



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 322 723**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/08 (2006.01)

A61K 38/12 (2006.01)

A61K 31/435 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99922828 .1**

96 Fecha de presentación : **07.05.1999**

97 Número de publicación de la solicitud: **1075277**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **14.02.2001**

54 Título: **Métodos para detectar e inhibir la angiogénesis.**

30 Prioridad: **08.05.1998 US 84850 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.06.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.06.2009

73 Titular/es:
**The Regents of the University of California
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, California 94607-5200, US**

72 Inventor/es: **Varnier, Judith, A.**

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 322 723 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

Métodos para detectar e inhibir la angiogénesis.

5 Fundamentos de la invención**Campo de la invención**

Esta invención se refiere en general a métodos para detectar y tratar afecciones que implican angiogénesis no deseada y más específicamente a métodos para detectar o inhibir la angiogénesis interfiriendo con la unión específica de una integrina $\alpha 5/\beta 1$ a un ligando.

Información sobre los fundamentos

La angiogénesis es el proceso por medio del cual se forman nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis, también denominada neovascularización, se produce normalmente durante la embriogénesis y el desarrollo, y se produce en los organismos plenamente desarrollados durante la curación de heridas y el desarrollo de la placenta. Además, se produce angiogénesis en varias afecciones patológicas, incluyendo en enfermedades oculares tales como la retinopatía diabética y la degeneración macular debida a la neovascularización, en afecciones asociadas con inflamación de los tejidos tales como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal, y en cáncer, donde la formación de vasos sanguíneos en el tumor creciente proporciona oxígeno y nutrientes a las células tumorales, a la vez que proporciona una ruta a través de la cual las células tumorales se metastatizan por todo el cuerpo. Puesto que hay millones de personas en todo el mundo aquejadas de estas enfermedades, se ha hecho un considerable esfuerzo para comprender los mecanismos implicados en la angiogénesis, con la esperanza de que tal comprensión permita el desarrollo de métodos para detectar e inhibir dicha angiogénesis no deseada.

La angiogénesis se produce en respuesta a la estimulación por uno o más factores de crecimiento conocidos, y puede que implique también otros factores aún no identificados. Las células endoteliales, que son las células que revisten los vasos sanguíneos maduros, normalmente no proliferan. Sin embargo, en respuesta a un estímulo apropiado, las células endoteliales se activan y comienzan a proliferar y a migrar hacia el tejido no vascularizado, para formar nuevos vasos sanguíneos. En algunos casos, pueden activarse células precursoras para diferenciarse en células endoteliales, que forman nuevos vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos están rodeados por una matriz extracelular. Además de la estimulación por los factores de crecimiento, la angiogénesis depende de la interacción de las células endoteliales con la matriz extracelular, así como de unas con otras. La activación de las células endoteliales por los factores de crecimiento y la migración e interacción con la matriz extracelular y de unas con otras depende de los receptores de superficie celular expresados por las células endoteliales. Estos receptores de superficie celular, que incluyen receptores de factores de crecimiento e integrinas, interaccionan específicamente con moléculas particulares.

En las afecciones patológicas tales como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética, la disminución de la disponibilidad de oxígeno para la retina da como resultado una afección hipóxica, que estimula la secreción de factores de crecimiento angiogénicos tales como los factores de crecimiento endotelial vasculares (VEGF, del inglés "vascular endothelial growth factors"), que inducen la migración y proliferación anómala de células endoteliales en los tejidos del ojo. Dicha vascularización en los tejidos oculares puede inducir cicatrización corneal, desprendimiento de retina y acumulación de fluido en la coroides, cada uno de los cuales puede afectar desfavorablemente a la visión y conducir a la ceguera.

La angiogénesis está también asociada con la progresión y agravamiento de enfermedades inflamatorias, incluyendo psoriasis, artritis reumatoide, osteoartritis, y enfermedades inflamatorias intestinales tales como la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. En la enfermedad artrítica inflamatoria, por ejemplo, la afluencia de linfocitos a la región que rodea las articulaciones estimula la angiogénesis en el revestimiento sinovial. El aumento en la vasculatura proporciona los medios para una mayor afluencia de leucocitos, que facilitan la destrucción del cartílago y el hueso en la articulación. La vascularización angiogénica que se produce en la enfermedad inflamatoria intestinal da como resultado efectos similares en el intestino.

El crecimiento de capilares en las placas ateroscleróticas en las arterias coronarias representa otra afección patológica asociada con la angiogénesis inducida por factores de crecimiento. Un flujo sanguíneo excesivo en las placas neovascluarizadas puede dar como resultado la ruptura y hemorragia de las placas llenas de sangre, liberándose coágulos de sangre que pueden dar como resultado una trombosis coronaria.

