



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 304 942**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00905742 .3**
86 Fecha de presentación : **26.01.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1150714**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **07.11.2001**

54 Título: **Procedimientos para inhibir el crecimiento de los tumores cerebrales.**

30 Prioridad: **01.02.1999 US 118126 P**
21.01.2000 US 489391

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **CHILDRENS HOSPITAL LOS ANGELES**
4650 Sunset Boulevard
Los Angeles, California 90027, US

72 Inventor/es: **Laug, Walter, E.**

74 Agente: **Curell Suñol, Marcelino**

ES 2 304 942 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para inhibir el crecimiento de los tumores cerebrales.

5 Antecedentes de la invención

Campo técnico

La invención se refiere generalmente a la inhibición del crecimiento tumoral y específicamente a la inhibición del crecimiento de los tumores cerebrales.

Descripción de la técnica anterior

A lo largo de la presente solicitud se hace referencia a varias referencias entre paréntesis. Las descripciones de estas publicaciones están incorporadas en su totalidad a la presente memoria como referencia a esta solicitud para describir con mayor detalle el estado de la técnica al que pertenece la presente invención. Todas las citas bibliográficas para estas referencias pueden encontrarse al final de esta solicitud, antes de las reivindicaciones.

Los tumores cerebrales, como otros tumores sólidos, requieren un suministro de sangre continuamente en aumento para mantener el crecimiento continuo más allá de 1 a 2 mm³ (1,2). Esto se realiza mediante la angiogénesis, un proceso que se produce en respuesta a factores de crecimiento endoteliales liberados por las células tumorales. La angiogénesis implica la producción de proliferación de células endoteliales del sistema microvascular en reposo, la migración del neoendotelio hacia el lecho tumoral y, por último, la maduración en una nueva red capilar (3). Los tumores cerebrales resultan los más angiogénicos de todas las neoplasias humanas. Los factores angiogénicos principales demostrados por hibridación *in situ* o anticuerpos específicos en secciones de tejido de pacientes con glioblastoma y meduloblastoma, los tumores cerebrales malignos más frecuentes, son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (4-7). De hecho, la expresión de VEGF y la densidad del microvaso en los tumores gliales se correlacionan directamente con el grado de características malignas y los resultados generales (8-9).

Pruebas recientes sugieren que la angiogénesis está regulada por la activación de las integrinas de las células endoteliales, una familia de receptores transmembranarios que dirigen la adhesión celular a las proteínas de la matriz extracelular (ECM) mediante la unión a la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD)(10). En respuesta a bFGF y VEGF, las células endoteliales regulan por aumento la expresión de las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, respectivamente (11-13). Se ha descubierto que los glioblastomas y su endotelio vascular asociado expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (14, 15). La adhesión mediada por integrinas da como resultado la propagación de señales intracelulares que estimulan la supervivencia, proliferación, motilidad celular y crecimiento capilar rápido (16, 17). El fallo de estas integrinas para unir el ligando da como resultado la apoptosis celular endotelial (18, 19). La glucoproteína de la matriz, vitronectina, actúa como ligando para $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ y es producido en el borde invasivo principal por gliomas malignos (15, 20). Conjuntamente, estos descubrimientos sugieren una compleja interacción de la paracrina entre las células tumorales, la ECM del cerebro y las integrinas de las células endoteliales para la angiogénesis continuada y el crecimiento de tumores cerebrales malignos.

Los estudios que utilizan el anticuerpo anti $\alpha_v\beta_3$, LM-609 o un antagonista del péptido cíclico RGD de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, que evita las interacciones integrina-ECM, han demostrado una respuesta de la antiangiogénesis en la membrana corioalantoica (CAM) del pollo y un modelo híbrido de ratón (21-23). Otros agentes que actúan en puntos alternativos de la vía de la angiogénesis, tales como los anticuerpos contra VEGF o su ajuste del receptor de tirosina cinasa, han sido también eficaces en la inhibición de la angiogénesis (24, 25).

Los estudios anteriores han demostrado que la adhesión de las células de carcinoma de mama, melanoma y adenocarcinoma colónico HT29-D4 a la vitronectina, depende de α_v , $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, respectivamente (51-53). La vitronectina, que es producida por las células tumorales y endoteliales, es reconocida por $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ y es una proteína de la ECM descubierta en puntos de invasión tumoral y neovascularización (54-55). De este modo, además de apoyar la supervivencia de las células endoteliales mediante α_v ligadura y por consiguiente angiogénesis, la expresión de la vitronectina puede aumentar más la adhesión del tumor y las células endoteliales que expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, estimulando de este modo su invasión. En un estudio que utiliza un modelo de ratón SCID/híbrido humano para el cáncer de mama, la invasión tumoral se redujo considerablemente después de la administración del anticuerpo LM-609 anti $\alpha_v\beta_3$, lo que sugiere un efecto directo sobre la biología de la célula tumoral a través de un bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ (56).

Se ha analizado la migración e invasión de las células de las estirpes celulares tumorales que utilizan el análisis *in vitro* o la expresión de las integrinas en los vasos sanguíneos de los tumores cerebrales (14, 42, 63-67).

Los tumores cerebrales, debido a su naturaleza muy invasiva y grado de angiogénesis, proporcionan un modelo excelente con el que estudiar más la importancia de las integrinas en la evolución del tumor. Varios estudios han demostrado que la densidad del microvaso se correlaciona con los resultados y el grado maligno en los astrocitomas (57-59). Los inhibidores de la angiogénesis, tales como TNP-470, trombospodina-1 y el factor 4 de plaquetas, se han introducido en tumores cerebrales experimentales y han demostrado una inhibición del crecimiento tumoral (60-62). Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha examinado el efecto del antagonismo de las integrinas sobre la invasión

del tumor cerebral y la angiogénesis. Por consiguiente, existe la necesidad de estudiar el efecto y proporcionar por lo tanto un nuevo procedimiento para tratar los tumores cerebrales.

Sumario de la invención

La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que el antagonismo dirigido de las integrinas, específicamente $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, puede inhibir sustancialmente la tumorigénesis cerebral *in vivo*. Se basa también en el descubrimiento de que el micromedio del tumor cerebral es crítico para el comportamiento del tumor y en la determinación de su grado de respuesta a dichas terapias dirigidas biológicamente. La invención se basa además en el descubrimiento de que el antagonismo de la integrina puede tener un efecto antitumorigénico independiente de la anti-angiogénesis, que puede actuar sinérgicamente para retrasar el crecimiento tumoral. Por ejemplo, un descubrimiento de la presente invención consiste en que el antagonismo de la integrina puede producir la muerte directa de las células del tumor cerebral.

Por consiguiente, un aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista de una α_v integrina seleccionada de entre el grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir el crecimiento tumoral en el cerebro de un hospedador, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista de una integrina α_v debe administrarse al hospedador que necesita de dicha inhibición. En una forma de realización, la integrina α_v es α_v , $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista de una integrina α_v seleccionado de entre el grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_5$ y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la angiogénesis en un tejido tumoral localizado en el cerebro de un hospedador, en el que debe administrarse al hospedador una composición que comprende una cantidad que inhibe la angiogénesis de dicho antagonista de una integrina α_v . En una forma de realización, la integrina α_v es $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ seleccionado de entre el grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la adhesión celular dependiente de la ECM en células de tumor cerebral que se desarrollan en el cerebro de un hospedador, en el que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista a las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

Todavía en otro aspecto de la presente invención se proporciona una utilización de un antagonista a $\alpha_v\beta_3$ seleccionado de entre el grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la migración celular dependiente de la vitronectina en células de tumor cerebral que se desarrollan en el cerebro de un hospedador, en el que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista a $\alpha_v\beta_3$.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista polipeptídico de una integrina α_v para la preparación de una composición farmacéutica destinada a provocar apoptosis en células de tumor cerebral que se desarrollan en el cerebro de un hospedador, en el que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista de una integrina α_v .

En una forma de realización la integrina α_v es α_v , $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.

Las composiciones farmacéuticas preparadas según la presente invención son muy apropiadas para su utilización en el tratamiento de tumores cerebrales *in vivo*. La presente invención describe un nuevo método terapéutico para tratar tumores cerebrales.

Descripción de las figuras

Las propiedades mencionadas anteriormente y otras de la presente invención y su manera de obtención resultarán más evidentes, y se comprenderán mejor, haciendo referencia a la descripción siguiente, considerada en conjunto con los dibujos adjuntos. Estos dibujos describen únicamente una forma de realización típica de la invención y no limitan por lo tanto su alcance. Sirven para añadir especificidad y detalle, en las que:

Las Figs. 1a y 1b presentan la inhibición de la angiogénesis (a) y el crecimiento tumoral en la CAM (b) por el antagonista α_v .

La Fig. 2 presenta el tamaño del tumor (a) y la supervivencia del ratón (b) después de la inyección intracerebral de células DAOY y U87MG.

Las Fig. 3a y 3b presentan la histopatología de células DAOY (a) y U87MG (b) de tumor cerebral inyectadas por vía ortotópica, tratadas a diario con el péptido inactivo (A) o activo (B-D). Los tumores intracerebrales grandes

(cabezas de flecha) son visibles en los animales de referencia (A), mientras que ningún tumor (B) o solamente tumores residuales microscópicos (cabezas de flecha) se detectan en los animales tratados con el antagonista α_v (C y D).

La Fig. 4 presenta la supervivencia de ratones después de la implantación ortotópica del tumor cerebral, recibiendo el péptido activo o inactivo.

La Fig. 5 presenta el efecto del antagonista α_v en células DAOY implantadas por vía ortotópica (cerebro) y por vía heterotópica (subcutánea).

Las Figs. 6a-6d presentan las características de la integrina (a), y el efecto del antagonista de α_v sobre la adhesión a (b), la migración en la vitronectina (c) y la viabilidad celular en la vitronectina (d) para el tumor cerebral y las células endoteliales capilares del cerebro.

La Fig. 7 presenta el efecto del pentapéptido cíclico sobre la adhesión de las células tumorales a proteínas de la ECM.

La Fig. 8 presenta el efecto de inhibición de la adhesión, que da como resultado la muerte celular (apoptosis) tanto en las células del tumor cerebral como en las células capilares del cerebro. Este efecto está limitado a la vitronectina y la tenascina de la ECM.

La Fig. 9 presenta la inmunohistoquímica de tumores cerebrales U87 xenotrasplantados en el prosencéfalo de ratones lampiños y tratado con un péptido activo (anti α_v) o de referencia.

Descripción detallada de la invención

Un aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista de una integrina α_v seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_5$ y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir el crecimiento tumoral en el cerebro de un hospedador, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista de una integrina α_v se administra al hospedador que necesita dicha inhibición.

La composición farmacéutica preparada según la presente invención puede utilizarse para tratar algunos tumores que crecen en el cerebro, con la condición de que el crecimiento de los tumores en el cerebro requiera la interacción de la integrina con su ligando. Ejemplos de dicho tumor incluyen, pero no se limitan a, glioblastoma, meduloblastoma (astrocitoma, otro neuroectoderma primitivo y los cánceres de glioma del tronco cerebral). En el contexto de la presente invención, preferentemente, el crecimiento tumoral está situado intracerebralmente en el cerebro de un hospedador. El hospedador puede ser cualquier animal, incluyendo, pero sin limitarse a la rata y al hombre. El crecimiento tumoral se inhibe si el crecimiento es alterado por el tratamiento.

En el contexto de la presente invención, una integrina es cualquier miembro de una familia específica de receptores transmembranarios heterodiméricos homólogos. Los receptores dirigen la adhesión celular uniéndose a la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD). Los receptores pueden expresarse tanto en las células tumorales como en las normales. Las características de las integrinas son bien conocidas y están bien caracterizadas en la técnica y se describen con detalle en las referencias citadas (1,2), cuyo contenido relevante está incorporado a la presente memoria como referencia. Ejemplos de integrinas incluyen, pero no se limitan a, la familia α_v , tal como $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_1$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_v\beta_8$ y similares.

Un antagonista de una integrina es una molécula que bloquea o inhibe la actividad fisiológica o farmacológica de la integrina inhibiendo la actividad de fijación de la integrina, de un receptor, a su ligando, varias proteínas de la matriz, incluyendo, pero sin limitarse a, vitronectina, tenascina, fibronectina y colágeno I.

Por ejemplo, un antagonista de $\alpha_v\beta_3$ puede ser cualquier factor peptídico que inhiba la fijación de $\alpha_v\beta_3$ a uno de sus múltiples ligandos, a saber vitronectina o tenascina. Ejemplos de antagonistas de $\alpha_v\beta_3$ se describen en las publicaciones PCT WO 96/37492 y WO 97/45137, cuyo contenido relevante se incorpora a la presente memoria como referencia.

Asimismo, un antagonista de $\alpha_v\beta_5$ puede ser cualquier factor que inhiba la fijación de $\alpha_v\beta_5$ a su ligando, a saber vitronectina. En la publicación PCT WO 97/06791 se describen ejemplos de antagonistas de $\alpha_v\beta_5$, cuyo contenido relevante se incorpora a la presente invención como referencia.

En una forma de realización de la presente invención, el antagonista es un antagonista polipeptídico de α_v , a saber, un antagonista polipeptídico de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido que contiene Arg-Gly-Asp (RGD). En una forma de realización, el antagonista polipeptídico es un antagonista polipeptídico cíclico RGD de α_v .

Según otra forma de realización de la presente invención, el antagonista puede ser un anticuerpo monoclonal inmunoespecífico para $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$. Alternativamente, puede ser una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. En una forma de realización, un anticuerpo monoclonal inmunoespecífico para $\alpha_v\beta_3$ tiene características de inmunorreacción de un anticuerpo monoclonal denominado LM-609. En otra forma de realización de la presente

invención, un anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_3$ tiene las características de inmunorreacción de un anticuerpo monoclonal denominado P1-F6. Tanto el anticuerpo LM-609 como el anticuerpo P1-F6 son bien conocidos en la industria y están comercializados por Chemicon, Temecula, California.

- 5 En el contexto de la presente invención, los antagonistas pueden utilizarse solos o en combinación entre sí para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir el crecimiento tumoral en el cerebro.

La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de antagonista suficiente para producir una inhibición mensurable de un crecimiento tumoral en el cerebro de un huésped que está siendo tratado. La inhibición del crecimiento tumoral puede determinarse por medición microscópica tras la tinción, tal como se describe en la presente memoria, por exploración MRI del cerebro del ratón o por incorporación de 3H-timidina, cuyos procedimientos son bien conocidos por un experto en la materia.

15 En la medida en que un antagonista de integrina puede tener la forma de un péptido que contiene RGD, un anticuerpo monoclonal anti $\alpha_v\beta_3$ o un fragmento del mismo, un anticuerpo monoclonal anti $\alpha_v\beta_5$ o un fragmento del mismo o una combinación de los anticuerpos monoclonales de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, debe apreciarse que puede variar la potencia, y por consiguiente la expresión, de una "cantidad terapéuticamente eficaz". Sin embargo, como se demuestra por los presentes métodos de análisis, un experto en la materia puede evaluar fácilmente la potencia de un antagonista experimental.

20 La potencia de un antagonista puede medirse mediante una variedad de medios que incluyen, pero no se limitan a, la inhibición de la angiogénesis en el análisis CAM, en el análisis del tumor cerebral *in vivo* y midiendo la inhibición de la fijación de ligandos naturales a las integrinas tales como $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$, descritos en su totalidad en la presente memoria, y análisis similares.

