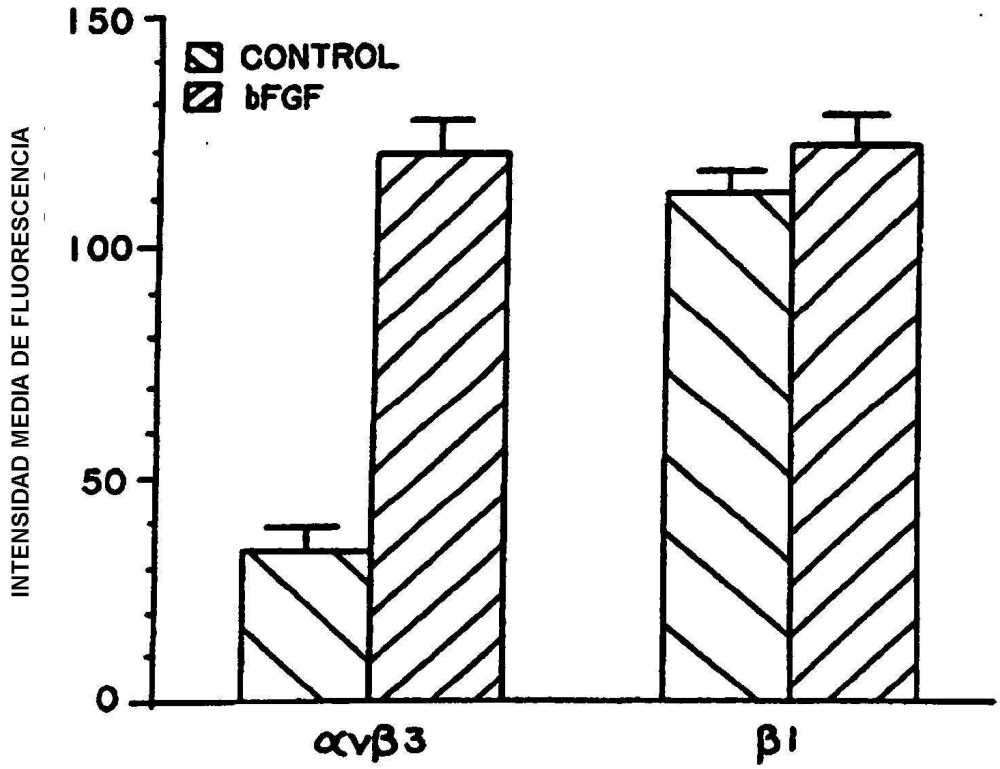

150
100
50
0
CONTROL
bFGF
INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA
αvβ3
β1