La implicación de la angiogénesis en enfermedades tan diversas como el cáncer, la enfermedad ocular y enfermedades inflamatorias ha llevado a hacer un esfuerzo para identificar métodos para inhibir específicamente la angiogénesis como un medio de tratar estas enfermedades. Para los pacientes con cáncer, tales métodos de tratamiento pueden proporcionar una ventaja sustancial frente a los métodos usados actualmente tales como la quimioterapia, que destruye o perjudica no sólo las células tumorales diana, sino también células normales en el paciente, particularmente células normales en proliferación tales como células sanguíneas, células epiteliales, y células que revisten el lumen intestinal. Tal destrucción inespecífica por los agentes quimioterapéuticos da como resultado efectos secundarios que son, en

el mejor de los casos, desagradables, y pueden dar como resultado con frecuencia una morbilidad inaceptable del paciente, o mortalidad. De hecho, los efectos secundarios no deseados asociados con las terapias del cáncer limitan con frecuencia el tratamiento que puede recibir un paciente.

5 Para otras afecciones patológicas asociadas con angiogénesis anómala tales como la retinopatía diabética, no hay tratamientos eficaces salvo los trasplantes de retina. Sin embargo, incluso si se realiza un trasplante de retina, la nueva retina sería objeto de las mismas afecciones que dieron como resultado la retinopatía original. Por tanto, existe la necesidad de identificar las interacciones moleculares implicadas en la angiogénesis no deseada que se produce en ciertas afecciones patológicas, de tal forma que puedan desarrollarse métodos para diagnosticar y tratar específicamente tales patologías. La presente invención satisface esta necesidad y proporciona asimismo ventajas relacionadas.

Compendio de la invención

15 La presente invención proporciona un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo para usar en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un tejido por un método que comprende poner en contacto la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el tejido con dicho agente, reduciendo o inhibiendo de ese modo la angiogénesis en el tejido.

20 El método descrito anteriormente es útil, por ejemplo, para reducir o inhibir la angiogénesis en el tejido ocular tal como la retina, la mácula o la córnea; en la piel; en el tejido sinovial; en el tejido intestinal; o en el hueso. Además, el método descrito anteriormente es útil para reducir o inhibir la angiogénesis en un neoplasma, que puede ser benigno o maligno, y cuando es maligno, puede ser un neoplasma metastásico. En la presente memoria se describen medicamentos que contienen antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ y que son útiles para reducir o inhibir la angiogénesis en un individuo. Un agente descrito en la presente memoria puede ser un péptido, por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos CRRETAWAC (SEC ID N° 1); o una molécula orgánica pequeña, no peptídica, por ejemplo, para el método diagnóstico el ácido (S)-2-[(2,4,6-trimetilfenil)sulfonyl]amino-3-[(7-benciloxicarbonil-8-(2-piridinilamino-20 metil)-1-oxi-2,7-diazaspiro-[4,4]-non-2-en-3-il)]carbonilaminopropiónico. Un agente útil como antagonista de $\alpha 5\beta 1$ puede enlazarse a una citotoxina, por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico para el cáncer.

30 La invención proporciona también métodos para identificar la presencia de angiogénesis en un tejido poniendo en contacto una muestra del tejido con un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, agente que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo, y detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido. En la presente memoria se describen también métodos para identificar la presencia de angiogénesis, en los que el agente puede ser un péptido, o una molécula orgánica pequeña, no peptídica. Un agente de la invención o un agente descrito en la presente memoria puede enlazarse a un marcador detectable, que puede detectarse directamente, o cuya presencia puede detectarse debido a su interacción con un reactivo particular. Un método como este es útil para identificar la presencia de angiogénesis en varios tejidos, incluyendo en tejidos normales tales como el tejido embrionario o el tejido placentario, en tejido de granulación, o en un tejido implicado en una afección patológica tal como un neoplasma, una retinopatía, o una afección artrítica u otra afección inflamatoria.

45 La invención proporciona además métodos para diagnosticar una afección patológica caracterizada por angiogénesis en un tejido en un individuo. Se realiza un método de diagnóstico, (a) poniendo en contacto (i) una muestra del tejido que se ha obtenido del individuo, en el que, en un individuo que tiene la afección patológica, el tejido muestra angiogénesis; con (ii) un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, agente que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo; y detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido, diagnosticando de ese modo una afección patológica caracterizada por angiogénesis en el individuo. La afección patológica puede implicar el ojo, por ejemplo, retinopatía diabética o degeneración macular; la piel, por ejemplo, un hemangioma o psoriasis; una articulación, por ejemplo, artritis reumatoide u osteoartritis; o el intestino, por ejemplo, la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; o puede ser un neoplasma, que puede ser benigno o maligno. Un neoplasma maligno, que puede ser metastásico, puede ser, por ejemplo, un carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de ovario, o carcinoma pancreático.

55 La presente invención proporciona también un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo para usar en el diagnóstico de una afección patológica caracterizada por angiogénesis en un tejido en un individuo, por un método que comprende los pasos de:

- 60 (a) administrar dicho agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un individuo bajo sospecha de tener la afección patológica; y
- 65 (b) detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en un tejido, diagnosticando de ese modo una afección patológica caracterizada por angiogénesis en el individuo. El agente puede marcarse de manera detectable, por ejemplo enlazándolo a un resto tal como un radionucleido, un material paramagnético o un material atenuante de rayos X. El método de detección puede ser un método de adquisición de imágenes *in vivo*, tal como la adquisición de imágenes de un radionucleido, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computerizada, o un método de adquisición de imágenes por

resonancia magnética, o puede ser un método *ex vivo*, en el que, tras la administración del agente, se obtiene una muestra del tejido del individuo, y se detecta la unión específica del agente en la muestra. Un agente que está unido específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ en una muestra así puede detectarse directamente, por ejemplo, detectando la radiactividad debida al resto enlazado al agente, o puede detectarse indirectamente poniendo en contacto el agente específicamente unido con un reactivo que interactúe específicamente con el agente, o con el resto, y detectando una interacción del reactivo con el agente del resto.