25 Los intervalos de dosis para la administración del antagonista dependen de la forma del antagonista y de su potencia para una determinada integrina. Un experto en la materia puede encontrar la dosis apropiada de un antagonista determinado a la vista de la descripción de la presente invención sin experimentación innecesaria. La dosis sería lo suficientemente grande para producir un efecto deseado en el que el crecimiento tumoral en el cerebro está inhibido. La dosis no debería ser tan grande como para producir efectos secundarios desfavorables, tal como edema cerebral o la liberación rápida de citocinas de tumores cerebrales que producen caquexia, por ejemplo, cuando un antagonista de la integrina se administra en forma de polipéptido. La dosis por kg de peso corporal puede estar comprendida entre 1 y 20 mg, en una o más administraciones de dosis diarias, durante uno o varios días o indefinidamente. Cuando un antagonista de integrina se administra en forma de un anticuerpo monoclonal, la dosis puede estar comprendida entre 30 1 y 20 mg/kg, en una administración de dosis una a dos veces a la semana durante un tiempo indefinido.

El polipéptido o los anticuerpos monoclonales pueden administrarse por vía parenteral mediante inyección o por infusión gradual a lo largo del tiempo. Aunque el tejido que debe tratarse es con la mayor frecuencia tratado por administración intraperitoneal o subcutánea (anticuerpo), los antagonistas pueden también administrarse por vía intraocular, intravenosa, intramuscular, intracavidad, transdérmica y pueden suministrarse por medios peristálticos.

40 Las composiciones se administran de una manera compatible con la formulación de la dosis y en una cantidad terapéuticamente eficaz. La cantidad que debe administrarse y el programa de administración dependen del paciente que ha de tratarse, de la capacidad del sistema del paciente para utilizar el ingrediente activo y del grado de efecto terapéutico deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo requeridas que han de administrarse dependen del criterio del médico y son peculiares para cada individuo. Sin embargo, los intervalos de la dosis adecuada para la aplicación generalizada están descritos en la presente memoria y dependen de la vía de administración. Los regímenes adecuados para la administración son también variables pero están tipificados por una administración inicial, seguida de dosis repetidas a intervalos de una o más horas mediante una inyección posterior u otra administración.

50 Las composiciones farmacéuticas preparadas según la presente invención pueden contener un antagonista en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en la presente memoria, las expresiones "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable" y las variaciones gramaticales de las mismas, en cuanto que se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos, se utilizan indistintamente y representan que los materiales son capaces de administración a un animal sin producción de efectos fisiológicos indeseables.

Las preparaciones para la administración parenteral de un péptido o de un anticuerpo incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como el aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como el oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo la solución salina y el medio tamponado. Los vehículos parentales incluyen la solución de cloruro sódico, la dextrosa de Ringer, la dextrosa y el cloruro sódico, Ringer lacteado o aceites fijados. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores fluidos y de nutrientes, reabastecedores de electrolito (tales como aquellos a base de dextrosa de Ringer) y similares. Pueden estar también presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, 65 agentes quelantes y gases inertes y similares.

Otro aspecto de la presente invención proporciona la utilización de un antagonista de una integrina α_v seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra

$\alpha_v\beta_5$ y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la angiogénesis en un tejido tumoral situado en el cerebro de un hospedador, en la que una composición que comprende una cantidad que inhibe la angiogénesis de dicho antagonista de una integrina α_v se administra al hospedador.

Como se expuso en el apartado anterior, la angiogénesis es la formación de una red neovascular a partir de vasos del hospedador preexistentes y se requiere para el crecimiento del tumor más allá de 1 a 2 mm³. En el contexto de la presente invención, la angiogénesis se inhibe si mejoran la angiogénesis y los síntomas de la enfermedad mediados por la angiogénesis.

En una forma de realización de la presente invención, el tejido tumoral está situado dentro del cerebro en el cerebro de un hospedador. El hospedador puede ser cualquier animal. Ejemplos de hospedadores incluyen, pero no se limitan a, ratón, rata y ser humano.

Los intervalos de la dosis para la administración del antagonista dependen de la forma del antagonista y su potencia para una integrina específica. Un experto en la materia puede encontrar la dosis apropiada para un antagonista específico a la vista de la exposición de la presente invención sin experimentación excesiva. La dosis debería ser lo suficiente grande para producir el efecto deseado en el que mejoran la angiogénesis y los síntomas de la enfermedad mediados por la angiogénesis. La dosis no debería ser tan grande como para originar efectos secundarios desfavorables, tal como edema cerebral debido a la rápida lisis del tumor con liberación de citocina o hemorragia.

En una forma de realización de la presente invención, un antagonista de una integrina puede ser un antagonista de integrina $\alpha_v\beta_3$ o integrina $\alpha_v\beta_5$. Los antagonistas de integrina preferidos pueden ser un anticuerpo monoclonal o un péptido. En una forma de realización de la presente invención, el antagonista es un antagonista polipeptídico de α_v , a saber, un antagonista polipeptídico de $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. Preferentemente, el polipéptido es un polipéptido contenido en Arg-Gly-Asp (RGD). En una forma de realización, el antagonista polipeptídico es un antagonista pentapeptídico cíclico de RGD de α_v .

Según otra forma de realización de la presente invención, el antagonista puede ser un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$ y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de antagonista suficiente para producir una inhibición mensurable de la angiogénesis en el tejido que está siendo tratado, es decir, una cantidad para la inhibición de la angiogénesis. La inhibición de la angiogénesis puede medirse *in situ* por inmunohistoquímica, tal como se describe en la presente memoria, o por otros métodos conocidos por un experto en la materia.

Otro aspecto de la presente invención proporciona la utilización de un antagonista contra las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ seleccionadas de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir la adhesión celular dependiente de ECM en células de tumor cerebral que crecen en el cerebro de un hospedador, en el que se administra al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista contra las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

En el contexto de la presente invención, la adhesión celular dependiente de ECM incluye cualquier adhesión celular que sea dependiente de ECM y que esté mediada por integrinas α_v . Ejemplos de dicha adhesión incluyen, pero no se limitan a, la adhesión celular dependiente de vitronectina y la adhesión celular dependiente de tenascina. Un descubrimiento de la presente invención consiste en que los tumores cerebrales humanos pueden producir vitronectina y tenascina, y estas ECM desempeñan una importante función en la adhesión celular del tumor y en la migración interactuando con integrinas. En el contexto de la presente invención, la inhibición se consigue si se reduce la adhesión celular del tumor a la ECM.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria indica una cantidad de antagonista que es suficiente de modo que se reduce la adhesión celular del tumor mediada por la ECM. La adhesión celular puede medirse por los métodos descritos en la presente memoria y por los métodos conocidos comúnmente en la materia.

Por ejemplo, el antagonista puede ser un antagonista pentapeptídico cíclico RGD de α_v o una combinación de anticuerpos monoclonales denominados LM-609 y P1-F6.

Otro aspecto de la presente invención proporciona una utilización de un antagonista a $\alpha_v\beta_3$ seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v y un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la migración celular dependiente de vitronectina en células del tumor cerebral que crecen en el cerebro de un hospedador, en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista a $\alpha_v\beta_3$ debe administrarse al hospedador.

En el contexto de la presente invención, la inhibición se consigue si se reduce la migración de las células del tumor.

La frase “cantidad terapéuticamente eficaz” tal como se utiliza en la presente memoria indica una cantidad de antagonista que es suficiente de modo que se reduce la migración de las células tumorales mediada por vitronectina.

La migración celular puede medirse por los procedimientos descritos en la presente memoria y por los procedimientos conocidos generalmente en la materia.

Por ejemplo, el antagonista puede ser un antagonista pentapeptídico cíclico de RGD de α_v o un anticuerpo monoclonal denominado LM-609.

La presente invención proporciona también una utilización de un antagonista polipeptídico de una integrina α_v para la preparación de una composición farmacéutica destinada a producir apoptosis en el crecimiento de células tumorales en el cerebro de un hospedador, en el que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista de una integrina α_v .

En el contexto de la presente invención, se produce apoptosis de las células del tumor cerebral si se observa un aumento de la cantidad de apoptosis de células tumorales en el cerebro después de la administración del antagonista. La cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de antagonista suficiente para producir una apoptosis mensurable de la célula tumoral en el cerebro de un huésped que está siendo tratado. La apoptosis de la célula tumoral en el cerebro puede medirse por procedimientos descritos en la presente memoria o conocidos generalmente en la materia.

Según una realización de la presente invención, la integrina puede ser α_v , $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.

Ejemplos

Materiales y procedimientos

Materiales: El pentapéptido EMD 121974 de RGD cíclico activo, ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-[N-Me]-Val), y el péptido cRAD de referencia inactivo (EMD 135981) fueron proporcionados por A. Jonczyk, Ph.D., Merck KgaA, Darmstadt, Alemania. Los anticuerpos monoclonales LM609 y P1F6 han sido descritos (13). Las estirpes celulares del tumor cerebral DAOY y U87MG fueron adquiridas en ATCC, Rockville, MD. Los cultivos primarios de células endoteliales capilares del cerebro humano fueron proporcionados por M. Stins, Ph.D., Childrens Hospital, Los Angeles (49). La vitronectina humana se adquirió en Promega, Madison, WI.

Análisis FACS: Se utilizó un citómetro FACScan (Becton-Dickinson, San Jose). Las condiciones fueron las descritas anteriormente (43). Los anticuerpos primarios fueron LM609 y P1F6 a 1:100, y el Ab secundario fue IgG antiratón de cabra marcado con FITC a 1:250.

La determinación de la apoptosis fue tal como la instrucción del fabricante (Clontech, Palo Alto, CA, kit para apoptosis Apo Alert Annexin V-FITC).

Adhesión: Las condiciones del análisis fueron las descritas anteriormente (15). Los pocillos tratados con cultivo sin tejido se incubaron durante la noche a 4°C con vitronectina (1-10 $\mu\text{g/ml}$ de PBS), se lavó y se bloqueó durante 30 min. con BSA al 1% desnaturalizado térmicamente en PBS, seguido de lavado con PBS. Las células de referencia y de ensayo, se preincubaron a 37°C con la sustancia de ensayo (20 $\mu\text{g/ml}$) en tampón de adhesión durante 30 min. se lavaron en pocillos (5×10^4 células/pocillo) y se incubaron durante 1 h. a 37°C. Después de un suave lavado de los pocillos con tampón de adhesión, las células adherentes se fijaron y se tiñeron con violeta cristal, el colorante se solubilizó en metanol y se determinó la D.O. a 600Å.

Migración: Se incubaron filtros de policarbonato Transwell (8 μm de tamaño de poro) durante 30 min. a 37°C con vitronectina en PBS (1 $\mu\text{g/ml}$ de la parte superior y 10 μg del lado del fondo), se bloquearon durante 30 min. con BSA desnaturalizado térmicamente al 1% y se lavaron con PBS. Se añadieron células de ensayo (5×10^5 /pocillo) en tampón de adhesión que contiene las sustancias de ensayo indicadas (20 $\mu\text{g/ml}$) y se incubó durante 4 h. a 37°C con la cámara inferior conteniendo el tampón de adhesión. Las células en la cámara superior se retiraron con una torunda de algodón y las células de la parte del fondo de fijaron y se tiñeron con violeta cristal y se determinó por recuento el número de células migradas.

Apoptosis: Las condiciones de la adhesión fueron las anteriores, con la excepción de que placas de 12 pocillos cubiertas con vitronectina y 5×10^5 células/pocillo se colocaron en el tampón de adhesión. Después de 30 min. de incubación a 37°C, se sustituyó el tampón de adhesión por tampón que contenía 20 $\mu\text{g/ml}$ del péptido cRGD activo o cRAD inactivo y se incubaron durante 4 h. Las células unidas se tripsinizaron y se combinaron con las células desprendidas en el sobrenadante y a continuación se examinó la presencia de células apoptóticas utilizando el kit de apoptosis Apo Alert Annexin V-FITC (Clontech).

Análisis CAM: El suministrador del huevo y la preparación se han descrito anteriormente (23). Se colocaron células tumorales en 50 μl de PBS a razón de 4×10^6 células/huevo para DAOY y $3,5 \times 10^6$ células/huevo para U87MG. Se cultivaron las células para tumores durante 7 días, a continuación se recogieron en condiciones estériles, se recortaron a tamaños similares y se repitió en la CAM de embriones de 10 días. Al día siguiente se inyectó el péptido activo o inactivo (100 μg /huevo) en una vena de la CAM. Se fotografiaron los tumores *in situ* después de 7 días de cultivo, a continuación se recogieron, se pesaron y se fijaron en formalina tamponada al 4% y se impregnaron en parafina. Después del seccionamiento en serie, las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Modelo de tumor cerebral: Los detalles del modelo han sido descritos por los autores (31). Células tumorales ($10^6/10 \mu\text{l}$ de PBS) se inyectaron por vía intercerebral en las coordenadas mencionadas. Se inició un tratamiento intraperitoneal con el cRGD activo o el péptido cRAD inactivo ($100 \mu\text{g}/50 \mu\text{l}/\text{ratón}$) el día 3 después de la implantación para U87MG y el día 10 para las células DAOY y se repitió diariamente hasta que apareció caquexia y/o estado de moribundo. Se sacrificaron a continuación los animales por anestesia con CO_2 , se extirparon los cerebros y ya sea congelados repentinamente en nitrógeno líquido o fijados en formalina tamponada, se impregnaron en parafina y las secciones del corte se tiñeron con hematoxilina-eosina.

Crecimiento del tumor subcutáneo: Para el crecimiento del tumor subcutáneo, se inyectaron s.c. las células (10^6 ratón) por debajo de la almohadilla del omoplato derecho inmediatamente después de la inyección intracerebral.

Estudios en animales: Se realizaron estudios en animales según las directrices NIH y fueron aprobados por el comité local para la custodia de animales.

Experimentos

Angiogénesis en CAM

Para evaluar el efecto del antagonista α_v en la angiogénesis asociada al tumor cerebral, se cultivaron células de tumor cerebral humano DAOY y U87MG en membranas corioalantoicas (CAM) de pollo. Se dejaron crecer los tumores durante 7 días antes de que se extirparan y se reimplantarán en las CAM recientes. 24 horas después de la transferencia, se inyectaron en una vena de la CAM $100 \mu\text{g}$ del péptido cRGD activo o del péptido de referencia (cRAD). Se cultivaron los tumores durante 6 días adicionales y a continuación se pesaron y se analizó la vascularización. Bajo examen al estereomicroscopio, los tumores recibieron angiogénesis extensa presentada por el péptido de referencia, mientras que los tumores tratados con el antagonista α_v presentaban supresión significativa de angiogénesis (Fig. 1a). El crecimiento del tumor fue inhibido también por el antagonista α_v . En contraste con los tumores de referencia, que aumentaron el 80% en peso, los tumores tratados con antagonista α_v disminuyeron el 30% en peso (Fig. 1b). Estos datos sugieren que la inhibición del crecimiento tumoral por el antagonismo α_v produjo como consecuencia de la angiogénesis asociada al tumor destruido.

Las Figs. 1a y 1b presentan la inhibición de la angiogénesis (a) y del crecimiento tumoral en el CAM (b) por un antagonista de α_v . Los tumores cerebrales desarrollados en CAM se recogieron y se cortaron en tamaños similares y se colocaron en CAM recientes de huevos de pollo de 10 días. Al día siguiente, se inyectaron $100 \mu\text{g}$ de inhibidor α_v activo o el péptido de referencia en las venas del pollo y se cultivaron durante otros 6 días. Los huevos que recibieron el péptido de referencia presentaban angiogénesis significativa (a) (DAOY=A y U87MG=C), mientras que se observó supresión significativa de la neovascularización en los huevos que recibieron el péptido activo (DAOY=B y U87MG=D). Los tumores colocados en la CAM se pesaron al comienzo y final del experimento (b). El peso de los tumores tratados con el péptido de referencia aumentó el 80% para ambos tipos de tumor (izquierda, $n=8$), mientras que disminuyó en aproximadamente el 30% cuando se administró el péptido activo (derecha, $n=8$).