FIG. 6

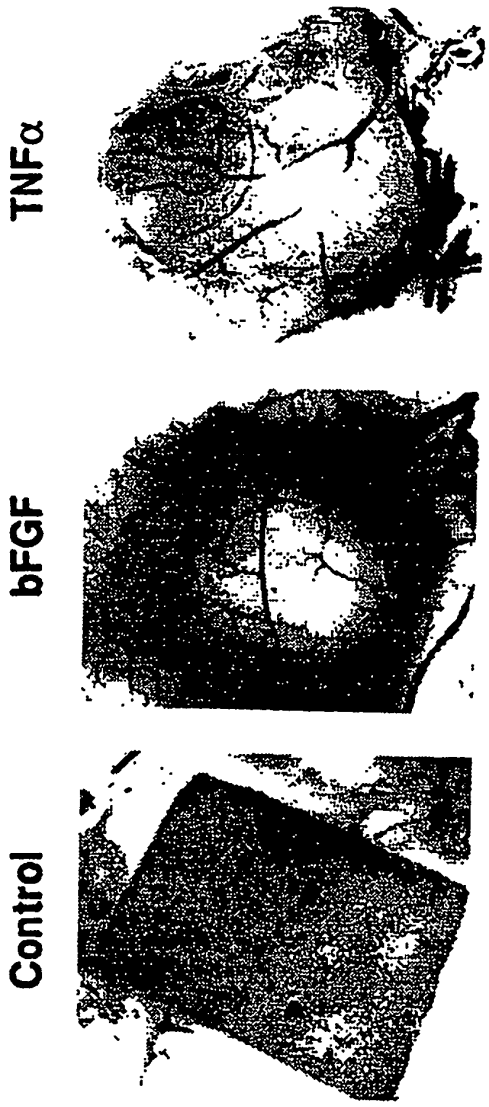


FIG. 7C

FIG. 7B

FIG. 7A

FIG. 8A
Control

bFGF





FIG. 8B



FIG. 8C
Anti-β_1



FIG. 8D
Anti-$\alpha_v\beta_5$



FIG. 8E
Anti-$\alpha_v\beta_3$

FIG. 9A



Péptido control
Tumor

FIG. 9B



RGD cíclico
Tumor

FIG. 9C



RGD cíclico
CAM adyacente

FIG. 10A
Control

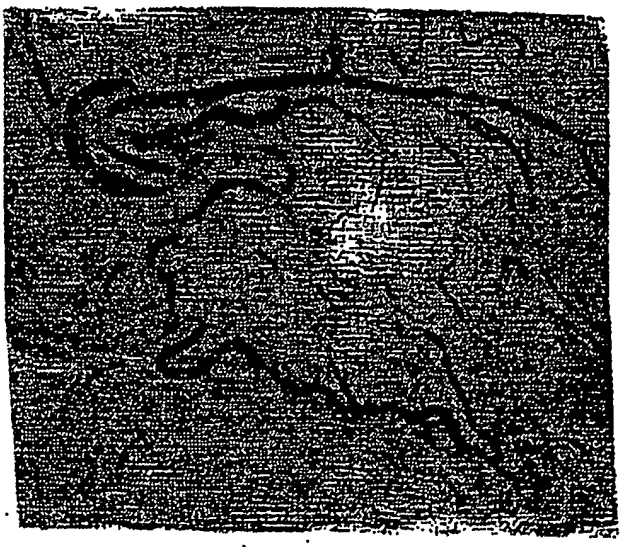
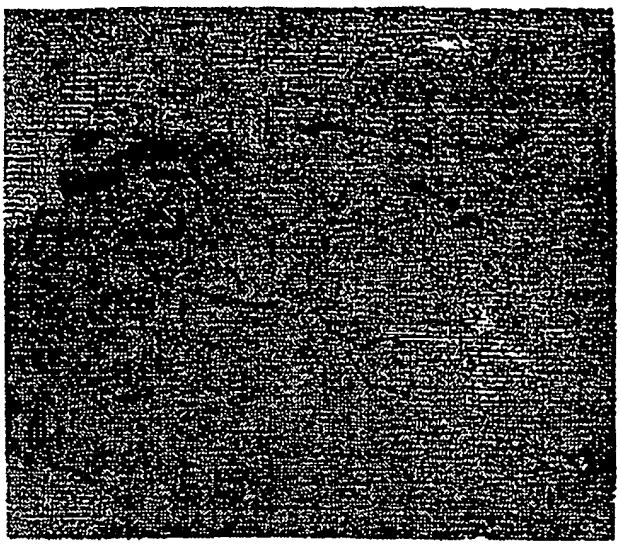


FIG. 10B
Anti-$\alpha V\beta_5$ (P3G2)



FIG. 10C
Anti-$\alpha V\beta_3$ (LM609)