El agente para usar conforme a la presente invención puede adaptarse para el tratamiento del tejido en un individuo, según el cual se administra el agente al individuo. También el tejido puede estar asociado con una afección patológica asociada con angiogénesis y el tratamiento puede reducir o inhibir la angiogénesis en el tejido y, en consecuencia, reducir la gravedad de la afección patológica. La afección puede ser cualquier afección patológica asociada con angiogénesis, incluyendo un neoplasma, que puede ser un neoplasma maligno, por ejemplo un carcinoma tal como el carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de ovario o carcinoma pancreático, o un sarcoma, mesotelioma, teratocarcinoma, un astrocitoma, glioblastoma, u otro neoplasma, incluyendo un neoplasma maligno metastásico. El agente puede administrarse por varias vías, por ejemplo, intravenosa, oral, o directamente en la región a tratar, por ejemplo, directamente en un tumor neoplásico; mediante gotas en los ojos, cuando la afección patológica implica al ojo; o por vía intrasinovial, cuando la afección implica a una articulación.

La invención proporciona además el uso de un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo para la fabricación de un medicamento para usar en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un tejido por un método que comprende poner en contacto la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el tejido con dicho agente, reduciendo o inhibiendo de ese modo la angiogénesis en el tejido.

También se describen en la presente memoria métodos para identificar un agente que reduce o inhibe la angiogénesis asociada con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en un tejido. Un método así, que es útil como ensayo de búsqueda y selección, puede realizarse poniendo en contacto una muestra del tejido que presenta angiogénesis asociada con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con un agente, y detectando una reducción o inhibición de la angiogénesis en el tejido. El contacto del tejido con el agente puede producirse *in vivo* o *ex vivo*. Cuando el método se realiza usando un formato *in vitro*, puede adaptarse fácilmente para ensayos de búsqueda y selección automatizados de alto rendimiento. El tejido puede ser cualquier tejido que sufra angiogénesis asociada con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$, por ejemplo, tejido neoplásico maligno, y puede ser de cualquier individuo, incluyendo, por ejemplo, de un mamífero, ave, reptil o anfibio.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra el efecto inhibitorio de la molécula orgánica pequeña no peptídica, SJ749, sobre la adhesión de células tumorales HT29 $\alpha 5^+$ a fibronectina. Las células tumorales HT29 $\alpha 5^+$ se produjeron transfectando células HT29 con el cADN de $\alpha 5^+$.

La Figura 2 muestra el efecto inhibitorio dependiente de dosis de SJ749 en la formación de puntos de ramificación de vasos sanguíneos en membranas corioalantoicas (CAMs, del inglés "chorioallantoic membranes"). La angiogénesis se estimuló por tratamiento de las CAMs con factor de crecimiento de fibroblastos básico.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para detectar angiogénesis en un tejido identificando la unión de $\alpha 5\beta 1$ a un ligando en un vaso sanguíneo en el tejido. Se proporcionan también métodos para diagnosticar la presencia de angiogénesis en un individuo. Se describen también métodos para reducir o inhibir la angiogénesis en un tejido interfiriendo con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un ligando expresado en el tejido. Se describen también métodos para reducir o inhibir la angiogénesis, que puede estar asociada con una afección patológica, en un individuo.

La angiogénesis depende de la cooperación de varios factores de crecimiento y sucesos de adhesión celular. Se ha demostrado que las integrinas αV juegan roles críticos en la angiogénesis, aunque los estudios usando ratones carentes de integrinas αV han sugerido que pueden estar implicados también en la angiogénesis otros receptores de adhesión y sus ligandos. Como se describe en la presente memoria, la integrina $\alpha 5\beta 1$ y su ligando fibronectina están regulados por incremento de manera coordinada durante la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento y en los vasos sanguíneos presentes en biopsias de tumores humanos, y la interacción de estas moléculas se requiere para la angiogénesis que se produce durante el tumor y sostiene su crecimiento *in vivo*, así como la angiogénesis asociada con varias afecciones patológicas.

