(11) Número de Publicação: **PT 1468695 E**

(51) Classificação Internacional:
A61K 39/395 (2011.01) ***C07K 16/00*** (2011.01)
C07K 16/18 (2011.01) ***C07K 16/28*** (2011.01)
C07K 16/30 (2011.01)

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: **1995.03.09**

(30) Prioridade(s): **1994.03.18 US 210715**
1994.12.30 US 366665

(43) Data de publicação do pedido: **2004.10.20**

(45) Data e BPI da concessão: **2011.11.23**
029/2012

(73) Titular(es):
THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE
10550 NORTH TORREY PINES ROAD LA JOLLA, CA 92037 **US**

(72) Inventor(es):
DAVID A. CHERESH **US**
PETER BROOKS **US**

(74) Mandatário:
PEDRO DA SILVA ALVES MOREIRA
RUA DO PATROCÍNIO, N.º 94 1399-019 LISBOA **PT**

(54) Epígrafe: **MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE**

(57) Resumo:
A PRESENTE INVENÇÃO DESCREVE MÉTODOS PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE EM TECIDOS UTILIZANDO ANTAGONISTAS ΑVΒ3 DA VITRONECTINA E, PARTICULARMENTE, PARA A INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE EM TECIDOS INFLAMADOS E EM TECIDOS TUMORAIS E METÁSTASES UTILIZANDO COMPOSIÇÕES TERAPÊUTICAS CONTENDO ANTAGONISTAS ΑVΒ3.

RESUMO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE"

A presente invenção descreve métodos para inibição da angiogénese em tecidos utilizando antagonistas $\alpha_v\beta_3$ da vitronectina e, particularmente, para a inibição da angiogénese em tecidos inflamados e em tecidos tumorais e metástases utilizando composições terapêuticas contendo antagonistas $\alpha_v\beta_3$.

DESCRIÇÃO

"MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE"

Campo Técnico

A presente invenção refere-se, genericamente, ao campo da medicina e refere-se, especificamente, a métodos e composições para inibir a angiogénese de tecidos, utilizando antagonistas do receptor $\alpha_v\beta_3$ da vitronectina.

Antecedentes

As integrinas são uma classe de receptores celulares conhecidos por se ligarem a proteínas de matriz extracelular e, portanto, medeiam interacções célula-célula e célula-matriz extracelular, designadas, genericamente, por eventos de adesão celular. Contudo, embora muitas integrinas e os ligandos que ligam uma integrina estejam descritos na literatura, a função biológica de muitas das integrinas permanece indefinida. Os receptores das integrinas constituem uma família de proteínas com características estruturais comuns de complexos glicoproteicos heterodiméricos não covalentes formados por subunidades α e β.

O receptor de vitronectina, designado devido à sua característica original de ligação preferida à vitronectina, é agora conhecido por se referir a três integrinas diferentes, designadas $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$. Horton, Int. J. Exp. Pathol.

71:741-759 (1990). O $\alpha_v\beta_1$ liga-se à fibronectina e vitronectina. O $\alpha_v\beta_3$ liga-se a uma grande variedade de ligandos, incluindo fibrina, fibrinogénio, laminina, trombospondina, vitronectina, factor de von Willebrand, osteospontina e sialoproteína I do osso. O $\alpha_v\beta_5$ liga-a à vitronectina. Os papéis de adesão celular específica que estas três integrinas desempenham nas muitas interacções celulares em tecidos estão ainda sob investigação, mas é claro que existem integrinas diferentes com funções biológicas diferentes.

Um local de reconhecimento importante no ligando para muitas integrinas é a sequência tripeptídica arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). A RGD é encontrada em todos os ligandos identificados acima para as integrinas receptoras de vitronectina. Este local de reconhecimento RGD pode ser mimetizado por polipéptidos ("péptidos") que contêm a sequência RGD e esses péptidos RGD são inibidores conhecidos da função integrina. Contudo, é importante notar que, dependendo da sequência e estrutura do péptido RGD, a especificidade da inibição pode ser alterada de forma a direccionar-se para integrinas específicas.

Para discussões sobre o local de reconhecimento RGD, ver Pierschbacher *et al.*, Nature, 309:30-33 (1984) e Pierschbacher *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:5985-5988 (1984). Vários polipéptidos RGD com especificidade de integrina variável também foram descritos por Grant *et al.*, Cell, 58:933-943 (1989), Cheresh, *et al.*, Cell, 58:945-953 (1989), Aumailley *et al.*, FEBS Letts., 291:50-54 (1991) e Pfaff *et al.*, J. Biol. Chem., 269:20233-20238 (1994) e nas Patentes dos Estados Unidos N° 4517686, 4578079, 4589881, 4614517, 4661111, 4792525, 4683291, 4879237, 4988621, 5041380 e 5061693.

A angiogénese é um processo de vascularização de tecidos que envolve o crescimento de novos vasos sanguíneos em desenvolvimento num tecido e é, também, designada por neovascularização. O processo é mediado pela infiltração de células endoteliais e células de músculo liso. Acredita-se que o processo se desenvolve em qualquer uma de três formas: os vasos podem-se desenvolver a partir de vasos pré-existentes, a partir de um desenvolvimento de vasos novos com origem em células precursoras (vasculogénese) ou os pequenos vasos existentes podem aumentar em diâmetro. Blood *et al.*, Bioch. Biophys, Acta, 1032:89-118 (1990). As células endoteliais vasculares são conhecidas por conterem, pelo menos, cinco integrinas dependentes de RGD, incluindo o receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_5$), receptor de colagénio Tipos I e IV ($\alpha_1\beta_1$), receptor de laminina ($\alpha_2\beta_1$), receptor de fibronectina/laminina/colagénio ($\alpha_3\beta_1$) e receptor de fibronectina ($\alpha_5\beta_1$). Davis *et al.*, J. Cell. Biochem., 51:206-218 (1993). A célula de músculo liso é conhecida por conter, pelo menos, seis integrinas dependentes de RGD, incluindo $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_v\beta_5$.

A angiogénese é um processo importante no crescimento neonatal, mas é, também, importante na cicatrização de feridas e na patogénese de uma grande variedade de doenças clínicas incluindo inflamação de tecidos, artrite, crescimento de tumores, retinopatia diabética, degeneração macular por neovascularização da retina e estados semelhantes. Estas manifestações clínicas associadas com a angiogénese são referidas como doenças angiogénicas. Folkman *et al.*, Science, 235:442-447 (1987). A angiogénese está normalmente ausente nos tecidos adultos ou maduros, embora ocorra na cicatrização de feridas e no ciclo de crescimento do corpo lúteo. Ver, por exemplo, Moses *et al.*, Science, 248:1408-1410 (1990).

Foi já proposto que a inibição da angiogénese seria uma terapia útil para a restrição do crescimento de tumores. A inibição da angiogénese foi proposta por (1) inibição da libertação de "moléculas angiogénicas", tal como βFGF (factor de crescimento de fibroblastos), (2) neutralização de moléculas angiogénicas, tal como por utilização de anticorpos anti-βFGF e (3) inibição da resposta de células endoteliais a estímulos angiogénicos. Esta última estratégia tem recebido atenção e Folkman *et al.*, Cancer Biology, 3:89-96 (1992), descreveram vários inibidores da resposta de células endoteliais, incluindo inibidor da colagenase, inibidores da renovação de membranas basais, esteróides angiostáticos, inibidores da angiogénese derivados de fungos, factor 4 das plaquetas, trombospondina, fármacos da artrite, tais como D-penicilamina e tiomalato de ouro, análogos de vitamina D_3, interferão-alfa e semelhantes, que possam ser utilizados para inibir a angiogénese. Para os inibidores adicionais da angiogénese propostos ver 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), e Patentes dos Estados Unidos N° 5092885, 5112946, 5192744 e 5202352. Nenhum dos inibidores da angiogénese descritos nas referências anteriores é dirigido à inibição de $\alpha_v\beta_3$.

Descreveram-se, também, péptidos contendo RGD que inibem o 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) e Pfaff *et al.*, J. Biol. Chem., 269:20233-20238 (1994). Contudo, o papel da integrina $\alpha_v\beta_3$ na angiogénese nunca foi sugerido ou identificado até à presente invenção.

A inibição da adesão celular in vitro utilizando anticorpos monoclonais imuno-específicos para várias subunidades α ou β de integrina implicou $\alpha_v\beta_3$ na adesão celular de uma variedade de tipos celulares incluindo células endoteliais microvasculares. Davis *et al.*, J. Cell. Biol., 51:206-218 (1993). Além disso, Nicosia *et al.*, Am. J. Pathol., 138:829-833 (1991), descreveram a utilização do péptido RGD GRGDS na inibição in vitro da formação de "microvasos" a partir da aorta de rato cultivada em gel de colagénio. Contudo, a inibição da formação de "microvasos" in vitro em culturas de gel de colagénio não é um modelo para a inibição da angiogénese num tecido, porque não mostra que as estruturas microvasculares são as mesmas que os rebentos capilares ou que a formação do microvaso numa cultura em gel de colagénio é a mesma que o crescimento neovascular num tecido intacto, tal como o tecido artrítico, tecido tumoral ou tecido doente em que a inibição da angiogénese é desejável.

Portanto, além dos estudos aqui referidos, a Requerente não tem conhecimento de qualquer outra demonstração de que a angiogénese possa ser inibida num tecido utilizando inibidores de adesão celular. Em particular, nunca foi demonstrado anteriormente que a função $\alpha_v\beta_3$ é requerida para angiogénese num tecido ou que os antagonistas $\alpha_v\beta_3$ podem inibir a angiogénese num tecido.

Breve Descrição da Invenção

A divulgação da presente invenção demonstra que a angiogénese em tecidos requer a integrina $\alpha_v\beta_3$ e que os inibidores de $\alpha_v\beta_3$ podem inibir a angiogénese. A divulgação também demonstra que os antagonistas de outras integrinas, tais

como $\alpha_v\beta_5$, ou $\alpha_v\beta_1$, não inibem a angiogénese, presumivelmente porque estas outras integrinas não são essenciais para a ocorrência da angiogénese.

Portanto, a invenção proporciona anticorpo monoclonal ou um seu fragmento que imunorreage com $\alpha_v\beta_3$ e que é um antagonista $\alpha_v\beta_3$, para utilização no tratamento de tumores, inflamação de tecidos, artrite, retinopatia diabética, degenerescência macular ou restenose pela inibição de angiogénese, em que o tratamento de tumores é seleccionado de inibição da formação de metástases tumorais e regressão de tumores estabelecidos.

O tecido a ser tratado pode ser qualquer tecido em que a inibição da angiogénese é desejável, tal como tecido doente em que ocorre neovascularização. Os tecidos exemplificativos incluem tecido inflamado, tumores sólidos, metástases, tecidos que sofrem restenose e tecidos semelhantes.

Um antagonista $\alpha_v\beta_3$, que é um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento, para utilização nos presentes métodos é capaz de se ligar a $\alpha_v\beta_3$ e inibir competitivamente a capacidade de $\alpha_v\beta_3$ se ligar a um ligando natural. De um modo preferido, o antagonista apresenta especificidade para $\alpha_v\beta_3$ comparativamente a outras integrinas.

Numa forma de realização particularmente preferida, o anticorpo monoclonal ou seu fragmento, que é um antagonista $\alpha_v\beta_3$, inibe a ligação do fibrinogénio ou outros ligandos contendo RGD a $\alpha_v\beta_3$, mas não inibe substancialmente a ligação de fibronectina a $\alpha_v\beta_3$. Um antagonista $\alpha_v\beta_3$ da invenção é um anticorpo monoclonal, ou seu fragmento funcional, que imunorreaja com $\alpha_v\beta_3$.

Breve Descrição dos Desenhos

Nos desenhos que formam uma parte desta divulgação:

As Figuras 1A-1D ilustram a distribuição tecidual das subunidades de integrina, β_3 e β_1, em pele normal e na pele que sofre cicatrização de feridas designada por tecido de granulação. A imuno-histoquímica com anticorpos para β_3 e β_1 foi realizada como descrito no Exemplo 3A. As Figuras 1A e 1B ilustram, respectivamente, a imunorreactividade de anti-β_3 em pele normal e em tecido de granulação. As Figuras 1C e 1D ilustram, respectivamente, a imunorreactividade de anti-β_1 em pele normal e em tecido de granulação.

As Figuras 2A-2D ilustram a distribuição tecidual do factor de Willebrand e dos ligandos de laminina que se ligam respectivamente, a subunidades de integrina β_3 e β_1 na pele normal e em pele que sofre cicatrização de feridas designada por tecido de granulação. A imuno-histoquímica com anticorpos do factor de von Willebrand (anti-vWF) e da laminina (anti-laminina) foi realizada como descrito no Exemplo 3B. As Figuras 2A e 2B ilustram, respectivamente, a imunorreactividade de anti-vWF em pele normal e em tecido de granulação. As Figuras 2C e 2D ilustram, respectivamente, a imunorreactividade da anti-laminina em pele normal e em tecido de granulação.

As Figuras 3A-3D ilustram a distribuição tecidual da integrina receptora de vitronectina, $\alpha_v\beta_3$, em biopsias de tecido de cancro da bexiga, cancro do cólon, cancro da mama e cancro do pulmão, respectivamente. Realizou-se a imuno-histoquímica com o anticorpo LM609 contra $\alpha_v\beta_3$, como descrito no Exemplo 3C.

A Figura 4 ilustra uma fotomicrografia típica de uma CAM desta invenção, desprovida de vasos sanguíneos, num embrião de frango de 10 dias de idade não tratado. A preparação é descrita no Exemplo 5B.

As Figuras 5A-5C ilustram a Distribuição Tecidual das integrinas β_1 e $\alpha_v\beta_3$ na preparação de CAM desta invenção. A Figura 5A mostra a distribuição da subunidade β_1 numa preparação de CAM com 10 dias de idade não tratada, como detectada por imunorreactividade de imuno-fluorescência com CSAT, um anticorpo anti-β_1. A Figura 5B mostra a distribuição do receptor $\alpha_v\beta_3$ numa preparação de CAM com 10 dias de idade não tratada, como detectada por imunorreactividade de imuno-fluorescência com LM609, um anticorpo anti-$\alpha_v\beta_3$. A Figura 5C mostra a distribuição do receptor $\alpha_v\beta_3$ numa preparação de CAM com 10 dias de idade tratada com βFGF como detectada por imunorreactividade de imuno-fluorescência com LM609, um anticorpo anti-$\alpha_v\beta_3$. Os tratamentos e resultados são descritos no Exemplo 5C.

A Figura 6 ilustra a quantificação num gráfico de barras da expressão relativa de $\alpha_v\beta_3$ e β_1 em CAM com 10 dias de idade não tratadas e tratadas com βFGF como descrito no Exemplo 6A. A intensidade de fluorescência média é representada no eixo dos Y com os perfis de integrina representados no eixo dos X.

As Figuras 7A-7C ilustram o aspecto de uma CAM com 10 dias de idade não tratada, uma CAM tratada com βFGF e uma CAM tratada com TNFα, respectivamente, sendo os processos e resultados descritos no Exemplo 6A.

As Figuras 8A-8E ilustram o efeito do tratamento tópico de anticorpos na angiogénese induzida por FGF numa CAM com 10 dias

como descrito no Exemplo 7A1). A Figura 8A mostra uma preparação de CAM não tratada que é desprovida de vasos sanguíneos. A Figura 8B mostra a infiltração de uma nova vasculatura numa área anteriormente desprovida de vasculatura induzida pelo tratamento com βFGF. As Figuras 8C, 8D e 8E mostram, respectivamente, os efeitos de anticorpos contra β_1 (anti-β_1; CSAT); $\alpha_v\beta_5$ (anti-$\alpha_v\beta_5$, P3G2) e $\alpha_v\beta_3$ (anti-$\alpha_v\beta_3$; LM609).

As Figuras 9A-9C ilustram o efeito da injecção intravenosa do péptido sintético 66203 na angiogénese induzida por tumores como descrita no Exemplo 7D2). A Figura 9A mostra a ausência de efeito inibidor do tratamento intravenoso com um péptido de controlo (péptido de controlo tumoral) na angiogénese resultante de indução de tumor. A inibição dessa angiogénese por injecção intravenosa do péptido 66203 (tumor RGD cíclico) é mostrada na Figura 9B. A ausência de efeitos inibidores ou de citotoxicidade nos vasos maduros pré-existentes após a infusão intravenosa de péptido 66203 na área adjacente à área tratada do tumor é mostrada na Figura 9C (CAM adjacente a RGD cíclico).

As Figuras 10A-10C ilustram o efeito da aplicação intravenosa de anticorpos monoclonais na angiogénese induzida por factores de crescimento como descrito no Exemplo 7B1). A Figura 10A mostra a angiogénese induzida por βFGF não exposta a tratamento por anticorpos (controlo). Não resultou inibição da angiogénese quando se tratou uma preparação semelhante com o anticorpo P3G2 anti-$\alpha_v\beta_5$, como se mostra na Figura 10B. A inibição da angiogénese resultou com o tratamento do anticorpo LM609 anti-$\alpha_v\beta_3$, como se mostra na Figura 10C.

As Figuras 11A-11C ilustram o efeito na angiogénese embriónica após aplicação tópica de anticorpos anti-integrina

como descrito no Exemplo 7C. A angiogénese não foi inibida por tratamento de uma CAM com 6 dias com anticorpos anti-β_1 e anti-$\alpha_v\beta_5$, respectivamente, mostrado nas Figuras 11A e 11B. Contrariamente, o tratamento com o anticorpo LM609 anti-$\alpha_v\beta_3$ resultou na inibição da formação de vasos sanguíneos como se mostra na Figura 11C.

A Figura 12 ilustra a quantificação do número de vasos que entram num tumor, numa preparação de CAM como descrito no Exemplo 7D1). O gráfico mostra o número de vasos representado no eixo dos Y resultando da aplicação tópica de CSAT (anti-β_1), LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$).

As Figuras 13A-13D ilustram uma comparação entre o peso húmido de tumores 7 dias após tratamento e o peso inicial dos tumores como descrito no Exemplo 9Al)a. Cada barra representa a média ± S.E. de 5-10 tumores por grupo. Os tumores foram derivados de preparações de CAM de melanoma humano (M21-L) (Figura 13A), carcinoma pancreático (Fg) (Figura 13B), carcinoma do pulmão (UCLAP-3) (Figura 13C) e carcinoma da laringe (HEp3) (Figura 13D) e tratados intravenosamente com PBS, CSAT (anti-β_1) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Os gráficos mostram o peso de tumor representado no eixo dos Y que resulta da aplicação intravenosa de CSAT (anti-β_1), LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou de PBS como indicado no eixo dos X.

As Figuras 14A e 14B ilustram secções histológicas de tumores tratados com o P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) (Figura 14A) e LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 14B) e corados com hematoxilina e eosina, como descrito no Exemplo 9Al)a. Como mostrado na Figura 14A, os tumores tratados com o anticorpo de controlo (P3G2) mostraram várias células tumorais viáveis e em divisão activa como indicado pelas

figuras mitóticas (pontas de setas) bem como pelos múltiplos vasos sanguíneos (setas) ao longo do estroma do tumor. Contrariamente, detectaram-se poucas ou mesmo nenhumas células tumorais ou vasos sanguíneos viáveis em tumores tratados com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) na Figura 14B.

As Figuras 15A-15E correspondem a tumores M21L tratados com péptidos como descrito no Exemplo 9A1)b e são os seguintes: Figura 15A, péptido RAD cíclico de controlo (69601); Figura 15B, péptido RGD cíclico (66203); Figura 15C, tecido adjacente a CAM retirado dos mesmos embriões tratados com péptido RGD cíclico (66203) e grande ampliação (13x) de tumores tratados com o RAD de controlo (69601) na Figura 15D ou péptido RGD cíclico (66203) na Figura 15E. A Figura 15D representa vasos normais do tumor tratado com péptido RAD de controlo (69601). A Figura 15E representa exemplos de vasos sanguíneos destruídos de tumores (setas) tratados com péptido RGD cíclico (66203).

As Figuras 16A-16E representam a inibição da angiogénese por antagonistas da angiogénese no ensaio do modelo do olho de coelho in vivo como descrito no Exemplo 10. As Figuras 16A e 16B representam a angiogénese do olho de coelho na presença de βFGF e mAb P1F6 (anti-$\alpha_v\beta_5$). As Figuras 16C, 16D e 16E representam a inibição da angiogénese do olho de coelho na presença de βFGF e mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$).

A Figura 17 representa um diagrama de fluxo de como o modelo quimérico de rato in vivo rato:humano foi produzido, como descrito no Exemplo 11A. Uma parte de pele de um rato SCID foi substituída por prepúcio humano neonatal e deixada cicatrizar durante 4 semanas. Após o enxerto ter cicatrizado, o prepúcio humano foi inoculado com células tumorais humanas. Durante o

período de 4 semanas seguinte, estabeleceu-se um tumor mensurável que compreendeu um tumor humano com crescimento da vasculatura da pele humana para o tumor humano.

A Figura 18 ilustra a percentagem de células únicas derivadas de CAM tratadas com mAb e péptido e coradas com Apop Tag como determinada por análise FACS e descrita nos Exemplos 12A e 12B, respectivamente. As barras negras e penteadas representam células de embriões tratados 24 horas e 48 horas antes do ensaio, respectivamente. Cada barra representa a média ± S.E. de três replicados. As CAM foram tratadas com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou CSAT (anti-β_1), ou PBS como descrito no Exemplo 12A2). As CAM foram também tratadas com péptido cíclico 69203 (ciclo-RGDfV, indicado como Péptido 203) ou péptido cíclico de controlo 69601 (ciclo-RADfV, indicado como Péptido 601) como descrito no Exemplo 12B.

As Figuras 19A e 19B ilustram os resultados combinados de suspensões de células únicas de CAM de embriões tratados com CSAT (anti-β_1) (Figura 19A) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 19B), corados com Apop Tag e iodeto de propídio e analisados por FACS como descrito no Exemplo 12C. O eixo dos Y representa a coloração Apop Tag em número de células (Apoptose), o eixo dos X representa a coloração com iodeto de propídio (teor de ADN). A linha horizontal representa o canal negativo para a coloração Apop Tag. Os painéis direito e esquerdo indicam células de CAM de embriões tratados com CSAT (anti-β_1) (Figura 19A) e LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 19B), respectivamente. A análise do ciclo celular foi realizada por análise de, aproximadamente, 8000 eventos por estado.

As Figuras 20A-20C representam tecido de CAM de embriões tratados com CSAT (anti-β_1) e as Figuras 20D-20F representam tecido CAM de embriões tratados com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) preparados como descrito no Exemplo 12C. As Figuras 20A e 20D representam tecidos corados com Apop Tag e visualizados por fluorescência (FITC) sobrepostos numa imagem D.I.C. As Figuras 20B e 20E representam os mesmos tecidos corados com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) e visualizados por fluorescência (rodamina). As Figuras 20C e 20F representam imagens sobrepostas dos mesmos tecidos corados com Apop Tag e LM609 onde a coloração amarela representa uma co-localização. A barra representa 15 e 50 μm nos painéis esquerdo e direito, respectivamente.

Descrição Detalhada da Invenção

A. Definições

Resíduo de Aminoácido: Um aminoácido formado após digestão química (hidrólise) de um polipéptido nas suas ligações peptídicas. Os resíduos de aminoácido aqui descritos estão, de um modo preferido, na forma isomérica "L". Contudo, os resíduos na forma isomérica "D" podem ser substituídos por qualquer resíduo de aminoácido L desde que a propriedade funcional pretendida seja conservada pelo polipéptido. NH_2 refere-se ao grupo amino livre presente na terminação amino de um polipéptido. COOH refere-se ao grupo carboxilo livre presente na terminação carboxilo de um polipéptido. Mantendo a nomenclatura polipeptídica corrente (descrita em J. Biol. Chem., 243:3552-59 (1969) e adoptada em 37 CFR §1.822(b)(2)), as abreviaturas dos resíduos de aminoácidos são mostradas na seguinte Tabela de Correspondência:

TABELA DE CORRESPONDÊNCIA

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
Q	Gln	glutamina
E	Glu	ácido glutâmico
Z	Glx	Glu e/ou Gln
W	Trp	triptofano
R	Arg	arginina
D	Asp	ácido aspártico
N	Asn	asparagina
B	Asx	Asn e/ou Asp
C	Cys	cisteína

(continuação)

X	Xaa	desconhecido/outro

Além disso, os seguintes têm os significados abaixo:

BOC	terc-butiloxicarbonilo
DCCI	diciclo-hexilcarbodiimida
DMF	dimetilformamida
OMe	metoxilo
HOBt	1-hidroxibenzotriazole.

Deve notar-se que todas as sequências de resíduos de aminoácidos são aqui representadas por fórmulas cuja orientação esquerda e direita está na direcção convencional da terminação amino para a terminação carboxilo. Além disso, deve notar-se que um traço no início ou no final de uma sequência de resíduos de aminoácido indica uma ligação peptídica a uma outra sequência de um ou mais resíduos de aminoácido.

Polipéptido: refere-se a uma série linear de resíduos de aminoácido ligados uns aos outros por ligações peptídicas entre os grupos alfa-amino e os grupos carboxilo dos resíduos de aminoácido contíguos.

Péptido: como aqui utilizado, refere-se a uma série linear de não mais do que 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros como num polipéptido.

Péptido cíclico: deriva de um péptido linear correspondente e; refere-se a um péptido no qual não existe qualquer N ou C terminal livre e; no qual o N-terminal do péptido linear

correspondente forma uma ligação amida ao carboxilato C-terminal do referido péptido linear correspondente.

Proteína: refere-se a uma série linear maior do que 50 resíduos de aminoácido ligados uns aos outros como num polipéptido.

Péptido sintético: refere-se a uma cadeia de resíduos de aminoácidos quimicamente produzida, ligada conjuntamente por ligações peptídicas, que está livre de proteínas de ocorrência natural e seus fragmentos.

B. Considerações Gerais

A presente invenção refere-se, geralmente, à verificação de que a angiogénese é mediada pelo receptor $\alpha_v\beta_3$ específico da vitronectina e de que a inibição da função $\alpha_v\beta_3$ inibe a angiogénese. Esta verificação é importante devido ao papel que a angiogénese desempenha numa variedade de processos de doença. Inibindo a angiogénese, pode intervir-se na doença, melhorar os sintomas e, em alguns, casos curar a doença.

Quando o crescimento de novos vasos sanguíneos é a causa ou contribui para a patologia associada com uma doença, a inibição da angiogénese reduzirá os efeitos nocivos da doença. Os exemplos incluem artrite reumatóide, retinopatia diabética, doenças inflamatórias, restenose e semelhantes. Quando o crescimento de novos vasos sanguíneos é necessário para suportar o crescimento de um tecido nocivo, a inibição da angiogénese reduzirá o fornecimento de sangue ao tecido e contribui, deste modo, para a redução na massa de tecido com base nas

necessidades de fornecimento de sangue. Os exemplos incluem o crescimento de tumores em que a neovascularização é um requisito constante de modo a que o tumor cresça além de uns poucos milímetros em espessura e para o estabelecimento de metástases de tumor sólidas.