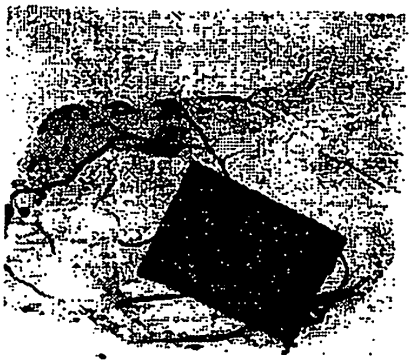


FIG. 11A

Anti-β1

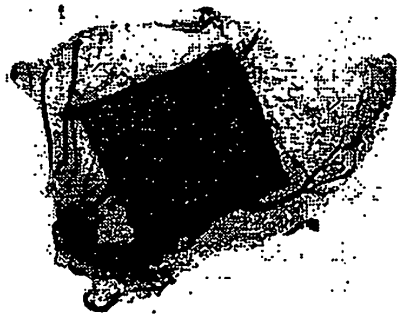


FIG. 11B

Anti-αvβ5

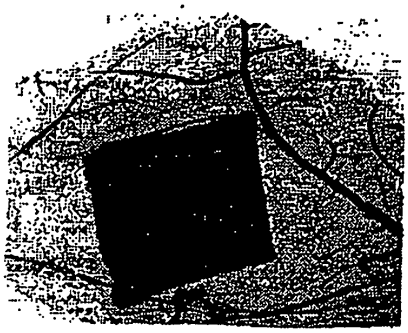


FIG. 11C

Anti-αvβ3

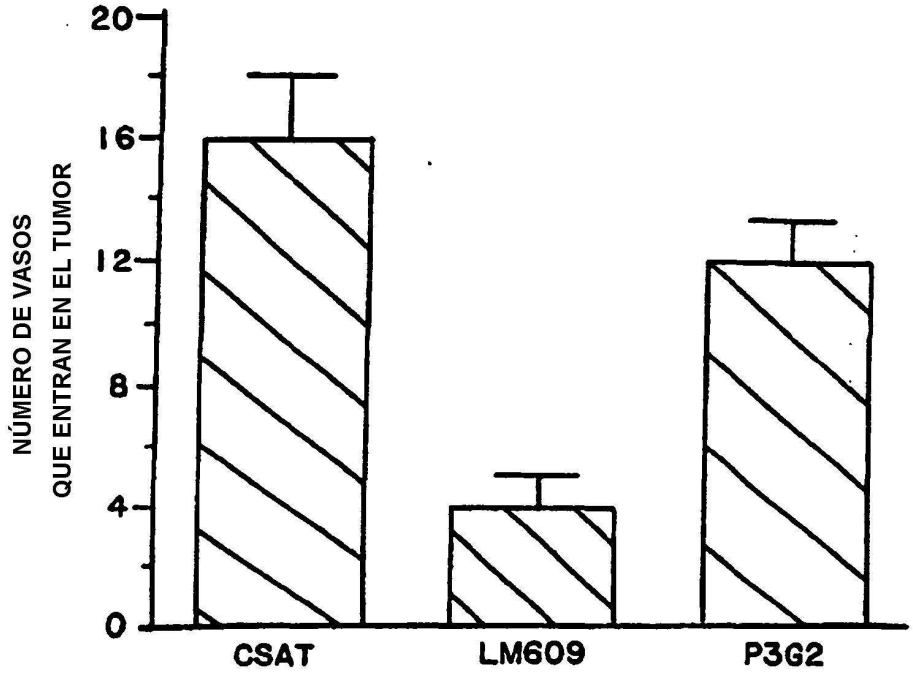

NÚMERO DE VASOS
QUE ENTRAN EN EL TUMOR
20
16