El desarrollo de redes vasculares durante la embriogénesis o la angiogénesis normal y patológica depende de la estimulación inducida por factores de crecimiento (Breier y Risau, *Trends in Cell Biology* 6:454-456 (1996); Breier *et al.*, *Thromb. Haemost.* 78:678-683 (1997); Folkman, *Nature Med.* 1:27-31 (1995); Risau, *Nature* 386:671-674 (1997)) y de las interacciones celulares con la matriz extracelular (Stromblad y Chersesh, *Chemistry and Biology* 3:881-885 (1996); Varner, *Exs.* 79:361-390 (1997); cada una de las publicaciones citadas en esta descripción se incorpora a la presente memoria por referencia). Los análisis genéticos y funcionales indican que los componentes extracelulares y los receptores de superficie celular regulan el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación de las células endoteliales en la vasculogénesis y en la angiogénesis (George *et al.*, *Development* 119:1079-1091 (1993); Yang *et al.*,

Development 119:1093-1105 (1993); Stromblad y Cheresch, *ut supra*, 1996; Bloch *et al.*, *J. Cell Biol.* 139: 265-278 (1997); Varner, *ut supra*, 1997; Risau, *ut supra*, 1997; Bader *et al.*, *Cell* 95:507-519 (1998)).

Los vasos sanguíneos surgen durante la embriogénesis por dos procesos, vasculogénesis y angiogénesis (Risau, *ut supra*, 1997), y el rol de los factores de crecimiento en ambos procesos está bien establecido. Por ejemplo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, del inglés "Vascular Endothelial Growth Factor"; Ferrara *et al.*, *Nature* 380:439-442 (1996)) y sus receptores (de Vries *et al.*, *Science* 255:989-991 (1992); Fong *et al.*, *Nature* 376:66-70 (1995); Millauer *et al.*, *Cell* 72:835-846 (1993); Shalaby *et al.*, *Cell* 89:981-990 (1997)), y el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF, del inglés "basic Fibroblast Growth Factor"; Basilico y Moscatelli, *Adv. Cancer Res.* 59:115-165 (1992)) promueven el desarrollo inicial de la red vascular embrionaria, y están implicados en la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes durante el desarrollo, curación de heridas y el ciclo reproductivo femenino. El VEGF (Warren *et al.*, *J. Clin. Invest.* 95:1789-1797 (1995); Yoshida *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 17:14015-14023 (1997); Kong *et al.*, *Human Gene Ther.* 9:823-833 (1998)), el bFGF (Stan *et al.*, *J. Neurosurg.* 82:1044-1052 (1995); Chopra *et al.*, *J. Canc. Res. Clin. Oncol.* 123:167-172 (1997); Czubyko *et al.*, *Nature Med.* 3:1137-1140 (1997); Yoshida *et al.*, *ut supra*, 1997), la Interleuquina-8 (IL-8; Arenberg *et al.*, *J. Clin. Invest.* 97:2792-2802 (1996); Luca *et al.*, *Am. J. Pathol.* 151:1105-1113 (1997); Keane *et al.*, *J. Immunol.* 159:1437-43 (1997); Yatsunami *et al.*, *Cancer Lett.* 120:101-108 (1997); Yoshida *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 39:1097-1106 (1998)), y el factor- α de necrosis tumoral (TNF α , del inglés "Tumor Necrosis Factor- α "; Yoshida *et al.*, *ut supra*, 1997) son algunos de los factores de crecimiento que tienen un rol en la angiogénesis que está asociada con varias afecciones patológicas, incluyendo, por ejemplo, crecimiento de tumores sólidos, retinopatía diabética, y artritis reumatoide.

Mientras que los factores de crecimiento estimulan el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos, la adhesión a la matriz extracelular (ECM, del inglés "ExtraCellular Matrix") regula la supervivencia, proliferación y movilidad de las células endoteliales durante el crecimiento de los nuevos vasos sanguíneos (Stromblad y Cheresch, *ut supra*, 1996; Varner, *ut supra*, 1997). Las integrinas específicas o sus ligandos influyen también en el desarrollo vascular y la angiogénesis. Por ejemplo, las integrinas αV participan en la angiogénesis proporcionando señales de supervivencia a las células endoteliales activadas (Arap *et al.*, *Science* 279:377-380 (1997); Brooks *et al.*, *Science* 264: 569-571 (1994a); Carron *et al.*, *Cancer Res.* 58:1930-1955 (1998); Clark *et al.*, *Amer. J. Pathol.* 148:1407-1421 (1997); Drake *et al. Devel. Dyn.* 193:83-91 (1992); Clark *et al. J. Cell Science* 108:2655-2661 (1995); Friedlander *et al.*, *Science* 270:1500-1502 (1995)). Sin embargo, algunos aspectos de la angiogénesis pueden darse también en ausencia de las integrinas αV (Bader *et al.*, *ut supra*, 1998), sugiriendo que otras moléculas, incluyendo la familia de integrinas $\beta 1$, pueden compensar la ausencia de integrinas αV durante el desarrollo (Drake *et al.*, *ut supra*, 1992; Bloch *et al.*, *ut supra*, 1997; Senger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 94:13612-13617 (1997)).