As utilizações do anticorpo monoclonal ou seu fragmento da presente invenção são eficazes, em parte, devido à terapia ser altamente selectiva para angiogénese e não para outros processos biológicos. Como se mostra nos Exemplos, apenas o crescimento de novos vasos contém $\alpha_v\beta_3$ substancial e, portanto, os métodos terapêuticos não afectam negativamente os vasos maduros. Além disso, $\alpha_v\beta_3$ não está largamente distribuído nos tecidos normais, mas pelo contrário encontra-se selectivamente em vasos novos, assegurando, assim, que a terapia pode ser selectivamente direccionada para crescimento de novos vasos.

A verificação de que a inibição de $\alpha_v\beta_3$ isoladamente inibirá de modo eficaz, a angiogénese, permite o desenvolvimento de composições terapêuticas com elevada especificidade potencial e, portanto, uma toxicidade relativamente baixa. Deste modo, embora a invenção divulgue a utilização de reagentes à base de péptidos que têm a capacidade de inibir uma ou mais integrinas, podem conceber-se outros reagentes que inibam mais selectivamente $\alpha_v\beta_3$ e, portanto, não têm os efeitos secundários da inibição de outros processos biológicos que não os mediados por $\alpha_v\beta_3$.

Por exemplo, como mostrado pelos presentes ensinamentos, é possível preparar anticorpos monoclonais altamente selectivos para imunorreacção com $\alpha_v\beta_3$ que são, igualmente, selectivos para inibição da função $\alpha_v\beta_3$. Além disso, os péptidos contendo RGD

podem ser concebidos para serem selectivos para inibição de $\alpha_v\beta_3$, como descrito à frente.

Antes das verificações da presente invenção, não era conhecido que a angiogénese e quaisquer processos dependentes da angiogénese, podiam ser inibidos in vivo pela utilização de reagentes que antagonizam a função biológica de $\alpha_v\beta_3$.

C. Métodos Para Inibição da Angiogénese

A invenção descreve um método para inibição da angiogénese num tecido e, deste modo, de inibição de ocorrências no tecido que dependem da angiogénese. Geralmente, o método compreende a administração ao tecido de uma composição compreendendo uma quantidade inibidora de angiogénese de um antagonista $\alpha_v\beta_3$, em que o antagonista $\alpha_v\beta_3$ é um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento que imunorreage com $\alpha_v\beta_3$.

Como descrito anteriormente, a angiogénese inclui uma variedade de processos envolvendo a neovascularização de um tecido incluindo o aparecimento de "rebentos", vasculogénese ou aumento dos vasos, todos os processos de angiogénese são mediados por, e dependentes da, expressão de $\alpha_V\beta_3$. Com a excepção da cicatrização traumática de ferimentos, formação de corpo lúteo e embriogénese, acredita-se que a maior parte dos processos de angiogénese estão associados com processos de doença e, portanto, a utilização do presente anticorpo monoclonal ou seu fragmento é selectiva para a doença e não tem efeitos secundários nocivos.

Existe uma variedade de doenças nas quais se acredita que a angiogénese é importante, referidas como doenças angiogénicas, incluindo, mas não limitado a, distúrbios inflamatórios, tais como inflamação imune e não imune, reumatismo crónico articular e psoríase, distúrbios associados com invasão inapropriada e inoportuna de vasos, tais como retinopatia diabética, glaucoma neovascular, restenose, proliferação capilar nas placas aterioescleróticas e osteoporose e distúrbios associados com o cancro, tais como tumores sólidos, metástases tumorais sólidos, angiofibromas, fibroplastia retrolental, hemangiomas, sarcoma de Kaposi e cancros semelhantes que requerem neovascularização para suportar o crescimento tumoral.

Deste modo, os métodos que inibem a angiogénese num tecido doente melhoram os sintomas da doença e podem, dependendo da doença, contribuir para a cura da doença. Numa forma de realização, a invenção contemplata a inibição de angiogénese, *per se*, num tecido. A extensão da angiogénese num tecido e, portanto, a extensão de inibição conseguida pelos presentes métodos, pode ser avaliada por uma variedade de métodos, tais como são descritos nos Exemplos para detectar estruturas de vasos nascentes e imaturas imuno-positivas a $\alpha_v\beta_3$ por imuno-histoquimica.

Como aqui descrito, qualquer de uma variedade de tecidos ou órgãos consistindo de tecidos organizados, pode suportar angiogénese em estados de doença, incluindo tecido da pele, músculo, intestino, tecido conectivo, articulações, ossos e tecidos semelhantes, em que os vasos sanguíneos podem invadir após estímulos angiogénicos.

Deste modo, numa forma de realização relacionada, um tecido a ser tratado é um tecido inflamado e a angiogénese a ser inibida é angiogénese de tecido inflamado onde existe neovascularização do tecido inflamado. Nesta classe o método contempla a inibição de angiogénese em tecidos artríticos, tal como num doente com reumatismo articular crónico, em tecidos inflamados imunes ou não imunes, em tecido psoriático e semelhantes.

O doente tratado na presente invenção, nas suas muitas formas de realização, é desejavelmente um doente humano, embora, se entenda que os princípios da invenção indicam que a invenção é eficaz no que se refere a todos os mamíferos, os quais se destinam a ser incluídos no termo "doente". Neste contexto, um mamífero é entendido como incluindo qualquer espécie de mamífero em que se pretende o tratamento das doenças associadas com a angiogénese, particularmente as espécies de mamíferos pecuários e domésticas.

Noutra forma de realização relacionada, um tecido a tratar é um tecido retiniano de um doente com retinopatia diabética ou degeneração macular e a angiogénese a inibir é a angiogénese do tecido retiniano quando existe neovascularização do tecido retiniano.

Numa forma de realização relacionada adicional, um tecido a tratar é um tecido tumoral de um doente com um tumor sólido, uma metástase, um cancro da pele, um cancro da mama, um hemangioma ou angiofibroma e cancros semelhantes e a angiogénese a inibir é a angiogénese do tecido tumoral quando existe neovascularização de um tecido tumoral. Os tecidos tumorais sólidos típicos tratáveis pelos presentes métodos incluem pulmão, pâncreas,

mama, cólon, laringe, ovários e tecidos semelhantes. Em formas de realização referentes ao tratamento de tumores, o tratamento é seleccionado da inibição de formação de metástases tumorais e da regressão de tumores estabelecidos. A angiogénese de tecidos tumorais e a sua inibição são descritas de modo exemplificativo nos Exemplos.

Um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento para utilização no tratamento de tumores pela inibição da angiogénese do tecido tumoral é uma forma de realização particularmente preferida devido ao papel importante que a neovascularização desempenha no crescimento tumoral. Na ausência de neovascularização do tecido tumoral, o tecido tumoral não obtém os nutrientes necessários, o crescimento diminui, o crescimento adicional cessa, regride e, em última análise, torna-se necrótico resultando na morte do tumor.

Por outras palavras, a presente invenção proporciona um anticorpo monoclonal ou um seu fragmento para utilização no tratamento de tumores inibindo a neovascularização de tumores, inibindo a angiogénese tumoral de acordo com os presentes tratamentos.

Os anticorpos monoclonais ou seus fragmentos também são particularmente eficazes contra a formação de metástases devido (1) à sua formação requerer vascularização de um tumor primário, de modo a que as células cancerosas metastáticas possam abandonar o tumor primário e (2) ao seu estabelecimento num local secundário requerer neovascularização para suportar o crescimento das metástases.

Numa forma de realização relacionada, a invenção contempla a prática do tratamento em conjunto com outras terapias, tais como quimioterapia convencional dirigida contra tumores sólidos e para controlo do estabelecimento de metástases. A administração de um inibidor da angiogénese é, tipicamente, conduzida durante ou após a quimioterapia, embora seja preferido inibir a angiogénese após um regime de quimioterapia nos momentos em que o tecido tumoral responderá ao ataque tóxico por indução da angiogénese para recuperar pela provisão de um fornecimento de sangue e nutrientes ao tecido tumoral. Além disso, prefere-se administrar os tratamentos de inibição da angiogénese após a cirurgia em que os tumores sólidos tenham sido removidos como profilaxia contra as metástases.

Embora os presentes tratamentos se apliquem à inibição da neovascularização de tumores, os tratamentos aplicam-se à inibição da formação de metástases tumorais e à regressão de tumores estabelecidos. Os Exemplos demonstram regressão de um tumor estabelecido depois de uma simples administração intravenosa de um antagonista $\alpha_v\beta_3$ desta invenção.

A restenose é um processo de migração e proliferação de células do músculo liso (SMC) no local da angioplastia transluminal percutânea coronária que dificulta o sucesso da angioplastia. A migração e proliferação das SMC durante a restenose podem ser consideradas um processo de angiogénese que é inibido pelos presentes tratamentos. Por conseguinte, a invenção também contempla inibição da restenose por inibição da angiogénese de acordo com os presentes tratamentos num doente depois dos processos de angioplastia. Para inibição da restenose, o anticorpo monoclonal ou seu fragmento é tipicamente, administrado depois do processo de angioplastia

durante cerca de 2 a cerca de 28 dias e, mais tipicamente, durante cerca dos primeiros 14 depois do processo.

O presente tratamento para inibição da angiogénese num tecido e, portanto, também para a prática do tratamento de doenças relacionadas com a angiogénese, compreende a colocação em contacto de um tecido no qual ocorre angiogénese ou está em risco de ocorrer, com uma composição compreendendo uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista $\alpha_v\beta_3$ capaz de inibir a ligação de $\alpha_v\beta_3$ ao seu ligando natural. Deste modo, o método compreende administrar a um doente uma quantidade terapeuticamente eficaz de uma composição fisiologicamente tolerável contendo um antagonista $\alpha_v\beta_3$ da invenção.

As gamas de dosagem para a administração do antagonista $\alpha_v\beta_3$ dependem da forma do antagonista e da sua potência, como adicionalmente descrito aqui e são quantidades suficientemente grandes para produzir o efeito pretendido no qual a angiogénese e os sintomas da doença mediados pela angiogénese são melhorados. A dosagem não deve ser tão grande que provoque efeitos secundários adversos, tais como sindromas de hiperviscosidade, edema pulmonar, falha cardíaca congestiva e semelhantes. Geralmente, a dosagem variará com a idade, condição, sexo e extensão da doença no doente e pode ser determinada por um especialista na técnica. A dosagem pode também se ajustada pelo médico na eventualidade de qualquer complicação.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz é uma quantidade de antagonista $\alpha_v\beta_3$ suficiente para produzir uma inibição mensurável da angiogénese no tecido a tratar, *i. e.*, uma quantidade inibidora da angiogénese. A inibição da angiogénese pode ser

medida *in situ* por imuno-histoquimica, como aqui descrito, ou por outros métodos conhecidos dos especialistas na técnica.

Um antagonista $\alpha_v\beta_3$ pode tomar a forma de um anticorpo monoclonal anti-$\alpha_v\beta_3$ ou seu fragmento e entende-se que a potência e, portanto, uma expressão de uma quantidade "terapeuticamente eficaz" pode variar. Contudo, como mostram os presentes métodos de ensaio, um especialista na técnica pode imediatamente determinar a potência de um candidato a antagonista $\alpha_v\beta_3$ desta invenção.

A potência de um antagonista $\alpha_v\beta_3$ pode ser medida por uma variedade de meios incluindo a inibição da angiogénese no ensaio de CAM, no ensaio do olho de coelho in vivo, no ensaio quimérico rato:humano in vivo e por medição da inibição da ligação do ligando natural a $\alpha_v\beta_3$, todos como aqui descritos e ensaios semelhantes.

Um antagonista $\alpha_v\beta_3$ preferido tem a capacidade de inibir substancialmente a ligação de um ligando natural, tal como fibrinogénio ou vitronectina a $\alpha_v\beta_3$ em solução, a concentrações de antagonista de menos do que 0,5 micromolar (μm), de um modo preferido, menos do que 0,1 μm e, de um modo mais preferido, menos do que 0,05 μm. Por "substancialmente" entende-se que se observa uma redução de, pelo menos, 50 por cento na ligação de fibrinogénio por inibição na presença do antagonista $\alpha_v\beta_3$ e a inibição a 50% é referida aqui como um valor IC_{50}.

Um antagonista $\alpha_v\beta_3$ mais preferido apresenta selectividade para $\alpha_v\beta_3$ sobre outras integrinas. Deste modo, um antagonista $\alpha_v\beta_3$ preferido inibe substancialmente a ligação de fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$ mas não inibe substancialmente a ligação do fibrinogénio a outra

integrina, tal como $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_5$ ou $\alpha_{IIb}\beta_3$. É particularmente preferido um antagonista $\alpha_v\beta_3$ que apresente uma actividade IC_{50} 10 a 100 vezes menor na inibição da ligação do fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$ comparativamente à actividade IC_{50} na inibição da ligação do fibrinogénio a outra integrina. Os exemplos de ensaios para a medição da actividade IC_{50} na inibição da ligação do fibrinogénio a uma integrina são descritos nos Exemplos.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de $\alpha_v\beta_3$ desta invenção na forma de um anticorpo monoclonal é, tipicamente, uma quantidade tal que, quando administrada numa composição fisiologicamente tolerável, é suficiente para atingir uma concentração de plasma de desde cerca de 0,01 microgramas (µg) por mililitro (mL) a cerca de 100 µg/mL, de um modo preferido, desde cerca de 1 µg/mL a cerca de 5 µg/mL e, normalmente, cerca de 5 µg/mL. Apresentado de forma diferente, a dosagem pode variar desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 300 mg/kg, de um modo preferido, desde cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 200 mg/kg, de um modo mais preferido, desde cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 20 mg/kg, numa ou mais doses de administração diária, durante um ou vários dias.

Quando o antagonista está na forma de um fragmento de um anticorpo monoclonal, a quantidade pode ser imediatamente ajustada com base na massa do fragmento relativamente à massa do anticorpo total. Uma concentração de plasma preferida, em molaridade, é desde cerca de 2 micromolar (µM) a cerca de 5 milimolar (mM) e, de um modo preferido, cerca de 100 µM a 1 mM de antagonista do anticorpo.

Uma quantidade terapeuticamente eficaz de um antagonista de $\alpha_v\beta_3$ descrita aqui na forma de um polipéptido ou outra molécula

pequena de tamanho semelhante mimética de $\alpha_v\beta_3$ é, tipicamente, uma quantidade de polipéptido tal que, quando administrada numa composição fisiologicamente tolerável, é suficiente para atingir uma concentração no plasma de desde 0,1 microgramas (µg) por mililitro (mL) a cerca de 200 µg/mL, de um modo preferido, desde cerca de 1 µg/mL a cerca de 150 µg/mL. Com base num polipéptido tendo uma massa de cerca de 500 gramas por mole, a concentração de plasma preferida, em molaridade, é desde cerca de 2 micromolar (µM) a cerca de 5 milimolar (mM) e, de um modo preferido, cerca de 100 µM a 1 mM de antagonista polipeptídico. Afirmado de outro modo, a dosagem por peso corporal pode variar desde cerca de 0,1 mg/kg a cerca de 300 mg/kg e, de um modo preferido, desde cerca de 0,2 mg/kg a cerca de 200 mg/kg, numa ou mais doses de administração diária, durante um ou vários dias.

Os anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados parentericamente por injecção ou por infusão gradual ao longo do tempo. Embora o tecido a ser tratado possa ser, tipicamente, acessível no corpo por administração sistémica e, portanto, muitas vezes tratado por administração intravenosa de composições terapêuticas, podem considerar-se outros tecidos e meios de administração em que existe uma possibilidade de que o tecido alvo contenha a molécula alvo. Deste modo, os anticorpos monoclonais da invenção podem ser administrados intravenosamente, intraperitonialmente, intramuscularmente subcutaneamente, intracavidade, trasdermicamente e podem ser administrados por meios peristálticos.

As composições terapêuticas contendo um anticorpo monoclonal desta invenção são convenientemente administradas intravenosamente, como por injecção de uma dose unitária, por

exemplo. O termo "dose unitária", quando utilizado em referência a uma composição terapêutica da presente invenção, refere-se a unidades fisicamente discretas adequadas como dosagens unitárias para o indivíduo, contendo cada unidade uma quantidade pré-determinada de material activo calculado para produzir o efeito terapêutico pretendido em associação com o diluente requerido; *i. e.*, veículo ou veículo.

Numa forma de realização preferida como mostrada nos Exemplos, o antagonista $\alpha_v\beta_3$ é administrado intravenosamente numa dosagem única.

As composições são administradas de um modo compatível com a formulação da dosagem e numa quantidade terapeuticamente eficaz. A quantidade a ser administrada e a ocasião dependem do indivíduo a tratar, da capacidade do sistema do indivíduo utilizar o ingrediente activo e do grau de efeito terapêutico pretendido. As quantidades exactas de ingrediente activo requeridas para serem administradas dependem da avaliação do médico e são específicas para cada indivíduo. Contudo, são aqui divulgadas gamas de dosagem adequadas para aplicação sistémica e dependem da via de administração. Os regimes adequados para a administração são também variáveis, mas são tipificados por uma administração inicial seguida por doses repetidas em intervalos de uma ou mais horas por uma injecção subsequente ou outra administração. Alternativamente, contemplam-se infusões intravenosas contínuas suficientes para manter concentrações no sangue nas gamas especificadas para terapias in vivo.

Como demonstrado pelos presentes Exemplos, a inibição da angiogénese e a regressão tumoral ocorrem tão cedo como 7 dias após o contacto inicial com o antagonista. É preferida a

exposição adicional ou prolongada ao antagonista durante 7 dias a 6 semanas, de um modo preferido, cerca de 14 a 28 dias.

Os Exemplos também demonstram a relação entre a inibição de $\alpha_v\beta_3$ e a indução da apoptose nas células da neovasculatura que contêm $\alpha_v\beta_3$. Deste modo, também são descritos métodos para a inibição da apoptose na neovasculatura de um tecido. O método é praticado substancialmente como aqui descrito, para a inibição da angiogénese em todos os tecidos e condições descritos para o efeito. A única diferença perceptível é a da ocasião do efeito, que é que a apoptose se manifesta rapidamente, tipicamente, cerca de 48 horas após o contacto com o antagonista, enquanto a inibição da angiogénese e a regressão tumoral se manifestam mais lentamente, como aqui descrito. Esta diferença afecta o regime terapêutico em termos do tempo de administração e efeito pretendido. Tipicamente, a administração para a apoptose da neovasculatura pode ser desde 24 horas a cerca de 4 semanas, embora seja preferido 48 horas a 7 dias.

D. Composições Terapêuticas

A presente invenção contempla composições terapêuticas úteis para a prática dos tratamentos terapêuticos aqui descritos. As composições terapêuticas da presente invenção contêm um veículo fisiologicamente tolerável juntamente com um antagonista $\alpha_v\beta_3$ como aqui descrito, nelas dissolvido ou disperso como ingrediente activo. Numa forma de realização preferida, a composição terapêutica antagonista de $\alpha_v\beta_3$ não é imunogénica quando administrada a um doente mamífero ou humano para efeitos terapêuticos.

Como utilizados aqui, os termos “farmaceuticamente aceitável”, “fisiologicamente tolerável” e suas variações gramaticais, na medida em que se referem a composições, veículos, diluentes e reagentes, são utilizados com o mesmo significado e significam que os materiais são passíveis de ser administrados a um mamífero sem a produção de efeitos fisiológicos indesejáveis, tais como náuseas, tonturas, perturbações gástricas e semelhantes.

A preparação de uma composição farmacológica que contém ingredientes activos nela dissolvidos ou dispersos é bem conhecida na técnica e não necessita de ser limitada com base na formulação. Tipicamente, essas composições são preparadas como injectáveis, como soluções ou suspensões líquidas, contudo, também podem preparar-se formas sólidas adequadas para soluções ou suspensões, num líquido antes da utilização. A preparação pode também ser emulsionada.

O ingrediente activo pode ser misturado com excipientes que sejam farmaceuticamente aceitáveis e compatíveis com o ingrediente activo e em quantidades adequadas para utilização nos tratamentos terapêuticos aqui descritos. Os excipientes adequados são, por exemplo, água, soro fisiológico, dextrose, glicerol, etanol ou semelhantes e suas combinações. Além disso, se pretendido, a composição pode conter pequenas quantidades de substâncias auxiliares, tais como agentes molhantes ou emulsionantes, agentes tamponantes de pH tampão e semelhantes que aumentem a eficácia do ingrediente activo.

A composição terapêutica da presente invenção pode incluir sais farmaceuticamente aceitáveis dos seus componentes. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem os sais de adição ácida

(formados com os grupos amino livres do polipéptido) que são formados com ácidos inorgânicos, tais como, por exemplo, ácidos clorídrico ou fosfórico, ou ácidos orgânicos, tais como acético, tartárico, mandélico e semelhantes. Os sais formados com os grupos carboxilo livres podem também ser derivados de bases inorgânicas, tais como, por exemplo, hidróxidos de sódio, potássio, amónio, cálcio ou férrico, e bases orgânicas, tais como a isopropilamina, trimetilamina, 2-etilaminoetanol, histidina, procaína e semelhantes.

São particularmente preferidos os sais de TFA e HCl, quando utilizados na preparação de antagonistas $\alpha_v\beta_3$ de polipéptidos cíclicos. Os sais de péptidos representativos são descritos nos Exemplos.

Os veículos fisiologicamente toleráveis são bem conhecidos na técnica. Os exemplos dos veículos líquidos são soluções aquosas estéreis que não contêm materiais além dos ingredientes activos e água ou contêm um tampão, tal como fosfato de sódio a um valor de pH fisiológico, soro fisiológico ou ambos, tal como soro fisiológico tamponado com fosfato. Além disso, os veículos aquosos podem conter mais do que um sal de tampão, bem como sais, tais como cloretos de sódio e potássio, dextrose, polietilenoglicol e outros solutos.

As composições líquidas podem também conter fases líquidas além de à exclusão de água ou na sua ausência. São exemplos dessas fases líquidas adicionais a glicerina, óleos vegetais, tais como óleo de semente de algodão e emulsões água-óleo.

Uma composição terapêutica contém uma quantidade inibidora da angiogénese de um antagonista $\alpha_v\beta_3$ da presente invenção,

tipicamente formulada para conter uma quantidade de, pelo menos, 0,1 por cento em peso de antagonista por peso da composição terapêutica total. Uma percentagem em peso é uma relação em peso de inibidor à composição total. Deste modo, por exemplo, 0,1 por cento em peso corresponde a 0,1 gramas de inibidor por 100 gramas de composição total.

E. Antagonistas da Integrina $\alpha_v\beta_3$

Os antagonistas $\alpha_v\beta_3$ são utilizados na presente invenção para inibição da angiogénese em tecidos e podem tomar uma variedade de formas que incluem compostos que interagem com $\alpha_v\beta_3$ de um modo tal que interfiram nas interacções funcionais com ligandos $\alpha_v\beta_3$ naturais. Os antagonistas proporcionados pela invenção são anticorpos monoclonais ou seus fragmentos que imunorreagem com $\alpha_v\beta_3$ e que apresentam actividade de antagonista como aqui definido.

1. Polipéptidos

São descritos os antagonistas $\alpha_v\beta_3$ na forma de polipéptidos. Um antagonista polipeptídico (péptido) $\alpha_v\beta_3$ pode ter características da sequência do ligando natural de $\alpha_v\beta_3$ ou do próprio $\alpha_v\beta_3$ na região envolvida na interacção $\alpha_v\beta_3$-ligando e apresenta uma actividade antagonista de $\alpha_v\beta_3$ como aqui descrito. Um antagonista peptídico $\alpha_v\beta_3$ preferido contém o tripéptido RGD e corresponde em sequência ao ligando natural na região contendo RGD.

Os polipéptidos contendo RGD preferidos têm uma sequência correspondendo à sequência de resíduos de aminoácido da região contendo RGD de um ligando natural de $\alpha_v\beta_3$, tal como fibrinogénio, vitronectina, factor de von Willebrand, laminina, trombospondina e ligandos semelhantes. A sequência destes ligandos $\alpha_v\beta_3$ é bem conhecida. Deste modo, um péptido antagonista de $\alpha_v\beta_3$ pode ser derivado de qualquer dos ligandos naturais, embora se prefiram o fibrinogénio e a vitronectina.

Um antagonista peptídico de $\alpha_v\beta_3$ particularmente preferido inibe, de um modo preferido, a ligação de $\alpha_v\beta_3$ ao(s) seu(s) ligando(s) natural(ais) quando comparado com outras integrinas, como descrito anteriormente. Estes péptidos $\alpha_v\beta_3$ específicos são particularmente preferidos, pelo menos, porque a especificidade pelo $\alpha_v\beta_3$ reduz a incidência de efeitos secundários indesejáveis, tais como a inibição de outras integrinas. A identificação de péptidos antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ preferidos tendo selectividade para $\alpha_v\beta_3$ pode imediatamente ser identificada num ensaio corrente de inibição da ligação, tal como um ensaio ELISA descrito nos Exemplos.

Opcionalmente, um polipéptido compreende não mais do que cerca de 100 resíduos de aminoácido, de um modo preferido, não mais do que cerca de 60 resíduos, de um modo mais preferido, não mais do que cerca de 30 resíduos. Os péptidos podem ser lineares ou cíclicos, embora os péptidos particularmente preferidos sejam cíclicos.

Os péptidos cíclicos e lineares preferidos e as suas designações são mostradas na Tabela 1 nos Exemplos.

Deve entender-se que um polipéptido em questão não necessita de ser idêntico à sequência de resíduos de aminoácidos de um ligando $\alpha_v\beta_3$ natural, desde que inclua a sequência requerida e seja capaz de funcionar como antagonista $\alpha_v\beta_3$ num ensaio, tal como aqueles aqui descritos.

Um polipéptido em questão inclui qualquer análogo, fragmento ou derivado químico de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácidos é aqui mostrada desde que o polipéptido seja um antagonista $\alpha_v\beta_3$. Portanto, um polipéptido presente pode ser submetido a várias modificações, substituições, inserções e eliminações em que estas alterações proporcionam determinadas vantagens para a sua utilização. A este respeito, o polipéptido antagonista $\alpha_v\beta_3$ corresponde, mais do que ser idêntico, à sequência de um péptido citado, em que uma ou mais modificações foram feitas e mantém a capacidade de funcionar como antagonista $\alpha_v\beta_3$ num ou mais dos ensaios como aqui definidos.

Deste modo, um polipéptido pode estar em qualquer de uma variedade de formas de derivados peptídicos, que incluem amidas, conjugados com proteínas, péptidos ciclizados, péptidos polimerizados, análogos, fragmentos, péptidos quimicamente modificados e derivados semelhantes.