12
8
4
0
CSAT
LM609
P3G2

FIG. 12

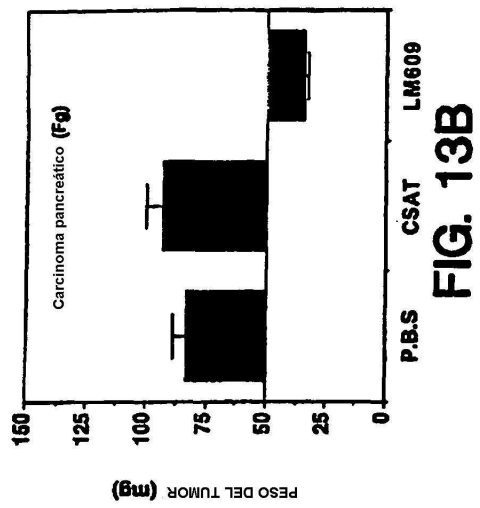


FIG. 13B

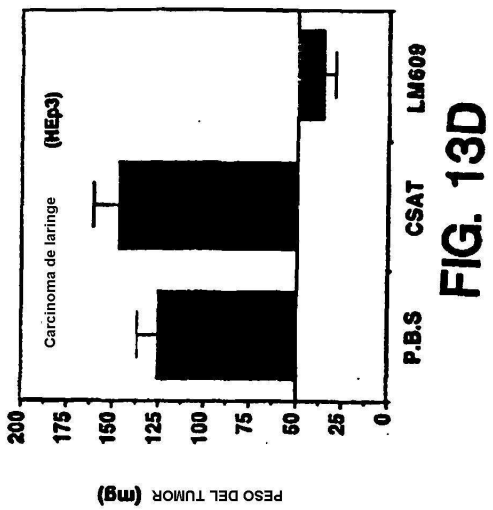


FIG. 13D

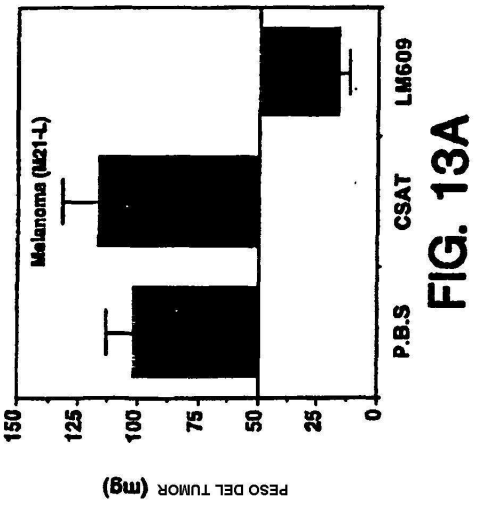


FIG. 13A

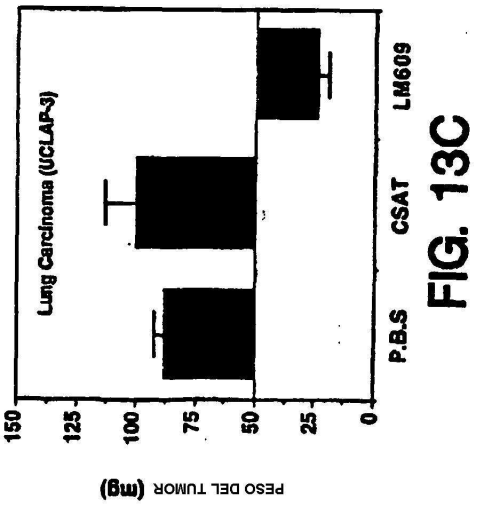
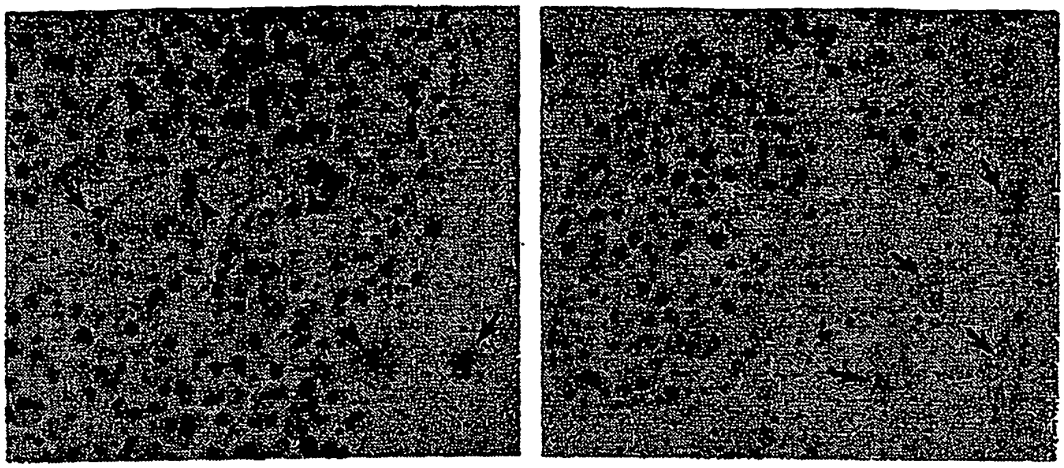