Modelo de tumor ortotópico

Se inyectaron células DAOY y U87MG (10^6 células/ratón) estereotácticamente en la corteza cerebral frontal derecha de ratones nu/nu con el fin de crear un sistema que recapitule el micromedio cerebral. Este procedimiento permitió un modelo muy reproducible de tumorigénesis cerebral humana y permitió la medición del crecimiento tumoral y de la supervivencia del ratón a lo largo del tiempo antes de la introducción del antagonismo α_v (Figs. 2a y 2b). La Fig. 2 presenta el tamaño del tumor (A) y de la supervivencia del ratón (B) después de la inyección intracerebral de células DAOY y U87MG. Las células U87MG presentan un crecimiento rápido y alcanzan una fase estacionaria de aproximadamente 6 mm en 6 semanas, mientras que las células DAOY crecen más lentamente y alcanzan un diámetro de 5,5 mm en 9 semanas (A). Todos los animales están muertos la semana 9 (B). Para cada punto de tiempo, $n = 5$ ó 6.

Con el fin de analizar el efecto del péptido cRGD en este modelo, se cultivaron en primer lugar los tumores durante 7 días (DAOY) o 3 días (U87MG) antes de la administración i.p. diaria del antagonista α_v ($100 \mu\text{g}/\text{ratón}$) o su control inactivo durante 3 semanas más. En el momento del sacrificio (tiempo total de crecimiento tumoral de 4 semanas), los ratones de control tenían tumores cerebrales muy visibles de 3 mm de promedio (DAOY) y de 5,5 mm (U87MG) de tamaño. Los ratones tratados no presentaban tumor o solamente células tumorales residuales escasas encontradas en aglomerados microscópicos a lo largo de las superficies ventricular y de la duramadre (Figs. 3a y 3b). Las Figs. 3a y 3b presentan la histopatología de células DAOY (a) y U87MG (b) de tumor cerebral inyectadas por vía ortotópica, tratadas a diario con el péptido inactivo (A) o activo (B-D). Los tumores intracerebrales grandes (cabezas de flecha) son visibles en los animales de referencia (A), mientras que no se detecta ningún tumor (B) o solamente tumores residuales microscópicos (cabezas de flecha) en los animales tratados con el antagonista α_v (C y D).

Los ratones tratados también mantenían su peso de referencia de 21 g; sin embargo, los ratones DAOY y de referencia U87MG pesaban 16 g y 15 g, respectivamente, lo que representa una pérdida de 5 a 6 g del peso de referencia (véase Tabla 1). El tiempo medio para el comienzo de los síntomas neurológicos en el grupo de referencia fue de 2,5 semanas para los ratones U87MG y de 4,5 semanas para DAOY, mientras que los animales tratados no presentaban pruebas de síntomas neurológicos en ningún momento.

TABLA 1

Estirpe celular	Tamaño del tumor (mm)		Peso del ratón (g)
	Cerebro	Subcutánea	
DAOY			
Péptido de referencia	3,0 ± 0,71	18 ± 1,41	16 ± 1,3
Péptido activo	NM	17 ± 0,84	21 ± 0,89
U87MG			
Péptido de referencia	5,5 ± 0,55	20 ± 1,0	15 ± 0,45
Péptido activo	NM	19 ± 0,77	20 ± 0,71

NM = no mensurable

Se ensayó la supervivencia en más animales. Se midió la supervivencia como el punto de tiempo en el que los ratones requirieron sacrificio, debido a un estado moribundo. Todos los animales de referencia se sacrificaron antes de las 6 semanas del crecimiento del tumor y la mayoría (>50%) en ambos grupos de referencia se sacrificaron las semanas 3-4 (Fig. 4). La Fig. 4 presenta la supervivencia de ratones después de la implantación del tumor cerebral ortotópico, recibiendo el péptido activo o inactivo; tratamiento i.p. (100 µg/ratón/día) se inició el día 3 para las células U87MG y el día 7 para DAOY. N para DAOY y U87MG de referencia es de 16 ratones cada uno y 32 ratones para DAOY tratadas y 24 para U87MG tratadas. La Fig. 4 demuestra que ninguno de los animales tratados requirió sacrificio y, actualmente, los ratones DAOY tratados han sobrevivido hasta 24 semanas y 15 semanas los ratones U87MG desde la inyección de células tumorales. Ninguno de los animales tratados ha desarrollado signos neurológicos y todo continúa desarrollándose normalmente.

Modelo de tumor heterotópico

Para determinar la influencia del micromedio sobre el crecimiento del tumor sometido a antagonismo α_v , los autores inyectaron las mismas células de tumor cerebral humano por vía subcutánea (10⁶ células/ratón lampiño) antes de iniciar el tratamiento con los péptidos activo y de referencia (100 µg/ratón al día i.p.) a los 3 (U87MG) y 7 días después de la inyección de la célula tumoral (DAOY). En estas condiciones, no hubo inhibición del crecimiento tumoral por el péptido activo, y después de 6 semanas, los tumores de los grupos tratados y no tratados aparecieron idénticos tanto a nivel macroscópico como microscópico, demostrando cada uno la presencia de extensa angiogénesis (datos no mostrados). Esto indica que las propiedades intrínsecas de las células del tumor cerebral determinadas no son suficientes para hacerlas sensibles a la actividad del antagonista del péptido cRGD, pero en cambio requieren condiciones únicas para el microambiente cerebral.

Para investigar más este descubrimiento, se inyectaron simultáneamente las células DAOY y U87MG por vía intracranial y subcutánea antes de iniciar el tratamiento con los péptidos como se esboza en el modelo ortópico. La figura 5 presenta el efecto del antagonista α_v en células DAOY implantadas por vía ortópica (cerebro) y heterotópica (subcutánea). Se inyectaron células (10⁶) tumorales en el cerebro y epidermis y el tratamiento con el péptido inactivo (a) o activo se inició el día 7 (b). Las fotografías se tomaron la semana 4. Los animales que reciben el péptido inactivo (a) o activo (b) presentaron un tamaño similar de tumores subcutáneos (A) y vascularización (B). En ambas condiciones, los tumores s.c. crecieron dentro de la capa de músculo subyacente (cabezas de flecha) (C). En cambio, los animales de referencia desarrollaron tumores cerebrales grandes (cabezas de flecha), mientras que los ratones que reciben el péptido activo presentaban ausencia o enfermedad residual microscópica (D). Por lo tanto, la Fig. 5 demuestra que los tumores subcutáneos en los grupos de referencia y tratados crecieron ambos hasta un tamaño medio de 18 mm³ con pruebas de extensa vascularización (Fig. 5). Los ratones de referencia también desarrollaron grandes tumores cerebrales similares en tamaño a los observados anteriormente en el modelo de tumor ortópico, así como pruebas clínicas de compromiso neurológico (Tabla 1). En cambio, los ratones que recibieron el péptido activo sobrevivieron sin pruebas de síntomas neurológicos, y la necropsia puso de manifiesto la ausencia de tumor intracerebral o solamente grupos de células tumorales microscópicas residuales (Fig. 5). Sin embargo, este grupo presentaba crecimiento progresivo de sus tumores subcutáneos, que necesitaron sacrificio tras 10 semanas. Esto confirmó que los tumores que crecen en el interior del cerebro son sensibles al tratamiento con el péptido RGD cíclico, mientras que los mismos tumores que crecen subcutáneamente no lo son.

Expresión de la integrina

La vitronectina es una proteína de la matriz que podría influir en las diferentes respuestas biológicas observadas en el cerebro y en los compartimentos subcutáneos. Es abundante en puntos extraneurales, pero no es producida normalmente por el tejido glial y neuronal (15, 20). Sin embargo, las células de glioma maligno sintetizan vitronectina, que a su vez puede ser crucial para permitir su acoplamiento y extensión (15). Alternativamente, la vitronectina puede

estimar la adhesión de las células endoteliales y la migración hacia el lecho del tumor y de este modo aumentar la angiogénesis. Dado que el acoplamiento de la célula a la vitronectina está mediado por las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$, los autores llevaron a cabo el análisis FACS para determinar si el meduloblastoma de DAOY humano, el glioblastoma U87MG y los cultivos primarios de células endoteliales de cerebro humano (HBEC) expresan las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (Fig. 6a).

Las Figs. 6a-6d presentan las características de la integrina (a), el efecto del antagonista de α_v sobre la adhesión a (b), la migración en (c) y la viabilidad celular en la vitronectina (d) para el tumor cerebral y las células endoteliales capilares del cerebro. Tanto las células tumorales DAOY como U87MG y las células capilares del cerebro expresan las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (a). La adhesión a la vitronectina fue inhibida de manera significativa por el péptido activo, así como por la combinación de anticuerpos contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, mientras que ni el péptido de referencia ni el anticuerpo anti $\alpha_v\beta_3$ específico ni el anti $\alpha_v\beta_5$ solos tenían ningún efecto significativo. La migración de las células en un gradiente de vitronectina fue suprimido por los anticuerpos $\alpha_v\beta_3$ y el antagonista de α_v , mientras que ni el péptido de referencia ni los anticuerpos contra $\alpha_v\beta_5$ tenían ningún efecto inhibitorio. Se determinó la viabilidad celular dejando las células unirse a la vitronectina durante 1 hora y a continuación exponiéndolas durante 4 horas al péptido de referencia o al antagonista de α_v (20 $\mu\text{g/ml}$) (d). Las células adherentes y flotantes se combinaron y se examinó la apoptosis por FACS, utilizando antianexina V marcada con FITC y yoduro de propidio. Aunque se observó poca apoptosis en los cultivos expuestos al péptido de referencia (d, izquierda), tanto las células endoteliales capilares del cerebro como las células DAOY presentaban cantidades significativas de células apoptóticas (d, derecha).

Las figuras 6a-6d demuestran que las células U87MG expresan altos niveles de $\alpha v\beta 3$ en comparación con las células DAOY, pero estas últimas expresan grandes cantidades de $\alpha v\beta 5$. Las células de HBEC cultivadas en medio que contiene VEGF expresan grandes cantidades de $\alpha v\beta 5$, mientras que el 50% de las células expresan la integrina $\alpha v\beta 3$ en el cultivo a corto plazo. Las células se analizaron también por análisis FACS, después de 2 días de crecimiento en el cultivo en placas recubiertas con vitronectina. La expresión de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ no cambió en estas condiciones (datos no representados).

Adhesión de la vitronectina

Para determinar si $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ regulan la adhesión de DAOY, U87MG y HBEC a la vitronectina, se colocaron las células en placas en pocillos recubiertos con vitronectina y se dejaron que se adherieran en presencia o ausencia de anticuerpos bloqueantes contra $\alpha v\beta 3$ (LM-609) y $\alpha v\beta 5$ (P1-F6) o el péptido cRGD. P1-F6 inhibió mínimamente el acoplamiento de las células DAOY, mientras que LM-609 no tuvo ningún efecto sobre el acoplamiento de algunas de las células. Se observó inhibición significativa de la adhesión de todas las células incubando P1-F6 y LM-609 juntas o cRGD solas (Fig. 6b). Estos datos indican que el bloqueo de una de las dos integrinas por separado es insuficiente y que se requiere el bloqueo doble de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ para destruir de manera significativa la adhesión dependiente de la vitronectina demostrada por las células analizadas.

Migración de la vitronectina

Para estudiar si $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ modulan la migración sobre la vitronectina, independiente de la adhesión, los autores analizaron las mismas células en membranas recubiertas con vitronectina en cámaras de Borden aunque en presencia de anticuerpos de bloqueo o cRGD. P1-F6 no efectuó la migración; sin embargo, LM-609 y cRGD inhibieron de manera significativa la migración de los tres tipos de células (Fig. 6c). Dado que LM-609, en ausencia de P1-F6, era incapaz de bloquear la adhesión, este efecto antimigratorio debe estar mediado por una vía distinta que es independiente de las fuerzas responsables de la adhesión. Además, LM-609 bloqueó la migración igualmente bien que cRGD, lo que sugiere que la señalización de la célula mediada por $\alpha v\beta 3$ es un componente crítico en la determinación de la migración del tumor cerebral y de las células endoteliales del cerebro analizadas.

Apoptosis

Los astrocitomas en grado alto producen vitronectina en el borde invasivo principal, lo que sugiere que esta proteína desempeña una función importante en la adhesión de las células del tumor cerebral, en la migración y posiblemente en la supervivencia celular (15). Los autores han demostrado previamente que la preincubación de las células del tumor cerebral o capilares con el péptido cRGD, o la combinación de los anticuerpos anti $\alpha v\beta 3$ y anti $\alpha v\beta 5$, impide la adhesión de la célula a la vitronectina. La apoptosis de células endoteliales y de melanoma se ha demostrado, siguiendo una inhibición similar de la adhesión dependiente de la integrina a las proteínas de la matriz (26-28). Fue por consiguiente de interés para determinar si los antagonistas de α_v podrían provocar la apoptosis de estas células después de su desprendimiento de la vitronectina. Se sembraron células DAOY y HBEC primarias en tampón de adhesión en pocillos recubiertos con vitronectina (1 $\mu\text{g/ml}$) y se dejaron unir durante 30 min. a 37°C. El tampón se reemplazó a continuación por tampón que contenía péptido cRGD o cRAD (referencia) a 20 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron más durante 4 h. Las células acopladas se combinaron tras la tripsinización con células flotantes y se determinó el número de células apoptóticas por FACS, utilizando anticuerpo antianexina V-FITC y yoduro de propidio (kit de apoptosis para detección de Apo alert Annexin V-FITC de Clontech). Las células expuestas al péptido cRAD de referencia presentaban poca apoptosis, mientras que tanto las células DAOY como las HBEC tratadas con cRGD demostraron apoptosis significativa (Fig. 6d). Estos datos indican que el péptido cRGD no solamente desprende estas células de la vitronectina, sino que también provoca su posterior apoptosis.

Efecto del pentapéptido sobre la adhesión de las células al tumor cerebral a diferentes sustratos de ECM

La Fig. 7 demuestra el efecto del pentapéptido cíclico sobre la adhesión de la célula tumoral a proteínas ECM. Se incubaron placas de cultivo sin tejido 1 hora a 37°C con vitronectina, tenascina, fibronectina o colágeno I (10 $\mu\text{g/ml}$), a continuación se lavaron con PBS. Tras el lavado, se colocaron en placas 5×10^5 células/pocillo y se incubaron durante 16 horas a 37°C. Se lavaron a continuación los cultivos y un tampón de adhesión que contiene 20 $\mu\text{g/ml}$ de pentapéptido o de péptido de referencia se añadió y se incubó durante 2 a 24 horas más. Los cultivos se lavaron a continuación dos veces con tampón de adhesión y se tiñeron con violeta cristal y se determinó la D.O. 600. Cuantas más células adherentes están presentes, mayor es la D.O. Los datos representan células adherentes después de 8 horas después de la incubación. U87 = glioblastoma y DAOY = meduloblastoma.

Como se ilustra en la Fig. 7, las células tumorales se desprendieron de la vitronectina y la tenascina, cuya adhesión está mediada por integrinas α_v , pero no las de colágeno y fibronectina, que interactúan con integrinas α_v . Se obtuvieron datos similares con células capilares del cerebro (no representados).