O termo “análogo” inclui qualquer polipéptido tendo uma sequência de resíduos de aminoácidos substancialmente idêntica a uma sequência especificamente aqui mostrada, em que um ou mais resíduos foram conservativamente substituídos com um resíduo funcionalmente semelhante e que apresenta actividade antagonista $\alpha_v\beta_3$ como aqui descrita. Os exemplos de substituições conservativas incluem a substituição de um resíduo não-polar

(hidrofóbico), tal como isoleucina, valina, leucina ou metionina por outro, a substituição de um resíduo polar (hidrofílico), tal como entre arginina e lisina, entre glutamina e asparagina, entre glicina e serina por outro, a substituição de um resíduo básico, tal como a lisina, arginina ou histidina por outro ou a substituição de um resíduo acídico, tal como ácido aspártico ou ácido glutâmico por outro.

A expressão "substituição conservativa" também inclui a utilização de um resíduo quimicamente derivatizado no lugar de um resíduo não derivatizado desde que esse polipéptido apresente a actividade de inibição requerida.

"Derivado químico" refere-se a um polipéptido em questão tendo um ou mais resíduos quimicamente derivatizados por reacção de um grupo funcional secundário. Essas moléculas derivatizadas incluem, por exemplo, as moléculas em que os grupos amino livres foram derivatizados de modo a formar cloridratos de amina, grupos p-toluenosulfonilo, grupos carbobenzoxilo, grupos t-butiloxicarbonilo, grupos cloroacetilo ou grupos formilo. Os grupos carboxilo livres podem ser derivatizados para formar sais, ésteres metílicos e etílicos ou outros tipos de ésteres ou hidrazidas. Os grupos hidroxilo livres podem ser derivatizados para formar derivados O-acilo ou O-alquilo. O azoto imidazole da histidina pode ser derivatizado para formar N-imbenzil-histidina. Também incluídos como derivados químicos estão os péptidos que contêm um ou mais derivados de aminoácidos de ocorrência natural dos vinte aminoácidos padrão. Para exemplos: a 4-hidroxiprolina pode ser substituída por prolina; a 5-hidroxilisina pode ser substituída por lisina; a 3-metil-histidina pode ser substituída por histidina; a homoserina pode ser substituída por serina; e a ornitina pode

ser substituída por lisina. Os polipéptidos como aqui descritos também incluem qualquer polipéptido tendo uma ou mais adições e/ou eliminações ou resíduos relativos à sequência de um polipéptido cuja sequência é aqui mostrada, desde que a actividade requerida seja mantida.

O termo "fragmento" refere-se a qualquer polipéptido em questão tendo uma sequência de resíduos de aminoácidos mais curta do que a de um polipéptido cuja sequência de resíduos de aminoácidos é aqui mostrada.

Quando um polipéptido como aqui descrito tem uma sequência que não é idêntica à sequência de um ligando natural de $\alpha_v\beta_3$, o facto deve-se, tipicamente, a terem sido feitas uma ou mais substituições conservativas ou não conservativas, normalmente são substituídos não mais do que cerca de 30% em número e, de um modo preferido, não mais do que 10% em número dos resíduos de aminoácidos. Podem também adicionar-se resíduos adicionais em qualquer das terminações de um polipéptido para efeitos de proporcionar um "ligante" através do qual os polipéptidos desta invenção podem ser convenientemente afixados a um marcador ou matriz sólida ou veículo.

Os marcadores, matrizes sólidas e veículos que podem ser utilizados com os polipéptidos aqui descritos são descritos abaixo.

Os ligantes de resíduos de aminoácidos são normalmente, pelo menos, um resíduo e podem ser 40 ou mais resíduos, mais frequentemente, 1 a 10 resíduos, mas não formam epitopos de ligando de $\alpha_v\beta_3$. Os resíduos de aminoácidos típicos utilizados para ligação são tirosina, cisteína, lisina, ácido glutâmico e

aspártico ou semelhantes. Além disso, um polipéptido em questão pode diferir, a não ser que especificado em contrário, da sequência natural de um ligando de $\alpha_v\beta_3$ através da modificação da sequência por acilação do NH_2 terminal, *e. g.*, acetilação, ou amidação do acido tioglicólico, por carboxilamidação terminal, *e. g.*, com amónia, metilamina e modificações terminais semelhantes. As modificações terminais são úteis, como é bem conhecido, para reduzir a susceptibilidade por digestão de proteinase e, portanto, servem para prolongar a meia vida dos polipéptidos em soluções, particularmente, fluidos biológicos em que possam estar presentes proteases. A este respeito, a ciclização polipeptídica é também uma modificação de terminal útil e é particularmente preferida também devido às estruturas estáveis formadas por ciclização e com vista às actividades biológicas observadas para esses péptidos cíclicos como aqui descritos.

Qualquer péptido aqui descrito pode ser utilizado na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Os ácidos adequados são capazes de formar sais com os péptidos da presente invenção incluem ácidos inorgânicos, tais como ácido trifluoroacético (TFA), ácido clorídrico (HCl), ácido bromídrico, ácido perclórico, ácido nítrico, ácido tiociânico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico acético, ácido propiónico, ácido glicólico, ácido láctico, ácido pirúvico, ácido oxálico, ácido malónico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido antranílico, ácido cinâmico, ácido naftalenossulfónico, ácido sulfanílico ou semelhantes. Os sais de HCl e TFA são particularmente preferidos.

As bases adequadas capazes de formar sais com os péptidos aqui descritos incluem bases inorgânicas, tais como hidróxido de

sódio, hidróxido de amónio, hidróxido de potássio e semelhantes; e bases orgânicas, tais como mono-, di- e tri-alquilo e arilaminas (*e. g.*, trietilamina, di-isopropilamina, metilamina, dimetilamina e semelhantes) e etanolaminas opcionalmente substituídas (*e. g.*, etanolamina, dietanolamina e semelhantes).

Um péptido aqui descrito, também aqui referido como um polipéptido em questão, pode ser sintetizado por qualquer das técnicas que são conhecidas dos especialistas na técnica polipeptídica, incluindo técnicas de ADN recombinante. As técnicas de química sintética, tais como a síntese em fase sólida do tipo Merrifield, são preferidas por razões de pureza, especificidade antigénica, ausência de produtos secundários indesejáveis, facilidade de produção e semelhantes. Um resumo excelente das muitas técnicas disponíveis pode ser encontrado em Steward *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis", W.H. Freeman Co., San Francisco, 1969; Bodanszky, *et al.*, "Peptide Synthesis", John Wiley & Sons, Segunda Edição, 1976; J. Meienhofer, "Hormonal Proteins and Peptides", Vol. 2, p. 46, Academic Press (Nova Iorque), 1983; Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, 1969; Fields *et al.*, Int. J. Peptide Protein Res., 35:161-214, 1990; e Patente dos Estados Unidos N° 4244946 para síntese de péptidos em fase sólida e Schroder *et al.*, "The Peptides", Vol. 1 Academic Press (Nova Iorque), 1965, para síntese clássica em solução. Os grupos protectores apropriados utilizáveis nesta síntese são descritos nos textos acima e em J.F.W. McOmie, "Protective Groups in Organic Chemistry", Plenum Press, Nova Iorque, 1973.

Em geral, os métodos de síntese em fase sólida contemplados compreendem a adição sequencial de um ou mais resíduos de aminoácido ou resíduos de aminoácido adequadamente protegidos a

uma cadeia peptídica em crescimento. Normalmente, o grupo amino ou carboxilo do primeiro resíduo de aminoácido é protegido por um grupo protector selectivamente removível adequado. Um grupo protector selectivamente removível diferente é utilizado para aminoácidos contendo um grupo lateral reactivo, tal como lisina.

Utilizando uma síntese em fase sólida como exemplo, o aminoácido protegido ou derivatizado é conjugado a um suporte sólido inerte através do seu grupo carboxilo ou amino não protegido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é, depois, selectivamente removido e o aminoácido seguinte na sequência que tem o grupo complementar (amino ou carboxilo) adequadamente protegido é misturado e feito reagir sob condições adequadas para formação da ligação amida com o resíduo já conjugado ao suporte sólido. O grupo protector do grupo amino ou carboxilo é, depois, removido deste resíduo de aminoácido novamente adicionado e o próximo aminoácido (adequadamente protegido) é, depois, adicionado e assim sucessivamente. Após todos os aminoácidos pretendidos terem sido ligados na sequência própria, quaisquer grupos protectores terminais e laterais remanescentes (e suporte sólido) são removidos sequencialmente ou simultaneamente, para dar o polipéptido linear final.

Os polipéptidos lineares resultantes preparados, por exemplo, como descrito acima, podem ser feitos reagir para formar os seus péptidos cíclicos correspondentes. Um método exemplificativo para ciclização dos péptidos é descrito por Zimmer *et al.*, Peptides 1992, p. 393-394, ESCOM Science Publishers, B.V., 1993. Tipicamente, o éster metilpeptídico protegido por terc-butoxicarbonilo é dissolvido em metanol e adiciona-se uma solução de hidróxido de sódio e a mistura é feita reagir a 20 °C (20C) para remover hidroliticamente o grupo

protector de éster metílico. Após evaporar o solvente, o péptido protegido por terc-butoxicarbonilo é extraído com acetato de etilo a partir do solvente aquoso acidificado. O grupo protector terc-butoxicarbonilo é, depois, removido sob condições acídicas suaves num co-solvente de dioxano. O péptido linear não protegido com terminações livres amino e carboxilo assim obtido é convertido ao seu péptido cíclico correspondente, por reacção de uma solução diluída do péptido linear, numa mistura de diclorometano e dimetilformamida com diciclo-hexilcarbodiimida na presença de 1-hidroxibenzotriazole e N-metilmorfolina. O péptido cíclico resultante é, depois, purificado por cromatografia.

Um método de síntese do péptido cíclico particularmente preferido é o descrito por Gurrath *et al.*, Eur. J. Biochem., 210:911-921 (1992) e descrito nos Exemplos. Os péptidos particularmente preferidos para utilização nos presentes métodos são c-(GrGDFV) (SEQ ID Nº 4), c-(RGDfV) (SEQ ID Nº 5), c-(RADfV) (SEQ ID Nº 6), c-(RGDFv) (SEQ ID Nº 7) e péptido linear YTAECKPQVTRGDVF (SEQ ID Nº 8), em que "c-" indica um péptido cíclico, as letras maiúsculas são o código de letra única para o aminoácido L e as letras minúsculas são o código de letra única para o aminoácido D. As sequências de resíduos de aminoácidos destes péptidos são também mostradas na SEQ ID Nº 4, 5, 6, 7 e 8, respectivamente.

2. Anticorpos Monoclonais

A presente invenção descreve, numa forma de realização, antagonistas $\alpha_v\beta_3$ na forma de anticorpos monoclonais que imunorreagem com $\alpha_v\beta_3$ e inibem a ligação do $\alpha_v\beta_3$ ao seu ligando

natural como aqui descrito. A invenção também descreve linhas celulares que produzem os anticorpos, métodos para a produção das linhas celulares e métodos para produção dos anticorpos monoclonais.

Um anticorpo monoclonal desta invenção compreende moléculas de anticorpo que 1) imunorreagem com $\alpha_v\beta_3$ isolado e 2) inibem a ligação de fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$. Os anticorpos monoclonais preferidos que se ligam, de um modo preferido, a $\alpha_v\beta_3$, incluem um anticorpo monoclonal tendo as características imunorreactivas de mAb LM609, segregado pela linha celular de hibridoma ATCC HB 9537. A linha celular de hibridoma ATCC HB 9537 foi depositada de acordo com os requisitos do Tratado de Budapeste na American Type Culture Collection (ATCC), 1301 Parklawn Drive, Rockville, Md., EUA, em 15 de Setembro de 1987.

O termo "anticorpo ou molécula de anticorpo" nas suas várias formas gramaticais é aqui utilizado como um substantivo colectivo que se refere a uma população de moléculas de imunoglobulina e/ou partes imunologicamente activas de moléculas de imunoglobulina, *i. e.*, moléculas que contêm um local de combinação de anticorpo ou paratopo.

Um "local de combinação com o anticorpo" é a parte estrutural de uma molécula de anticorpo compreendida por regiões de cadeia pesada e leve, variáveis e hipervariáveis, que se ligam especificamente ao antigénio.

Os exemplos de anticorpos para utilização na presente invenção são moléculas de imunoglobulina intactas, moléculas de imunoglobulina substancialmente intactas e as partes de uma molécula de imunoglobulina que contêm o paratopo, incluindo as

partes conhecidas na técnica por Fab, Fab', $F(ab')_2$ e F(v) e também referidas como fragmentos de anticorpos.

Noutra forma de realização preferida, a invenção contempla uma molécula de imunoglobulina truncada compreendendo um fragmento Fab derivado de um anticorpo monoclonal desta invenção. O fragmento Fab, sem o receptor Fc, é solúvel e proporciona vantagens terapêuticas na meia vida do soro e vantagens de diagnóstico em formas de utilização do fragmento Fab solúvel. A preparação de um fragmento Fab solúvel é geralmente conhecida nas técnicas imunológicas e pode ser conseguida por uma variedade de métodos.

Por exemplo, as partes Fab e $F(ab')_2$ (fragmentos) dos anticorpos são preparadas pela reacção proteolítica de papaína e pepsina, respectivamente, sobre anticorpos substancialmente intactos por métodos que são bem conhecidos. Ver por exemplo, a Patente U.S. Nº 4342566 de Theofilopolous e Dixon. As partes de anticorpos Fab' são também bem conhecidas e são produzidas a partir de partes $F(ab')_2$, seguidas por redução das ligações dissulfureto ligando as duas partes de cadeias pesadas como com mercaptoetanol e seguidas por alquilação da proteína mercaptano resultante com um reagente, tal como iodoacetamida. Prefere-se um anticorpo contendo moléculas de imunoglobulina intactas e são aqui utilizadas a título ilustrativo.

A expressão "anticorpo monoclonal" nas suas várias formas gramaticais refere-se a uma população de moléculas de anticorpo que contêm apenas uma espécie de local de combinação com o anticorpo capaz de imunorreagir com um epítopo particular. Um anticorpo monoclonal apresenta, deste modo, tipicamente uma afinidade de ligação única para qualquer epitopo com o qual

imunorreage. Um anticorpo monoclonal pode, portanto, conter uma molécula de anticorpo tendo uma pluralidade de locais de combinação de anticorpos, cada um imuno-específico por um epitopo diferente, *e. g.*, um anticorpo monoclonal bioespecífico.

Um anticorpo monoclonal é, tipicamente, composto por anticorpos produzidos por clones de uma célula única designada hibridoma que segrega (produz) apenas um tipo de molécula de anticorpo. A célula de hibridoma é formada por fusão de uma célula produtora de anticorpo e um mieloma ou outra linha celular auto-prepetuante. A preparação desses anticorpos foi primeiro descrita por Kohler e Milstein, Nature 256:495-497 (1975), cuja descrição é incorporada por referência. Descrevem-se métodos adicionais em Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, CRC Press, Inc. (1987). Os sobrenadantes de hibridoma assim preparados podem ser rastreados quanto à presença de moléculas de anticorpos que imunorreajam com $\alpha_v\beta_3$ e quanto à inibição da ligação de $\alpha_v\beta_3$ a ligandos naturais.

Resumidamente, para formar o hibridoma a partir do qual a composição de anticorpo monoclonal é produzida, um mieloma ou outra linha celular auto-prepetuante é fundida com linfócitos obtidos do baço de um mamífero hiperimunizado com uma fonte de $\alpha_v\beta_3$, tal como $\alpha_v\beta_3$ isolado de células de melanoma humano M21 como descrito por Cheresh *et al.*, J. Biol. Chem., 262:17703-17711 (1987).

Prefere-se que a linha celular de mieloma utilizada para preparar um hibridoma seja da mesma espécie que os linfócitos. Tipicamente, um rato da estirpe 129 $G1X^+$ é o mamífero preferido. Os mielomas de rato adequados para utilização na presente invenção incluem linhas celulares P3X63-Ag8.653 e Sp2/0-Agl4

sensíveis à hipoxantina-aminopterina-timidina (HAT), que estão disponíveis na American Type Culture Collection, Rockville, Md, sob as designações CRL 1580 e CRL 1581, respectivamente.

Os esplenócitos são, tipicamente, fundidos com células de mieloma utilizando polietilenoglicol (PEG) 1500. Os híbridos fundidos são seleccionados pela sua sensibilidade a HAT. Os hibridomas que produzem um anticorpo monoclonal desta invenção são identificados utilizando o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) descrito nos Exemplos.

Um anticorpo monoclonal da presente invenção pode também ser produzido por iniciação de uma cultura de hibridoma monoclonal compreendendo um meio nutriente contendo um hibridoma que segrega moléculas de anticorpo da especificidade apropriada. A cultura é mantida sob condições e durante um período de tempo suficiente para o hibridoma segregar as moléculas de anticorpo para o meio. O meio contendo o anticorpo é, depois, recolhido. As moléculas de anticorpo podem, depois, ser ainda isoladas por técnicas bem conhecidas.

Os meios úteis para a preparação destas composições são ambos bem conhecidos na técnica e comercialmente disponíveis e incluem meios de cultura sintéticos, ratinhos consanguíneos e semelhantes. Um meio sintético exemplificativo é o meio mínimo essencial de Dulbecco (DMEM; Dubelcco *et al.*, Virol. 8:396, 1959) suplementado com glucose 4,5 gm/L, glutamina 20 mM e soro de feto de vitela a 20%. Um exemplo de uma estirpe de ratos consanguíneos é o Balb/c.

Outros métodos de produzir um anticorpo monoclonal, uma célula de hibridoma ou uma cultura de células de hibridoma são

também bem conhecidos. Ver, por exemplo, o método de isolamento de anticorpos monoclonais de uma colecção imunológica como descrita por Sastry, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:5728-5732 (1989) e Huse *et al.*, Science, 246:1275-1281 (1989).

Está também contemplada nesta invenção a célula de hibridoma e culturas contendo uma célula de hibridoma que produz um anticorpo monoclonal desta invenção. É particularmente preferida a linha celular de hibridoma que segrega o anticorpo monoclonal mAb LM609 designada por ATCC HB 9537. O mAb LM609 foi preparado como descrito por Cheresh *et al.*, J. Biol. Chem., 262:17703-17711 (1987) e a sua preparação é também descrita nos Exemplos.

A invenção contempla, numa forma de realização, um anticorpo monoclonal que tem as características imunorreactivas do mAb LM609.

É também possível determinar, sem experimentação indevida, se um anticorpo monoclonal tem a mesma (*i. e.*, equivalente) especificidade (características imunorreactivas) que um anticorpo monoclonal desta invenção, determinando se o primeiro impede o último de se ligar a uma molécula alvo pré-seleccionada. Se o anticorpo monoclonal a ser testado competir com o anticorpo monoclonal da invenção, como mostrado por um decréscimo na ligação pelo anticorpo monoclonal da invenção em ensaios padrão de competição pela ligação à molécula alvo quando presente na fase sólida, então, é provável que os dois anticorpos monoclonais se liguem ao mesmo epitopo ou a um intimamente relacionado.

Ainda outra forma para determinar se um anticorpo monoclonal tem a especificidade de um anticorpo monoclonal da invenção é o de pré-incubar o anticorpo monoclonal da invenção com a molécula alvo com a qual é normalmente reactivo e, depois, adicionar o anticorpo monoclonal em teste, para determinar se o anticorpo monoclonal em teste é inibido na sua capacidade de se ligar à molécula alvo. Se o anticorpo monoclonal em teste for inibido então, muito provavelmente, ele tem uma especificidade de epitopo idêntica ou funcionalmente equivalente à do anticorpo monoclonal da invenção.

Uma forma adicional para determinar se um anticorpo monoclonal tem a especificidade de um anticorpo monoclonal da invenção é determinar a sequência de resíduos de aminoácido das regiões CDR dos anticorpos em questão. As moléculas de anticorpos tendo sequências de resíduos de aminoácidos idênticas ou funcionalmente equivalentes nas suas regiões CDR têm a mesma especificidade de ligação. Os métodos de sequenciação de polipéptidos são bem conhecidos na técnica.

A imuno-especificidade de um anticorpo, a sua capacidade de se ligar à molécula alvo e a afinidade associada que o anticorpo apresenta para o epitopo, são definidas pelo epitopo com o qual o anticorpo imunorreage. A especificidade de epitopo é definida, pelo menos em parte, pela sequência de resíduos de aminoácido da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina do anticorpo e, em parte, pela sequência de resíduos de aminoácido da região variável de cadeia leve.

A utilização da expressão “possuindo a especificidade de ligação a” indica que anticorpos monoclonais equivalentes apresentam as mesmas características de imunorreacção

(ligação) ou semelhantes e competem pela ligação de uma molécula alvo pré-seleccionada.

Os anticorpos monoclonais humanizados oferecem vantagens particulares relativamente aos anticorpos monoclonais murinos, particularmente, desde que possam ser utilizados terapeuticamente em humanos. Especificamente, os anticorpos humanos não são eliminados da circulação tão rapidamente como os antigénios "estranhos" e não activam o sistema imunitário da mesma forma que os antigénios estranhos e anticorpos estranhos. Os métodos de preparação de anticorpos "humanizados" são geralmente bem conhecidos na técnica e podem ser facilmente aplicados aos anticorpos da presente invenção.

Deste modo, a invenção contempla, numa forma de realização, um anticorpo monoclonal desta invenção que é humanizado por enxerto para introduzir componentes do sistema imunitário humano sem interferir substancialmente com a capacidade do anticorpo se ligar ao antigénio.

São particularmente preferidos os antagonistas que interferem especificamente com a função $\alpha_v\beta_3$ e não interferem com a função de outras integrinas.

F. Métodos para Identificação de Antagonistas de $\alpha_v\beta_3$

A invenção também descreve métodos de ensaio para identificação dos candidatos a antagonistas $\alpha_v\beta_3$ para utilização de acordo com os presentes métodos. Nestes métodos de ensaio, as moléculas candidatas são avaliadas quanto à sua potência de inibição da ligação de $\alpha_v\beta_3$ a ligandos naturais e, além disso,

são avaliadas quanto à sua potência de inibição da angiogénese num tecido.

O primeiro ensaio mede a inibição da ligação directa de um ligando natural a $\alpha_v\beta_3$ e, nos Exemplos, descreve-se uma forma de realização preferida, em pormenor. O ensaio mede, tipicamente, o grau de inibição da ligação de um ligando natural, tal como fibrinogénio, a $\alpha_v\beta_3$ isolado na fase sólida por ELISA.

O ensaio pode também ser utilizado para identificar compostos que apresentam especificidade para $\alpha_v\beta_3$ e não inibem os ligandos naturais de se ligarem a outras integrinas. O ensaio de especificidade é conduzido realizando ensaios ELISA paralelos em que o $\alpha_v\beta_3$ e outras integrinas são rastreados simultaneamente em câmaras de ensaio separadas quanto às suas respectivas capacidades de se ligarem a um ligando natural e quanto ao composto candidato inibir as respectivas capacidades de as integrinas se ligarem a um ligando pré-seleccionado. Os formatos de ensaio de rastreio preferidos são descritos nos Exemplos.

O segundo ensaio mede a angiogénese na membrana corioalantóica (CAM) de um pinto e é referido como o ensaio de CAM. O ensaio de CAM tem sido descrito em pormenor por outros e tem ainda sido utilizado para medir a angiogénese e a neovascularização de tecidos tumorais. Ver Ausprunk *et al.*, Am. J. Pathol., 79:597-618 (1975) e Ossonski *et al.*, Cancer Res., 40:2300-2309 (1980).

O ensaio de CAM é um modelo de ensaio bem reconhecido para angiogénese in vivo porque ocorre neovascularização do tecido completo e os próprios vasos sanguíneos do embrião do pinto crescem para a CAM ou para o tecido crescido na CAM.

Como aqui demonstrado, o ensaio de CAM ilustra a inibição da neovascularização com base na quantidade e extensão de crescimento de novos vasos. Além disso, é fácil controlar o crescimento de qualquer tecido transplantado na CAM, tal como um tecido tumoral. Finalmente, o ensaio é particularmente útil devido a existir um controlo interno quanto à toxicidade no sistema de ensaio. O embrião do pinto é exposto a qualquer reagente de teste e, como tal, a saúde do embrião é uma indicação de toxicidade.

O terceiro ensaio mede a angiogénese no modelo do olho de coelho in vivo e é referido como o ensaio do olho do coelho. O ensaio do olho do coelho foi descrito em pormenor por outros e, além disso, foi utilizado para medir angiogénese e neovascularização na presença de inibidores angiogénicos, tal como a talidomida. Ver D'Amato, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:4082-4085 (1994).

O ensaio do olho do coelho é um modelo de ensaio bem conhecido para angiogénese in vivo dado que o processo de neovascularização, exemplificado pelo crescimento dos vasos sanguíneos dos coelhos da periferia da córnea para a córnea, é facilmente visualizado através da córnea naturalmente transparente do olho. Além disso, a extensão e a quantidade de estímulo ou inibição da neovascularização ou regressão de neovascularização pode ser facilmente controlada ao longo do tempo.

Finalmente, o coelho é exposto a qualquer reagente de teste e, portanto, a saúde do coelho é uma indicação de toxicidade do reagente de teste.

O quarto ensaio mede a angiogénese no modelo de rato quimérico:humano do rato e é referido como o ensaio do rato quimérico. O ensaio foi já descrito em pormenor por outros, e foi ainda descrito aqui para a medição da angiogénese, neovascularização e regressão dos tecidos tumorais. Ver Yan, *et al.*, J. Clin. Invest., 91:986-996 (1993). O ensaio do rato quimérico é um modelo de ensaio da angiogénese in vivo útil devido aos enxertos de pele transplantados se parecerem muito de perto com a pele humana normal histologicamente e a neovascularização do tecido completo ocorre onde os próprios vasos sanguíneos humanos crescem da pele humana enxertada para o tecido humano tumoral na superfície da pele humana enxertada. A origem da neovascularização para o enxerto humano pode ser demonstrada por coloração imuno-histoquímica da neovasculatura com marcadores de células endoteliais específicos de humanos.

Como aqui demonstrado, o ensaio quimérico do rato demonstra a regressão da neovascularização com base na quantidade e na extensão da regressão de crescimento de novos vasos. Além disso, é fácil seguir os efeitos no crescimento de qualquer tecido transplantado na pele enxertada, tal como um tecido tumoral. Finalmente, o ensaio é útil porque existe um controlo interno de toxicidade no sistema de ensaio. O rato quimérico é exposto a qualquer reagente de teste e, portanto, a saúde do rato é uma indicação de toxicidade.

Exemplos

Os seguintes exemplos relacionados com esta invenção são ilustrativos e não devem, evidentemente, ser considerados como limitando especificamente a invenção.