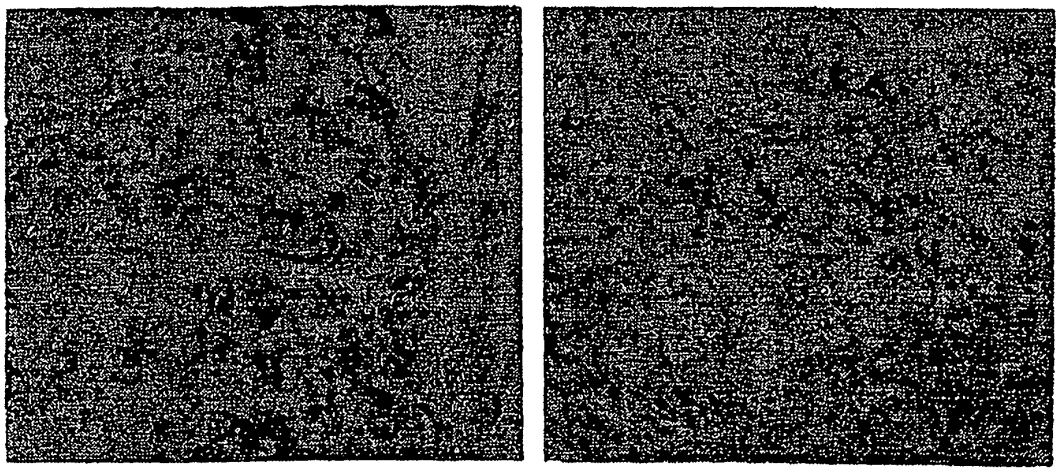
FIG. 13C

FIG. 14A



Anti-αVβ5
(P3G2)

FIG. 14B



Anti-αVβ3
(LM609)

FIG. 15A



Tumor de péptido control

FIG. 15B



Tumor RGD cíclico

FIG. 15C



RGD cíclico
CAM adyacente



FIG. 15D

Péptido control



FIG. 15E

Péptido RGD cíclico

P1F6
(Anti-$\alpha_v\beta_5$)



FIG. 16A

LM609
(Anti-$\alpha_v\beta_3$)