Efecto del desprendimiento celular sobre la supervivencia de las células

La Fig. 8 presenta la apoptosis del tumor cerebral y las células capilares cultivadas en la ECM y expuestas al pentapéptido. Las condiciones del ensayo fueron como en la Fig. 7, excepto que las células desprendidas y las células adherentes se combinaron después de la tripsinización. Las células se lavaron a continuación, se pusieron en suspensión en 50 μl de PBS y se centrifugaron en portaobjetos recubiertos con vidrio (cytospin). Tras la fijación con paraformaldehído al 4%, se tiñeron las células para la apoptosis utilizando el kit para apoptosis de Boehringer. Los resultados se expresan en porcentaje de células apoptóticas frente al número total de células. El experimento se realizó después de 24 horas de incubación con los péptidos.

El efecto del desprendimiento de las células sobre la supervivencia celular se presenta en la Fig. 8. Como se demuestra, las células expuestas al péptido activo durante 24 horas y cultivadas en vitronectina o tenascina presentaban aumento del número de células muertas en comparación con las células de referencia. En cambio, el pentapéptido no alteró la supervivencia de las células cultivadas en colágeno I o fibronectina. Se observó disminución de la supervivencia celular en ambos tipos de células tumorales y de células capilares del cerebro. Se obtuvieron datos similares cuando las células se tiñeron para un marcador precoz de muerte celular, expresados en la suficiencia celular (Annexin-V, datos no mostrados). Por lo tanto, el pentapéptido activo provoca el desprendimiento y muerte de las células tanto en las células del tumor cerebral como en las capilares adherentes a la vitronectina y tenascina.

Producción de proteínas ECM en el tumor cerebral humano

Como se esbozó anteriormente, los tumores cerebrales producen vitronectina y tenascina en seres humanos y se cree que estas sustancias mejoran la supervivencia de las células tumorales y aumentan su invasión. Los autores determinaron en el modelo de tumor cerebral la producción de estas proteínas.

La Fig. 9 presenta la inmunohistoquímica de tumores cerebrales U87 xenotrasplantados en el prosencéfalo de ratones lampiños y tratados con péptido activo (anti α_v) o de referencia. Se inyectaron a los ratones células tumorales (10^6 células/ratón) y el tratamiento con el péptido activo o inactivo (100 $\mu\text{g/ratón/día}$) se inició el día 7 después de la inyección. Se extirparon los tumores después de 2 semanas de tratamiento, se fijaron en formalina tamponada, se impregnaron en parafina y se obtuvieron secciones de 5 μm . Se examinó la expresión de CD31 en las secciones (marcador para células capilares) utilizando un anticuerpo antiratón de rata monoclonal (Pharmingen), anticuerpo de vitronectina antihumano de ratón monoclonal (Sigma), anticuerpo de tenascina antihumano de ratón (Neo-Marker) y el kit para apoptosis de Boehringer para las células muertas. CD31 = marcador capilar, VN = vitronectina, TN = tenascina y APO = apoptosis.

Como se muestra en la Fig. 9, los tumores cerebrales produjeron en efecto vitronectina y tenascina, y su origen a partir de las células tumorales se demostró mediante la utilización de anticuerpos específicos para las proteínas humanas. La administración del pentapéptido activo no tuvo influencia en la síntesis de estas proteínas. Además, los autores pueden asimismo demostrar que las células del tumor cerebral producen estas proteínas en cultivo tisular (datos no representados). Por lo tanto, el modelo de ratón de los autores simula la situación de los tumores cerebrales humanos.

El efecto antiangiogénico del pentapéptido se presenta en la parte superior de la Fig. 9, donde los autores tiñeron las secciones de tejido para un marcador específico para células capilares, es decir CD31. Aunque los tumores tratados con el péptido de referencia tenían múltiples vasos, que fueron teñidos de positivo por este marcador, había muy pocos de tales vasos en los tumores tratados con el pentapéptido activo ($p < 0,005$), lo que indica la supresión del crecimiento capilar. En la parte inferior de la Fig. 9 se presenta la tinción para las células apoptóticas (muertas). El procedimiento es similar al descrito en la Fig. 8. Los tumores tratados con el pentapéptido activo presentaban significativamente más células muertas que los tratados con el péptido de referencia ($p < 0,02$). Se tomaron fotografías para el glioblastoma U87, pero se obtuvieron datos similares con el meduloblastoma DAOY (no representados).

Relación de la muerte celular con la apoptosis de la célula tumoral

Con el fin de demostrar que este aumento de la muerte celular es debido a la apoptosis directa de la célula tumoral y no una consecuencia de la supresión del crecimiento capilar, los autores implantaron en cerebros de ratón células de melanoma que expresan (M21 L αv pos.) o no (M21L αv neg.) la integrasa αv . Si los ratones trasplantados con células positivas a αv y tratados con el pentapéptido activo sobreviven más que los ratones tratados con el péptido de referencia, entonces la apoptosis de la célula tumoral directa debe ser la responsable.

La Tabla 2 presenta la supervivencia de ratones con tumores negativos y positivos a $\alpha v\beta 3$ tratados con RGDfV. Se inyectaron células tumorales (10^6) en el prosencéfalo de ratones lampiños de 6 semanas de vida y se inició el día 3 el tratamiento con el péptido activo o de referencia ($100 \mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$). Se sacrificaron los ratones cuando eran caquéticos y se verificó por autopsia la presencia del tumor.

TABLA 2

Estirpe celular	Supervivencia (día)	
	RGDfV (activa)	RADfV (referencia)
M21Lav neg.	$15,7 \pm 3,8$	$15,3 \pm 3,3$
M21Lav pos.	$36,5 \pm 2,9$	$17,3 \pm 1,9$

Como se muestra en la Tabla 2, los ratones trasplantados con células de melanoma negativas a αv sobrevivieron 15 días, independientemente del tratamiento recibido. En cambio, el lapso de vida de los ratones con tumores positivos a αv aumentó a 36 días cuando se trataron con el pentapéptido activo, en comparación con 17 días cuando se trataron con el péptido de referencia. Esto indica que la apoptosis directa de la célula tumoral deber ser responsable de la muerte de la célula tumoral.

En conclusión, los datos expuestos anteriormente apoyan la hipótesis de que el pentapéptido cíclico provoca la muerte directa de las células tumorales.

Exposición

Los tumores cerebrales son muy angiogénos y dependen de la neovascularización para su crecimiento continuado. La antiangiogénesis es por lo tanto una estrategia terapéutica potencialmente importante destinada a estas enfermedades cancerosas. Las integrinas $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ son dianas antiangiogénas experimentales, dado que su expresión en el endotelio está activada durante la angiogénesis (12,13). Su función en la neovascularización fue confirmada previamente mediante estudios que demostraron que la provocación de la angiogénesis por bFGF y TNF-alfa en la CAM podría ser destruida por la presencia del anticuerpo LM-609 que bloquea a $\alpha v\beta 3$ o un antagonista peptídico cíclico RGD de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ (21, 23). En cada caso, el efecto de la antiangiogénesis se cree que se produce por la provocación de la apoptosis de la célula endotelial como resultado de prevenir las interacciones de unión de la proteína de la matriz esencial para αv (28-30). En este estudio, los autores utilizaron un antagonista de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ peptídico cíclico RGD igualmente específico (EMD 121974) y demostraron su capacidad para inhibir la angiogénesis de CAM producida por dos estirpes celulares del tumor cerebral humano, DAOY y U87MG. El tratamiento con cRGD no solamente suprimió la angiogénesis de CAM, sino que posteriormente condujo a la necrosis tumoral y a la involución tumoral.

Para estudiar si podrían conseguirse respuestas similares en un modelo que recapitula el microambiente cerebral, se inyectaron por vía estereotáctica células de tumor cerebral en el prosencéfalo de ratón lampiño. Se seleccionaron células de glioma U87MG y de meduloblastoma DAOY para estudiar la causa de su sensibilidad al péptido en el análisis de la CAM y su extensas invasividad y angiogénesis demostradas previamente *in vivo* (31, 32). En este modelo ortopico, cRGD de nuevo inhibió significativamente el crecimiento del tumor cerebral de U87MG y DAOY. Los ratones de referencia sucumbieron a la evolución del tumor y se descubrió que tenían tumores muy invasivos mayores de 3 mm^3 de promedio. Los ratones tratados con cRGD sobrevivieron sin pruebas de morbilidad y los tumores viables no pudieron detectarse, además de reducir las células residuales a lo largo de la zona de implantación o en pequeños grupos a lo largo de las superficies ventricular y de la duramadre. Todos los focos del tumor residual en el grupo tratado eran inferiores a 1 mm^3 y por consiguiente no adquirieron una respuesta a la angiogénesis del hospedador. Se ha demostrado también que inhibidores alternativos de la angiogénesis, tales como la trombospodina-1, TNP-470 y el factor 4 de plaquetas, inhiben el crecimiento del tumor cerebral experimental, aunque la mayoría de estos resultados estaban limitados a xenotrasplantes subcutáneos o requerían la administración directa de fármacos al lecho del tumor mediante inyección estereotáctica (32-34). Un antagonista peptídico de $\alpha v\beta 3$ en un modelo de tumor subcutáneo de ratón SCID/célula Leydig de rata se demostró que inhibe el crecimiento del tumor en un 80%, después de su administración intraperitoneal (35). La angioestatina, agente antiangiogénico con un mecanismo de actuación todavía sin aclarar, también demostró una inhibición del crecimiento considerable de los xenotrasplantes de glioma en rata C6 y 9L intracraneales (36). En contraste con el estudio de los autores, el tratamiento con angioestatina ($1 \text{ mg}/\text{ratón}/\text{día}$) o con el antagonista peptidomimético ($2 \text{ mg}/\text{ratón}/\text{día}$) se inició inmediatamente después de la implantación de la célula

tumoral. El estudio de los autores reveló casi la ablación de xenotrasplantes tumorales demostrados y es el primero en demostrar la inhibición del crecimiento y angiogénesis del tumor cerebral intracraneal por antagonismo de la integrina.

De modo interesante, los tumores con DAOY y U87MG desarrollados simultáneamente bajo la piel presentaban poco o ningún efecto al tratamiento con cRGD en el estudio de los autores. Esto puntuó por debajo la importancia del medio extracelular en la regulación de las respuestas de la integrina a la célula tumoral del hospedador. Se descubrió que la angioestatina inhibe igualmente el crecimiento de las células de tumor cerebral inyectadas s.c. e i.c., lo que indica que este compuesto suprime la angiogénesis por un mecanismo diferente al del péptido RGD (36). Una posible explicación para la diferencia en la inhibición del crecimiento de cRGD es que las células endoteliales de la epidermis pueden ser inherentemente diferentes de las de los vasos sanguíneos del SNC, lo que hace a la angiogénesis menos susceptible al antagonismo de la integrina. Esto está apoyado por el reciente descubrimiento de que en los ratones modificados genéticamente por α_v , solamente las células capilares del cerebro y del intestino son anormales, aunque el resto del sistema circulatorio está intacto (37). Alternativamente, las proteínas de la matriz, que actúan como ligandos para las integrinas de la célula endotelial, pueden ser expresadas preferentemente por las células tumorales, dependiendo de una posición ortópica o heterotópica. Por ejemplo, las células de glioblastoma humano implantadas por vía subcutánea no se encontró que produzcan vitronectina, sin embargo, su colocación en el micromedio cerebral produjo su expresión del gen con vitronectina (15). El tejido cerebral normal puede asimismo alterar la expresión de las proteínas de ECM en respuesta a la invasión de las células de glioma (38). A diferencia de las zonas extraneurales, la vitronectina está normalmente ausente en el cerebro, y de este modo pequeños cambios en la concentración de esta proteína dentro del SNC pueden modificar profundamente las respuestas celulares. Los estudios indican que la locomoción de la célula endotelial depende de la concentración de vitronectina y de la distancia entre los puntos de contactos entre la célula y la matriz que permiten la expansión celular (39,40).

Los efectos antitumorígenos del péptido en el estudio de los autores son en general mayores que los observados con otros agentes antiangiogénos. Dado que muchos tumores expresan también las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ (incluyendo U87MG y DAOY), el efecto de los antagonistas de la integrina puede no estar limitado al endotelio del hospedador, aunque la importancia de las integrinas específicas en las respuestas de la célula tumoral es menos evidente (41). Estudios anteriores han demostrado que la unión de células de glioma, carcinoma de mama, melanoma y adenocarcinoma colónico HT29-D4 a la vitronectina depende de las integrinas α_v (42-45). La vitronectina es producida por las células del tumor y del estroma y es más abundante en las zonas de invasión tumoral y neovascularización, incluyendo los tumores cerebrales malignos (46,47). Por lo tanto la vitronectina, además de apoyar la supervivencia de la célula endotelial, puede también ser crítica para aumentar la adhesión e invasión de las células tumorales, que expresan $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$. En un modelo híbrido ratón/hombre de SCID para el cáncer de mama, la invasión tumoral se redujo de forma notable después de la administración del anticuerpo LM-609 anti $\alpha_v\beta_3$, lo que sugiere un efecto directo del bloqueo de $\alpha_v\beta_3$ en el tumor independiente de la angiogénesis (48).

Con el fin de estudiar esta cuestión, los autores examinaron la adhesión y migración celular sobre la vitronectina en presencia de antagonistas de α_v , utilizando células DAOY, U87MG y células endoteliales primarias de cerebro humano aisladas (HBEC) (49). El anticuerpo LM-609 anti $\alpha_v\beta_3$ inhibió la migración de U87MG, DAOY y HBEC en vitronectina, y en combinación con el anticuerpo P1-F6 anti $\alpha_v\beta_5$ inhibió la adhesión de estas células a la vitronectina. La cRGD sola inhibió de manera significativa la adhesión y migración en vitronectina mediante los tres tipos de célula. En un estudio similar, la invasión de las células de melanoma fue aumentada por la vitronectina y bloqueada por los péptidos RGD (50). Por último, el tratamiento con cRGD produjo aumento de la apoptosis no solamente en las células HBEC, sino también en las células tumorales DAOY y U87MG también. Estos resultados sugieren que cRGD puede actuar para inhibir la invasión del tumor y la proliferación directamente, además de su función antiangiogénica.

Los datos de los autores demuestran además que el pentapéptido cíclico puede inhibir la adhesión de las células del tumor cerebral para sustratos diferentes de la ECM tales como vitronectina o tenascina. El efecto de la adhesión de dicha inhibición produjo la muerte celular (apoptosis) tanto en las células del tumor cerebral como en las células capilares del cerebro. Este efecto está restringido a la vitronectina y a la tenascina de la ECM. Los autores han demostrado también que el aumento de la muerte celular es debido a la apoptosis directa de la célula tumoral y no una consecuencia de la supresión del crecimiento capilar. En otras palabras, un descubrimiento de la presente invención consiste en que el pentapéptido cíclico provoca la muerte directa de la célula tumoral.

En resumen, este estudio proporciona pruebas de que el antagonismo dirigido de las integrinas, específicamente $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$, puede inhibir sustancialmente la tumorigénesis cerebral *in vivo* y puede de este modo representar un nuevo método terapéutico importante para los tumores cerebrales. Los resultados de los autores también sugieren que el microambiente es crítico para el comportamiento del tumor y en la determinación de su sensibilidad a dichas terapias dirigidas biológicamente. Por último, los autores demuestran que el antagonismo de la integrina puede tener un efecto antitumorígeno independiente de la antiangiogénesis, que puede actuar sinérgicamente para retardar el crecimiento del tumor.