1. Preparação de Péptidos Sintéticos

Este exemplo não se encontra abrangido pelo âmbito da invenção e é incorporado apenas para efeitos ilustrativos. Os polipéptidos lineares e cíclicos listados na Tabela 1 foram sintetizados utilizando técnicas de síntese em fase sólida correntes como, por exemplo, as descritas por Merrifield, Adv. Enzymol., 32:221-96, (1969), e Fields, G.B. e Noble, R.L., Int. J. Peptide protein Res., 35:161-214, (1990).

Em primeiro lugar, dissolveram-se duas gramas (g) de BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OMe (SEQ ID N° 1) em 60 mililitros (mL) de metanol ao qual se adicionaram 1,5 mL de uma solução de hidróxido de sódio 2 N de modo a formar uma mistura. A mistura foi, depois, agitada durante 3 horas a 20 graus C (20 °C). Após evaporação, o resíduo foi dissolvido em água, acidificado a pH 3 com HCl diluído e extraído com acetato de etilo. O extracto foi seco sobre Na_2SO_4, evaporado novamente e o BOC-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH (SEQ ID N° 2) resultante foi agitado a 20 °C durante 2 horas com 20 mL de HCl 2 N em dioxano. A mistura resultante foi evaporada para obter H-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val-OH (SEQ ID N° 3) que foi subsequentemente dissolvido numa mistura de 1800 mL de diclorometano e 200 mL de dimetilformamida (DMF) seguido por arrefecimento a 0 °C. Posteriormente, adicionaram-se sucessivamente 0,5 g de diciclo-hexilcarbodiimida (DCCI), 0,3 g de 1-hidroxibenzotriazole (HOBt) e 0,23 mL de N-metilmorfolina com agitação.

A mistura resultante foi agitada durante mais 24 horas a 0 C° e, depois, a 20 °C durante outras 48 horas. A solução foi concentrada e tratada por permuta iónica de leito misto para libertá-la dos sais. Após remover a resina resultante por

filtração, a solução clarificada foi evaporada e o resíduo foi purificado por cromatografia resultando na recuperação de ciclo(-Gly-D-Arg-Gly-Asp-Phe-Val) (SEQ ID Nº 4). Os seguintes péptidos, listados na Tabela 1 utilizando abreviaturas dos resíduos de aminoácido com uma única letra e identificados por uma designação de número peptídico, foram obtidos de forma 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). Um péptido designado por 66203, tendo uma sequência idêntica à do péptido 62184, apenas diferiu do último por conter o sal HCl em vez do sal TFA presente em 62184. Nos ensaios de inibição da angiogénese, como descritos no Exemplo 7, em que se utilizaram os péptidos sintéticos, o péptido 66203 tendo HCl foi ligeiramente mais eficaz na inibição da angiogénese do que o péptido idêntico em TFA.

Tabela 1

Péptido Nº	Sequência de Aminoácidos*	SEQ ID Nº
62181	ciclo(GrGDFV)	4
62184	ciclo(RGDfV)	5
62185	ciclo(RADfV)	6
62187	ciclo(RGDFv)	7
62880	YTAECKPQVTRGDVF	8
62186	ciclo(RaDFV)	9
62175	ciclo(ARGDfL)	10
62179	ciclo(GRGDfL)	11
62411	TRQVVCDLGNPM	12
62503	GWRNNEALARLS	13

(continuação)

Péptido Nº	Sequência de Aminoácidos*	SEQ ID Nº
62502	TDVNGDGRHDL	14

* As letras minúsculas indicam um aminoácido D; as letras maiúsculas indicam um aminoácido L.

Um péptido designado como 69601, tendo uma sequência idêntica à do péptido 62185, apenas diferiu do último por conter o sal HCl em vez do sal TFA presente em 62184.

O péptido cíclico c-RADfv (69601) mostrou inibir a ligação do fibrinogénio à integrina $\alpha_v\beta_3$ e não inibir a ligação do fibrinogénio às integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_1$ (Pfaff, *et al.*, J. Biol. Chem., 269:20233-20238, 1994). Deste modo, o péptido c-RADfV é especifico para $\alpha_v\beta_3$.

2. Anticorpos Monoclonais

O anticorpo monoclonal LM609 segregado pelo hibridoma ATCC HB 9537 foi produzido utilizando métodos de hibridoma correntes por imunização com $\alpha_v\beta_3$ isolado absorvido em esferas de lecitina de Sepharose em lentilhas. O $\alpha_v\beta_3$ foi isolado a partir de células de melanoma humano designadas M21 e produziu-se o anticorpo como descrito por Cheresh *et al.*, J. Biol. Chem., 262:17703-17711 (1987). As células M21 foram proporcionadas pelo Dr. D.L. Morton (Universidade da Califórnia em Los Angeles, CA) e cultivadas em culturas de suspensão em meio de cultura RPMI 1640 contendo L-glutamina 2 mM, sulfato de gentamicina 50 mg/mL e soro de vitelo fetal a 10%.

O anticorpo monoclonal LM609 mostrou imunorreagir especificamente com o complexo $\alpha_v\beta_3$ e não imunorreagir com a subunidade α_v, com a subunidade β_3 ou com outras integrinas.

3. Caracterização da Distribuição Tecidual da Expressão de $\alpha_v\beta_3$

A. Imuno-Fluorescência com Anticorpos Receptores de Anti-Integrinas

Durante a cicatrização de feridas, as membranas basais dos vasos sanguíneos expressam várias proteínas adesivas, incluindo o factor de von Willebrand, fibronectina e fibrina. Além disso, vários membros da família da integrina dos receptores de adesão são expressos na superfície de células de músculos lisos e endoteliais cultivadas. Ver, Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471 (1987); Janat *et al.*, J. Cell-Physiol., 151:588 (1992) e Cheng *et al.*, J. Cell Physiol., 139:275 (1989). Entre estas integrinas está o $\alpha_v\beta_3$, o receptor celular endotelial do factor de von Willebrand, fibrinogénio (fibrina) e a fibronectina como descrito por Cheresh, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:6471 (1987). Esta integrina inicia uma via de sinalização dependente do cálcio conduzindo à migração de células endoteliais e, portanto, parece desempenhar um papel fundamental na biologia celular vascular como descrito por Leavelsey *et al.*, J. Cell Biol., 121:163 (1993).

Para investigar a expressão de $\alpha_v\beta_3$ durante a angiogénese, obteve-se tecido de granulação de ferimentos humanos ou de pele adjacente normal de doentes com o seu consentimento, que se lavou com 1 mL de soro fisiológico tamponado com fosfato e

embebeu-se num meio O.T.C. (Tissue Tek). Os tecidos embebidos foram congelados rapidamente em azoto líquido durante, aproximadamente, 30 a 45 segundos. Cortaram-se secções de seis mícron de espessura dos blocos congelados num micrótomo criostático para subsequente coloração com imuno-peroxidase com anticorpos específicos de integrinas β_3 ($\alpha_v\beta_3$ ou $\alpha_{IIb}\beta_3$) ou da subfamília β_1 de integrinas.

Os resultados da coloração na pele humana normal e no tecido de granulação de ferimentos são mostrados nas Figuras 1A-1D. Os anticorpos monoclonais AP3 e LM534, dirigidos a integrinas β_3 e β_1, respectivamente, foram utilizados para análise imuno-histoquímica das secções congeladas. As experiências com tecidos de quatro dadores humanos diferentes produziram resultados idênticos. As fotomicrografias são apresentadas com uma ampliação de 300x.

A integrina $\alpha_v\beta_3$ foi abundantemente expressa nos vasos sanguíneos do tecido de granulação (Figura 1B) mas não foi detectada na derme e epitélio da pele normal do mesmo dador (Figura 1A). Contrariamente, as integrinas β_1 foram abundantemente expressas em vasos sanguíneos e células do estroma em pele normal (Figura 1C) e tecido de granulação (Figura 1D) e, como anteriormente mostrado na descrição de Adams *et al.*, Cell, 63:425 (1991), nas células basais dentro do epitélio.

B. Imuno-Fluorescência com Anticorpos Anti-Ligandos

Examinaram-se também secções adicionais de pele normal e tecidos de granulação humanos, acima preparados, quanto à

presença de ligandos das integrinas β_3 e β_1, factor de von Willebrand e laminina, respectivamente. O factor de von Willebrand direccionou-se para os vasos sanguíneos na pele normal (Figura 2A) e tecido de granulação (Figura 2B), enquanto a laminina se direccionou para todos os vasos sanguíneos bem como para a membrana basal epitelial em ambas as preparações de tecidos (Figuras 2C e 2D).

C. Distribuição de Anticorpos Anti-$\alpha_v\beta_3$ no Tecido canceroso

Além das análises acima, examinaram-se também biopsias de tecido canceroso de doentes humanos quanto à presença e distribuição de $\alpha_v\beta_3$. Os tecidos foram preparados como descrito no Exemplo 1A com a excepção de que foram corados com o anticorpo monoclonal LM609 preparado no Exemplo 2 que é específico do complexo receptor de integrina, $\alpha_v\beta_3$. Além disso, os tumores foram, também, preparados para análise histológica microscópica por fixação de exemplos representativos de tumores em Fixador Bulins durante 8 horas e as secções em série foram cortadas e coradas com H&E.

Os resultados da coloração com imuno-peroxidase de tecidos de cancro da bexiga, cólon, mama e pulmão são mostrados nas Figuras 3A-3D, respectivamente. O $\alpha_v\beta_3$ é abundantemente expresso apenas nos vasos sanguíneos presentes nas quatro biopsias de cancro analisadas e não em quaisquer outras células presentes no tecido.

Os resultados aqui descritos mostram, deste modo, que o receptor de integrina $\alpha_v\beta_3$ é selectivamente expresso em tipos específicos de tecido, nomeadamente, tecidos metastáticos,

granulados e outros tecidos nos quais ocorre angiogénese e não em tecido normal onde a formação de novos vasos sanguíneos foi interrompida. Portanto, estes tecidos proporcionam um alvo ideal para os aspectos terapêuticos desta invenção.

4. Identificação de Péptidos Sintéticos Específicos de $\alpha_v\beta_3$ Detectados por um Ensaio de Ligação Ligando-Receptor

Este exemplo não se encontra abrangido pelo âmbito da invenção e é incorporado apenas para efeitos ilustrativos. Os péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 foram rastreados por medição da sua capacidade de antagonizar a actividade de ligação dos receptores $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ em ensaios purificados de ligação ligando-receptor. O método para estes estudos de ligação foi descrito por Barbas *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 90:10003-10007 (1993), Smith *et al.*, J. Biol. Chem., 265:11008-11013 (1990) e Pfaff *et al.*, J. Biol. Chem., 269:20233-20238 (1994), cujas divulgações são, por este meio, incorporadas por referência.

Descreve-se aqui um método de identificação de antagonistas num ensaio de ligação ligando-receptor em que o receptor é imobilizado a um suporte sólido e o ligando e antagonista são solúveis. Descreve-se, também, um ensaio de ligação ligando-receptor em que o ligando é imobilizado a um suporte sólido e o receptor e antagonistas são solúveis.

Resumidamente, as integrinas purificadas seleccionadas foram separadamente imobilizadas em poços de microtitulação Titertek numa concentração de revestimento de 50 nanogramas (ng) por poço. A purificação dos receptores utilizada nos ensaios de

ligação ligando-receptor é bem conhecida na técnica e é facilmente obtenível por métodos familiares aos actuais especialistas na técnica. Após incubação durante 18 horas a 4 °C, os locais de ligação não específicos na placa foram bloqueados com 10 miligramas/mililitro (mg/mL) de albumina de soro bovino (BSA) em soro fisiológico tamponado com Tris. Para os estudos de inibição, testaram-se várias concentrações de péptidos seleccionados da Tabela 1 quanto à capacidade de bloquear a ligação da ^{125}I-vitronectina ou ^{125}I-fibrinogénio aos receptores de integrina, $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$. Embora estes ligandos apresentem uma ligação óptima a uma integrina particular, a vitronectina para $\alpha_v\beta_3$ e o fibrinogénio para $\alpha_{IIb}\beta_3$, os estudos de inibição de ligação utilizando péptidos para bloquear a ligação de fibrinogénio a qualquer receptor permitiram a determinação exacta da quantidade em micromoles (μM) de péptido necessário para inibir em metade do máximo a ligação do receptor ao ligando. Utilizaram-se ligandos radiomarcados em concentrações de 1 nM e a ligação foi testada separadamente com péptidos sintéticos não marcados.

Depois de uma incubação de três horas, o ligando livre foi removido por lavagem e o ligando ligado foi detectado por contagem gama. Os dados dos ensaios onde os péptidos cíclicos seleccionados listados na Tabela 1 foram utilizados para inibir a ligação dos receptores e do fibrinogénio radiomarcado a receptores $\alpha_v\beta_3$ e $\alpha_{IIb}\beta_3$ imobilizados separadamente foram altamente reprodutíveis com o erro entre os pontos de dados tipicamente abaixo de 11%. Os dados de IC_{50} em micromoles (IC_{50} μM) são expressos como média dos pontos de dados em duplicado ± o desvio padrão como mostra a Tabela 2.

Tabela 2

Péptido N°	$\alpha_v\beta_3$ (IC_{50} μM)	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (IC_{50} μM)
62181	1,96 ± 0,62	14,95 ± 7,84
62184	0,05 ± 0,001	0,525 ± 0,10
62185	0,885 ± 0,16	100 ± 0,001
62187	0,05 ± 0,001	0,26 ± 0,056
62186	57,45 ± 7,84	100 ± 0,001
62175	1,05 ± 0,07	0,63 ± 0,18
62179	0,395 ± ,21	0,055 ± 0,007

Deste modo, os péptidos ciclizados contendo RGD ou derivatizados de RGD 62181, 62184, 62185 e 62187, cada um possuindo um resíduo aminoácido D, apresentaram inibição preferencial da ligação de fibrinogénio ao receptor $\alpha_v\beta_3$ como medido pela concentração inferior do péptido requerida para metade da inibição máxima comparada com a do receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Contrariamente, os outros péptidos cíclicos contendo RGD ou derivatizados de RGD, 62186, 62175 e 62179, não foram tão eficazes no bloqueio da ligação de fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$ nem apresentaram uma inibição preferencial da ligação de fibrinogénio a $\alpha_{IIb}\beta_3$ comparativamente a $\alpha_v\beta_3$. Estes resultados são consistentes com os recentemente publicados por Pfaff, *et al.*, J. Biol. Chem., 26920233-20238 (1994) nos quais o péptido cíclico RGDFV (em que F indica o resíduo de aminoácido D) inibiu especificamente a ligação de fibrinogénio à integrina $\alpha_v\beta_3$ e não às integrinas $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou $\alpha_5\beta_3$. Realizaram-se ensaios de inibição da ligação semelhantes com péptidos linearizados com ou sem o motivo RGD, cujas sequências foram derivadas da subunidade receptora α_v, subunidade receptora α_{IIb} ou sequências de resíduos de aminoácidos de ligando de vitronectina. As sequências dos

péptidos lineares, 62880 (resíduos de aminoácidos VN-derivados 35-49), 62411 (resíduos de aminoácidos α_v derivados 676-687) 62503 (resíduos de aminoácidos α_v-derivados 655-677) e 62502 (resíduos de aminoácidos α_{IIb}-derivados 296-306), são listados na Tabela 1. Cada um destes péptidos foi utilizado em ensaios separados para inibir a ligação da vitronectina (VN) ou fibrinogénio (FG) a $\alpha_{IIb}\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_3$. Os dados de IC_{50} em micromoles (IC_{50} μM) de um ensaio individual para cada experiência são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3

Péptido N°	$\alpha_{IIb}\beta_3$ IC_{50} (μM)		$\alpha_v\beta_3$ IC_{50} (μM)	
	FG	VN	FG	VN
62880	4,2	0,98	<0,1	0,5
62411	>100	>100	>100	>100
62503	>100	>100	>100	>100
62502	90	5	>100	>100

Os resultados dos ensaios de inibição da ligação dos ligandos para seleccionar os receptores de integrina com péptidos linearizados mostram que apenas o péptido 62880 foi eficaz na inibição de metade do valor máximo da ligação de FG ou VN a $\alpha_v\beta_3$ como medido pela concentração inferior do péptido necessária para metade da inibição máxima comparativamente ao receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$. Nenhum dos outros péptidos linearizados foi eficaz no bloqueio da ligação dos ligandos a $\alpha_v\beta_3$, embora o péptido 62502 tenha sido eficaz no bloqueio da ligação de VN a $\alpha_{IIb}\beta_3$.

Deste modo, o ensaio ligando-receptor aqui descrito pode ser utilizado para detectar péptidos sintéticos circulares ou linearizados que apresentem especificidade selectiva para um receptor de integrina particular, especificamente $\alpha_v\beta_3$, como os utilizados como antagonistas de receptor de vitronectina ($\alpha_v\beta_3$) na prática desta invenção.

5. Caracterização da Membrana Corioalantóica (CAM) de Pinto Não Tratada

A. Preparação da CAM

A angiogénese pode ser induzida na membrana corioalantóica (CAM) do pinto após a angiogénese embriónica normal ter resultado na formação de vasos sanguíneos maduros. A angiogénese mostrou ser induzida em resposta às citocinas ou fragmentos tumorais específicos, como descrito por Leibovich *et al.*, Nature, 329:630 (1987) e Ausprunk *et al.*, Am. J. Pathol., 79:597 (1975). As CAM foram preparadas a partir de embriões de pintos para subsequente indução da angiogénese e sua inibição como descrito nos Exemplos 6 e 7, respectivamente. Obtiveram-se embriões de pintos com dez dias a partir de McIntyre Poultry (Lakeside, CA) e incubaram-se a 37 °C com humidade a 60%. Efectuou-se um pequeno furo através da casca, na extremidade do ovo directamente sobre o saco de ar, com a utilização de uma broca de pequeno calibre (Dremel, Division of Emerson Electric Co. Racine WI). Perfurou-se um segundo furo no lado mais largo do ovo numa região desprovida de vasos sanguíneos embriónicos determinada anteriormente por miragem do ovo. Aplicou-se uma pressão negativa ao furo original, o que resultou no destacamento da CAM (membrana corioalatóica) da membrana da

casca e na criação de um saco de ar falso por cima da CAM. Cortou-se uma janela quadrada de 1,0 centímetro (cm) x 1,0 cm através da casca sobre a CAM destacada com a utilização de uma pequena roda de modelo de corte (Dremel). A pequena janela permitiu acesso directo à CAM subjacente.

A preparação da CAM resultante foi, depois, utilizada aos 6 dias de embriogénese, um estágio marcado por uma neovascularização activa, sem tratamento adicional à CAM, reflectindo o modelo utilizado para avaliar os efeitos da neovascularização embriónica ou utilizada aos 10 dias de embriogénese, em que a angiogénese diminuiu. Esta última preparação foi, deste modo, utilizada nesta invenção para induzir a renovação da angiogénese em resposta ao tratamento com citocinas ou contacto com o tumor como descrito no Exemplo 6.

B. Histologia da CAM

Para analisar a estrutura microscópica das CAM dos embriões de pintos e/ou dos tumores humanos que foram resseccionados a partir dos embriões de pintos como descrito no Exemplo 8, as CAM e os tumores foram preparados por seccionamento por congelação como descrito no Exemplo 3A. Cortaram-se secções de seis mícron de espessura a partir dos blocos congelados com um micrótomo criostático para análise de imuno-fluorescência.

A Figura 4 mostra uma fotomicrografia típica de uma área livre de vasos sanguíneos numa CAM não tratada com 10 dias. Uma vez que a angiogénese no sistema de CAM é reduzida por este estágio de embriogénese, o sistema é útil nesta invenção para estimular a produção de nova vasculatura a partir de vasos

existentes das áreas adjacentes para áreas da CAM, actualmente sem quaisquer vasos.

C. Perfis de Integrina na CAM Detectados por Imuno-fluorescência

Para observar a Distribuição Tecidual dos receptores de integrina presentes nos tecidos da CAM, fixaram-se secções congeladas de 6 mícron (µm) de tecido tumoral e tecidos de CAM de embrião de pinto em acetona durante 30 segundos e efectuou-se uma coloração por imuno-fluorescência com 10 microgramas/mililitro (µg/mL) de mAb CSAT, um anticorpo monoclonal específico da subunidade de integrina β_1 como descrito por Buck *et al.*, J. Cell Biol., 107:2351 (1988) e utilizaram-se, deste modo, como controlos, ou LM609 como preparado no Exemplo 2. A coloração primária foi seguida por coloração com uma diluição 1:250 de anticorpo secundário de cabra anti-rato marcado com rodamina (Tago) para permitir a detecção do produto de imunorreacção primário. As secções foram depois analisadas com um microscópio composto de imuno-fluorescência Zeiss.

Os resultados da análise de imuno-fluorescência mostram que os vasos sanguíneos maduros presentes num embrião de pinto com 10 dias não tratado expressaram a subunidade de integrina β_1 (Figura 5A). Contrariamente, numa secção em série do tecido mostrado na Figura 5A, não se revelou imunorreactividade com LM609 (Figura 5B). Deste modo, a integrina $\alpha_v\beta_3$ detectada pelo anticorpo LM609 não foi activamente expressa pelos vasos sanguíneos maduros presentes num embrião de pinto de 10 dias de idade não tratado. Como mostrado no modelo CAM e nos seguintes Exemplos, à medida que os vasos sofrem um novo crescimento na

embriogénese normal ou induzida pelas citocinas ou tumores, os vasos sanguíneos expressam o $\alpha_v\beta_3$. Contudo, depois da neovascularização activa, uma vez terminado o desenvolvimento dos vasos, a expressão de $\alpha_v\beta_3$ diminui para níveis não detectáveis por análise de imuno-fluorescência. Esta regulação da expressão de $\alpha_v\beta_3$ nos vasos sanguíneos em processo de angiogénese em contraste com a falta de expressão nos vasos maduros proporciona a capacidade única desta invenção de controlar e inibir a angiogénese como se mostra nos Exemplos seguintes, como modelado utilizando o sistema de ensaio de angiogénese da CAM.

6. Ensaio de Angiogénese da CAM

A. Angiogénese Induzida por Factores de Crescimento

A angiogénese mostrou ser induzida por citocinas ou factores de crescimento, como referenciado no Exemplo 5A. Nas experiências aqui descritas, a angiogénese na preparação de CAM descrita no Exemplo 5 foi induzida por factores de crescimento que estavam topicamente sobre os vasos sanguíneos da CAM como aqui descrito.

A angiogénese foi induzida por colocação de um disco de papel de filtro Whatman de 5 milímetros (mm) x 5 mm (papel de Filtro Whatman N° 1) saturado com uma Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS, GIBCO, Grand Island, NY) ou HBSS contendo 150 nanogramas/mililitro (ng/mL) de factores de crescimento básicos de fibroblasto recombinante (βFGF) (Genzyme, Cambridge, MA) na CAM de um embrião de pinto com 10 dias numa região livre de vasos sanguíneos e as janelas foram depois seladas com fita

adesiva. Noutros ensaios, βFGF a 125 ng/mL foi também eficaz na indução do crescimento dos vasos sanguíneos. A angiogénese foi monitorizada por fotomicroscopia após 72 horas. As CAM foram rapidamente congeladas e fixaram-se secções criostáticas de 6 µm com acetona e coraram-se por imuno-fluorescência, como descrito no Exemplo 5C, com 10 µg/mL de anticorpo monoclonal anti-β_1 CSAT ou LM609.

A fotomicrografia de imuno-fluorescência na Figura 5C mostra a expressão melhorada de $\alpha_v\beta_3$ durante a angiogénese induzida por βFGF na CAM de pinto, em contraste com a ausência de expressão de $\alpha_v\beta_3$ numa CAM de pinto não tratada, como mostra a Figura 5B. O $\alpha_v\beta_3$ foi imediatamente detectável em muitos (75% a 80%) dos vasos nas CAM tratadas com βFGF. Além disso, a expressão da integrina β_1 não se alterou relativamente à que se observa numa CAM não tratada dado que o β_1 era também facilmente detectável nos vasos sanguíneos estimulados.

A expressão relativa das integrinas $\alpha_v\beta_3$ e β_1 foi depois quantificada durante a angiogénese induzida por βFGF por análise da imagem confocal de laser das secções criostáticas da CAM. As secções coradas foram depois analisadas num microscópio confocal de laser Zeiss. Seleccionaram-se vinte e cinco vasos corados com LM609 e 15 corados com CSAT (tamanho médio ~1200 sq mm^2, gama de 350 a 3500 mm^2) a partir de campos aleatórios e mediu-se a fluorescência média com rodamina para cada vaso, por unidade de área em unidades arbitrárias por análise de imagem confocal de laser. Os dados são expressos como a média da intensidade de fluorescência em unidades arbitrárias de vasos ± erro padrão (SE).

Os resultados representados graficamente na Figura 6 mostram que a coloração de $\alpha_v\beta_3$ foi significativamente aumentada (quatro vezes maior) nas CAM tratadas com βFGF como determinado pelo Teste de Soma das Classes de Wilcoxon ($p<0,0001$) enquanto a coloração β_1 não foi significativamente diferente com o tratamento βFGF.

O ensaio de CAM foi ainda utilizado para examinar o efeito de outro potente indutor da angiogénese, o factor alfa de necrose tumoral (TNFα), na expressão das integrinas β_1 e β_3. Verificou-se que os discos de papel de filtro impregnados com βFGF e TNFα e colocados nas CAM de embriões com 10 dias promovem a angiogénese local após 72 horas.

Os resultados são mostrados em fotomicrografias de CAM não tratadas (Figura 7A), tratadas com βFGF (Figura 7B) ou tratadas com TNFα (Figura 7C). Os vasos sanguíneos são facilmente evidentes em ambas as preparações tratadas com βFGF e TNFα mas não estão presentes na CAM não tratada. Deste modo, a aplicação tópica de um factor de crescimento/citocina resultou na indução da angiogénese dos vasos maduros numa área adjacente à área originalmente desprovida de vasos sanguíneos. Considerando os vasos sanguíneos induzidos por βFGF e a expressão concomitante de $\alpha_v\beta_3$ como mostra a Figura 5C, o tratamento de TNFα resulta em actividades comparáveis.

Estas constatações indicam que em humanos e pintos, os vasos sanguíneos envolvidos na angiogénese mostram uma expressão reforçada de $\alpha_v\beta_3$. Consistente com isto, a expressão de $\alpha_v\beta_3$ nas células endoteliais de cultura pode ser induzida por várias citocinas in vitro como descrito por Janat *et al.*, J. Cell Physiol., 151:588 (1992); Enenstein *et al.*, Exp. Cell Res.,

203:499 (1992) e Swerlick *et al.*, J. Invest. Derm., 99:715 (1993).

O efeito na angiogénese induzida por factores de crescimento de inibidores de anticorpos e péptidos é apresentado nos Exemplos 7A e 7B.