Aunque se han identificado roles activos para las integrinas en la promoción de la angiogénesis, los ligandos afines de la ECM para las integrinas que están implicadas en la angiogénesis *in vivo* no están tan bien descritos. Una proteína de la ECM, la fibronectina, se expresa en matrices vasculares provisionales y proporciona señales proliferativas a las células vasculares durante la curación de heridas, la aterosclerosis, y la hipertensión (Magnusson y Mosher, *Arterioscler, Thromb. Vasc. Biol.* 18:1363-1370 (1998)). La expresión de la fibronectina está regulada por incremento en los vasos sanguíneos en los tejidos de granulación durante la curación de heridas (Clark *et al.*, *J. Invest. Dermatol* 79:269-276 (1982)), y una isoforma de la fibronectina, la variante de corte y empalme EDB, se expresa preferentemente en los vasos sanguíneos en tejidos fetales y tumorales, pero no en vasos sanguíneos adultos normales inactivos (Castellani *et al.*, *Int. J. Cancer* 59:612-618 (1994); Kaczmarek *et al.*, *Int. J. Cancer* 58:11-16 (1994); Neri *et al.*, *Nature Biotech.* 15:1271-1275 (1997)). Estas observaciones sugieren que la fibronectina puede tener un rol en la angiogénesis. Además, los animales que carecen de fibronectina mueren temprano en el desarrollo por una colección de defectos, incluyendo la falta de notocordio y somitas así como una vasculatura incorrectamente formada (George *et al.*, *ut supra*, 1993). Con anterioridad a la presente descripción, sin embargo, no se había establecido un rol funcional directo para la fibronectina en la vasculogénesis o en la angiogénesis.

Hay varias integrinas que se unen a la fibronectina (Hynes, *Cell* 69:11-25 (1992)), y la integrina $\alpha 5\beta 1$ es generalmente selectiva hacia la fibronectina (Pytela, *et al.*, *Cell* 40:191-98 (1985)). Los estudios han demostrado que la pérdida del gen que codifica la subunidad $\alpha 5$ de la integrina es letal para el embrión en ratones y está asociada con una ausencia completa de las somitas posteriores y con algunos defectos vasculares y cardíacos (Yang *et al.*, *ut supra*, 1993; Goh *et al.*, *Development* 124: 4309-4319 (1997)). No estaba claro, sin embargo, si la integrina $\alpha 5\beta 1$ tiene un rol directo en la regulación del desarrollo vascular o de la angiogénesis en particular.

Tal como se describe en la presente memoria, tanto la fibronectina como su receptor, la integrina $\alpha 5\beta 1$, regulan directamente la angiogénesis. Además, la interacción específica de la fibronectina y $\alpha 5\beta 1$ es central para la contribución de estas dos moléculas a la angiogénesis. La integrina $\alpha 5\beta 1$ participa en rutas de la angiogénesis que son las mismas que las de la integrina $\alpha V\beta 3$, pero distintas de las rutas que implican a $\alpha V\beta 5$. Se describe adicionalmente en la presente memoria que los agentes que interfieren con la unión específica de $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina pueden reducir o inhibir la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento y la angiogénesis que se produce en los tumores y, por tanto, pueden ser útiles para tratar varias afecciones patológicas, incluyendo neoplasmas malignos. Por consiguiente, un agente que interfiera con la interacción entre $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina es utilizable conforme a la presente invención.

En la presente memoria se describe la participación del dominio de unión celular central de la fibronectina y su receptor $\alpha 5\beta 1$ en la angiogénesis. La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina se intensificó significativamente en los vasos sanguíneos de tumores humanos y en tejidos estimulados por factores de crecimiento, mientras que

estas moléculas se expresaban mínimamente en vasos normales humanos y en tejidos no estimulados (Ejemplo I). Además, los antagonistas de tipo anticuerpo, que se unen al dominio de unión celular central de la fibronectina y los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$, así como otras dos clases de antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ (péptidos y antagonistas de tipo molécula orgánica pequeña no peptídica) bloquearon la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento en membrana corioalantoica de pollo (CAM; Ejemplo II) y en piel humana crecida en ratones SCID (Ejemplo III). Los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ bloquearon la angiogénesis estimulada por bFGF, TNF α e IL-8, pero tuvieron un efecto mínimo sobre la angiogénesis inducida por VEGF. Cada uno de estos antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inhibió la angiogénesis tumoral y dio como resultado la regresión del tumor en sistemas animales modelo (Ejemplo IV). Los antagonistas de la función de la fibronectina bloquearon también la angiogénesis inducida tanto por bFGF como por VEGF, sugiriendo que hay otros receptores de fibronectina implicados en la angiogénesis mediada por VEGF.

Los resultados descritos en la presente memoria demuestran que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina en la angiogénesis está coordinada. Cuando la expresión de cada molécula es mínima, como en los vasos sanguíneos inactivos, no estimulados, los antagonistas de cada molécula y la adición de fibronectina a membranas corioalantoicas de pollo (CAMs) tuvo poco efecto sobre la angiogénesis. En comparación, tras la estimulación con factores de crecimiento, la expresión de $\alpha 5\beta 1$ y fibronectina se intensifica y los vasos sanguíneos se vuelven sensibles a los agentes que actúan como antagonistas de cualquiera de las dos moléculas, así como a los efectos de la fibronectina añadida de manera exógena. La estimulación por VEGF no aumenta la expresión de $\alpha 5\beta 1$, apoyando la observación de que la angiogénesis por VEGF no responde a los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$. Este resultado se ve corroborado por la publicación de que la expresión *in vitro* de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en células endoteliales estaba regulada por incremento en respuesta a bFGF (Collo y Pepper, *J. Cell Sci.*, 112:569-78 (1999)), y que VEGF no regulaba por incremento la expresión de $\alpha 5\beta 1$ (Senger *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 149:1-7 (1996), Senger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94:13612-17 (1997)). Por tanto, los roles funcionales de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina en la angiogénesis son probablemente una consecuencia directa de su expresión inducida por factores de crecimiento.