Lo que sigue pretende ilustrar, pero no limitar, el alcance de la invención. Ciertamente, los expertos ordinarios en la materia pueden prever y producir fácilmente otras formas de realización, basadas en lo dado a conocer en la presente memoria, sin excesiva experimentación.

Referencias

1. **Folkman, J.**, The role of angiogenesis in tumor growth, *Sem. Cancer Biol.*, 3:65-71, 1992.
- 5 2. **Plate, K.H.**, Risau, W., Angiogenesis in malignant gliomas, *Glia.*, 15:339-347, 1995.
3. **Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D.**, Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia, *Nature*, 339:58-61, 1989.
- 10 4. **Chan, A.S., Leunng, S.Y., Wong, M.P., Yuen, S.T., Cheung, N., Fan, Y.W., Chung, L.P.**, Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the anaplastic progression of astrocytoma, oligodendroglioma, and ependymoma, *Am. J. Surg. Pathol.*, 22:816-826, 1998.
- 15 5. **Takano, S., Yoshii, Y., Kondo, S., Suzuki, H., Maruno, T., Shirai, S., Nose, T.**, Concentration of vascular endothelial growth factor in the serum and tumor tissue of brain tumor patients, *Cancer Res.*, 56:2185-2190, 1996.
6. **Brem, S., Tzanacis, A.M., Gately, S., Gross, J.L., Herblin, W.F.**, Immunolocalization of basic fibroblast growth factor to the microvasculature of human brain tumors, *Cancer*, 70:2673-2680, 1992.
- 20 7. **Li, V.W., Folkert, R.D., Watanabe, H., Yu, C., Rupnick, M., Barnes, P., Scott, R.M., Black, P.M., Sallan, S., Folkman, J.**, Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors, *Lancet*, 344:82-86, 1994.
- 25 8. **Abulrauf, S.I., Edvardsen, K., Ho K.L., Yang, X.Y., Rock, J.P., Rosenblum, M.L.**, Vascular endothelial growth factor expression and vascular density as prognostic markers of survival in patients with low-grade astrocytoma, *J. Neurosurg.*, 88:513-520, 1998.
9. **Leon, S.P., Folkert, R.D., Black, P.M.**, Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors, *Cancer*, 77:362-372, 1996.
- 30 10. **Hynes, R.O.**, Integrins: a family of cell surface receptor, *Cell*, 48:455-459, 1987.
11. **Rusnati, M., Tanghetti, E., Dell'Era, P., Gualandris, A., Presta, M.**, Alphavbeta3 integrin mediates the cell adhesive capacity and biological activity of basic fibroblast growth factor (FGF-2) in cultured endothelial cells, *Mol. Biol. Cell*, 8:2449-2461, 1997.
- 35 12. **Varner, J.A.**, The role of vascular cell integrins alpha v beta 3 and alpha v beta 5 in angiogenesis, *EXS*, 79:361-390, 1997.
- 40 13. **Friedlander, M., Brooks, P.C., Shaffer, R.W., Kincaid, C.M., Varner, J.A., Cheres, D.A.**, Definition of two angiogenic pathways by distinct alphav integrins, *Science*, 270:1500-1502, 1995.
14. **Gladson, G.L.**, Expression of integrin alpha v beta 3 in small blood vessels of glioblastoma tumors, *J. Neuro-pathol. Exp. Neurol.*, 55:1143-1149, 1996.
- 45 15. **Gladson, C.L., Wilcox, J.N., Sanders, L., Gillespie, G.Y., Cheres, D.A.**, Cerebral microenvironment influences expression of the vitronectin gene in astrocytic tumors, *J. Cell Sci.*, 108:947-956, 1995.
16. **Longhurst, C.M., Jennings, L.K.**, Integrin-mediated signal transduction, *Cell Mol. Life Sci.*, 54:514-526, 1998.
- 50 17. **Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K., Juliano, R.L.**, Integrin signaling and cell growth control, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 10:220-231, 1998.
18. **Malik, R.K.**, Regulation of apoptosis by integrin receptors, *J. Pediatr. Hematol. Oncol.*, 19:541-545, 1997.
- 55 19. **Scatena, M., Almeida, M., Chisson, M.L., Fausto, N., Nicosia, R.F., Giachelli, C.M.**, NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival, *J. Cell Biol.*, 141:1083-1093, 1998.
- 60 20. **Gladson, C.L., Cheres, D.A.**, Glioblastoma expression of vitronectin and the avb3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells, *J. Clin. Invest.*, 88:1924-1932, 1991.
21. **Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheres, D.A.**, Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis, *Science*, 264:569-571, 1994.
- 65 22. **Christofidou-Solomidou, M., Bridges, M., Murphy, G.F., Abelda, S.M., DeLisser, H.M.**, Expression and function of endothelial cell av integrin receptors in wound-induced human angiogenesis in human skin/SCID mice chimeras, *Am. J. Pathol.*, 151:975-983, 1997.

23. **Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D.A.**, Integrin avb3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels, *Cell*, 79:1157-1164, 1994.
- 5 24. **Molema, G., Griffioen, A.W.**, Rocking the foundations of solid tumor growth by attacking the tumor's blood supply, *Immunol. Today*, 19:392-394, 1998.
25. **Kim, K.J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H.S., Ferrara, N.**, Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth *in vivo*, *Nature*, 362:841-844, 1993.
- 10 26. **Re, F., Zanetti, A., Sironi, M., Polentarutti, N., Lanfranccone, L., Dejana, E., Colotta, F.**, Inhibition of anchorage-dependent cell spreading triggers apoptosis in cultured human endothelial cells, *J. Cell Biol.*, 127:537-546, 1994.
- 15 27. **Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A., Cheresch, D.A.**, Integrin avb3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 91:8856-8860, 1994.
28. **Isik, F.F., Gibran, N.S., Jang, Y., Sandell, L., Schwartz, S.M.**, Vitronectin decreases microvascular endothelial cell apoptosis, *J. Cell Physiol.*, 173:149-155, 1998.
- 20 29. **Germer, M., Kanse, S.M., Kirkegaard, T., Kioler, L., Feldinng-Habermann, B., Goodman, S., Preissner, T.**, Kinetic analysis of integrin-dependent cell adhesion on vitronectin. The inhibitory potential of plasminogen activator inhibitor and RGD peptides, *Eur. J. Biochem.*, 253:669-674, 1998.
- 25 30. **Ruoslahti, E., Reed, J.C.**, Anchorage dependence, integrins, and apoptosis, *Cell*, 77:477-478, 1994.
31. **MacDonald, T.J., Tabrizi, P., Shimada, H., Zlokovic, B.V., Laug, W.E.**, Detection of brain tumor invasion and micrometastasis *in vivo* by expression of enhanced green fluorescent protein, *Neurosurgery*, 43:1437-1443, 1998.
- 30 32. **Hsu, S.C., Volpert, O.V., Steck, P.A., Mikkelsen, T., Polverini, P.J., Rao, S., Chou Bouck, N.P.**, Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of throbospondin-1, *Cancer Res.*, 56:5684-5691, 1996.
33. **Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Saitoh, Y., Izumoto, S., Mori, K., Hayakawa, T.**, Antiproliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma *in vivo*: potent inhibition of tumor angiogenesis, *J. Neurooncol.*, 19:251-258, 1994.
- 35 34. **Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., Fine, H.A.**, Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 cDNA inhibits angiogenesis and tumor growth, *Nat. Med.*, 3:437-442, 1997.
- 40 35. **Carron, C.P., Meyer, D.M., Pegg, J.A., Engleman, V.W., Nickols, M.A., Settle, S.L., Westlin, W.F., Ruminiski, P.G., Nickols, G.A.**, A peptidomimetic antagonist of the integrin avb3 inhibits Leydig cell tumor growth and the development of hypercalcemia of malignancy, *Cancer Res.*, 58:1930-1935, 1998.
- 45 36. **Kirsch, M., Strasser, J., Allende, R., Bello, L., Zhang, J., Black, P.M.**, Angiostatin suppresses malignant glioma growth *in vivo*, *Cancer Res.*, 58:4654-4659, 1998.
37. **Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., Hynes, R.O.**, Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all av integrins, *Cell*, 95:507-519, 1998.
- 50 38. **Knott, J.C., Mahesparan, R., Garcia-Cabrera, I., Bolge, T.B., Edvardsen, K., Ness, G.O., Mark, S., Lund-Johansen, M., Bjerkvig, R.**, Stimulation of extracellular matrix components in the normal brain by invading glioma cells, *Int. J. Cancer*, 75:864-872, 1998.
- 55 39. **Seger, D., Gechtman, Z., Shaltiel, S.**, Phosphorylation of vitronectin by casein kinase II. Identification of the sites and their promotion of cell adhesion and spreading, *J. Biol. Chem.*, 273:24805-24813, 1998.
40. **Woodard, A., Garcia-Cardena, G., Leong, M., Madri, J., Sessa, W., Languino, L.**, The synergistic activity of alphavb3 integrin and PDGF receptor increases cell migration, *J. Cell Sci.*, 111:469-478, 1998.
- 60 41. **Sanders, R.J., Mainiero, F., Giancotti, F.G.**, The role of integrins in tumorigenesis and metastasis, *Cancer Invest.*, 16:329-344, 1998.
42. **Treasurywala, S., Berens, M.E.**, Migration arrest in glioma cells is dependent on the alpha-v integrin subunit, *Glia*, 24:236-243, 1998.
- 65 43. **Won, N.C., Mueller, B.M., Barbas, C.F., Ruminiski, P., Quaranta, V., Lin, E.C., Smith, J.W.**, Alpha-v integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines, *Clin. Exp. Metastasis*, 16:50-61, 1998.

44. Van Leeuwen, R.L., Yoshinaga, I.G., Akasaka, T., Dekker, S.K., Vermeer, B.J., Byers, H.R., Attachment, spreading and migration of melanoma cells on vitronectin. The role of alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins, *Exp. Dermatol.*, 5:308-315, 1996.
- 5 45. Lehmann, M., El Battari, A., Abadie, B., Martin, J.M., Marvallldi, J., Role of alpha v beta 5 and alpha v beta 6 integrin glycosylation in the adhesion of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29-D4), *J. Cell Biochem.*, 61:266-277, 1996.
- 10 46. Kost, C., Benner, K., Stockmann, A., Linder, D., Preissner, K.T., Limited plasmin proteolysis of vitronectin. Characterization of the adhesion protein as morpho-regulatory and angiostatin binding factor, *Eur. J. Biochem.*, 236:682-688, 1996.
- 15 47. Maenpaa, A., Kovanen, P.E., Paetau, A., Jaaskelainen, J., Timonen, T., Lymphocyte adhesion molecule ligands and extracellular matrix proteins in gliomas and normal brain: expression of VCAM-1 in gliomas, *Acta. Neuropathol.*, 94:216-225, 1997.
48. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visscher, D., Sarkar, F.H., Cheresch, D.A., Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin, *J. Clin. Invest.*, 96:1815-1822, 1995.
- 20 49. Stins, M.F., Gillesl, F., Kim, K.S., Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells, *J. Neuroimmunol.*, 76:81-90, 1997.
- 50 50. Bafetti, L.M., Young, T.N., Itoh, Y., Stack, M.S., Intact vitronectin induces matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 expression and enhanced cellular invasion by melanoma cells, *J Biol. Chem.*, 273:143-149, 1998.
- 25 51. Wong, N.C., Mueller, B.M., Barbas, C.F., Ruminski, P., Quaranta, V., Lin, E.C., Smith, J.W., Alphav integrins mediate adhesion and migration of breast carcinoma cell lines, *Clin. Exp. Metastasis*, 16:50-61, 1998.
- 30 52. Van Leeuwen, R.L., Yoshinaga, I.G., Akasaka, T., Dekker, S.K., Vermeer, B.J., Byers, H.R., Attachment, spreading and migration of melanoma cells on vitronectin. The role of alpha v beta 3 and alpha v beta 5 integrins, *Exp. Dermatol.*, 5:308-315, 1996.
- 35 53. Lehmann, M., El Battari, A., Abadie, B., Martin, J.M., Marvaldi, J., Role of alpha v beta 5 and alpha v beta 6 integrin glycosylation in the adhesion of a colonic adenocarcinoma cell line (HT29-D4), *J. Cell Biochem.*, 61:266-277, 1996.
54. Gladson, C.L., Cheresch, D.A., Glioblastoma expression of vitronectin and the integrin, *J. Clin. Invest.*, 88:1924-1932, 1991.
- 40 55. Jaskiewicz, K., Chasen, M.R., Robson, S.C., Differential expression of extracellular matrix proteins and integrins in hepatocellular carcinoma and chronic liver disease, *Anticancer Res.*, 13:2229-2237, 1993.
56. Brooks, P.C., Stromblad, S., Klemke, R., Visseher, D., Sarkar, F.H., Cheresch, D.A., Antiintegrin alpha v beta 3 blocks human breast cancer growth and angiogenesis in human skin, *J. Clin. Invest.*, 96:1815-1822, 1995.
- 45 57. Leon, S.P., Folkert, R.D., Black, P.M., Microvessel density is a prognostic indicator for patients with astroglial brain tumors, *Cancer*, 77:362-372, 1996.
- 50 58. Wesseling, P., Van Der Laak, J.A., Link, M., Teepen, H.L., Ruiter, D.J., Quantitative analysis of microvascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy, *Hum. Pathol.*, 29:352-358, 1998.
- 55 59. Li, V.W., Folkert, R.D., Watanabe, H., Yu, C., Rupnick, M., Barnes, P., Scott, M., Black, P.M., Sallan, S., Folkman, J., Microvessel count and cerebrospinal fluid basic fibroblast growth factor in children with brain tumors, *Lancet*, 344:82-86, 1994.
- 60 60. Taki, T., Ohnishi, T., Arita, N., Hiraga, S., Saitoh, Y., Izumoto, S., Mori, K., Hayakawa, T., Antiproliferative effects of TNP-470 on human malignant glioma in vivo: potent inhibition of tumor angiogenesis, *J. Neurooncol.*, 19:251-258, 1994.
61. Hsu, S.C., Volpert, O.V., Steck, P.A., Mikkelsen, T., Polverini, P.J., Rao, S., Chou Bouck, N.P., Inhibition of angiogenesis in human glioblastomas by chromosome 10 induction of thrombospondin-1, *Cancer Res.*, 56:5684-5691, 1996.
- 65 62. Tanaka, T., Manome, Y., Wen, P., Kufe, D.W., Fine, H.A., Viral vector-mediated transduction of a modified platelet factor 4 CDNA inhibits angiogenesis and tumor growth, *Nat. Med.*, 3:437-442, 1997.
63. Friedlander, D.R., et al., *Cancer Res.*, 56:1939-1947, 1996.

ES 2 304 942 T3

64. **Amar**, A.P., *et al.*, *J. Neurooncol.*, 20:1-15, 1994.

65. **Paulus**, W., *et al.*, *J. Neurosurg.*, 80:515-519, 1994.

5 66. **Tonn**, J.C., *et al.*, *Anticancer Res.*, 18:2599-2605, 1998.