B. Angiogénese Embriónica

A preparação de CAM para a avaliação do efeito dos inibidores da angiogénese na formação natural da neovasculatura embriónica foi a do embrião de pinto com seis dias, como descrito anteriormente. Neste estádio de desenvolvimento, os vasos sanguíneos são submetidos a um novo crescimento e, deste modo, proporcionam um sistema útil para determinar se o $\alpha_v\beta_3$ participa na angiogénese embriónica. O sistema de CAM foi preparado como descrito acima com a excepção que o ensaio foi realizado no dia 6 do embrião em vez de no dia 10. O efeito na angiogénese embriónica por tratamento com anticorpos e péptidos desta invenção é apresentado no Exemplo 7C.

C. Angiogénese Induzida por Tumores

Para investigar o papel de $\alpha_v\beta_3$ na angiogénese induzida por tumores, utilizaram-se vários fragmentos de melanoma e carcinoma humano $\alpha_v\beta_3$ negativos no ensaio da CAM, que foram anteriormente cultivados e isolados da CAM de um embrião de pinto com 17 dias como descrito por Brooks *et al.*, J. Cell Biol., 122:1351 (1993) e como aqui descrito. Os fragmentos induziram uma neovascularização extensa apenas na presença de tampão.

A angiogénese foi induzida no sistema do ensaio de CAM por oposição directa de um fragmento de tumor na CAM. A preparação da CAM de embrião de pinto foi idêntica ao processo descrito acima. Em vez de um disco de papel de filtro, colocou-se sobre a CAM um fragmento de 50 miligramas (mg) a 55 mg em peso de um de tumor M21L de melanoma humano, tumor UCLAP-3 de carcinoma de pulmão humano, linha celular FG de carcinoma pancreático humano (Cheresh *et al.*, Cell 58:945-953, 1989) ou linha celular HEp3 de carcinoma laríngico humano, todos eles tumores negativos a $\alpha_v\beta_3$, numa área originalmente desprovida de vasos sanguíneos.

A linha celular de melanoma humano M21L, linha celular de carcinoma do pulmão humano UCLAP-3, linha celular de carcinoma pancreático FG ou linha celular de carcinoma laríngico humano HEp3, todas $\alpha_v\beta_3$ negativas, foram utilizadas para cultivar os tumores humanos sólidos nas CAM de embriões de pintos. Em primeiro lugar, aplicou-se uma suspensão de células únicas 8 x 10^6 de M21-L, UCLAP-3 e células FB ou 5 x 10^5 HEp3 às CAM num volume total de 30 microlitros (µL) de HBSS estéril. As janelas foram seladas com fita adesiva e os embriões foram incubados durante 7 dias, para permitir o crescimento de lesões tumorais humanas. No final dos 7 dias, um embrião agora com 17 dias, os tumores foram resseccionados a partir das CAM removendo-se o tecido de CAM circundante. Os tumores foram cortados em fragmentos de tumor de 50 mg a 55 mg para utilização em ensaios de angiogénese ou crescimento de tumores. Os fragmentos de tumores foram colocados num novo conjunto de CAM de embriões de pintos de 10 dias como descrito no Exemplo 6A numa área desprovida de vasos sanguíneos.

Os tumores cultivados in vivo nas CAM de embrião de pintos foram corados para detectar a expressão de $\alpha_v\beta_3$ com mAb LM609

como descrito no Exemplo 3A. Não se observou qualquer coloração específica das células tumorais que indicasse uma falta de expressão de $\alpha_v\beta_3$.

Estas preparações de tumores em CAM foram depois subsequentemente tratadas, como descrito nos Exemplos 7D e 7E, para medir os efeitos dos anticorpos e péptidos na angiogénese induzida por tumores. As preparações de tumores em CAM foram também tratadas como descrito nos Exemplos 8, 9 e 12, para medição dos efeitos de anticorpos e péptidos na regressão de tumores e apoptose de vasos sanguíneos e células vasculares angiogénicas.

7. Inibição da Angiogénese como Medida no Ensaio CAM

A. Inibição da Angiogénese Induzida por Factor de Crescimento por Aplicação Tópica de Inibidores

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

Para determinar se o $\alpha_v\beta_3$ desempenha um papel activo na angiogénese, colocaram-se discos filtrantes saturados com βFGF ou TNFα sobre CAM e, em seguida, adicionaram-se à preparação os anticorpos monoclonais (também referidos como mAb), LM609 (específico para $\alpha_v\beta_3$), CSAT (específico para β_1) ou P3G2 (específico para $\alpha_v\beta_3$).

Induziu-se a angiogénese em CAM de embriões de pinto com 10 dias através de discos de papel de filtro saturados com βFGF. Os discos foram, depois, tratados com 50 mL de HBSS contendo 25 mg de mAb num volume total de 25 µL de HBSS estéril às 0,

24 e 48 horas. Às 72 horas, as CAM foram recolhidas e colocadas numa placa de Petri de 35 mm e lavadas, uma vez, com 1 mL de soro fisiológico tamponado com fosfato. O lado inferior do papel de filtro e do tecido CAM foi depois analisado num microscópio estéreo Olympus, com dois observadores de uma forma duplamente cega. Considerou-se a inibição de angiogénese significativa quando as CAM apresentaram redução >50% na infiltração dos vasos sanguíneos da CAM directamente sob o disco. As experiências foram repetidas quatro vezes por anticorpo, com 6 a 7 embriões por estado.

Os resultados dos efeitos do tratamento de mAb na angiogénese induzida por βFGF são mostrados nas Figuras 8A-8B. Uma preparação de CAM não tratada desprovida de vasos sanguíneos é mostrada na Figura 8A para proporcionar uma comparação com a indução de vasos sanguíneos por βFGF mostrada na Figura 8B e os efeitos nela causados por mAb nas Figuras 8C-8E. Cerca de 75% destas CAM tratadas com mAb LM609 apresentaram inibição >50% da angiogénese como mostrado na Figura 8E e muitas destas revelaram-se desprovidas de infiltração de vasos. Contrariamente, o tampão de controlo (Figura 8A) e os discos tratados com mAb CSAT (Figura 8C) e P3G2 (Figura 8D) mostraram consistentemente, vascularização extensiva.

Obtiveram-se resultados idênticos quando a angiogénese foi induzida com TNFα. Para examinar os efeitos destes mesmos anticorpos nos vasos sanguíneos maduros pré-existentes presentes a partir do desenvolvimento normal de vasos adjacentes às áreas desprovidas de vasos, colocaram-se discos filtrantes saturados com mAb nas regiões vascularizadas das CAM de embriões com 10 dias que não receberam aplicação tópica de citocina. Nenhum dos três mAb afectou os vasos pré-existentes, como avaliado por

visualização sob um estereomicroscópio. Deste modo, o mAb LM609 inibiu selectivamente apenas o crescimento de vasos sanguíneos novos e não afectou os vasos sanguíneos maduros presentes nas áreas adjacentes. Este mesmo efeito foi observado com a aplicação de péptidos sintéticos aplicados topicamente ou intravenosamente como descrito nos Exemplos 7A2) e 7E2), respectivamente.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Realizaram-se também ensaios de CAM com os péptidos sintéticos aqui descritos para determinar o efeito de péptidos cíclicos e linearizados na angiogénese induzida pelo factor de crescimento, apenas para efeitos ilustrativos. Os péptidos foram preparados como descrito no Exemplo 1 e estavam presentes 80 µg de péptido num volume total de 25 µL de HBSS estéril. A solução de péptido foi aplicada à preparação de CAM imediatamente e, depois novamente, às 24 e 48 horas. Às 72 horas o papel de filtro e o tecido envolvente das CAM foi dissecado e analisado como descrito acima.

Os resultados deste ensaio revelaram ser semelhantes aos mostrados nas Figuras 9A-9C como descrito no Exemplo 7E2) onde se injectaram intravenosamente péptidos sintéticos em vasos sanguíneos induzidos por tumores. Neste caso, com o péptido de controlo, 62186, os vasos sanguíneos induzidos por βFGF permaneceram sem alteração como se mostra na Figura 9A. Contrariamente, quando o péptido cíclico RGD, 62814, foi aplicado ao filtro a formação de vasos sanguíneos foi inibida deixando a área desprovida de nova vasculatura. Este efeito foi semelhante em aparência ao mostrado na Figura 9B como descrito

no Exemplo 7E2) abaixo. Além disso, também como se mostra na Figura 9C para péptidos injectados intravenosamente, em áreas em que estavam presentes vasos sanguíneos maduros, embora distantes da localização do filtro saturado de factor de crescimento, não se verificou qualquer efeito com o tratamento tópico de péptidos sintéticos nestes vasos periféricos. A actividade inibidora dos péptidos na angiogénese é, deste modo, limitada às áreas da angiogénese induzida por factores de crescimento e não afecta os vasos maduros adjacentes pré-existentes ou resulta em qualquer citotoxicidade nociva para a área circundante.

Realizaram-se ensaios semelhantes com os outros péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 e listados na Tabela 1.

B. Inibição da Angiogénese Induzida por Factores de Crescimento por Aplicação Intravenosa de Inibidores

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

O efeito na angiogénese induzida por factores de crescimento por anticorpos monoclonais injectados intravenosamente na preparação de CAM foi também avaliado para utilização nesta invenção.

A preparação da CAM de embrião de pinto para injecções intravenosas foi essencialmente como descrita no Exemplo 7A com algumas modificações. Durante os processos de miragem seleccionaram-se os vasos sanguíneos em destaque e fizeram-se marcas na casca do ovo para indicar as suas posições. Os furos foram perfurados na casca e as CAM foram destacadas e os papéis de filtro saturados com βFGF foram colocados nas CAM como

descrito acima. As janelas foram seladas com fita adesiva estéril e os embriões foram recolocados na incubadora. Vinte e quatro horas mais tarde, cortou-se cuidadosamente uma segunda janela pequena no lado lateral de casca de ovo directamente sobre os vasos sanguíneos destacados seleccionados anteriormente. A casca de ovo exterior foi cuidadosamente removida deixando as membranas embriónicas intactas. A membrana da casca foi tornada transparente com uma pequena gota de óleo mineral (Perkin-Elmer Corp, Norwalk, CT) o que permitiu visualizar facilmente os vasos sanguíneos. Os mAb estéreis purificados ou péptidos sintéticos, os últimos dos quais são descritos abaixo, foram inoculados directamente nos vasos sanguíneos, uma vez, com uma agulha de calibre 30 numa dose de 200 µg de IgG por embrião num volume total de 100 µL de PBS estéril. As janelas foram seladas com fita adesiva e os embriões foram deixados a incubar até às 72 horas. Os discos filtrantes e os tecidos de CAM circundantes foram analisados como descrito anteriormente.

Para determinar a localização de mAB LM609 em tecidos de CAM ou em tecidos tumorais, como mostrado aqui e nos Exemplos seguintes, que foram anteriormente inoculados intravenosamente com LM609, as secções fixas foram bloqueadas com BSA a 2,5% em HBSS durante 1 hora, à temperatura ambiente, seguidas por coloração com uma diluição de 1:250 de anticorpo secundário de cabra anti-rato marcado com rodamina (Tago). As secções foram, depois, analisadas com um microscópio composto de imuno-fluorescência Zeiss.

Os resultados do tratamento intravenoso de anticorpos da preparação de CAM de vasos sanguíneos induzidos por βFGF são mostrados nas Figuras 10A-10C. Na Figura 10A, mostra-se a

angiogénese induzida como resultado do tratamento βFGF. Não se verificaram modificações na presença de vasculatura induzida por βFGF com a exposição intravenosa a mAb P3G2, um anticorpo anti-$\alpha_v\beta_5$, como mostra a Figura 10B. Contrariamente, o tratamento da angiogénese da preparação de CAM induzida por βFGF com LM609, um anticorpo anti-$\alpha_v\beta_3$, resultou na inibição completa do crescimento de novos vasos para a área do filtro como mostra a Figura 10C. O efeito inibidor na angiogénese é, deste modo, resultante da inibição da actividade do receptor $\alpha_v\beta_3$ pelo anticorpo LM609 anti-$\alpha_v\beta_3$ específico. Uma vez que o bloqueio de $\alpha_v\beta_5$ não inibe a formação de neovasculatura na zona do filtro das CAM, o $\alpha_v\beta_5$ não é, deste modo, essencial quando comparado a $\alpha_v\beta_3$ para o crescimento de novos vasos.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Os péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 são separadamente injectados intravenosamente nos vasos sanguíneos induzidos por factores de crescimento na preparação de CAM como descrito acima, apenas para efeitos ilustrativos. O efeito dos péptidos na viabilidade dos vasos é avaliado do mesmo modo.

C. Inibição da Angiogénese Embriónica por Aplicação Tópica

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

Para determinar se o $\alpha_v\beta_3$ participa na angiogénese embriónica, examinou-se o efeito de LM609 no crescimento de novos vasos sanguíneos nas CAM em embriões com 6 dias, um estádio marcado por uma neovascularização activa como descrito

no Exemplo 5A. O ensaio de CAM foi preparado como descrito no Exemplo 6C com a aplicação tópica subsequente de discos saturados com mAb colocados sobre CAM de embriões com 6 dias na ausência de citocinas. Após 3 dias, as CAM foram resseccionadas e fotografadas. Cada experiência incluiu 6 embriões por grupo e foi repetida 2 vezes.

O anticorpo LM609 (Figura 11C), mas não o CSAT (Figura 11A) ou o P3G2 (Figura 11B) impediu o crescimento vascular nestas condições; isto indica que $\alpha_v\beta_3$ desempenha um papel substancial na neovascularização embriónica que foi independente dos factores de crescimento adicionados para a indução da angiogénese.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Os péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 são adicionados separadamente à preparação embriónica de CAM acima e como descrito no Exemplo 5A2) por aplicação tópica à CAM ou aplicação intravenosa aos vasos sanguíneos, apenas para efeitos ilustrativos. O efeito dos péptidos na viabilidade dos vasos foi avaliado do mesmo modo.

D. Inibição da Angiogénese Induzida por Tumores por Aplicação Tópica

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

Além dos ensaios de angiogénese descritos acima, em que se avaliaram os efeitos dos antagonistas anti-$\alpha_v\beta_3$, LM609 e péptidos 62181, 62184, 62185, 62187 e 62880 na angiogénese embriónica,

investigou-se também o papel de $\alpha_v\beta_3$ na angiogénese induzida por tumores. Como um indutor, utilizaram-se fragmentos de melanoma humano M21-L $\alpha_v\beta_3$-negativo anteriormente cultivados e isolados a partir da CAM de um embrião de pinto de 17 dias. Os fragmentos foram preparados como descrito no Exemplo 6C.

Como descrito acima no Exemplo 7A1), os mAb foram separadamente aplicados topicamente aos fragmentos de tumor a uma concentração de 25 µg em 25 µL de HBSS e as janelas foram, depois, seladas com fita adesiva. Os mAb foram adicionados novamente do mesmo modo às 24 horas e 48 horas. Às 72 horas, os tumores e tecidos de CAM circundantes foram analisados como descrito acima no Exemplo 7A1).

Como descrito no Exemplo 6C, os tumores foram inicialmente derivados por transplante de células M21-L cultivadas, as quais não expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$ como descrito por Felding-Habermann *et al.*, J. Clin. Invest., 89:2018 (1992) sobre as CAM de embriões de pintos com 10 dias de idade. Estes fragmentos $\alpha_v\beta_3$-negativos induziram uma neovascularização extensa apenas na presença de tampão ou mAb CSAT (anti-β_1) ou P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$). Contrariamente, o mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) anulou a infiltração da maioria dos vasos na massa tumoral e CAM circundante.

De modo a quantificar o efeito dos mAb na angiogénese induzida por tumores, os vasos sanguíneos que entravam no tumor no interior do plano focal da CAM foram contados sob um microscópio estéril por dois observadores num modo duplamente cego. Cada barra de dados presente na Figura 12 representa a média do número de vasos ± SE de 12 CAM em cada grupo representando experiências duplicadas.

Esta análise quantitativa revelou uma redução de três vezes no número de vasos que entram nos tumores tratados com mAb LM609 comparativamente com tumores tratados com tampão ou outros mAb, P3G2 ou CSAT ($P < 0,0001$) como determinado pelo Teste da Soma por Classes de Wilcoxon. O facto de os tumores M21-L não expressarem $\alpha_v\beta_3$ indica que o mAb LM609 inibe a angiogénese afectando directamente os vasos sanguíneos em vez das células tumorais. Estes resultados correspondem à distribuição histológica de $\alpha_v\beta_3$ em biopsias de tecidos cancerosos mostrada na Figura 3A-3D, em que a distribuição de $\alpha_v\beta_3$ foi limitada aos vasos sanguíneos no tumor e não às próprias células de tumor.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Os péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 são aplicados topicamente ao sistema de ensaio angiogénico de CAM induzido por tumores como descrito acima, apenas para efeitos ilustrativos. O efeito dos péptidos na viabilidade dos vasos é avaliado do mesmo modo.

E. Inibição da Angiogénese Induzida por Tumores por Aplicação Intravenosa

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

Os vasos sanguíneos induzidos por tumores preparados como descrito no Exemplo 7D1) foram também tratados com mAb aplicados por injecção intravenosa. Os tumores foram colocados nas CAM como descrito no Exemplo 7D1) e as janelas seladas com fita adesiva e 24 horas mais tarde, inocularam-se 200 µg de mAb

purificados, uma vez, intravenosamente em vasos sanguíneos de embrião de pintos como descrito anteriormente. Os embriões de pintos foram, depois, deixados incubar durante 7 dias. A extensão da angiogénese foi depois observada como descrito acima. Como descrito no Exemplo 8 abaixo, após este período de tempo, os tumores foram resseccionados e analisados quanto ao seu peso para determinar o efeito da exposição dos anticorpos no crescimento ou supressão de tumores.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Os efeitos da exposição de péptidos na vasculatura induzida por tumores no sistema de ensaio de CAM foram também determinados, apenas para efeitos ilustrativos. A preparação tumor-CAM foi utilizada como descrito acima com a excepção de que em vez de injecção intravenosa de um mAb, os péptidos sintéticos preparados como descrito no Exemplo 1 e Exemplo 7A2) foram separadamente injectados intravenosamente nos vasos sanguíneos visíveis.

Os resultados dos ensaios de CAM com o péptido cíclico, 66203 contendo o sal de HCl e o péptido de controlo, 62186, são mostrados nas Figuras 9A-9C. Na Figura 9A, o tratamento com o péptido de controlo não afectou os vasos sanguíneos grandes e abundantes que foram induzidos pelo tratamento tumoral para crescerem numa área da CAM originalmente desprovida de vasos sanguíneos. Contrariamente quando o péptido cíclico RGD 66203, um antagonista de $\alpha_v\beta_3$, foi aplicado ao filtro, a formação de vasos sanguíneos foi inibida deixando a área desprovida de nova vasculatura como mostrado na Figura 9B. O efeito inibidor do péptido contendo RGD foi específico e localizado como é

evidenciado pela ausência de quaisquer efeitos nocivos nos vasos localizados adjacentes à localização do tumor. Deste modo, na Figura 9C, quando os péptidos inibidores são injectados intravenosamente no sistema de ensaio de CAM, não se verificou efeito nos vasos maduros pré-existentes presentes na CAM em áreas adjacentes embora distantes da localização do tumor. Os vasos pré-existentes nesta localização não foram afectados pelo péptido inibidor que fluiu no interior desses vasos embora tenha sido inibida a produção de novos vasos a partir destes vasos pré-existentes para massa tumoral. Deste modo, os péptidos sintéticos incluindo 66203 e 62184, que mostraram anteriormente nos ensaios de ligando-receptor no Exemplo 4 ser antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ demonstraram agora inibir a angiogénese que é limitada a vasos em fase de desenvolvimento e não a vasos maduros pré-existentes. Além disso, a infusão intravenosa de péptidos não resulta em qualquer citotoxicidade nociva para a área circundante como é evidente pela vasculatura intacta na Figura 9C.

Realizaram-se ensaios semelhantes com outros péptidos sintéticos preparados no Exemplo 1 e listados na Tabela 1.

8. Inibição do Crescimento de Tecido Tumoral Com Antagonistas $\alpha_v\beta_3$ Como Medida no Ensaio de CAM

Como descrito no Exemplo 7D1), além de determinar visualmente o efeito dos antagonistas anti-$\alpha_v\beta_3$ no factor de crescimento ou na angiogénese induzida por tumores, o efeito dos antagonistas foi também avaliado medindo quaisquer modificações à massa tumoral após a exposição. Para esta análise, preparou-se o sistema de ensaio de angiogénese da CAM induzida por tumores

como descrito no Exemplo 6C e 7D. No final do dia 7 do período de incubação, os tumores resultantes foram resseccionados das CAM e removidos de qualquer tecido de CAM residual, lavados com 1 mL de soro fisiológico tamponado com fosfato e determinaram-se os pesos húmidos de cada tumor.

Além disso, a preparação do tumor para análise microscópica histológica incluiu fixar exemplos representativos de tumores em Fixador Bulins durante 8 horas e embeber em parafina. Cortaram-se secções em série e coraram-se com hematoxilina e eosina (H&E) para análise microscópica. Gladson, *et al.*, J. Clin. Invest., 88:1924 (1991). As secções foram fotografadas com um microscópio composto Olympus a 250x.

A. Aplicação Tópica

Os resultados dos pesos de tumor de melanoma humano típico (M21L) resultantes da aplicação tópica do tampão de controlo (HBSS), P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) são listados na Tabela 4. Avaliou-se uma série de embriões para cada tratamento sendo o peso médio de tumor em miligramas (mg) de cada um calculado juntamente com o SE da média como se mostra no fundo da tabela.

Tabela 4

Embrião N° (mg)	Tratamento 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

Controlo HBSS	172 ± 26
P3G2	171 ± 36
LM609	52 ± 13

A exposição de uma massa tumoral de melanoma humano $\alpha_v\beta_3$-negativo no sistema de ensaio de CAM a LM609 provocou o decréscimo da média de peso do tumor não tratado de 172 mg ± 26 para 52 mg ± 13. O anticorpo P3G2 não teve qualquer efeito na massa tumoral. Deste modo, o bloqueio do receptor $\alpha_v\beta_3$ pela aplicação tópica de anticorpo LM609 $\alpha_v\beta_3$ específico resultou numa regressão da massa de tumor juntamente com uma inibição da angiogénese como se mostra nos Exemplos anteriores. A medida do diâmetro da massa tumoral resultante da exposição de P3G2 foi de, aproximadamente, 8 milímetros a 1 centímetro, em média. Contrariamente, os tumores tratados com LM609 tinham em média 2 a 3 milímetros em diâmetro.

As secções congeladas destes tumores revelaram uma citoarquitectura de tumor intacta para o tumor exposto a P3G2 em contraste com a falta de estrutura celular organizada no tumor exposto a LM609. A actividade do receptor $\alpha_v\beta_3$ é, portanto, essencial para um tumor negativo $\alpha_v\beta_3$ manter a sua massa alimentada pelo desenvolvimento de uma neovasculatura expressando $\alpha_v\beta_3$. O bloqueio de $\alpha_v\beta_3$ com antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ desta invenção resulta na inibição da angiogénese para o tumor resultando em última análise na diminuição da massa tumoral.

B. Aplicação Intravenosa

Os resultados dos pesos de tumores de carcinoma típico (UCLAP-3) resultantes da aplicação intravenosa do tampão de controlo (PBS, soro fisiológico tamponado com fosfato), CSAT (anti-β_1) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) são listados na Tabela 5. Avaliou-se uma série de embriões para cada tratamento com o peso tumoral médio de cada um a ser calculado juntamente com o SE da média como se mostra no fundo da tabela.

Tabela 5

Embrião Nº (mg)	Tratamento 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

(continuação)

Embrião N° (mg)	Tratamento mAb	Peso de Tumor
6		39
7		12
Tratamento mAB	85 ± 7	Peso médio do tumor
Controlo PBS		(ms)
CSAT	108 ± 22	
LM609	30 ± 6	

A exposição de uma massa tumoral de carcinoma humano $\alpha_v\beta_3$-negativo no sistema de ensaio de CAM a LM609 provocou o decréscimo do peso médio de tumor não tratado de 85 mg ± 7 para 30 mg ± 6. O anticorpo CSAT não afectou significativamente o peso da massa de tumor. Deste modo, o bloqueio do receptor $\alpha_v\beta_3$ pela aplicação intravenosa do anticorpo LM609 $\alpha_v\beta_3$-expecífico resultou na regressão de um carcinoma como foi para a massa de tumor de melanoma acima, em conjunto com uma inibição da angiogénese como se mostra nos Exemplos anteriores. Além disso, o crescimento de tumor de melanoma humano foi inibido do mesmo modo por injecção intravenosa de LM609.

9. Regressão do Crescimento de Tecido Tumoral Com Antagonistas $\alpha_v\beta_3$ Como Medido no Ensaio de CAM

Para determinar os efeitos dos antagonistas $\alpha_v\beta_3$ no crescimento e sobrevivência dos tumores, colocaram-se fragmentos de melanoma humano e fragmentos de carcinomas do pulmão, pâncreas e laringe sobre as CAM de embriões com 10 dias como descrito no Exemplo 5A.

A. Aplicação Intravenosa

1) Tratamento com Anticorpos Monoclonais

a. Tratamento com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) e CSAT (anti-β_1)

Vinte e quatro horas após a implantação de CAM com fragmentos de carcinoma de melanoma humano $\alpha_v\beta_3$-negativo M21-L, carcinoma pancreático FG, carcinoma humano do pulmão UCLAP-3 ou carcinoma humano da laringe HEp3, injectaram-se embriões intravenosamente com PBS isolado ou uma dose única (300 µg/100 mL) de mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou CSAT (anti-β_1). Os tumores foram deixados propagar durante seis dias adicionais. No final do período de incubação os tumores foram cuidadosamente resseccionados e removidos do tecido de CAM circundante. As ressecções tumorais foram realizadas por dois investigadores independentes removendo apenas a massa de tumor sólido facilmente definível. Os tumores tinham margens bem definidas, deste modo, a membrana fina semi-transparente (CAM) que é facilmente distinguível da massa de tumor sólido foi removida sem perturbar a própria massa do tumor. Os tumores resseccionados foram pesados e examinados morfologicamente e histologicamente.

Como se mostra na Figura 13, os pesos húmidos dos tumores no final dos 7 dias foram determinados e comparados com os pesos de tumores iniciais antes dos tratamentos. Cada barra representa a média ± SE de 5-10 tumores por grupo. O mAb LM609 inibiu significativamente o crescimento de tumores ($p<0,001$) comparativamente com controlos em todos os tumores testados. Os tumores tratados com PBS ou CSAT proliferaram em todos os casos. Contrariamente, o mAb LM609 não só preveniu o crescimento destes

tumores mas induziu uma regressão extensa na maioria dos casos. Um facto importante é que estas células tumorais não expressam a integrina $\alpha_v\beta_3$, demonstrando que a inibição do crescimento foi devida a efeitos anti-angiogénicos deste anticorpo na neovasculatura em vez de directamente sobre as próprias células tumorais.

b. Tratamento com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) e P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$)

Implantaram-se fragmentos (50 mg) de tumor de melanoma M21-L humanos nas CAM de embriões de 10 dias como descrito no Exemplo 5A. Vinte e quatro horas mais tarde, injectaram-se intravenosamente embriões com PBS isolado ou uma dose única (300 µg/100 µL) de mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$). Os tumores foram deixados propagar como descrito no Exemplo 9Al) acima e foram examinados morfologicamente e histologicamente como aqui descrito.