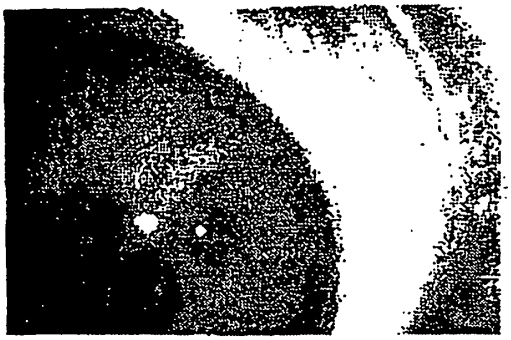


FIG. 16C

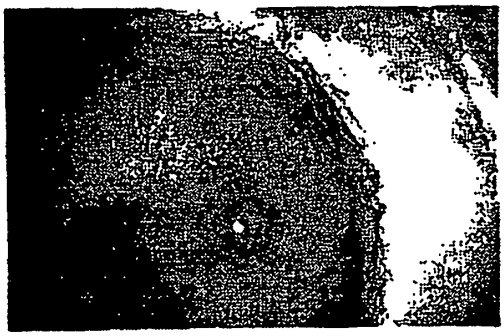


FIG. 16D



FIG. 16B

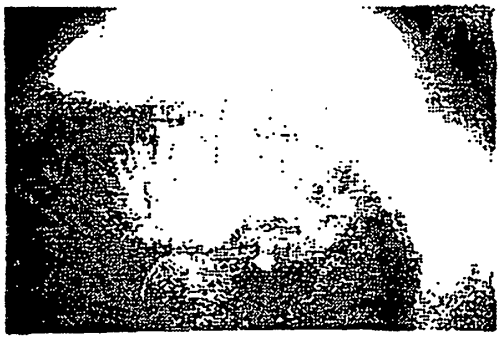


FIG. 16E

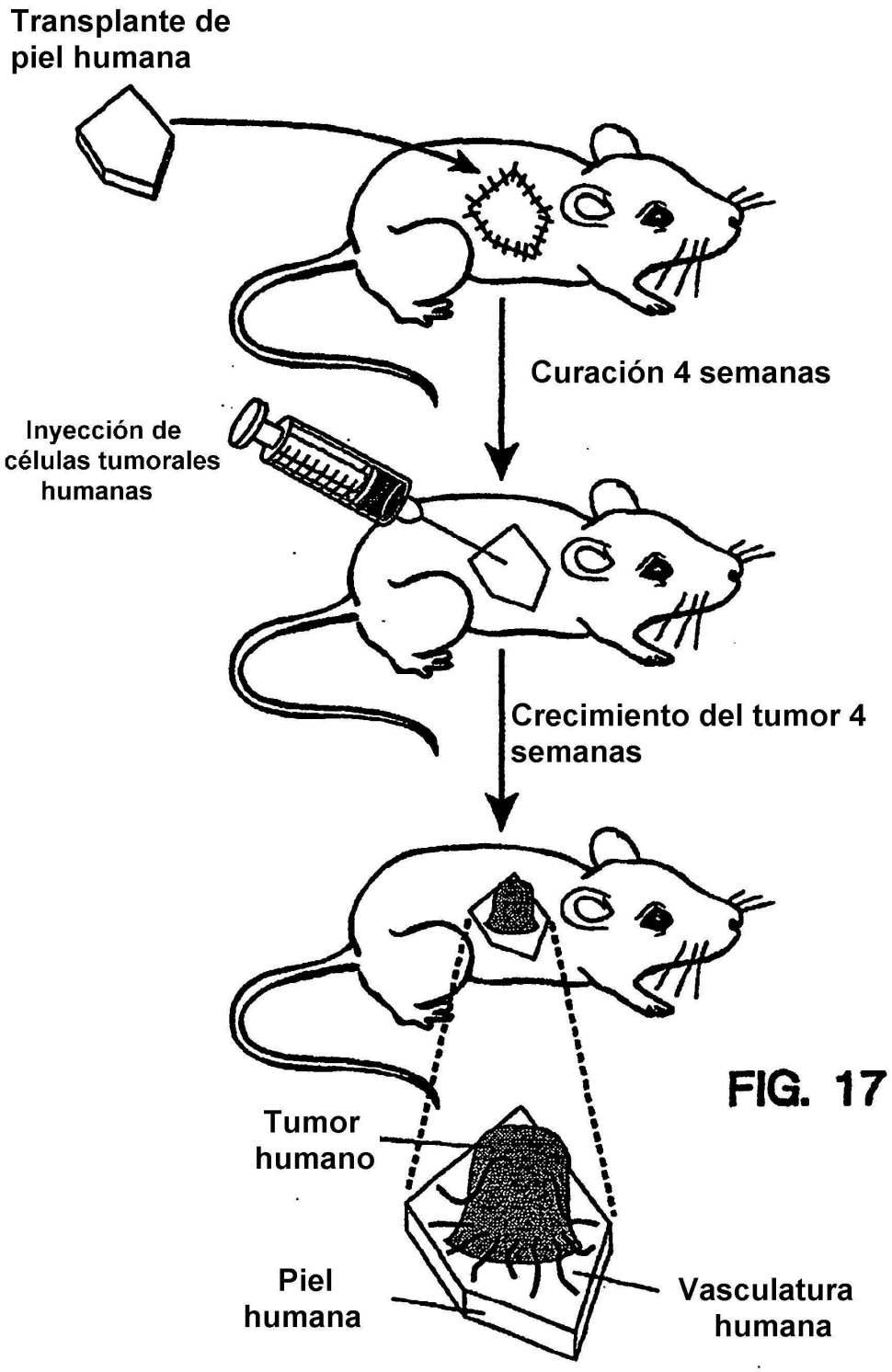

Transplante de piel humana
Curación 4 semanas
Inyección de células tumorales humanas
Crecimiento del tumor 4 semanas
Tumor humano
Piel humana
Vasculatura humana