67. **MacDonald**, T.J., *et al.*, *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.*, 39:497, 1998.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Utilización de un antagonista de una integrina α_v seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_5$, y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir el crecimiento tumoral en el cerebro de un hospedador, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista de una integrina α_v debe administrarse al hospedador que necesita de dicha inhibición.
2. Utilización según la reivindicación 1, en la que la integrina α_v es α_v , $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.
3. Utilización según la reivindicación 1, en la que el antagonista es un antagonista polipeptídico de α_v .
4. Utilización según la reivindicación 3, en la que el antagonista de α_v es un polipéptido que contiene Arg-Gly-Asp (RGD).
5. Utilización según la reivindicación 4, en la que el antagonista es un antagonista pentapeptídico cíclico RGD de α_v .
6. Utilización según la reivindicación 1, en la que el antagonista es un anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_3$.
7. Utilización según la reivindicación 6, en la que el anticuerpo monoclonal presenta las características de inmunorreacción de un anticuerpo monoclonal denominado LM-609.
8. Utilización según la reivindicación 1, en la que la combinación de los anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ es una combinación de un anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_3$ y un anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_5$.
9. Utilización según la reivindicación 8, en la que el anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_3$ presenta las características de inmunorreacción de un anticuerpo monoclonal denominado LM-609 y el anticuerpo monoclonal inmuno-específico para $\alpha_v\beta_5$ presenta las características de inmunorreacción de un anticuerpo monoclonal denominado P1-F6.
10. Utilización según la reivindicación 1, en la que el tumor está localizado intercerebralmente en el cerebro del hospedador.
11. Utilización según la reivindicación 1, en la que el tumor se selecciona de entre un grupo constituido por glioblastoma, meduloblastoma, astrocitoma, neuroectoderma primitivo y cánceres de glioma del tronco cerebral.
12. Utilización según la reivindicación 1, en la que el antagonista debe administrarse intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, transdérmica, intrasinovial, intramuscular u oralmente.
13. Utilización según la reivindicación 1, en la que el antagonista debe administrarse en relación con un portador farmacéutico.
14. Utilización de un antagonista de una integrina α_v seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v , un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$, un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_5$ y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la angiogénesis en un tejido tumoral localizado en el cerebro de un hospedador, en la que una composición que comprende una cantidad que inhibe la angiogénesis de dicho antagonista de una integrina α_v debe administrarse al hospedador.
15. Utilización según la reivindicación 14, en la que la integrina α_v es $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.
16. Utilización de un antagonista para las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v y una combinación de anticuerpos respectivamente contra $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la adhesión celular dependiente de una matriz extracelular (ECM) en células tumorales cerebrales que crecen en el cerebro de un hospedador, en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista para las integrinas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ se debe administrar al hospedador.
17. Utilización según la reivindicación 16, en la que el antagonista de α_v es un polipéptido que contiene Arg-Gly-Asp (RGD).
18. Utilización según la reivindicación 17, en la que el antagonista es un antagonista pentapeptídico cíclico RGD de α_v .
19. Utilización según la reivindicación 16, en la que la ECM es la vitronectina o la tenascina.

20. Utilización de un antagonista para $\alpha_v\beta_3$ seleccionado de entre un grupo constituido por un antagonista polipeptídico de α_v o de un anticuerpo contra $\alpha_v\beta_3$ para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inhibir la migración celular dependiente de la vitronectina en células tumorales cerebrales crecen en el cerebro de un hospedador, en la que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de dicho antagonista para $\alpha_v\beta_3$.

21. Utilización de un antagonista polipeptídico de una integrina α_v para la preparación de una composición farmacéutica destinada a inducir apoptosis en las células tumorales que crecen en el cerebro de un hospedador, en la que debe administrarse al hospedador una cantidad terapéuticamente eficaz de una integrina α_v .

22. Utilización según la reivindicación 21, en la que la integrina α_v es $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$.

23. Utilización según la reivindicación 21, en la que el antagonista de α_v es un polipéptido que contiene Arg-Gly-Asp (RGD).

24. Utilización según la reivindicación 23, en la que el antagonista es un antagonista pentapeptídico cíclico RGD de las integrinas α_v , $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$.