Os exemplos representativos de tumores M21-L tratados com mAb P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) foram examinados morfologicamente. Os tumores tratados com P3G2 eram grandes (8 mm de diâmetro) e bem vascularizados enquanto os tratados com mAb LM609 eram muito mais pequenos (3 mm de diâmetro) e não possuíam vasos sanguíneos detectáveis.

Os tumores foram ainda examinados através da preparação de secções histológicas e coloração com hematoxilina e eosina como descrito no Exemplo 9Al)a. Como mostrado na Figura 14 (painel superior), os tumores tratados com mAb P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) mostraram numerosas células tumorais viáveis e activamente em divisão como indicado pelas figuras mitóticas (pontas de setas) bem como por

múltiplos vasos sanguíneos (setas) ao longo do estroma do tumor. Contrariamente, detectaram-se poucas, se algumas, células tumorais ou vasos sanguíneos viáveis em tumores tratados com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) (Figura 14, painel inferior). Estes resultados demonstram que os antagonistas da integrina $\alpha_v\beta_3$ inibem a angiogénese induzida por tumores conduzindo à paragem do crescimento e à regressão de uma variedade de tumores humanos *in vivo*. É importante assinalar que os embriões examinados após sete dias de crescimento tumoral (dia embriónico 17) revelaram-se normais num exame genérico, tivessem ou não sido tratados com um antagonista $\alpha_v\beta_3$. Estas verificações indicam que os antagonistas desta integrina se revelaram não tóxicos relativamente aos embriões em desenvolvimento.

2) Tratamento com Péptidos Sintéticos

Implantaram-se fragmentos (50 mg) de tumor de melanoma M21-L humano em CAM de embriões de 10 dias como descrito no Exemplo 5A. Vinte e quatro horas mais tarde, os embriões receberam uma injecção intravenosa única de 300 µg/100 µL de ciclo RADfV (69601) e ou ciclo-RGDfV (66203). Isto descreve-se apenas para efeitos ilustrativos. Após um total de 72 horas, os tumores foram removidos, examinados morfologicamente e fotografados com um microscópico estéreo como descrito no Exemplo 9A1).

Os painéis mostrados nas Figuras 15A a 15E correspondem ao seguinte: Figura 15A, amostras em duplicado tratadas com péptido ciclo-RADfV (69601); Figura 15B, amostras em duplicado tratadas com péptido ciclo-RGDfV (66203); Figura 15C, tecido adjacente de CAM retirado dos mesmos embriões tratados com o

péptido ciclo-RGDfV (66203) e Figuras 15D e 15E, ampliação elevada (13x) de tumores tratados com péptido. A Figura 15D representa vasos sanguíneos normais de um tumor tratado com o péptido de controlo (69601). A Figura 15E representa exemplos de vasos sanguíneos destruídos de tumores (setas) tratados por péptidos ciclo-RGDfV (66203).

Os resultados ilustram que apenas o péptido 66203 inibiu a formação de vasos e ainda que os vasos no tecido da CAM adjacente ao tumor não foram afectados.

10. Regressão do Crescimento de Tecido Tumoral com Antagonistas $\alpha_v\beta_3$ como Medido pelo Ensaio do Modelo do Olho de Coelho In Vivo

O efeito dos antagonistas anti-$\alpha_v\beta_3$ na angiogénese induzida por factor de crescimento pode ser observado em estruturas naturalmente transparentes como exemplificado pela córnea do olho. Os vasos sanguíneos novos crescem da extremidade da córnea, que tem um fornecimento abundante de sangue, em direcção ao centro da córnea, que normalmente não tem um fornecimento de sangue. Os estimuladores de angiogénese, tal como βFGF, quando aplicados à córnea induzem o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da extremidade da córnea. Os antagonistas da angiogénese, aplicados à córnea, inibem o crescimento de novos vasos sanguíneos a partir da extremidade da córnea. Deste modo, a córnea é submetida a angiogénese através de uma invasão de células endoteliais a partir da extremidade da córnea para o tecido resistente envolto em colagénio da córnea que é facilmente visível. Portanto, o ensaio do modelo do olho de coelho proporciona um modelo in vivo para a observação directa

do estímulo e inibição da angiogénese depois da implantação de compostos directamente na córnea do olho.

A. Ensaio do Modelo do Olho de Coelho In Vivo

1) Angiogénese Induzida por Factores de Crescimento

A angiogénese foi induzida no ensaio do modelo do olho de coelho in vivo com o factor de crescimento βFGF e é descrita a seguir.

a. Preparação de Peletes de Hydron Contendo Factores de Crescimento e Anticorpos Monoclonais

Prepararam-se peletes de polímero hydron contendo factores de crescimento e mAb como descrito por D'Amato, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 91:4082-4085 (1994). As peletes individuais continham 650 ng do factor de crescimento βFGF ligado a sucralfato (Carafet, Marion Merrell Dow Corporation) para estabilizar o βFGF e garantir a sua libertação lenta para o tecido circundante. Além disso, prepararam-se peletes de hydron que continham 40 µg do mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou mAb P1F6 (anti-$\alpha_v\beta_5$) em PBS. As peletes formam moldadas em estacas de Teflon especialmente preparadas que têm um núcleo de 2,5 mm perfurado nas suas superfícies. Colocou-se aproximadamente 12 µL de material de moldagem em cada estaca e polimerizou-se, de um dia para o outro, numa hotte esterilizada. As peletes foram então esterilizadas por irradiação ultravioleta.

b. Tratamento com Anticorpos Monoclonais

Cada experiência consistiu em três coelhos em que um olho recebeu uma pelete compreendendo βFGF e LM609 e o outro olho recebeu uma pelete compreendendo βFGF e um mAb P1F6 de rato (anti-$\alpha_v\beta_5$). A utilização de testes de olhos emparelhados para comparar LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) a outros controlos mAb e PBS proporciona um meio rigoroso de teste para demonstrar as diferenças significativas entre os mAb testados.

O P1F6 mAb imunorreage com a integrina $\alpha_v\beta_5$ que se encontra na superfície de células vasculares endoteliais mas que não está presumivelmente envolvida na angiogénese. Para determinar se o mAb P1F6 estava envolvido na angiogénese, prepararam-se peletes contendo apenas este mAb e determinou-se como descrito abaixo para confirmar que o mAb não induzia a angiogénese.

Todos os mAb testados foram purificados a partir de fluido ascítico utilizando uma coluna de cromatografia por afinidade Protein-A Sepharose CL-4B de acordo com métodos bem conhecidos. A imunoglobulina eluída foi, depois, dializada contra PBS e tratada com Detoxi-gel (Pierce Chemicals) para remover a endotoxina. A endotoxina mostrou ser um potente estimulante angiogénico e inflamatório. Portanto, testaram-se mAb quanto à presença de endotoxina com o Ensaio de "Chromogenic Limulus Amebocyte Lysate" (Bio-Whittaker) e utilizaram-se apenas os mAb sem endotoxinas detectáveis no ensaio do modelo do olho de coelho.

Uma pelete de hydron compreendendo βFGF e mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou P1F6 (anti-$\alpha_v\beta_5$) foi inserida numa bolsa na córnea formada no olho dos coelhos. A pelete de hydron continha,

também, sucralfato para estabilizar o βFGF durante o ensaio. As peletes individuais foram implantadas em "bolsas" cirurgicamente criadas, formadas a meio do estroma da córnea dos coelhos. O processo cirúrgico foi feito com uma técnica estéril utilizando um microscópio Wild, modelo M691, equipado com uma divisor de feixe ao qual se acoplou uma máquina fotográfica para registar fotograficamente as córneas individuais. Criou-se uma "bolsa" de 3 mm por 5 mm no estroma da córnea através de uma incisão de 3 mm em metade da espessura da córnea com uma lâmina Beaver 69. O estroma foi dissecado perifericamente utilizando uma espátula de íris e a pelete foi implantada com a sua margem periférica a 2 mm do limbo.

Durante os 14 dias seguintes, o βFGF e mAb difundiram-se a partir da pelete implantada no tecido circundante e, deste modo, efectuaram a angiogénese a partir da extremidade da córnea.

Os resultados representativos de cada tratamento são representados nas Figuras 16A a 16E. A quantidade de vasos presentes é quantificada e descrita em termos de horas de relógio que se definem como se segue. O olho é dividido em 12 secções iguais da mesma forma que um relógio é dividido em horas. "Uma hora de relógio de vasos" refere-se a essa quantidade de vasos que preenche uma área do olho equivalente a uma hora num relógio. Os cinco coelhos que receberam apenas βFGF apresentaram angiogénese *florida* em que os novos vasos sanguíneos cresceram da extremidade da córnea em direcção ao centro da córnea, que normalmente não apresenta vasos sanguíneos. Um destes coelhos tinha apenas 1 hora de relógio de vasos por pelete. Dois dos coelhos que receberam βFGF e mAb LM609 não mostraram absolutamente nenhuma angiogénese detectável até 14 dias seguintes à cirurgia. Um destes coelhos tinha

3 focos de vasos hemorrágicos e em germinação no dia 14. Dois dos coelhos que receberam βFGF e mAb P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$) mostraram uma vascularização extensa em que os novos vasos sanguíneos tinham crescido da extremidade da córnea para a córnea. Um destes coelhos tinha apenas 1 a 2 horas de vasos por pelete.

Como evidenciado no ensaio do modelo do olho de coelho, não se observou efeito angiogénico nos vasos paralimbais normais na presença de factor de crescimento βFGF em ratos que receberam mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Contrariamente, observou-se angiogénese nos vasos paralimbais na presença do factor de crescimento βFGF em coelhos que receberam o mAb P3G2 (anti-$\alpha_v\beta_5$). A inibição completa da angiogénese da córnea pelo mAb LM609 é substancialmente maior do que por qualquer reagente anti-angiogénico anteriormente referido.

11. Regressão In Vivo do Crescimento de Tecido Tumoral Com Antagonistas $\alpha_v\beta_3$ Como Medido pelo Ensaio Quimérico Rato:Homem

Produziu-se um modelo quimérico in vivo rato:humano por substituição de uma área de pele de um rato SCID com prepúcio neonatal humano (Figura 17). Após o enxerto de pele estar estabelecido, o prepúcio humano foi inoculado com células de carcinoma. Após se estabelecer um tumor mensurável, injectou-se mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou PBS na veia da cauda do rato. Após um período de 2-3 semanas, o tumor foi excisado e analisado quanto ao seu peso e histologia.

A. Ensaio Quimérico In Vivo Rato:Humano

O modelo quimérico in vivo rato:humano é preparado essencialmente como descrito em Yan, *et al.*, J. Clin. Invest., 91:986-996 (1993). Resumidamente, removeu-se cirurgicamente uma área quadrada de 2 cm^2 de pele de um rato SCID (6-8 semanas de idade) e substituiu-se por um prepúcio humano. O rato foi anestesiado e removeram-se os pêlos de uma área de 5 cm^2 em cada lado da região abdominal lateral. Prepararam-se duas zonas circulares de enxerto de 2 cm^2 por remoção da espessura total de pele até à fáscia. Colocaram-se enxertos da pele humana da espessura completa do mesmo tamanho derivados de prepúcio neonatal humano nas zonas feridas e suturados nesses locais. O enxerto foi coberto com um Penso Rápido que foi suturado à pele. Aplicou-se também uma fita de tecido Micropore para cobrir o ferimento.

A linha celular de melanoma humano M21L ou linha celular de carcinoma da mama MDA 23.1 (ATCC HTB 26; negativo ao $\alpha_v\beta_3$ por imunorreactividade às secções de tecido com mAb LM609) foram utilizadas para formar os tumores humanos sólidos nos enxertos de pele humana nos ratos SCID. Uma suspensão de células únicas de 5 x 10^6 de M21-L ou células MDA 23.1 foram injectadas intradermicamente no enxerto de pele humana. Os ratos foram, depois, observados durante 2 a 4 semanas para permitir o crescimento de tumores humanos mensuráveis.

B. Aplicação Intravenosa

1) Tratamento Com Anticorpos Monoclonais

Seguindo o crescimento de tumores mensuráveis, injectaram-se ratos SCID, que tinham sido injectados intravenosamente com células tumorais M21L na veia da cauda com 250 µg de mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou PBS duas vezes por semana durante 2 a 3 semanas. Após este período, os tumores foram resseccionados da pele e removidos de tecido circundante. Avaliaram-se vários ratos para cada tratamento com o peso médio do tumor a ser calculado para cada tratamento como se mostra no fundo da Tabela 6.

Tabela 6

Número de Tumor M21L	Tratamento	Peso de 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

Tratamento	Peso Médio do Tumor (mg)
PBS	198
LM609	113

A exposição da massa tumoral de carcinoma humano M21L $\alpha_v\beta_3$ negativo no sistema de ensaio quimérico rato:homem a LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) provocou o decréscimo no peso médio de tumor tratado com PBS de 198 mg a 113 mg.

Os exemplos representativos de tumores M21L tratados com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) e PBS foram examinados morfologicamente. Os tumores tratados com PBS eram grandes (8 a 10 mm de diâmetro) e bem vascularizados enquanto os tratados com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) eram muito menores (3 a 4 mm de diâmetro) e não possuíam vasos sanguíneos detectáveis.

Os tumores formados em enxertos de pele que tinham sido injectados com células MDA 23.1 eram detectáveis e mensuráveis. O exame morfológico dos tumores estabelecidos revelou que ocorreu neovascularização do tecido humano enxertado para as células de tumor MDA 23.1.

Deste modo, o bloqueio do receptor $\alpha_v\beta_3$ pela aplicação intravenosa do anticorpo LM609 $\alpha_v\beta_3$ específico resultou numa regressão de um carcinoma neste sistema modelo da mesma forma que os sistemas modelos de CAM e do olho de coelho como descrito nos Exemplos 9 e 10, respectivamente.

12. Estimulação das Células Vasculares para Entrarem no Ciclo Celular e Sofrerem Apoptose na Presença de Antagonistas da Integrina $\alpha_v\beta_3$ como Medido no Ensaio da CAM

O processo angiogénico depende, claramente, da capacidade de as citocinas, tais como βFGF e VEGF, estimularem a proliferação celular vascular. Mignatti *et al.*, J. Cell. Biochem., 471:201 (1991); Takeshita *et al.*, J. Clin. Invest., 93:662 (1994); e Koyama *et al.*, J. Cell. Physiol., 158:1 (1994). Contudo, é também evidente que os efeitos de sinalização podem regular a diferenciação destas células vasculares em vasos sanguíneos maduros. Deste modo, é concebível que a interferência com sinais relacionados com o crescimento ou diferenciação das células vasculares em processo de crescimento novo ou angiogénese possa resultar na perturbação da angiogénese.

Mostrou-se que os eventos de ligação da integrina participam na proliferação celular bem como na apoptose ou morte celular programada in vitro. Schwartz, Cancer Res., 51:1503 (1993); Meredith *et al.*, Mol. Biol. Cell., 4:953 (1993); Frisch *et al.*, J. Cell Biol., 124:619 (1994) e Ruoslahti *et al.*, Cell, 77:477 (1994). O exame detalhado dos efeitos dos antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ na angiogénese revela a presença de vasos sanguíneos associados a tumores descontínuos e destruídos. Portanto, é possível que a perda de continuidade dos vasos sanguíneos possa ser devida a necrose ou apoptose selectiva das células vasculares.

Para explorar esta possibilidade, as CAM foram examinadas após indução da angiogénese com o factor de crescimento βFGF e tratamento com mAb e péptidos cíclicos desta invenção.

A. Tratamento com Anticorpos Monoclonais

A apoptose pode ser detectada por uma variedade de métodos que incluem o exame directo do ADN isolado de tecido para detectar a fragmentação do ADN e a detecção de 3'OH no tecido intacto com um anticorpo que detecta especificamente os grupos 3'OH livres de ADN fragmentado.

1) Análise da Fragmentação de ADN

A angiogénese foi induzida por colocação de discos de papel de filtro saturados com βFGF nas CAM de embriões com 10 dias como descrito nos Exemplos 6A. A análise imuno-histológica das CAM com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) revelou um pico na expressão de $\alpha_v\beta_3$ nos vasos sanguíneos 12 a 24 horas após o início da angiogénese com βFGF. Deste modo, 24 h após a estimulação com βFGF, os embriões foram inoculados intravenosamente com 100 µL de PBS isolado ou PBS contendo 300 µg de mAb CSAT (anti-β_1) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$).

A fragmentação do ADN foi detectada por extracção do tecido da CAM directamente abaixo dos discos filtrantes saturados com βFGF 24 h ou 48 h após inoculações intravenosas com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1) ou PBS. Os tecidos de CAM resseccionados foram lavados três vezes com PBS estéril e finamente triturados, ressuspensos em colagenase bacteriana a 0,25% (Worthington Biochemical; Freehold, NJ) e incubados durante 90 minutos a 37 °C com agitação vortex ocasional. O ADN foi extraído de números iguais de células CAM da suspensão de células únicas como descrito anteriormente. Bissonette, *et al.*, Nature, 359:552 (1992). Resumidamente, números iguais de células de CAM foram sujeitos a lise em tris-Cl 10 mM, pH 8,0, EDTA

10 mM em 0,5% (v/v) Triton X-100 (Sigma, St. Louis, MO). Os lisados celulares foram centrifugados a 16000x g durante 15 minutos, a 4 °C, para separar o ADN fragmentado solúvel do sedimento de cromatina intacta. O ADN fragmentado foi lavado, precipitado e analisado num gel de agarose 1,2% (p/v).

O ADN fragmentado solúvel foi isolado de um número igual de células CAM de cada tratamento, separado electroforeticamente num gel de agarose e visualizado por coloração com brometo de etídio. Não se detectou qualquer diferença na quantidade relativa de fragmentação de ADN resultante de três tratamentos diferentes 24 horas após tratamento. Contudo, 48 horas após tratamento com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), observou-se um aumento significativo na fragmentação do ADN quando comparado com embriões tratados com mAb CSAT (anti-β_1) ou PBS isolado.

2) Estimulação das Células Vasculares para Entrarem no Ciclo Celular

Para examinar experimentalmente o papel de $\alpha_v\beta_3$ nestes processos, as células derivadas das CAM tratadas com ou sem βFGF foram coradas com iodeto de propídio e feitas imunorreagir com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$).

As CAM isoladas de embriões 24 e 48 horas após tratamento com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1) ou PBS foram dissociadas em suspensões de células únicas por incubação com colagenase bacteriana como descrito acima. As células únicas foram, depois, permeabilizadas e coloradas com o Kit de Detecção Apop Tag Insitu de acordo com as instruções do fabricante (Oncor, Gaithersburg, MD). O Apop Tag é um anticorpo que detecta

especificamente os grupos 3'OH livres do ADN fragmentado. A detecção desses grupos 3'OH livres é um método estabelecido para a detecção de células apoptóticas. Gavrieli *et al.*, J. Cell Biol., 119:493 (1992).

As células Apop Tag coradas foram depois enxaguadas em Triton X-100 0,1% (v/v) em PBS e ressuspensas em tampão FACS contendo BSA 0,5% (p/v), azida de sódio 0,02% (p/v) e 200 µg/mL de RNase A em PBS. As células foram incubadas durante 1,5 h, lavadas e analisadas por triagem celular de activação fluorescente. A fluorescência celular foi medida utilizando um citómetro de fluxo FACScan e os dados analisados como descrito abaixo.

A fluorescência celular foi medida com um citómetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). A dispersão lateral (SSC) e dispersão frontal (FSC) foram determinadas simultaneamente e todos os dados foram recolhidos com um computador Hewlet Packard (HP9000) equipado com um software de pesquisa FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Os dados foram analisados com a versão I do software P.C Lysis (Becton Dickinson, Mountain View, CA). Estabeleceram-se canais de controlo negativo utilizando suspensões celulares sem a adição de anticorpos primários do kit Apop Tag. Idêntica activação de canal foi aplicada a ambas as populações celulares resultando na análise de, aproximadamente, 8000 células por tratamento celular diferente.

A percentagem de células únicas derivadas das CAM tratadas com mAb e coradas com Apop Tag como determinado por análise FACS é mostrada na Figura 18. A barra negra representa células de embriões tratados 24 horas antes da análise. A barra ponteada

representa células de embriões tratados 48 horas antes da análise. Cada barra representa a média ± SE de três replicados.

Como se mostra na Figura 18, as CAM tratadas dois dias antes com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) mostraram um aumento de 3 a 4 vezes na coloração com Apop Tag em comparação com CAM tratadas com PBS isolado ou CSAT (anti-β_1).

B. Tratamento Com Péptidos Sintéticos

Os ensaios de CAM com angiogénese induzida por factores de crescimento, como descrito no Exemplo 6A, foram também realizados com os péptidos sintéticos desta invenção para determinar o efeito dos péptidos cíclicos na apoptose. Isto descreve-se apenas para efeitos ilustrativos. Os péptidos ciclo-RGDfV (66203) e ciclo-RADfV (69601) foram preparados como se descreve no Exemplo 1. As soluções de péptido ou PBS foram injectadas na preparação de CAM a uma concentração de 300 µg/mL. Às 24 horas e 48 horas, o papel de filtro e o tecido circundante da CAM foram dissecados e corados com Apop Tag para detectar a apoptose como descrito acima no Exemplo 12A2).

Como se mostra na Figura 18, as CAM tratadas dois dias antes com péptido 69203 (ciclo-RGDfV) mostraram um aumento de 3 a 4 vezes na coloração de Apop Tag comparativamente com as CAM tratadas com PBS isolado ou péptido de controlo cíclico 69601 (ciclo-RADfV).

C. Efeito do Tratamento Com Anticorpos Monoclonais na Apoptose e Ciclo Celular

As suspensões de células únicas foram também examinadas quanto ao número de cópias de ADN cromossómico por coloração com iodeto de propídio para determinar o efeito do tratamento com anticorpos monoclonais no ciclo celular e quanto à apoptose por coloração com Apop Tag.

Prepararam-se suspensões de células únicas de CAM tratadas 24 ou 48 horas antes com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) ou CSAT (anti-β_1) ou PBS como descrito no Exemplo 12A1).

Para a coloração das células com o Apop Tag, as suspensões celulares foram lavadas três vezes com tampão contendo BSA a 2,5% (p/v) e azida de sódio a 0,25% (p/v). As células foram, depois, fixas em paraformaldeído a 1% (p/v) em PBS durante 15 minutos, seguidos por três lavagens como se descreve acima. Para prevenir a ligação não especifica, as suspensões de células únicas foram bloqueadas com BSA a 5% (p/v) em PBS, de um dia para o outro, a 4 °C. As células foram depois lavadas como anteriormente, coradas com Apop Tag e a fluorescência celular medida com um FACScan como descrito acima no Exemplo 12A.

As células de cada condição experimental foram coradas com iodeto de propídio (Sigma, St. Louis, MO) a 10 µg/mL em PBS durante 1 hora, lavadas duas vezes com PBS e analisadas quanto às características nucleares típicas da apoptose, incluindo a condensação e segmentação da cromatina. A percentagem de células apoptóticas foi estimada por análise morfológica de células a partir de, pelo menos, 10 a 15 campos microscópicos seleccionados aleatoriamente.

Os resultados combinados das suspensões de células únicas de CAM de embriões tratados com CSAT (anti-β_1) ou LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) corados com Apop Tag e iodeto de propídio e analisados por FACS são dados na Figura 19. O eixo dos Y representa a coloração Apop Tag (apoptose), o eixo dos X representa a coloração com iodeto de propídio (teor de ADN). A linha horizontal representa o canal negativo para a coloração Apop Tag. Os painéis esquerdo e direito indicam as células de CAM de embriões tratados com CSAT e LM609, respectivamente. A análise do ciclo celular foi realizada por análise de, aproximadamente, 8000 eventos por condição e dados representados num gráfico topográfico.

As amostras de células únicas coradas com o corante de ADN iodeto de propídio revelaram que 25-30% das células de CAM tratadas com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) 48 horas após tratamento mostraram evidência de condensação e/ou segmentação nuclear. Estes processos são característicos de células submetidas a apoptose. Isto está em contraste com as CAM tratadas com CSAT (anti-β_1) em que 90-95% das células mostraram uma coloração nuclear normal.

Como se mostra na Figura 19, consistente com a indução da apoptose por LM609, observou-se um número significativo de células num pico contendo menos do que uma cópia de ADN (AO). Mostrou-se, anteriormente, que este pico representa o ADN fragmentado em células num estágio avançado de apoptose. Telford *et al.*, Cytometry, 13:137 (1992). Além disso, estas células revelam coloração imediata com Apop Tag confirmando a capacidade de este regente detectar células em apoptose. Contudo, além da coloração das células em AO, um número significativo de células contendo mais do que uma cópia de ADN também coraram com Apop Tag (Figura 19). Estes resultados demonstram que o LM609 possui a capacidade de promover a apoptose entre as células

vasculares que tenham já entrado no ciclo celular. Em contraste, as células derivadas das CAM de controlo que tinham entrado no ciclo celular mostraram uma coloração Apop Tag mínima consistente com as poucas células apoptóticas detectadas nas CAM tratadas com controlo.

Dessas células, nas CAM estimuladas por βFGF que entraram no ciclo celular (fase S e G2/M), 70% mostraram coloração positiva com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Isto é comparável com a coloração com LM609 a 10% observada entre células em ciclo de CAM não tratadas com βFGF. Estas verificações indicam que após a estimulação com βFGF, a maior parte das células contendo $\alpha_v\beta_3$ mostram uma proliferação activa.

Tomados conjunto, estas verificações indicam que a injecção intravenosa de mAb LM609 ou antagonista de péptido cíclico de $\alpha_v\beta_3$ promove a apoptose no interior da CAM de pintos após a indução da angiogénese.

As CAM foram também examinadas histologicamente quanto à expressão de $\alpha_v\beta_3$ por imunorreactividade com LM609 e quanto a células em fase de apoptose por imunorreactividade com Apop Tag. As secções de CAM resseccionadas de embriões tratadas 48 h antes com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$), CSAT (anti-β_1) ou PBS preparadas no Exemplo 5A foram lavadas, embebidas em OTC (Baxter) e congeladas rapidamente em azoto líquido. Cortaram-se secções de seis mícron de tecidos de CAM, fixaram-se em acetona durante 30 segundos e armazenaram-se, a -70 °C, até à utilização. Prepararam-se secções de tecido para coloração através de um enxaguamento breve em etanol (EtOH) a 70% (v/v) seguido por lavagem três vezes em PBS. A seguir, as secções foram bloqueadas com BSA a 5% (p/v) em PBS durante 2 h, seguido por incubação com 10 µg/mL de

mAb LM609 durante 2 h. As secções foram, depois, lavadas e incubadas com uma diluição 1:50 de IgG de cabra anti-rato conjugado com rodamina (Fisher Scientific, Pittsburg, PA) durante 2 horas. Finalmente, as mesmas secções foram lavadas e coradas com Apop Tag como descrito no Exemplo 12A2). As secções de tecido corado foram montadas e analisadas por microscopia de imuno-fluorescência confocal.