Los anticuerpos dirigidos frente al fragmento de unión celular central de la fibronectina, que contiene el sitio de unión a integrina RGD, inhibieron la angiogénesis (Ejemplos II y III). Estos anticuerpos interfieren probablemente con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina, y, en consecuencia, con posibles sucesos de transducción de señales “aguas abajo” (*downstream*) *in vivo*. La estimulación de la angiogénesis por bFGF por parte de la fibronectina y su dominio de unión celular de manera dependiente de $\alpha 5\beta 1$ indica que $\alpha 5\beta 1$ es la integrina receptora para la fibronectina durante la angiogénesis. La ausencia de expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en la angiogénesis estimulada por VEGF explica probablemente por qué la fibronectina no intensifica la angiogénesis por VEGF, a pesar de que los anticuerpos dirigidos frente al péptido de unión celular de la fibronectina bloquearon la angiogénesis inducida por VEGF. Los resultados descritos en la presente memoria son la primera demostración de un rol directo *in vivo* de la fibronectina en la angiogénesis.

Los resultados descritos en la presente memoria son también los primeros en identificar claramente un rol para una proteína de la matriz extracelular en la promoción de la angiogénesis. Aunque se ha sugerido que los colágenos desempeñan roles en el desarrollo vascular, los colágenos intactos no sustentan el brote, la supervivencia o la proliferación de células endoteliales (Ilan *et al.*, *Cell Sci.*, 111:3621-31 (1998); Isik *et al.*, *J. Cell. Phys.*, 175:149-55 (1999)). De hecho, la inhibición de las integrinas receptoras de colágenos $\alpha 2\beta 1$ y $\alpha 1\beta 1$ evitó la formación de grandes vasos sanguíneos y promovió la formación de vasos pequeños (Senger *et al.*, *ut supra*, 1997). Esos resultados sugirieron que $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 1\beta 1$ y su ligando, el colágeno, están implicados en la maduración de los vasos sanguíneos, más que en la promoción de nuevos brotes de vasos sanguíneos.

Un rol funcional de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en la angiogénesis se estableció demostrando que los agentes que actúan como antagonistas de la unión de $\alpha 5\beta 1$ a su ligando bloqueaban la angiogénesis inducida por factores de crecimiento y la angiogénesis en fragmentos tumorales (Ejemplos II, III y IV). Igual que $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ puede servir como receptor de fibronectina (Charo *et al.*, *J. Cell Biol.*, 111:2795-800 (1990)), aunque, como se describe en la presente memoria, las células endoteliales utilizan $\alpha 5\beta 1$ como receptor principal de fibronectina cuando se expresan ambas integrinas.

La expresión de $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$ está regulada por factores de crecimiento similares, y ambas integrinas desempeñan un rol importante en la angiogénesis inducida por bFGF, TNF α , IL-8 y tumores, pero no en la angiogénesis inducida por VEGF (véanse los Ejemplos; véanse, también, Brooks *et al.*, *ut supra*, 1994a; Brooks *et al.*, *Cell* 79:1157-64 (1994b); Friedlander *et al.*, *ut supra*, 1995). Estas dos integrinas influyen probablemente en las mismas rutas de angiogénesis, puesto que las combinaciones de sus antagonistas en modelos animales de angiogénesis no fueron ni aditivas ni sinérgicas (véase el Ejemplo II).

La unión de las integrinas a las proteínas de la matriz extracelular promueve la adhesión, migración, invasión, supervivencia y proliferación celular (Varner, *ut supra*, 1997), y los antagonistas de $\alpha V\beta 3$ inducen la apoptosis de células endoteliales en proliferación *in vitro* e *in vivo* (Brooks *et al.*, *ut supra*, 1994b; Stromblad *et al.*, *ut supra*, 1996). Tal como se describe en la presente memoria, los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inducen también la apoptosis de células endoteliales estimuladas por factores de crecimiento *in vitro* e *in vivo*.