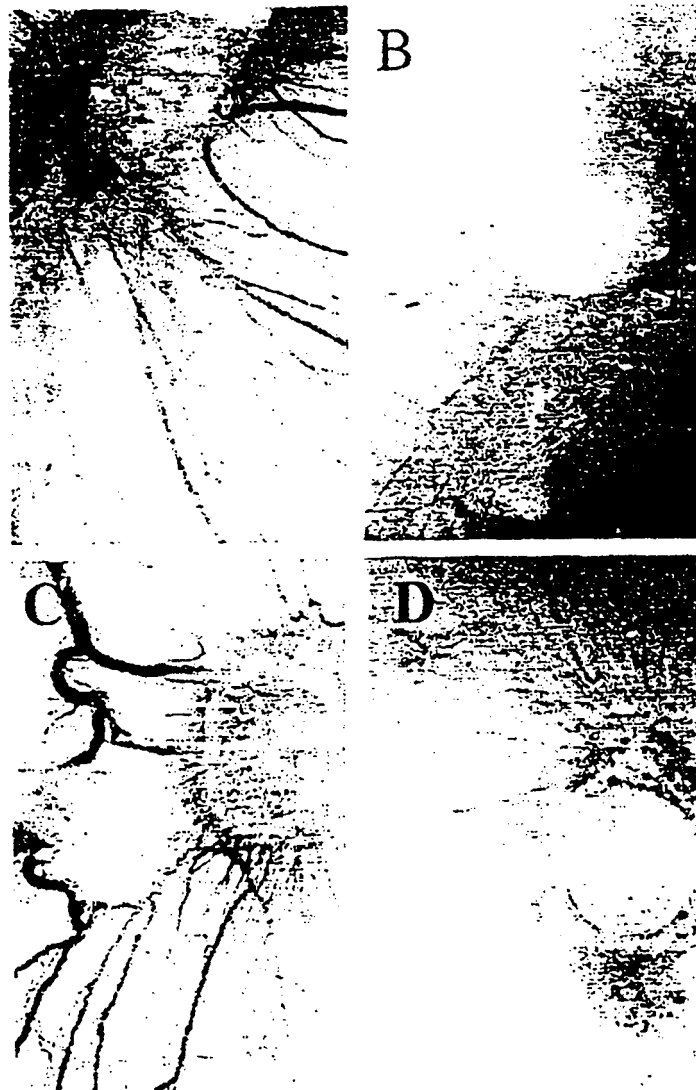


FIG.1a

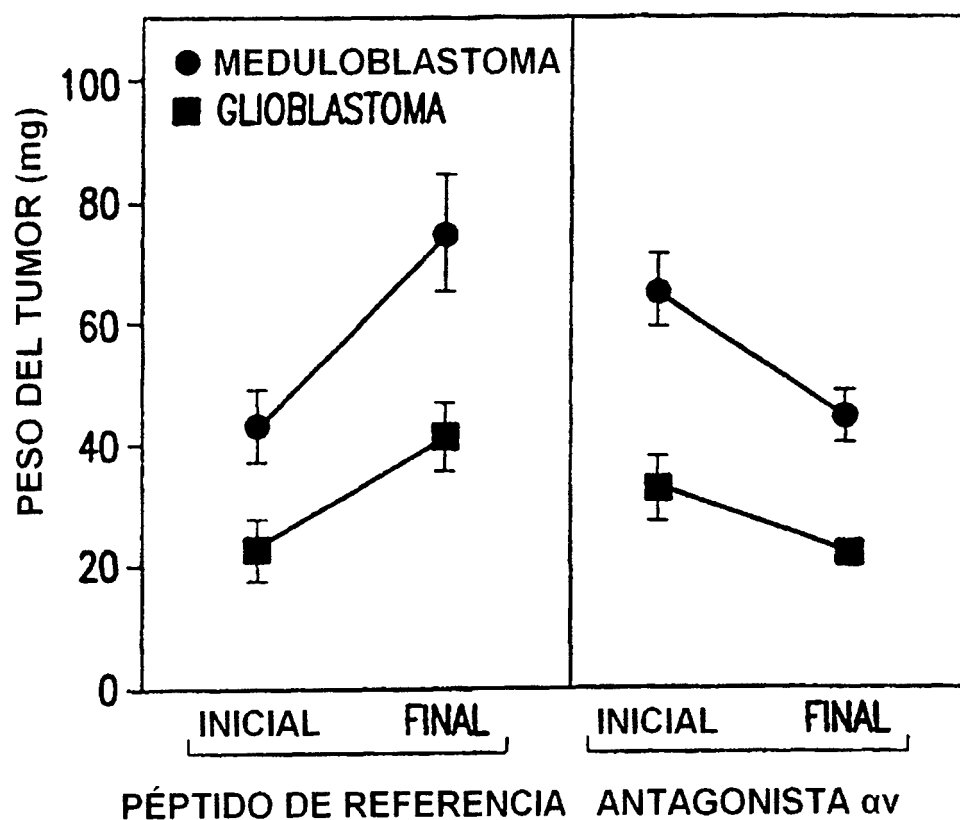


FIG. 1b

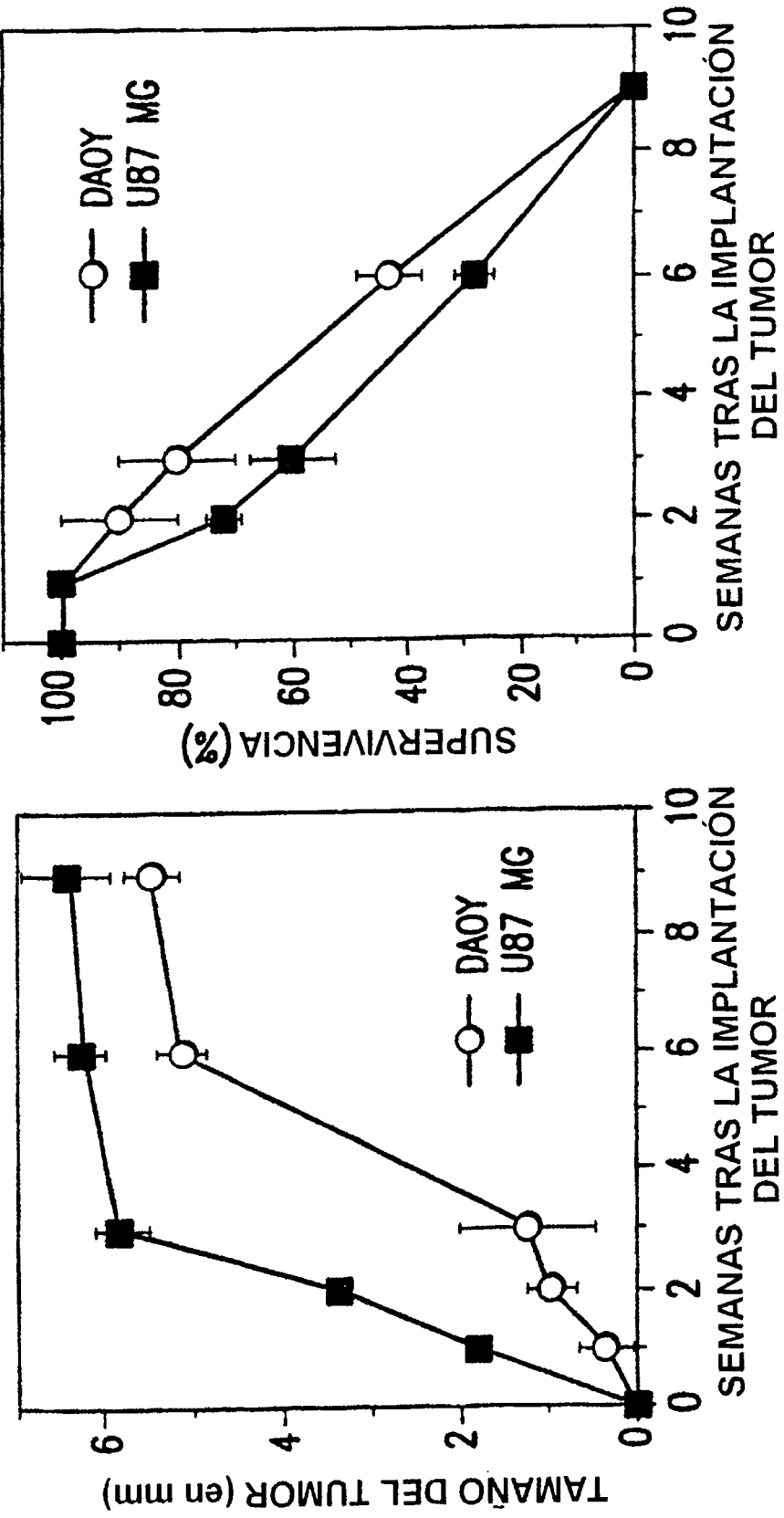


FIG. 2b

FIG. 2a

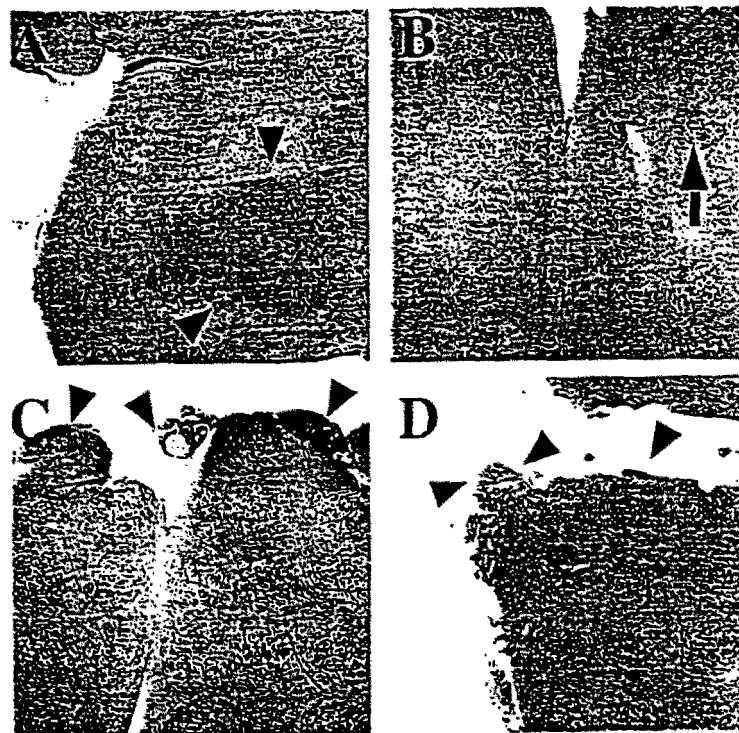


FIG.3a

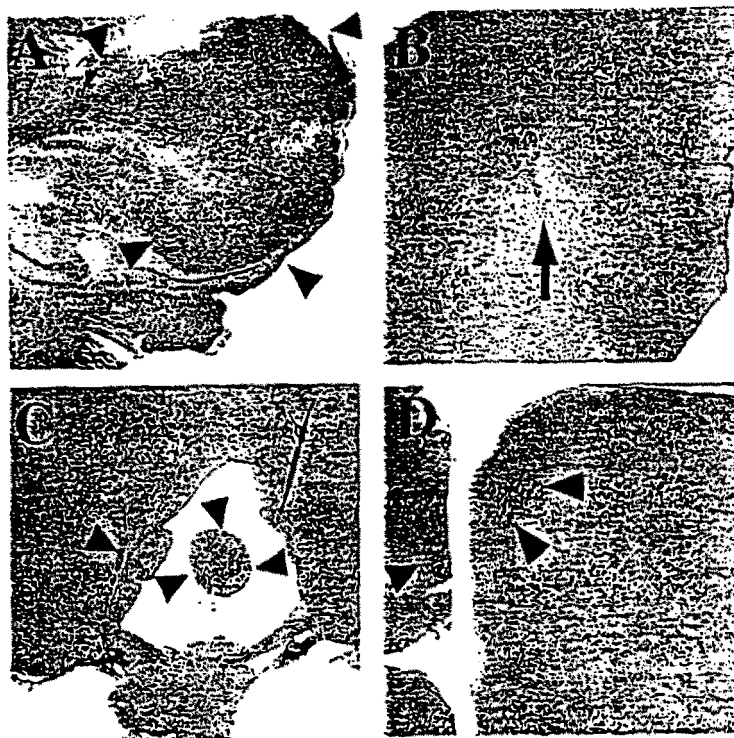


FIG.3b

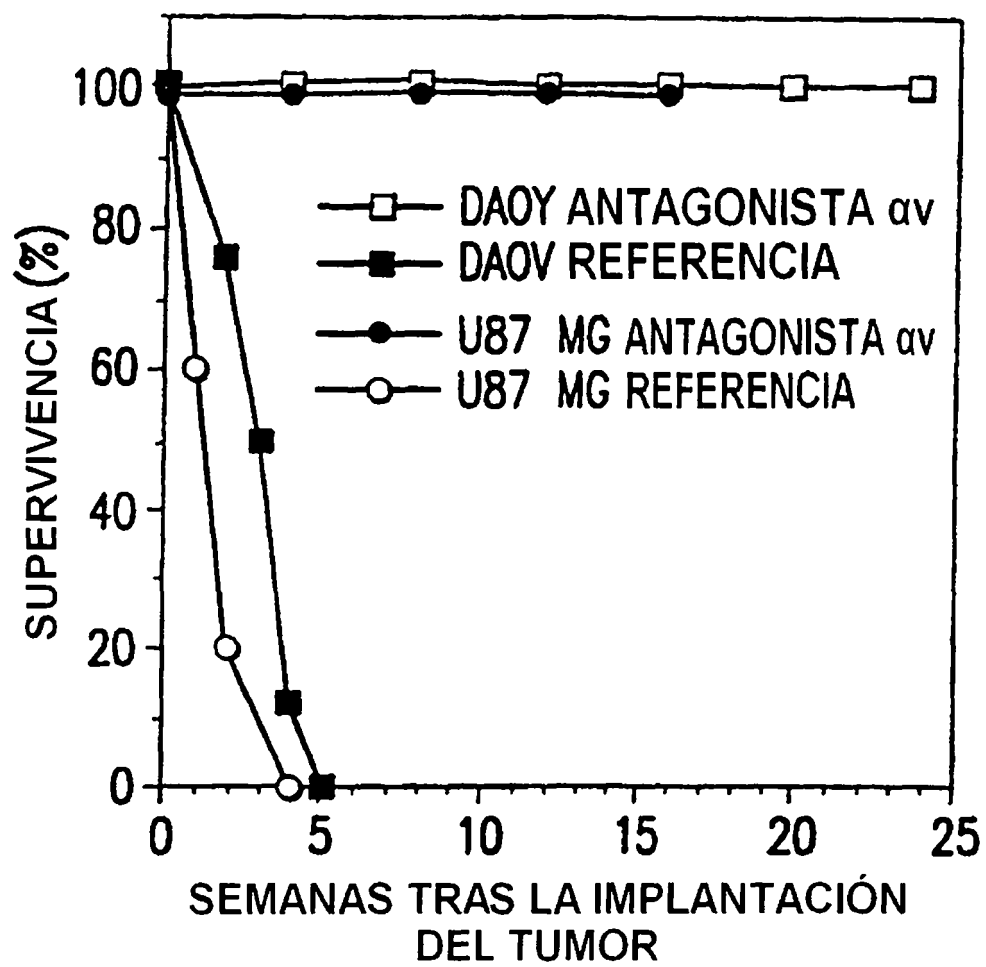


FIG.4

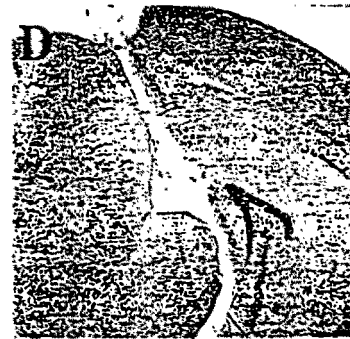
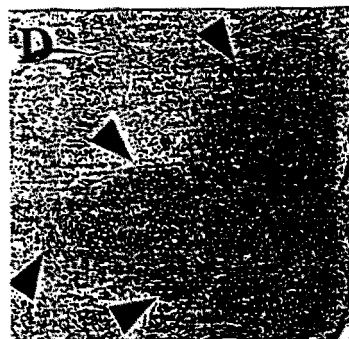
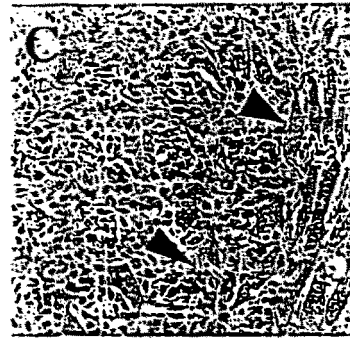
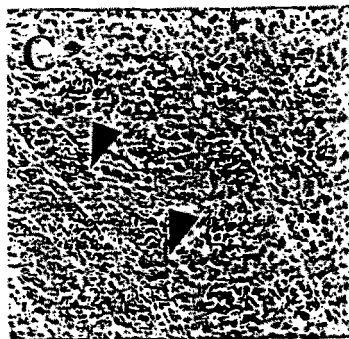