Na Figura 20, os painéis A a C representam tecido de CAM de embriões tratados com CSAT (anti-β_1) e os painéis D a F representam tecido de CAM de embriões tratados com LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$). Os painéis A e D representam tecidos corados com Apop Tag e visualizados por fluorescência (FITC) sobrepostos numa imagem D.I.C. Os painéis B e E representam os mesmos tecidos corados com mAb LM609 (anti-$\alpha_v\beta_3$) e visualizados por fluorescência (rodamina). Os painéis C e F representam imagens fundidas dos mesmos tecidos corados com Apop Tag e LM609, em que a coloração amarela representa co-localização. A barra representa 15 e 50 µm nos painéis da esquerda e direita, respectivamente.

Como se mostra na Figura 20 (A-C), após injecção intravenosa de CSAT ou controlo PBS, a coloração com Apop Tag revelou ser mínima e aleatória, indicando um nível mínimo de apoptose dentro do tecido. Contrariamente, as CAM dos embriões anteriormente tratados com LM609 ou péptido cíclico 203 mostraram uma maioria dos vasos corando intensamente com Apop Tag enquanto se observou uma reactividade mínima entre as células não vasculares circundantes (Figura 20 D-F). Além disso, quando se utilizaram o Apop Tag e LM609 para corar estes tecidos (19C e 19F) observou-se uma co-localização significativa apenas entre estes marcadores nas CAM derivadas de embriões tratados

com antagonistas $\alpha_v\beta_3$ (Figura 20F). Estas verificações demonstram que após a indução da angiogénese in vivo, os inibidores da integrina $\alpha_v\beta_3$ promovem selectivamente a apoptose dos vasos sanguíneos contendo $\alpha_v\beta_3$.

Embora a angiogénese seja um processo complexo envolvendo muitos eventos biológicos moleculares e celulares, várias linhas de evidência sugerem que a integrina $\alpha_v\beta_3$ das células vasculares desempenha um papel relativamente tardio neste processo. Em primeiro lugar, a análise imuno-histológica revela que a expressão de $\alpha_v\beta_3$ nas células vasculares atingiu um máximo 12-24 horas após a indução da angiogénese com βFGF. Em segundo lugar, os antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ perturbam a angiogénese induzida por múltiplos activadores sugerindo que este receptor está envolvido numa via comum a jusante de provavelmente todos os eventos de sinalização primários conduzindo à angiogénese. Em terceiro lugar, as CAM tratadas com mAb LM609 ou com péptido cíclico não mostraram um aumento significativo na apoptose como medida por análise do ADN até 48 horas após o tratamento com estes antagonistas. Finalmente, os antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ promovem a apoptose das células vasculares que já foram induzidas para entrar no ciclo celular.

Os resultados apresentados aqui proporcionam a primeira evidência directa de que os eventos de ligação da integrina podem regular a sobrevivência das células in vivo. Portanto, é formulada a hipótese de que uma vez iniciada a angiogénese, as células vasculares individuais dividem-se e iniciam um movimento em direcção à fonte angiogénica, após o que, a ligação de $\alpha_v\beta_3$ proporciona um sinal permitindo a continuação da sobrevivência da célula o que conduz a uma diferenciação e à formação de vasos sanguíneos maduros. Contudo, se a ligação de $\alpha_v\beta_3$ for evitada,

então, as células falham a recepção deste sinal molecular e as células entram em apoptose por defeito. Esta hipótese permitiria também prever que após a ocorrência da diferenciação os vasos sanguíneos maduros não necessitam mais da sinalização de $\alpha_v\beta_3$ para sobreviver e, deste modo, são refractários aos antagonistas desta integrina.

Finalmente, os resultados apresentados aqui proporcionam evidência de que os antagonistas da integrina $\alpha_v\beta_3$ podem fornecer uma aproximação terapêutica poderosa para o tratamento da neoplasia ou outras doenças caracterizadas pela angiogénese. Em primeiro lugar, os antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ destroem os vasos sanguíneos formados de novo sem afectarem a vasculatura pré-existente. Em segundo lugar, estes antagonistas não tiveram efeito significativo na viabilidade do embrião de pinto, sugerindo que são não tóxicos. Em terceiro lugar, a angiogénese foi significativamente bloqueada, independentemente dos estímulos angiogénicos. Finalmente, a administração sistémica de antagonistas $\alpha_v\beta_3$ causa uma regressão dramática de vários tumores humanos histologicamente distintos.

Deste modo, os Exemplos acima mencionados demonstram que a integrina $\alpha_v\beta_3$ desempenha um papel chave na angiogénese induzida por uma variedade de estímulos e, como tal, o $\alpha_v\beta_3$ é um agente terapêutico valioso com os antagonistas $\alpha_v\beta_3$ desta invenção para doenças caracterizadas por neovascularização.

A descrição anteriormente escrita é considerada suficiente para permitir a um especialista na técnica praticar a invenção. A presente invenção não é limitada no seu âmbito pela linha celular depositada, uma vez que a forma de realização depositada é entendida como uma ilustração simples de um aspecto da

invenção e qualquer linha celular que seja funcionalmente equivalente está dentro do âmbito desta invenção. O material depositado não constitui uma admissão de que a descrição escrita aqui contida é inadequada para permitir a prática de qualquer aspecto da invenção, incluindo o seu modo mais favorável, nem deve ser considerado como limitando o âmbito das reivindicações à ilustração específica que representa. De facto, várias modificações da invenção além das mostradas e descritas aqui tornar-se-ão evidentes para os especialistas na técnica a partir da descrição anterior e estão dentro do âmbito das reivindicações anexas.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

(i) INFORMAÇÃO GERAL

(i) REQUERENTE

(A) NOME : The Scripps Research Institute

(B) RUA: 10666 North Torrey Pines Road

(C) CIDADE: La Jolla

(D) ESTADO: CA

(E) PAÍS: EUA

(F) CÓDIGO POSTAL (ZIP): 92037

(G) TELEFONE: 619-544-2937

(H) TELEFAX: 619-554-6312

(ii) TÍTULO DA INVENÇÃO: MÉTODOS E COMPOSIÇÕES ÚTEIS PARA INIBIÇÃO DA ANGIOGÉNESE

(iii) NÚMERO DE SEQUÊNCIAS: 14

(iv) FORMA DE LEITURA INFORMÁTICA:

(A) TIPO DE MEIO: Diskette

(B) COMPUTADOR: IBM PC compatível

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

(D) SOFTWARE: Patentln Realese #1.0 Versão #1.25 (EPO)

(v) DADOS DO PRESENTE PEDIDO:

(A) NÚMERO DO PEDIDO: PCT/US 95/

(B) DATA DO PEDIDO: 09-MAR-1955

(vi) DADOS DE PEDIDOS ANTERIORES:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: US 08/210,715

(B) DATA DO PEDIDO: 18-MAR-1994

(vii) DADOS DE PEDIDOS ANTERIORES:

(A) NÚMERO DE PEDIDO: US 08/366,665

(B) DATA DO PEDIDO: 30-DEZ-1994

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº:1:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = BOC-GRGDFV-OMe

/nota - "BOC significa o grupo butiloxicarbonilo protector do N-terminal; OMe significa um éster metílico C-terminal; arginina na segunda posição

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = OMe

/nota - "OMe significa o grupo éster metílico protector de C-terminal."

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = D-Arg

/nota - "Um prefixo em "D" na D-Arg significa que a arGinina na posição 2 é um D-aminoácido.

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:1:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID Nº:2:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = BOC

/nota - "BOC significa grupo terbutiloxicarbonilo bloqueador do N-terminal."

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = OH

/nota - "OH significa um ácido carboxilico C-terminal livre."

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = D-Arg

/nota - "Um prefixo em "D" na D-Arg significa que a arginina na posição 2 é um D-aminoácido."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:2:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:3:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = H /nota - “H significa uma amina N-terminal livre.”

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = OH

/nota - “OH significa um ácido carboxílico C-terminal livre.”

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = D-Arg

/nota - “Um prefixo “D” na D-Arg significa que a arginina na posição 2 é um D-aminoácido.”

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:3:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:4:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo

/nota - "Ciclo significa um péptido cíclico; as letras minúsculas indicam um D-aminoácido, letras maiúsculas indicam um L-aminoácido."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:4:

Gly Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:5:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..5

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo - ciclo

/nota - "ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:5:

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:6:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..5

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo

/nota - "ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:6:

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:7:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:

(A) NOME/CHAVE: Péptido

(B) LOCALIZAÇÃO: 1..5

(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo /nota - "ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido."

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:7:

Arg Gly Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:8:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 15 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:8:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:9:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 5 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: Péptido
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..5
(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo

/nota - “ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido.”

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:9:

Arg Ala Asp Phe Val
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:10:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: Péptido
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6
(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo

/nota - “ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido.”

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:10:

Ala Arg Gly Asp Phe Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:11:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 6 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TIPOLOGIA: circular

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(ix) CARACTERÍSTICA:
(A) NOME/CHAVE: Péptido
(B) LOCALIZAÇÃO: 1..6
(D) OUTRA INFORMAÇÃO: /rótulo = ciclo

/nota - “ciclo significa um péptido cíclico; letras minúsculas indicam um D-aminoácido; letras maiúsculas indicam um L-aminoácido.”

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:11:

Gly Arg Gly Asp Phe Leu
1 5

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:12:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:
(A) COMPRIMENTO: 12 aminoácidos
(B) TIPO: aminoácido
(C) TIPO DE CADEIA: simples
(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:12:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:13:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 13 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:13:

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

(2) INFORMAÇÃO PARA A SEQ ID N°:14:

(i) CARACTERÍSTICAS DA SEQUÊNCIA:

(A) COMPRIMENTO: 11 aminoácidos

(B) TIPO: aminoácido

(C) TIPO DE CADEIA: simples

(D) TIPOLOGIA: linear

(ii) TIPO DE MOLÉCULA: péptido

(iii) HIPOTÉTICO: Não

(iv) ANTI-SENTIDO: Não

(v) TIPO DE FRAGMENTO: interno

(xi) DESCRIÇÃO DA SEQUÊNCIA: SEQ ID N°:14:

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

Lisboa, 2 de Fevereiro de 2012

REIVINDICAÇÕES

1. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento que imunorreage com $\alpha_v\beta_3$ e que é um antagonista $\alpha_v\beta_3$, para utilização no tratamento de tumores, inflamação de tecidos, artrite, retinopatia diabética, degenerescência macular ou restenose por inibição de angiogénese, em que o tratamento de tumores é seleccionado de inibição da formação de metástases tumorais e da regressão de tumores estabelecidos.

2. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento da artrite.

3. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 2 para utilização no tratamento da artrite reumatóide.

4. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento de retinopatia diabética ou degeneração macular e a referida angiogénese é a angiogénese retiniana.

5. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento de um hemangioma.

6. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento de um doente em risco de restenose após angioplastia coronária.

7. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 1 para utilização no tratamento de um tumor em que a referida angiogénese é a angiogénese tumoral.

8. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento que imunorreage com $\alpha_v\beta_3$ e que é um antagonista $\alpha_v\beta_3$, para utilização na indução de regressão num tumor estabelecido.

9. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 7 ou 8, em que o tratamento ou a regressão induzida compreende a administração do anticorpo monoclonal ou um seu fragmento em conjunto com quimioterapia.

10. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em quaisquer das reivindicações 1 a 9, em que o tratamento ou a regressão induzida compreende a administração do anticorpo monoclonal ou um seu fragmento para proporcionar o referido antagonista $\alpha_v\beta_3$ numa quantidade de desde 2 µM a 5 mM.

11. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em quaisquer das reivindicações 1 a 9, em que o tratamento ou a regressão induzida compreende a administração do anticorpo monoclonal ou um seu fragmento para proporcionar o referido antagonista $\alpha_v\beta_3$ numa quantidade de desde 0,1 mg por kg a 300 mg por kg.

12. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em quaisquer das reivindicações 1 a 11, em que o tratamento ou a regressão induzida compreende a administração tópica,

intravenosa, transdérmica, intra-sinovial, intramuscular ou oral do anticorpo monoclonal ou um seu fragmento.

13. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 9, em que o tratamento ou a regressão induzida compreende a administração como uma única dose intravenosamente do anticorpo monoclonal ou um seu fragmento.

14. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em qualquer reivindicação anterior, em que o referido anticorpo ou fragmento inibe a ligação do fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$ e apresenta uma actividade IC_{50}, pelo menos, 10 vezes maior na inibição da ligação do fibrinogénio a $\alpha_v\beta_3$ comparada à actividade IC_{50} na inibição da ligação do fibrinogénio a $\alpha_{iib}\beta_3$ ou $\alpha_v\beta_1$.

15. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em quaisquer das reivindicações 1 a 13, em que o referido anticorpo ou fragmento é imunoespecífico para αvβ3.

16. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 15, em que o referido anticorpo monoclonal é humanizado.

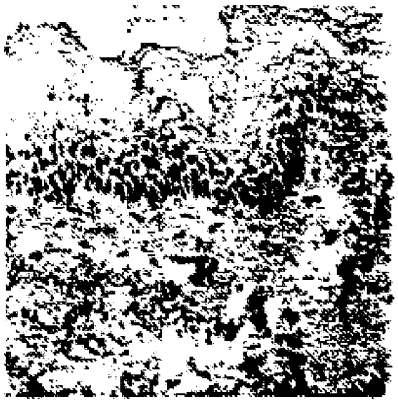
17. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 15, em que o referido anticorpo monoclonal é LM609 (ATCC HB 9537).

18. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado na reivindicação 15, em que o referido anticorpo monoclonal é LM609 humanizado (ATCC HB 9537).

19. Anticorpo monoclonal ou um seu fragmento como reivindicado em qualquer reivindicação anterior, para utilização no tratamento de um doente humano.

Lisboa, 2 de Fevereiro de 2012

Anti-β3



Pele normal

FIG. 1A

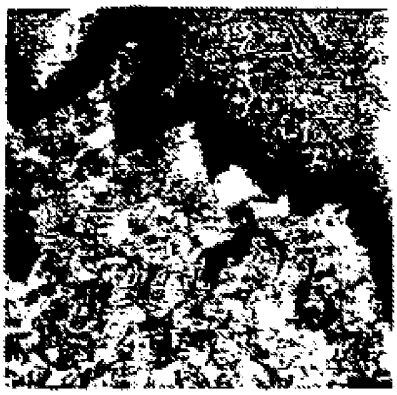


Anti-β3

Tecido de granulação

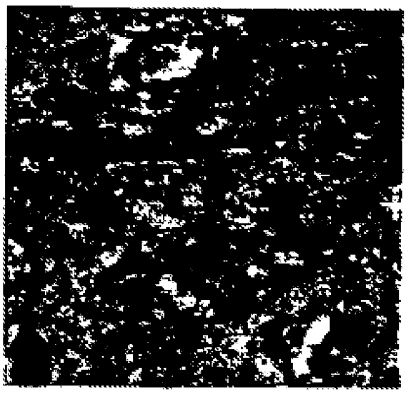
FIG. 1B

Anti-β1



Pele normal

FIG. 1C



Anti-β1

Tecido de granulação

FIG. 1D

Pele normal

Anti-vWF

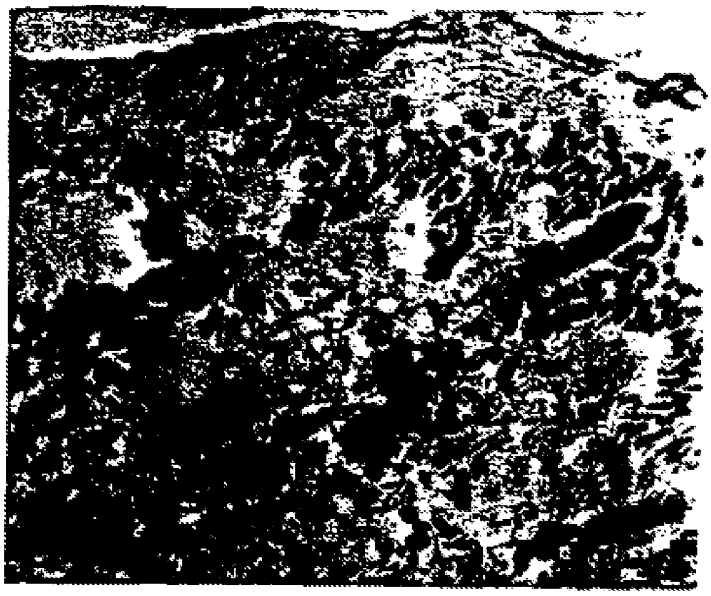


FIG. 2A

Tecido de Granulação

Anti-vWF

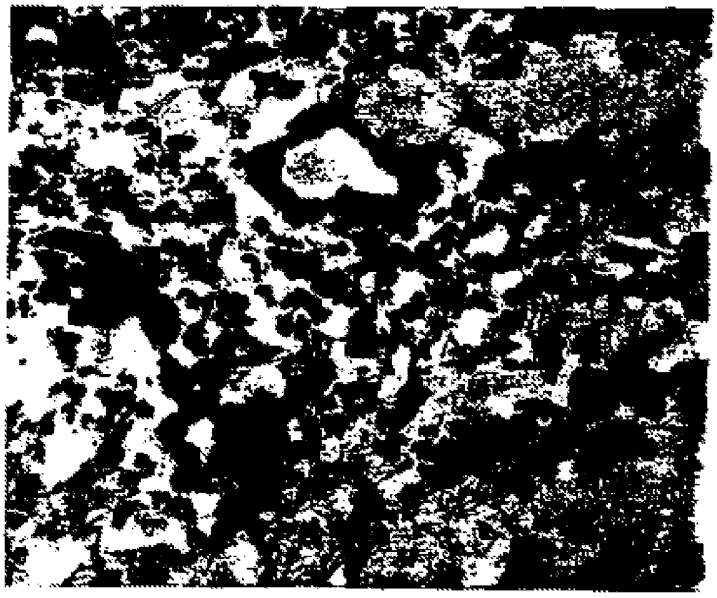


FIG. 2B

Pelo normal

Anti -laminina



FIG. 2C

Tecido de Granulação

Anti -laminina

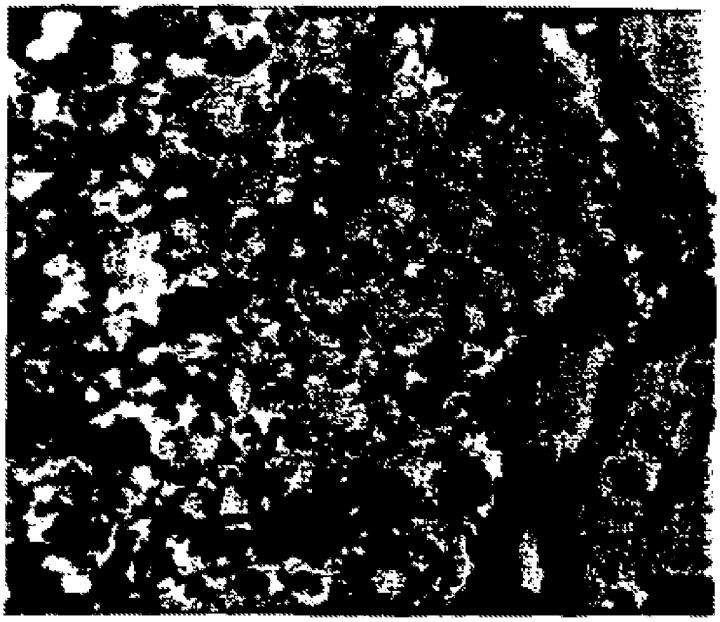
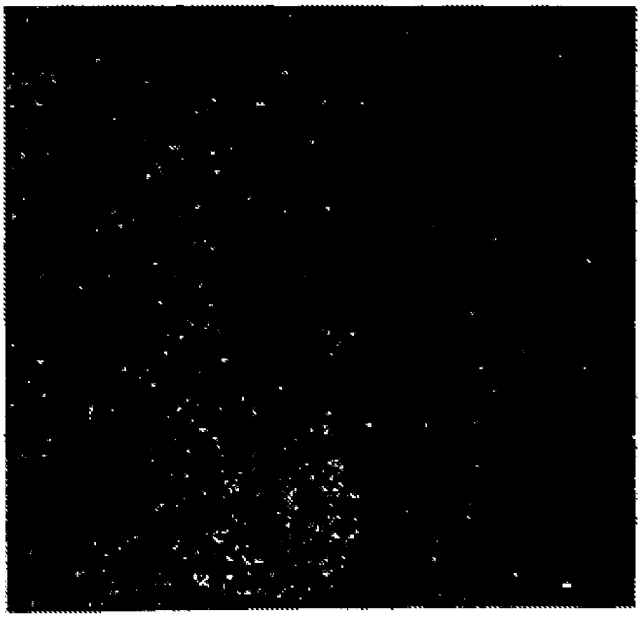


FIG. 2D



Cancro da Bexiga

FIG. 3A



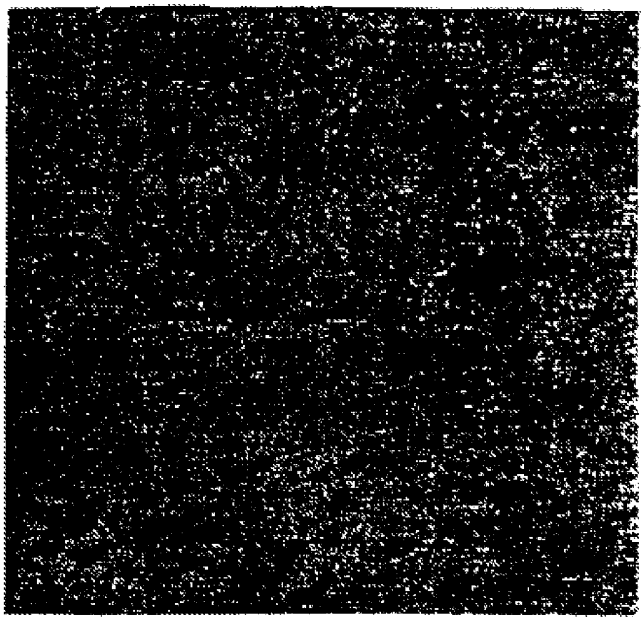
Cancro do Cólon

FIG. 3B



Cancro da mama

FIG. 3C



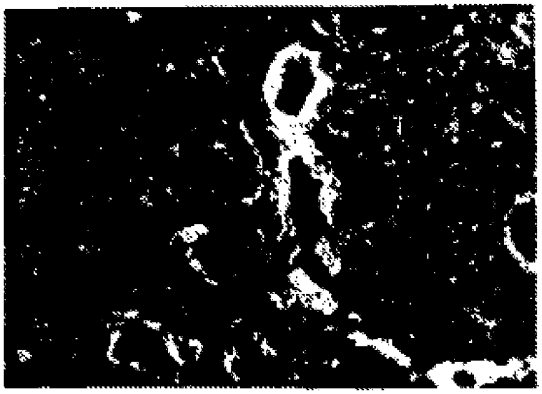
Cancro do pulmão

FIG. 3D



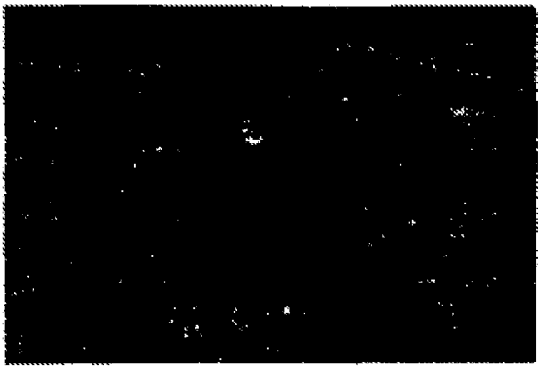
FIG. 4

FIG. 5A



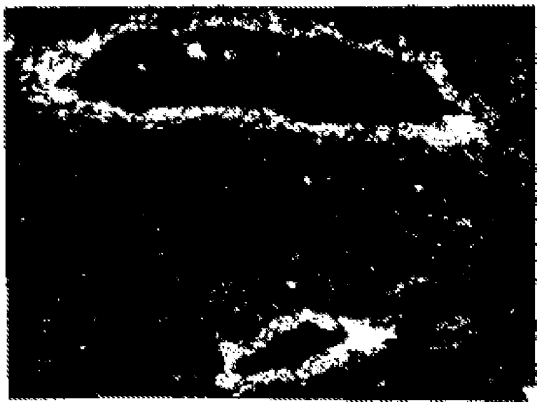
Anti-β_1 não tratado

FIG. 5B



Anti-$\alpha v\beta_3$ não tratado

FIG. 5C



Anti-$\alpha v\beta_3$ tratado com bFGF

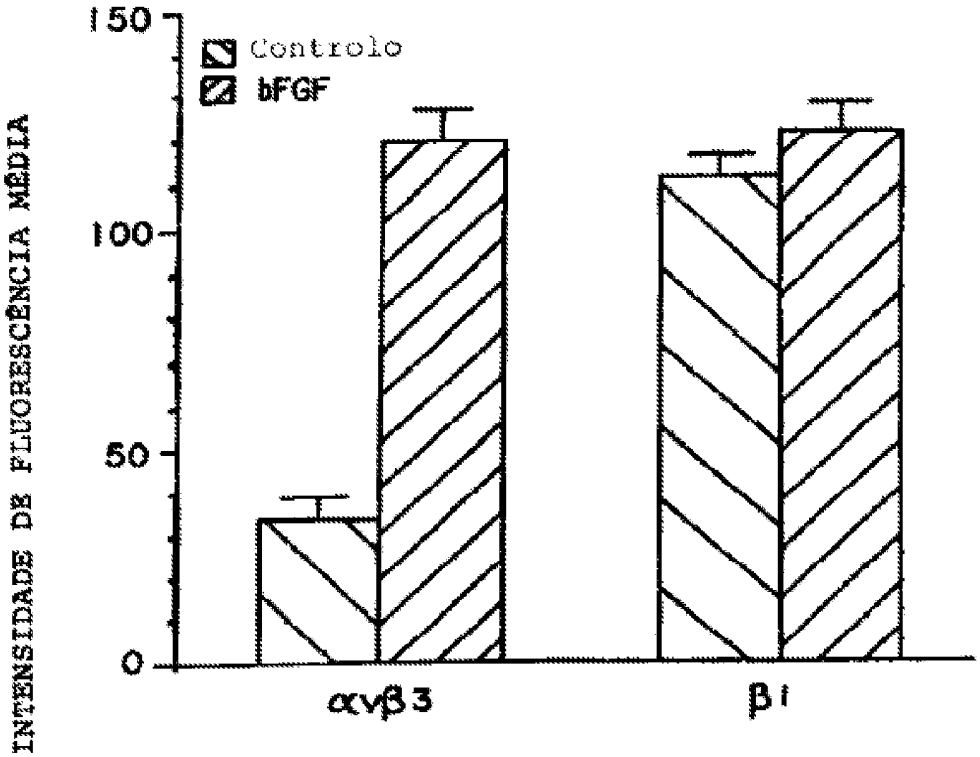

150
100
50
0
Controlo
bFGF
INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA MÉDIA
αvβ3
β1