FIG. 17

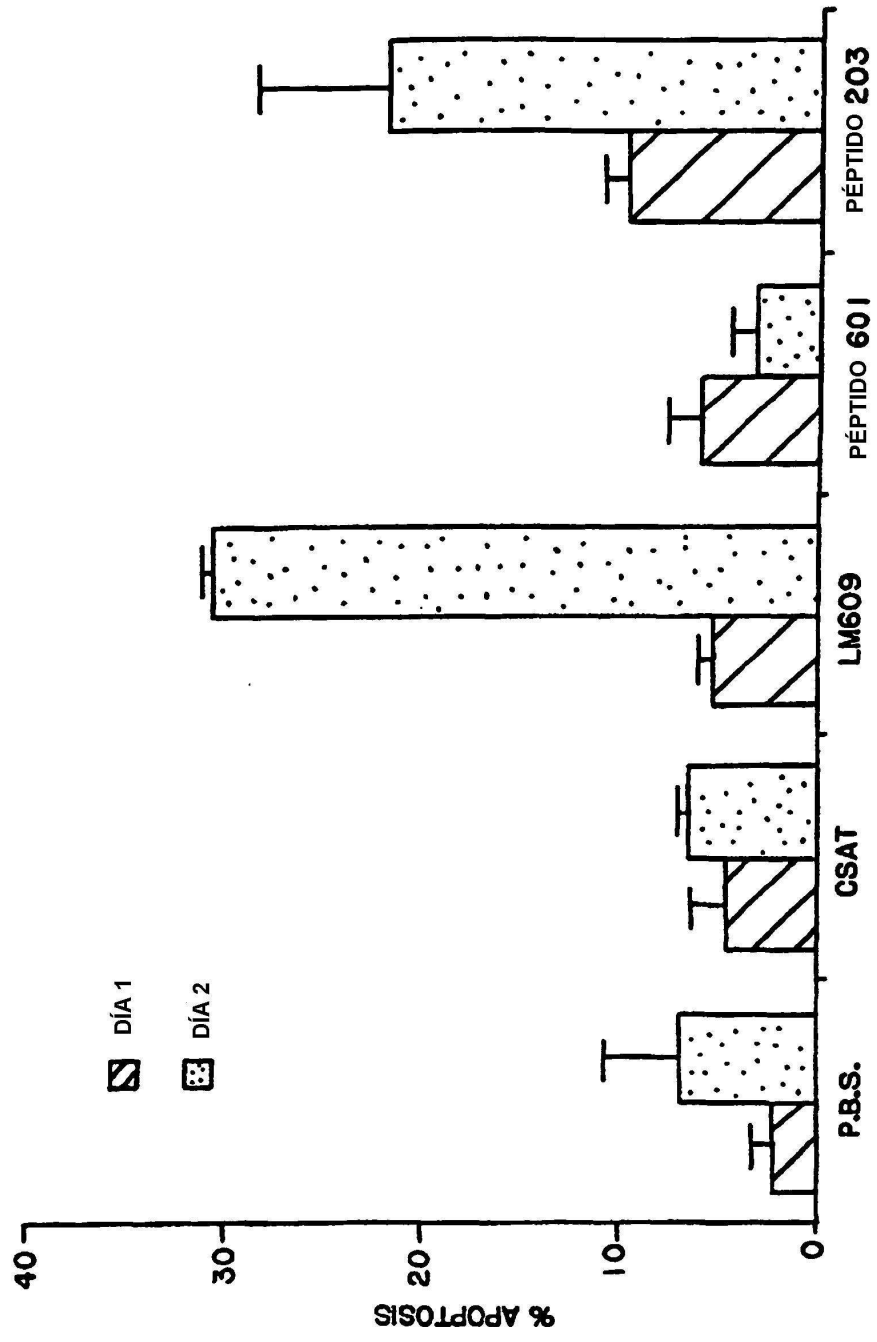

% APOPTOSIS
0
10
20
30
40
P.B.S.
CSAT
LM609
PÉPTIDO 601
PÉPTIDO 203
DÍA 1
DÍA 2

FIG. 18

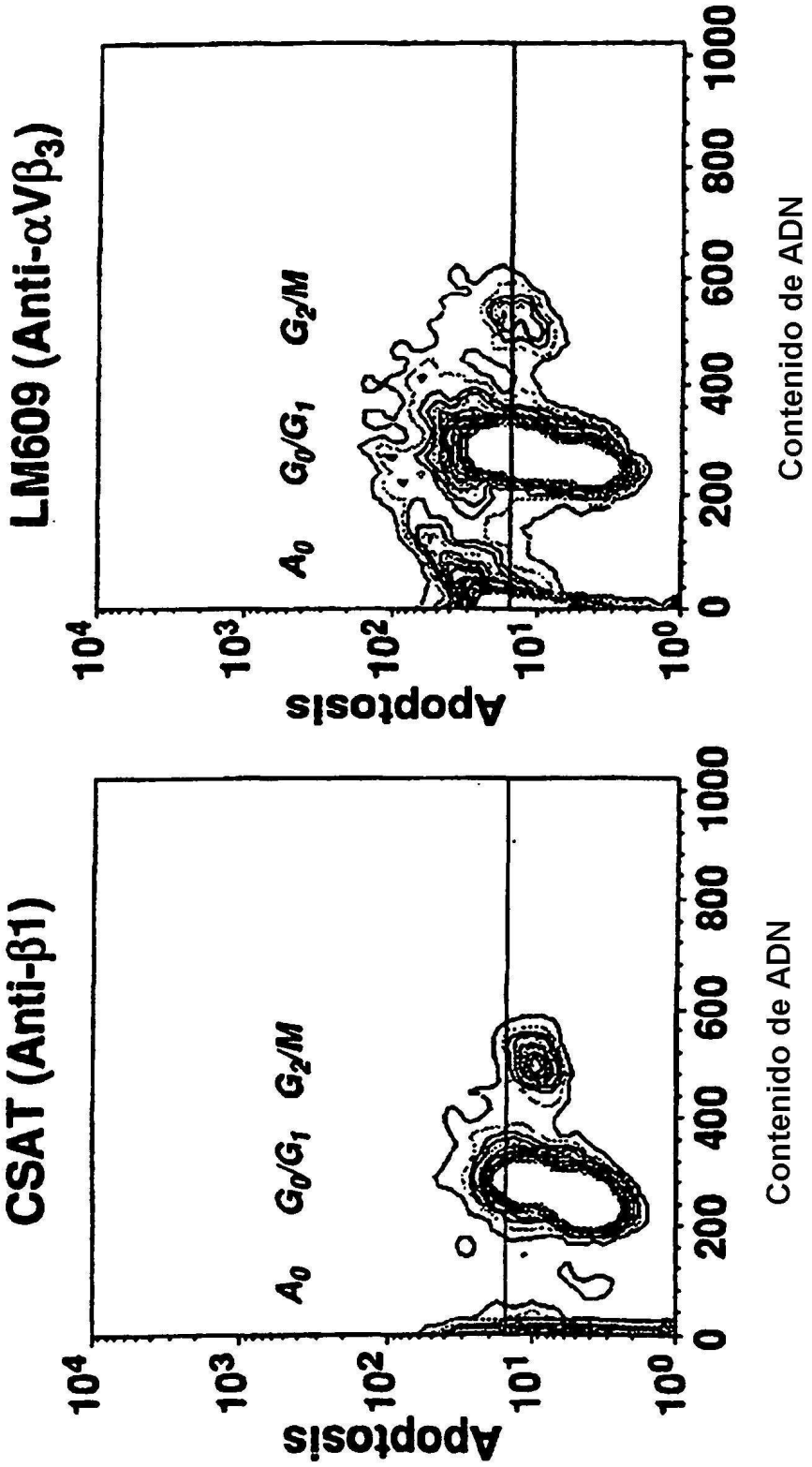

LM609 (Anti-αVβ3)
CSAT (Anti-β1)
Apoptosis
Contenido de ADN
A0
G0/G1
G2/M