FIG.5a

FIG.5b

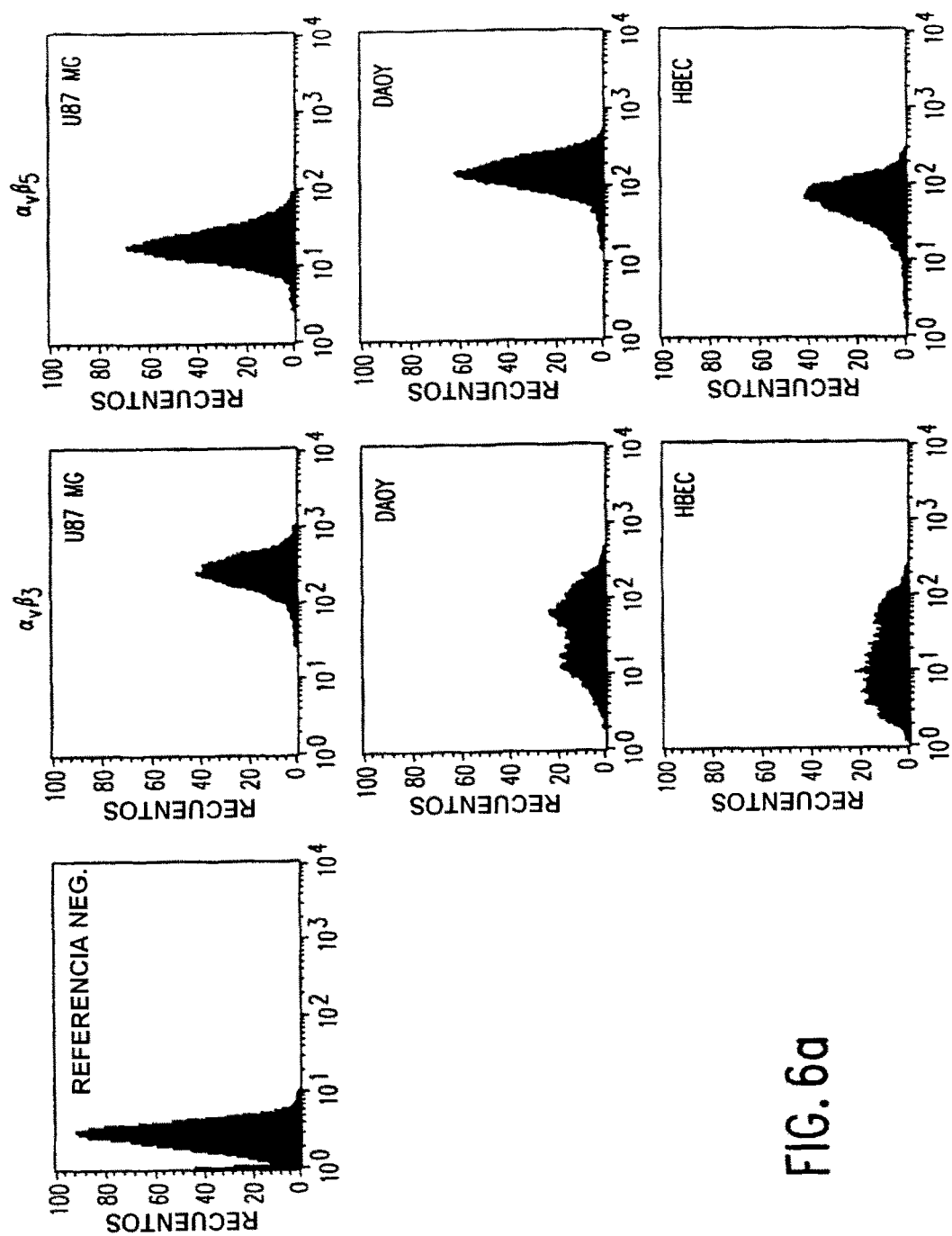


FIG. 6a

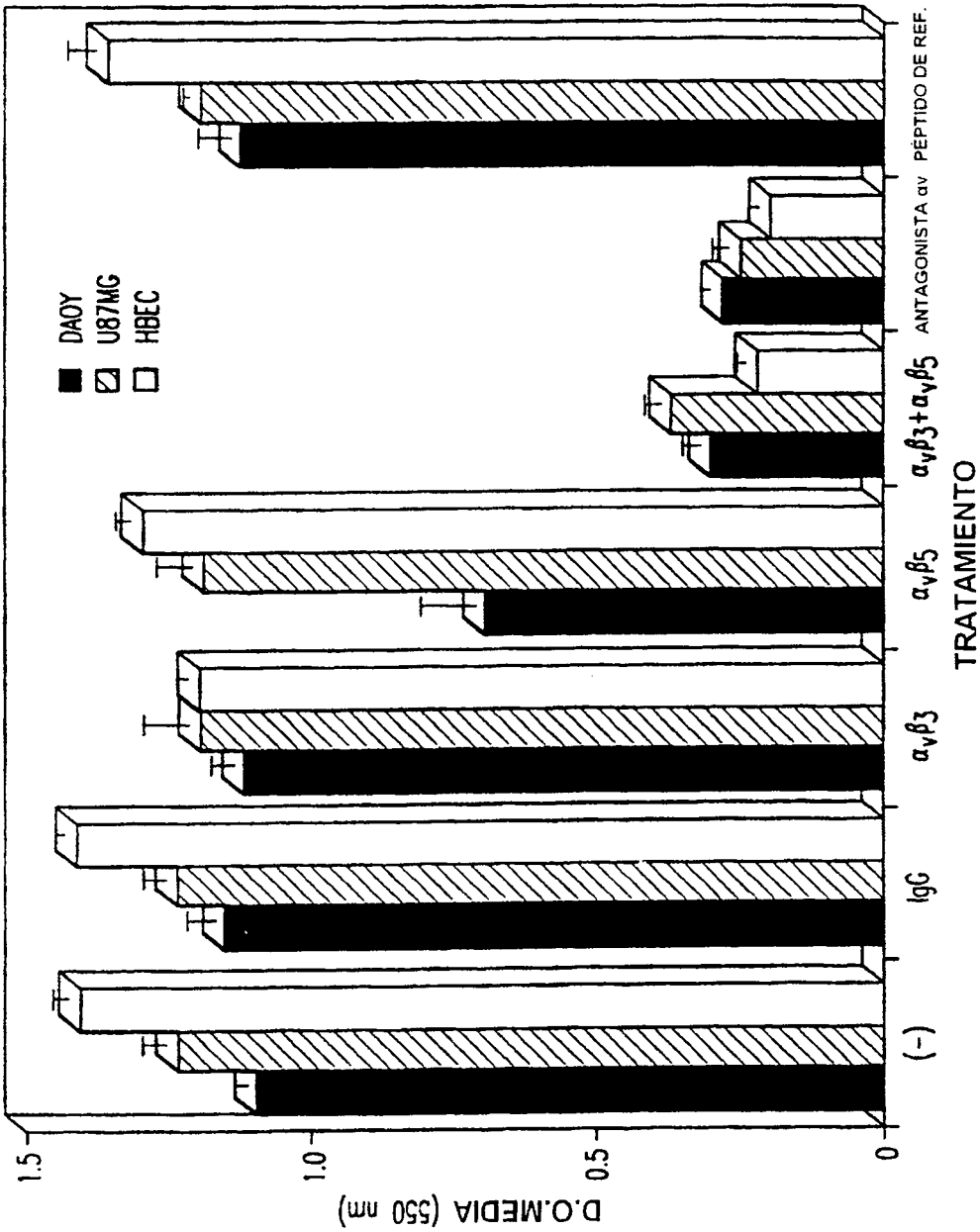


FIG. 6b

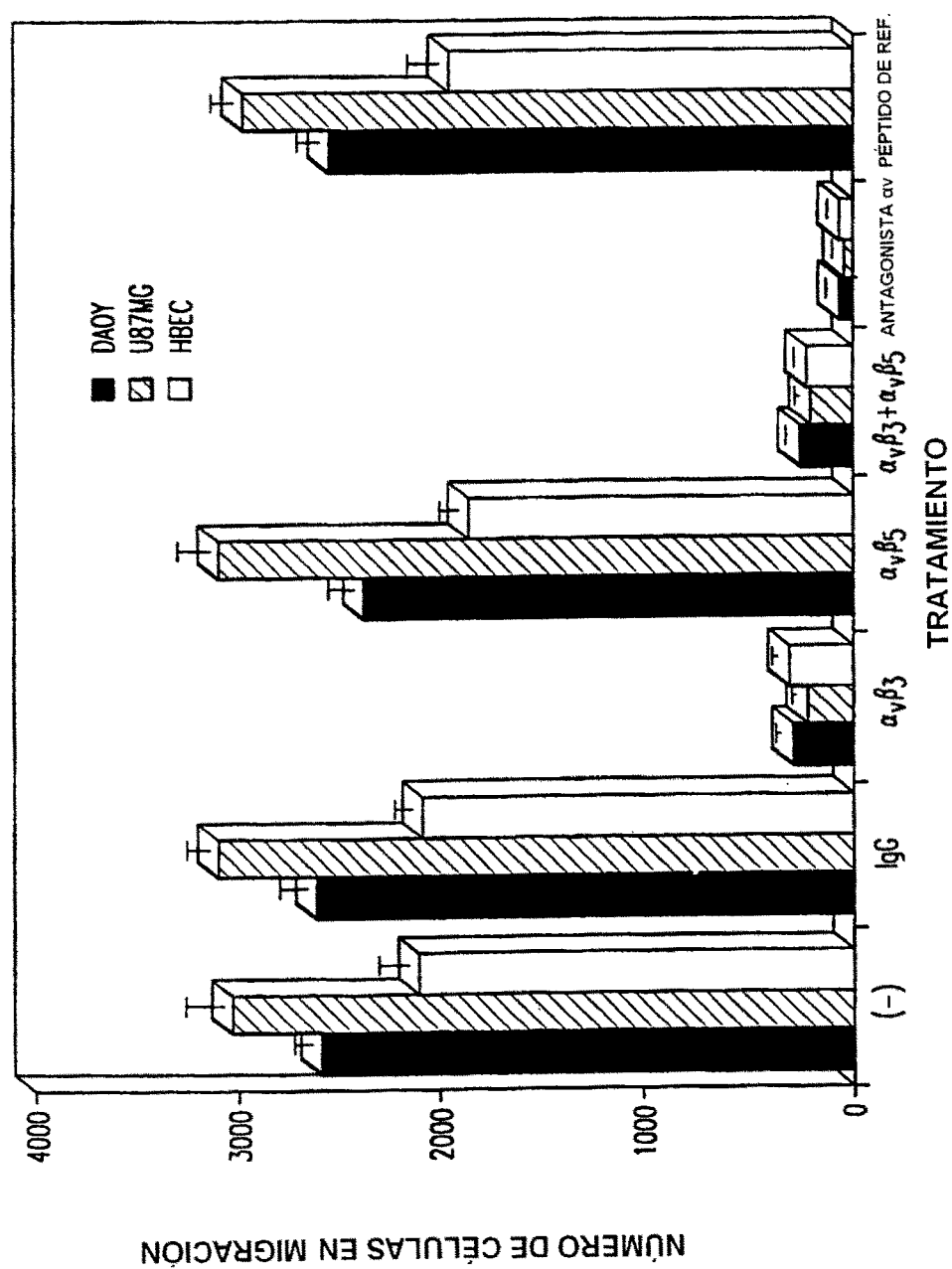
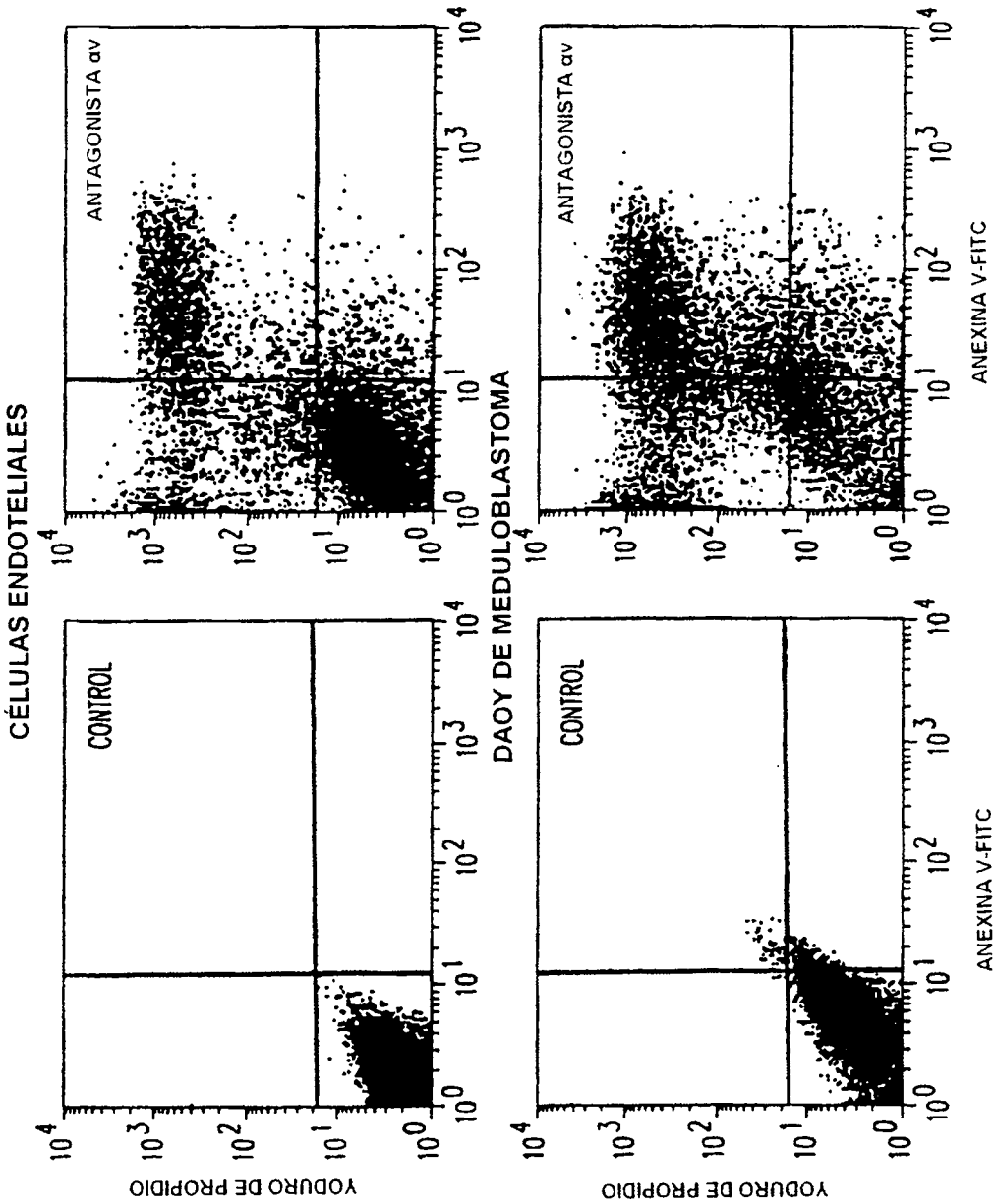


FIG. 6c



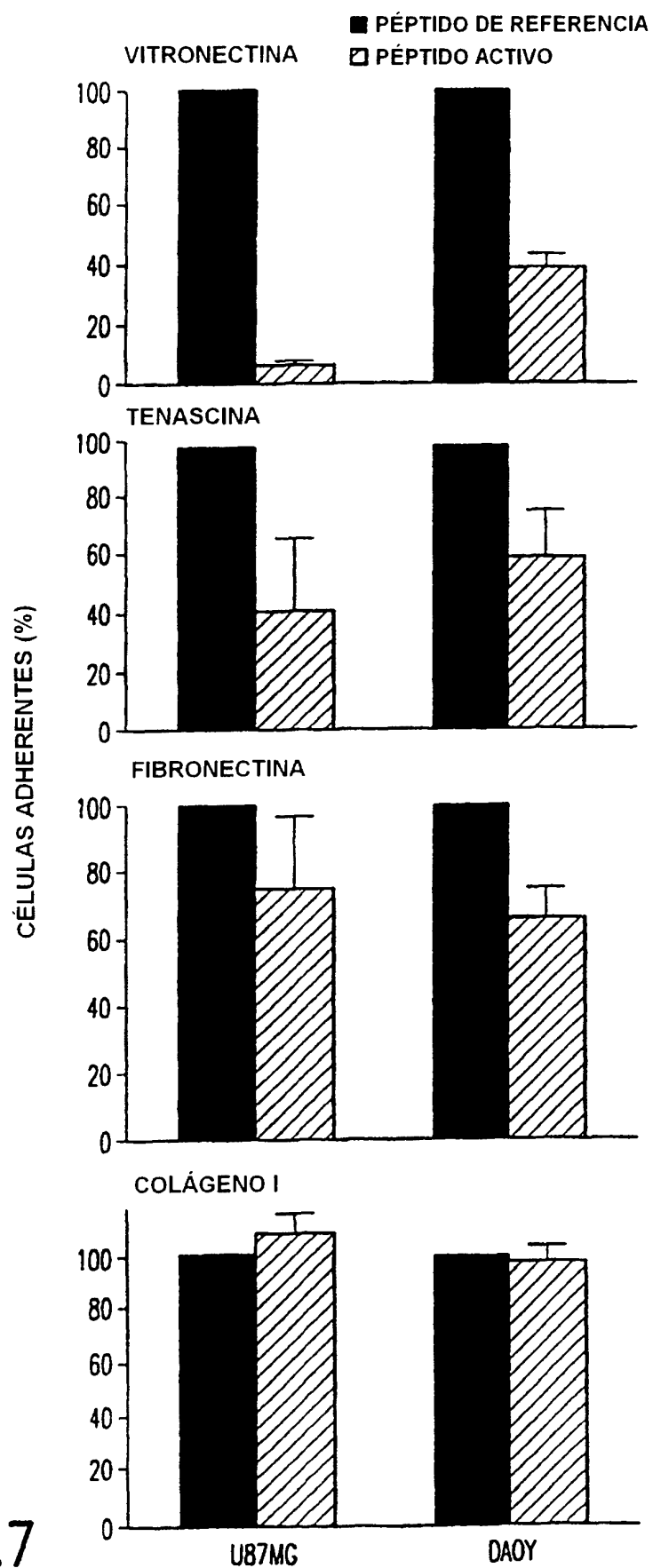


FIG.7

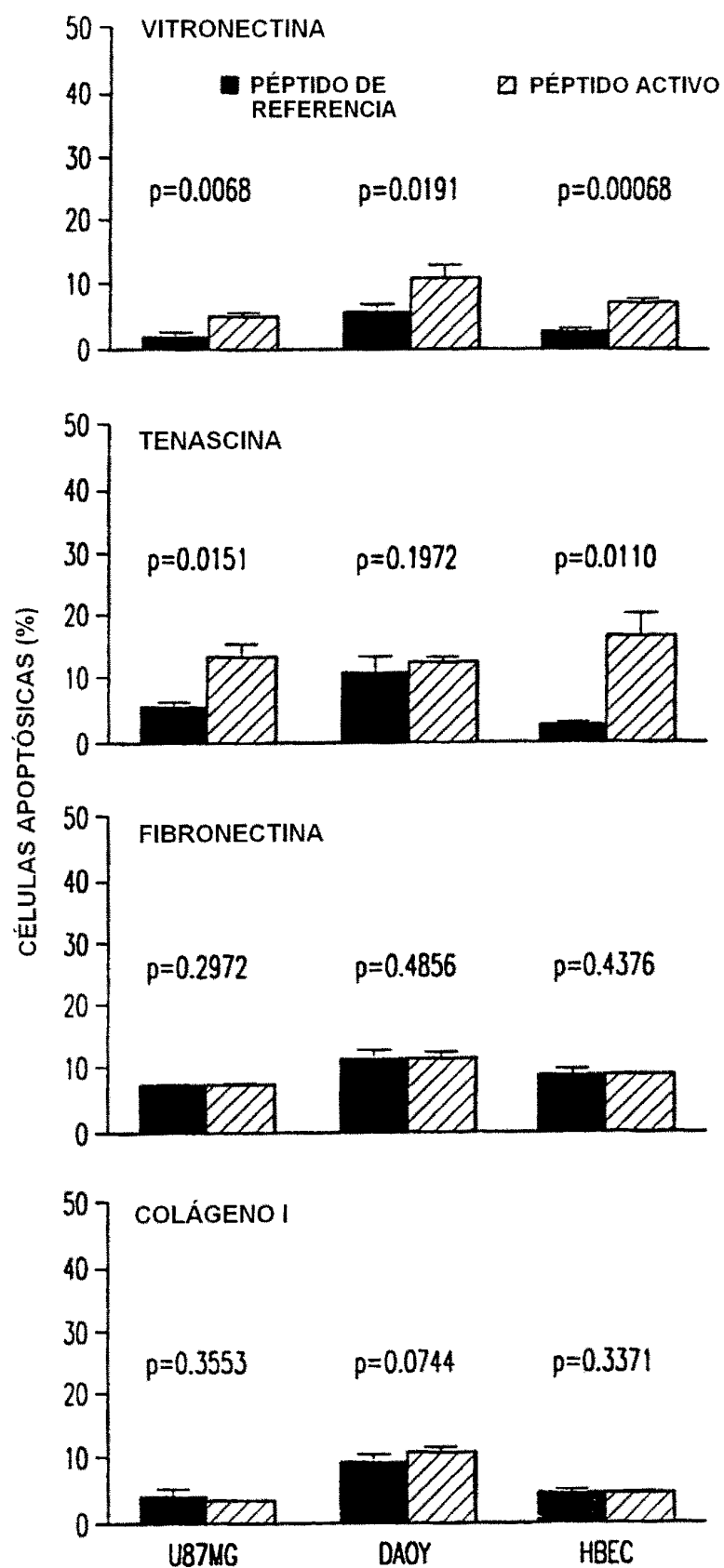


FIG.8

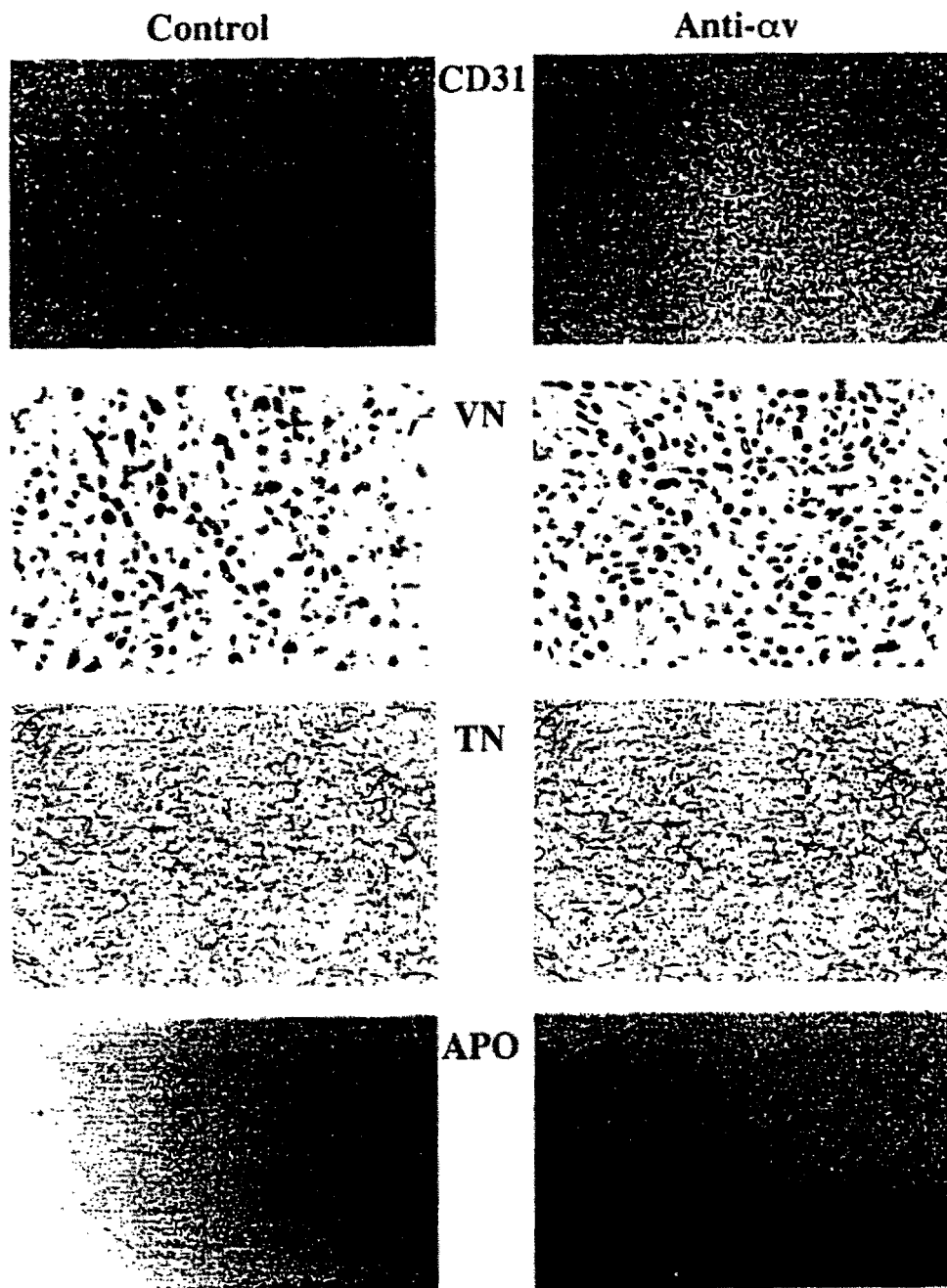


FIG.9