FIG. 6

Controlo



FIG. 7A

bFGF

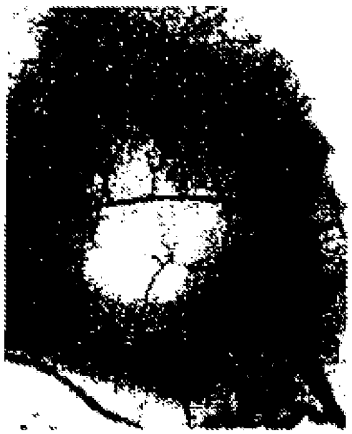


FIG. 7B

TNFα



FIG. 7C

FIG. 8A

Controlo



bFGF



FIG. 8B



FIG. 8C
Anti-β_1

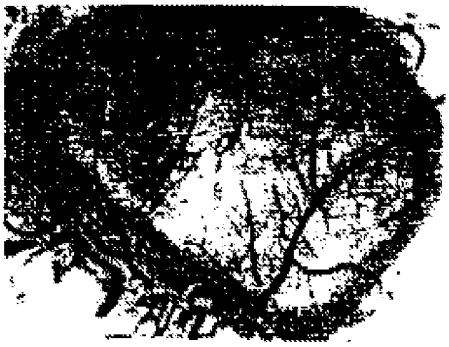


FIG. 8D
Anti-$\alpha_v\beta_5$



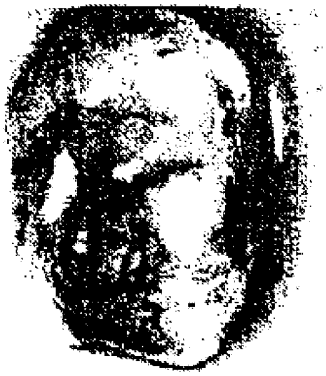
FIG. 8E
Anti-$\alpha_v\beta_3$

FIG. 9A



Péptido de controlo
Tumor

FIG. 9B



RGD cíclico
Tumor

FIG. 9C



RGD cíclico
Tumor

FIG. 10A

Controlo



FIG. 10B

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



FIG. 10C

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





FIG. 11A

Anti-β1

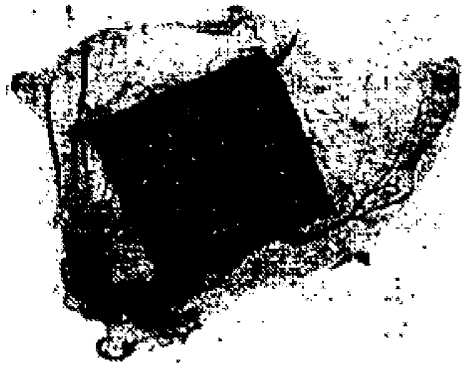


FIG. 11B

Anti-αvβ5

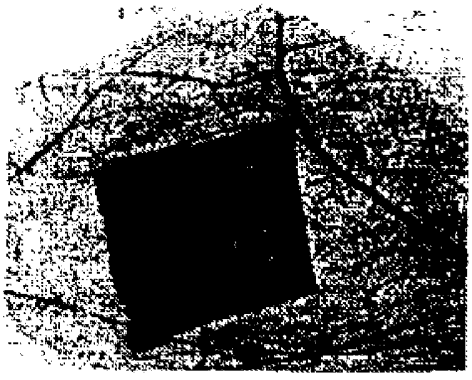


FIG. 11C

Anti-αvβ3

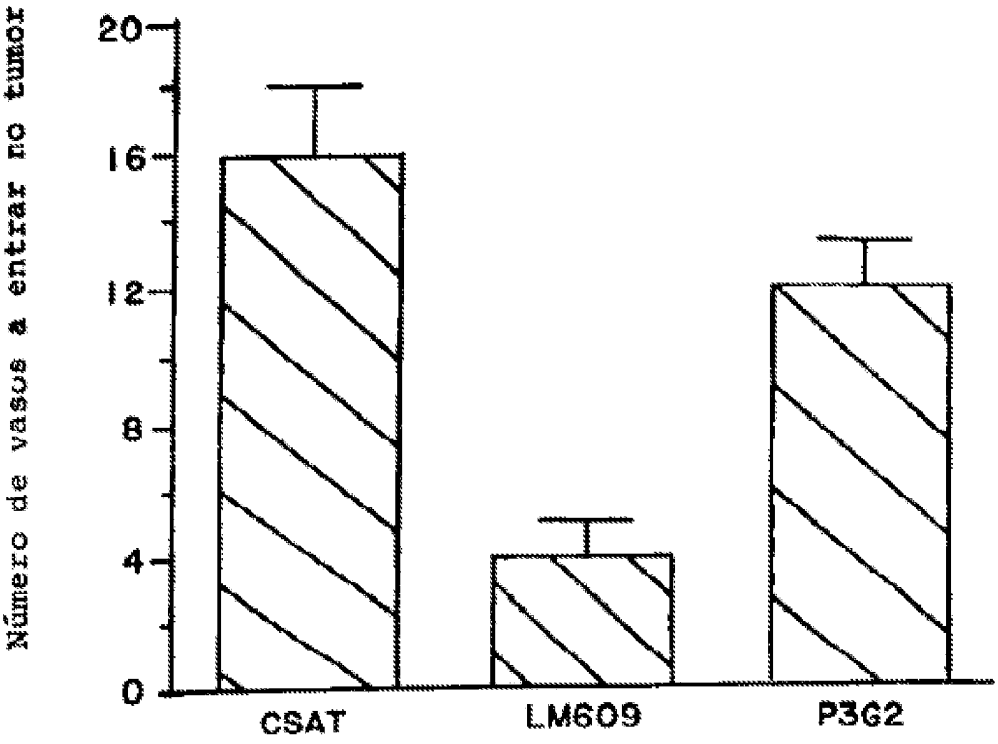


FIG. 12

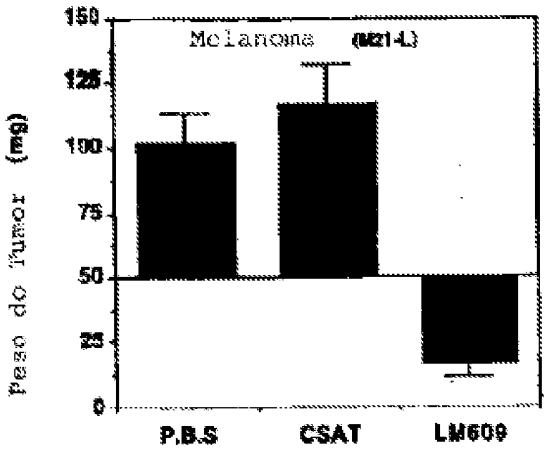


FIG. 13A

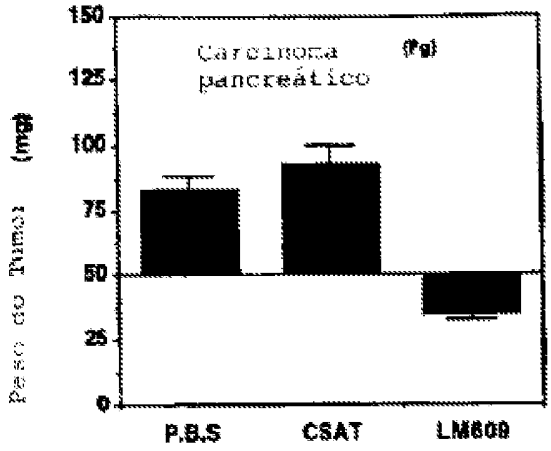


FIG. 13B

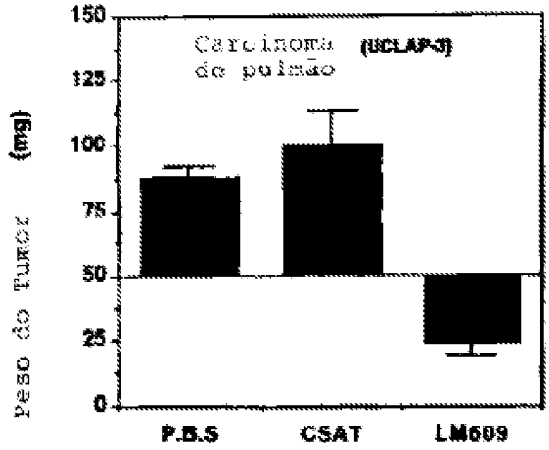


FIG. 13C

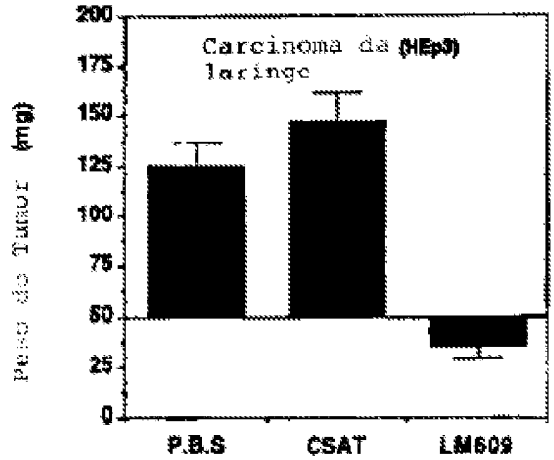
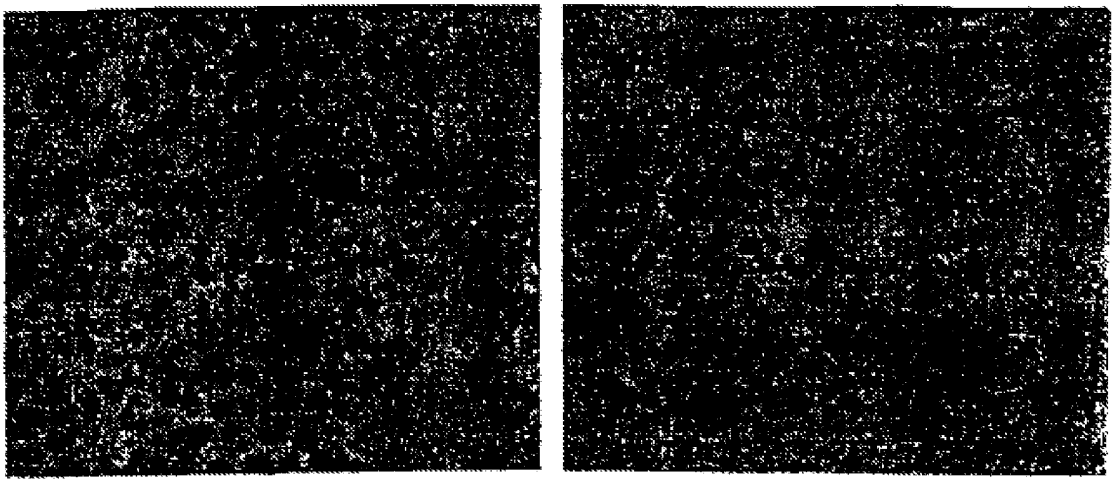


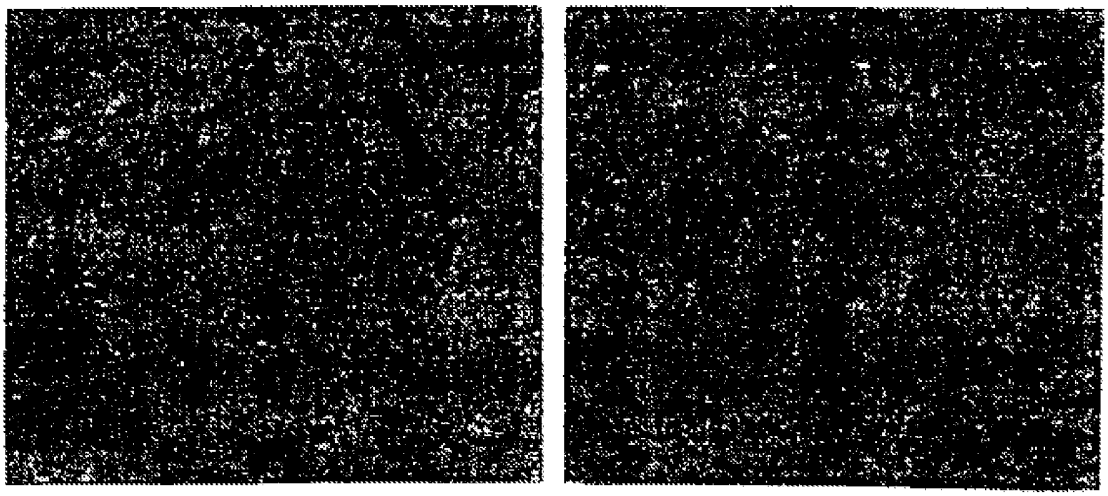
FIG. 13D

FIG. 14A



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

FIG. 14B



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

FIG. 15A



T Péptido de Controlo
Tumor

FIG. 15B



RGD cíclico
Tumor

FIG. 15C



RGD cíclico
CAM adjacente



FIG. 15D

RGD cíclico
Tumor



FIG. 15E

RGD cíclico
Tumor

P1F6
(Anti-$\alpha_v\beta_5$)



FIG. 16A

LM609
(Anti-$\alpha_v\beta_3$)



FIG. 16C

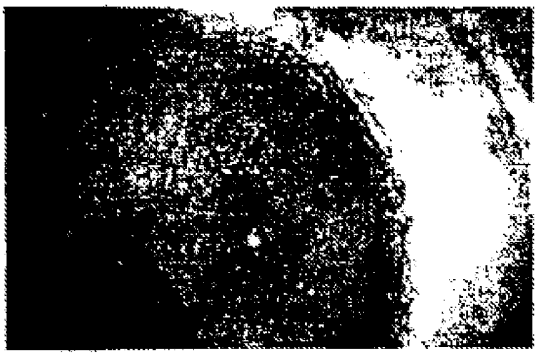


FIG. 16D



FIG. 16B

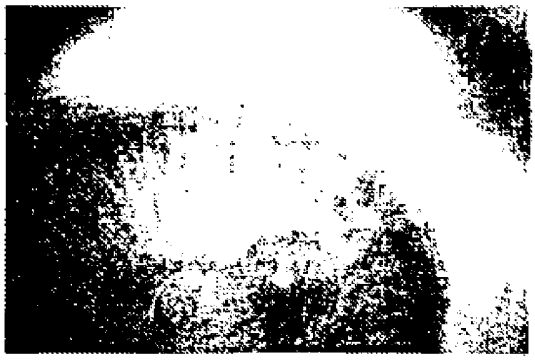


FIG. 16E

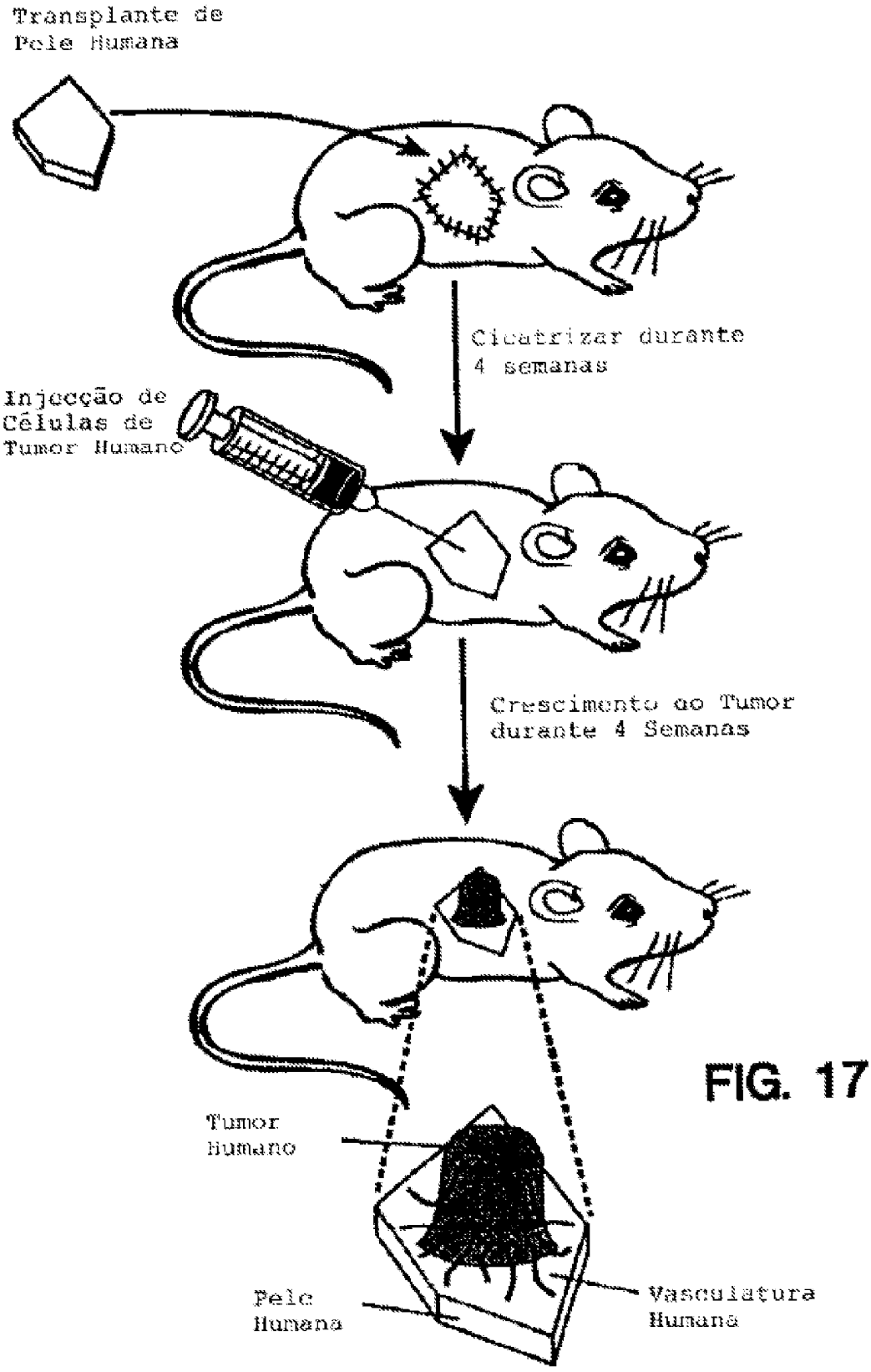

Transplante de
Pele Humana
Cicatrizar durante
4 semanas
Injecção de
Células de
Tumor Humano
Crescimento ao Tumor
durante 4 Semanas
Tumor
Humano
Pele
Humana
Vasculatura
Humana

FIG. 17

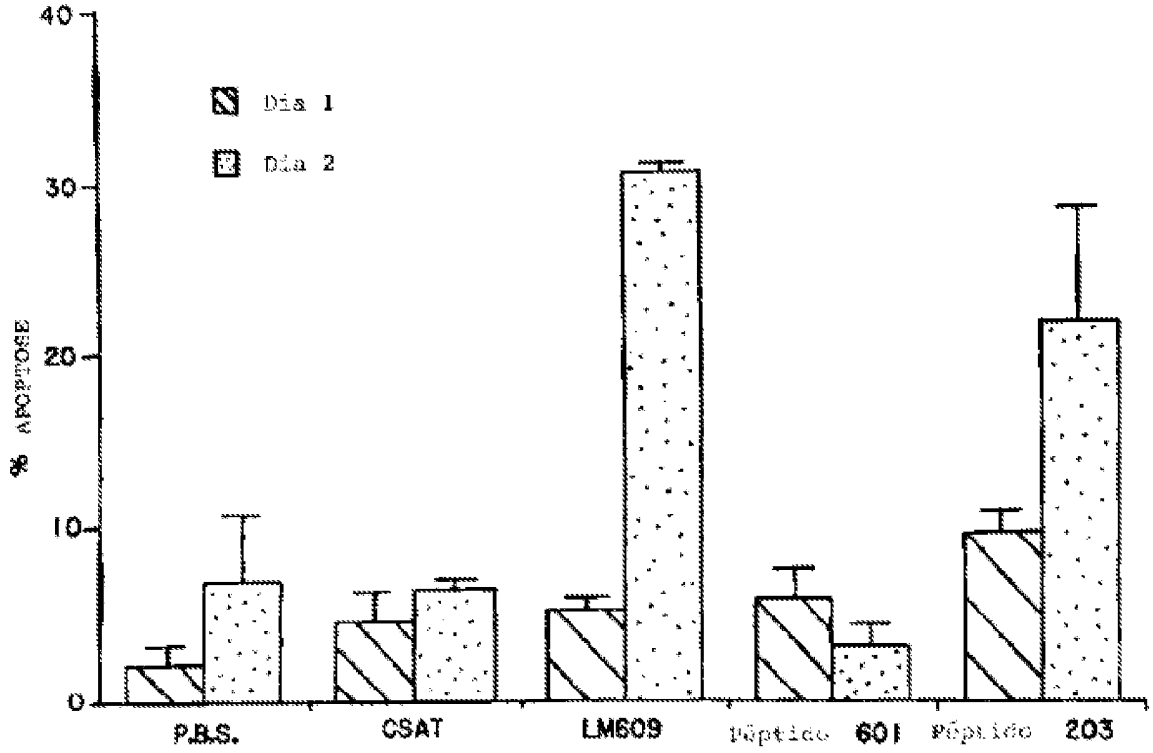

40
30
20
10
0
% MACROSE
Dia 1
Dia 2
P.B.S.
CSAT
LM609
Péptico 601
Péptido 203

FIG. 18

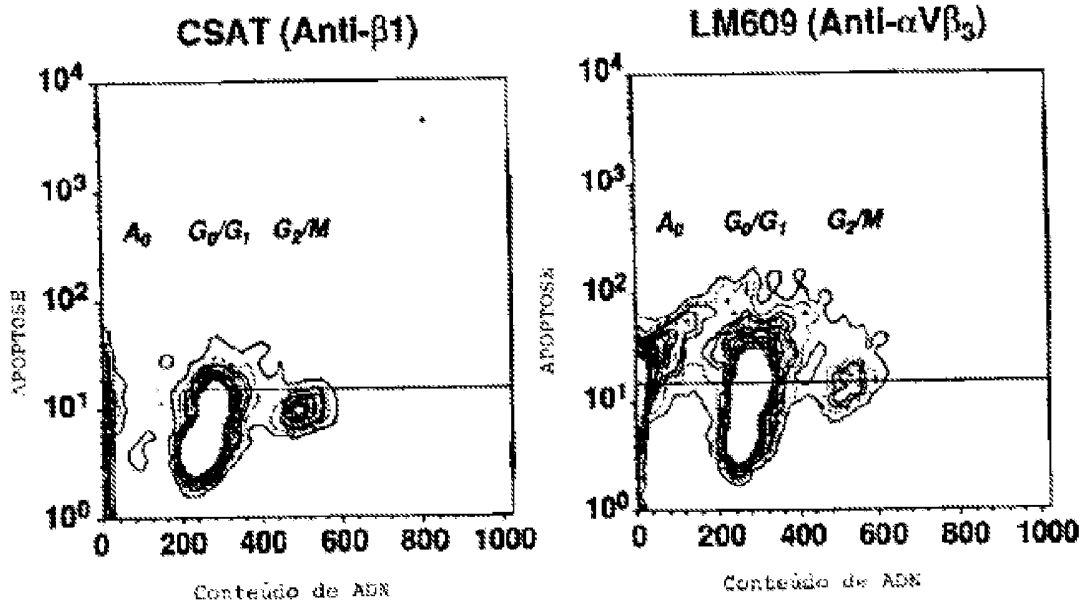

CSAT (Anti-β1)
LM609 (Anti-αVβ3)
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
A_0 G_0/G_1 G_2/M
APOPTOSE
0 200 400 600 800 1000
Conteúdo de ADN

FIG. 19

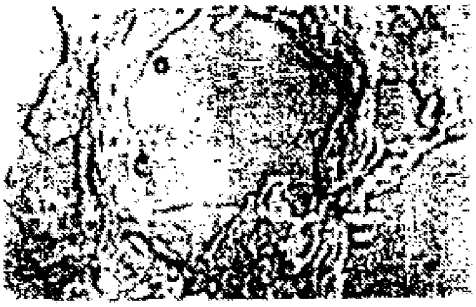


FIG. 20A

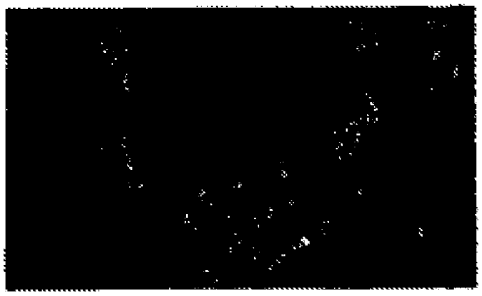


FIG. 20B



FIG. 20C

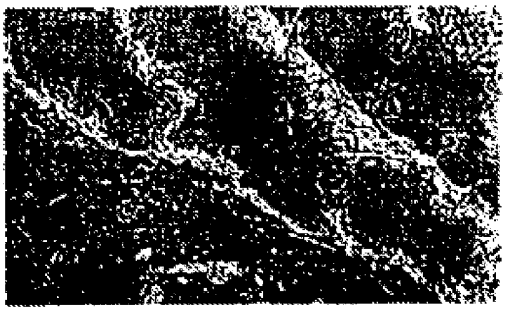


FIG. 20D

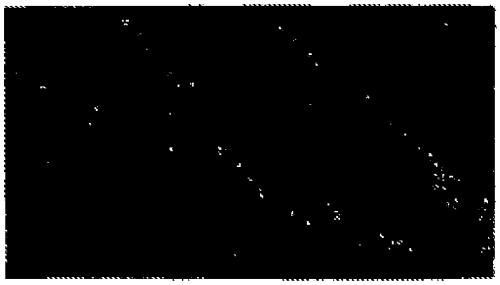


FIG. 20E

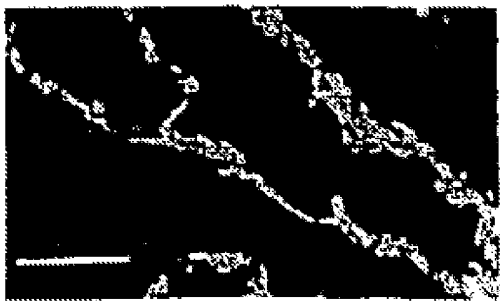


FIG. 20F