Los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ bloquearon la angiogénesis y el crecimiento del tumor (Ejemplo IV), de forma similar a los antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$ (Brooks *et al.*, *ut supra*, 1994b, 1995). Las líneas de células tumorales que se usaron para los estudios de tumorigenicidad y angiogénesis *in vivo* (Ejemplo IV) eran integrina $\alpha 5\beta 1$ -negativas, para descartar cualquier efecto directo de los antagonistas en las células tumorales, y siguieron siendo $\alpha 5\beta 1$ -negativas en

el transcurso de su cultivo sobre las CAMs. Los tumores HT29 expresan varios factores de crecimiento, incluyendo VEGF, TNF α , TGF α , TGF β , PDGF e IL-8; no se sabe si las células HT29 expresan también bFGF. VEGF se asocia más comúnmente con el núcleo hipóxico del tumor, y está regulado transcripcionalmente por hipoxia, mientras que bFGF y otros factores están asociados con el frente de crecimiento del tumor (Shweiki, *et al.*, *ut supra*, 1992; Kumar *et al.*, *Oncol. Res.* 10:301-311 (1998)). Tal como se observa para las CAMs estimuladas por factores de crecimiento, los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ no tuvieron un impacto sobre los grandes vasos ya existentes en la CAM que subyacen a los tumores trasplantados. Estos resultados demuestran que los agentes que interfieren con la unión específica de $\alpha 5\beta 1$ a sus ligandos, particularmente la fibronectina, pueden reducir o inhibir la angiogénesis. El uso de tales agentes, por tanto, puede proporcionar un beneficio clínico a individuos que padecen varias afecciones patológicas, incluyendo pacientes con cáncer.

Tal como se usa en la presente memoria, el término “integrina” se refiere a los receptores extracelulares que se expresan en una amplia variedad de células y se unen a ligandos específicos en la matriz extracelular. Los ligandos específicos que se unen a las integrinas pueden contener un tripéptido arginina-glicina-ácido aspártico (Arg-Gly-Asp; RGD) o un tripéptido leucina-ácido aspártico-valina, e incluyen, por ejemplo, fibronectina, vitronectina, osteopontina, tenascina, y factor de von Willebrand. Las integrinas comprenden una superfamilia de heterodímeros compuestos por una subunidad α y una subunidad β . Se han identificado numerosas subunidades α , designadas, por ejemplo, αV , $\alpha 5$ y similares, y numerosas subunidades β , designadas, por ejemplo, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 5$ y similares, y en la familia de las integrinas están representadas varias combinaciones de estas subunidades, incluyendo $\alpha 5\beta 1$, $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$. La superfamilia de las integrinas puede subdividirse en familias, por ejemplo, como las integrinas que contienen αV , incluyendo $\alpha V\beta 3$ y $\alpha V\beta 5$, o las integrinas que contienen $\beta 1$, incluyendo $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha V\beta 1$. Las integrinas se expresan en una amplia gama de organismos, incluyendo *C. elegans*, *Drosophila sp.*, anfibios, reptiles, aves, y mamíferos, incluyendo los humanos.

Tal como se describe en la presente memoria, los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ de tipo anticuerpo, péptido y molécula orgánica pequeña no peptídica pueden interferir con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con sus ligandos, particularmente la fibronectina, en el tejido vascular, y pueden reducir o inhibir la angiogénesis (véanse los Ejemplos II, III y IV). Tales moléculas que interfieren con la unión específica de $\alpha 5\beta 1$ con sus ligandos se denominan en la presente memoria en general “agentes”, “agentes antagonistas” o “antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ ”. Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “unión específica” o “se une específicamente”, cuando se usa en referencia a la interacción de dos o más moléculas, significa que las moléculas pueden asociarse entre ellas en condiciones *in vivo* e *in vitro* cuando se incuban en las condiciones apropiadas, que pueden mimetizar las condiciones *in vivo*. Las expresiones “interactúa específicamente” y “asociación específica” se usan también para referirse a moléculas que se unen específicamente.

A los efectos de la presente invención, las moléculas que interactúan específicamente entre ellas son generalmente una molécula tipo receptor y su ligando, incluyendo, por ejemplo, una integrina y su ligando o ligandos particulares, o un anticuerpo y su antígeno o antígenos particulares. Se admite, sin embargo, que otras moléculas, por ejemplo, una subunidad α de integrina y una subunidad β de integrina interactúan también específicamente para formar un heterodímero de integrina, como pueden hacer un antagonista de $\alpha 5\beta 1$ y una integrina $\alpha 5\beta 1$. En la presente memoria se describen métodos para determinar si dos moléculas interactúan específicamente, y los métodos para determinar la afinidad y especificidad de la unión son bien conocidos en la técnica (véanse, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988); Friefelder, “Physical Biochemistry: Applications to biochemistry and molecular biology” (W.H. Freeman y Co. 1976)).

Están ejemplificados los anticuerpos, péptidos y antagonistas de tipo molécula orgánica pequeña no peptídica que interfieren con la unión específica de $\alpha 5\beta 1$ con la fibronectina (véase el Ejemplo II). Tal como se usa en la presente memoria, el término “interferir”, cuando se usa en referencia a la acción de un agente antagonista sobre la interacción específica de un receptor y su ligando, significa que la afinidad de la interacción disminuye por debajo del nivel de unión que se produce en ausencia del agente. El experto en la técnica admitirá que la asociación de un receptor y su ligando es una relación dinámica que se produce entre una población de tales moléculas de tal forma que, en cualquier momento en particular, una cierta proporción de receptores y ligandos estará en asociación. Un agente que interfiere con la interacción específica de un receptor y su ligando, por tanto, reduce el número relativo de tales interacciones que se están produciendo en un momento dado y, en algunos casos, puede inhibir completamente todas esas asociaciones.