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
0
200
400
600
800
1000

FIG. 19

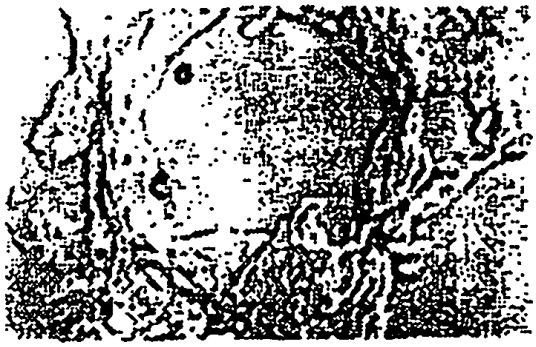


FIG. 20A



FIG. 20B



FIG. 20C



FIG. 20D

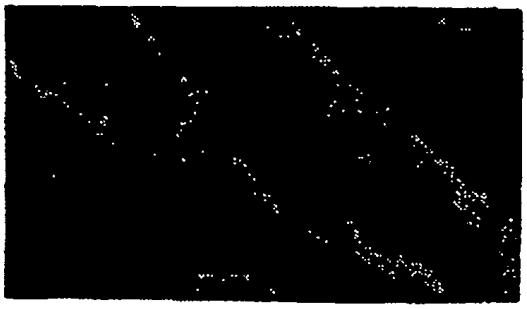


FIG. 20E

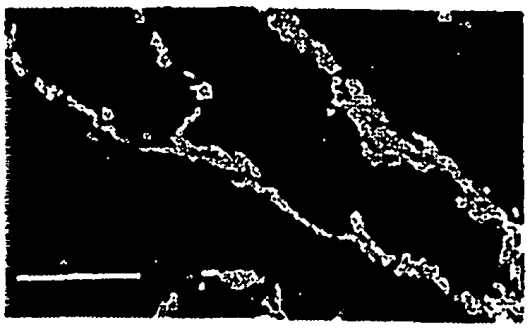


FIG. 20F