El término “antagonista” se usa en la presente memoria para significar un agente, que puede ser un anticuerpo, un péptido o una molécula orgánica pequeña no peptídica, que puede interferir con la interacción específica de un receptor y su ligando. Un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$, que puede interferir con la unión de $\alpha 5\beta 1$ con la fibronectina, reduciendo o inhibiendo de ese modo la asociación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con la fibronectina, es un ejemplo de un antagonista de $\alpha 5\beta 1$. Un antagonista puede actuar como un inhibidor competitivo o un inhibidor no competitivo de la unión de $\alpha 5\beta 1$ a su ligando.

Puede ser difícil distinguir si un antagonista inhibe completamente la asociación de un receptor con su ligando o reduce la asociación por debajo del límite de detección de un ensayo particular. Por tanto, el término “interferir” se usa ampliamente en la presente memoria para abarcar la reducción o la inhibición de la unión específica de un receptor y su ligando. Además, un agente puede interferir con la unión específica de un receptor y su ligando por varios mecanismos, incluyendo, por ejemplo, uniéndose al sitio de unión del ligando, interfiriendo de ese modo con la unión del ligando; uniéndose a un sitio distinto del sitio de unión del ligando del receptor, pero interfiriendo estéricamente con la unión del ligando al receptor; uniéndose al receptor y causando un cambio conformacional o de otro tipo en el receptor, que

interfiere con la unión del ligando; o por otros mecanismos. Análogamente, el agente puede unirse o interactuar de otra manera con el ligando para interferir con su interacción específica con el receptor. A los efectos de los métodos descritos en la presente memoria para interferir con la interacción específica de una integrina $\alpha 5\beta 1$ y su ligando, no se requiere la comprensión del mecanismo por el que se produce la interferencia y no se propone ningún mecanismo de acción.

Un agente que actúa como antagonista para la unión de una integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando puede ser un anticuerpo, particularmente un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ o un anticuerpo anti-fibronectina. Tal como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se usa en su sentido más amplio para incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de unión a antígeno de tales anticuerpos. Con respecto a un anticuerpo anti-integrina, particularmente un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, el término “antígeno” significa una integrina, particularmente una proteína, polipéptido o porción peptídica del mismo, de tipo integrina $\alpha 5\beta 1$, que puede incluir o no algunos o todos los dominios de unión RGD. Un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, o fragmento de unión a antígeno del mismo, se caracteriza por tener una actividad de unión específica para una integrina $\alpha 5\beta 1$ de al menos aproximadamente $1 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, generalmente al menos aproximadamente $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, y particularmente al menos aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$. Los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fd o Fv de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, que retienen la actividad de unión específica para la integrina $\alpha 5\beta 1$ se incluyen en la definición de anticuerpo.

El término “anticuerpo” tal como se usa en la presente memoria abarca anticuerpos existentes en la naturaleza así como anticuerpos no existentes en la naturaleza, incluyendo, por ejemplo, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos quiméricos, bifuncionales y humanizados, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos. Tales anticuerpos no existentes en la naturaleza pueden construirse usando síntesis peptídica en fase sólida, pueden producirse de forma recombinante o pueden obtenerse, por ejemplo, mediante búsqueda y selección de colecciones combinatorias consistentes en cadenas pesadas variables y cadenas ligeras variables como se describe en Huse *et al.*, *Science* 246:1275-1281 (1989), que se incorpora a la presente memoria por referencia. Estos y otros métodos para preparar, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, humanizados, injertados con CDR, de cadena sencilla, y bifuncionales son bien conocidos por los expertos en la técnica (Winter y Harris, *Immunol. Today* 14:243-246 (1993); Ward *et al.*, *Nature* 341:544-546 (1989); Harlow y Lane, *ut supra*, 1988; Hilyard *et al.*, *Protein Engineering: A practical approach* (IRL Press 1992); Borrabeck, *Antibody Engineering*, 2^a ed. (Oxford University Press 1995)).

Los anticuerpos anti-integrina, incluyendo los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$, pueden adquirirse de una fuente comercial, por ejemplo, Chemicon, Inc. (Temecula CA), o pueden conseguirse usando como inmunógeno una integrina completa sustancialmente pura, que puede ser una integrina humana, integrina de ratón o integrina de otro mamífero o no mamífero que se prepara a partir de fuentes naturales o se produce de forma recombinante, o una porción peptídica de una integrina, que puede incluir una porción del dominio de unión RGD, por ejemplo, un péptido sintético. Una porción peptídica no inmunogénica de una integrina tal como una $\alpha 5\beta 1$ humana puede hacerse inmunogénica acoplado el hapteno a una molécula portadora tal como la albúmina de suero bovino (BSA, del inglés “bovine serum albumin”) o la hemocianina de lapa californiana (KLH, del inglés “keyhole limpet hemocyanin”), o expresando la porción peptídica como una proteína de fusión. Otras moléculas portadoras diversas y los métodos para acoplar un hapteno a una molécula portadora son bien conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane (*ut supra*, 1988).

Los anticuerpos particularmente útiles para realizar un método de la invención son aquellos que se unen específicamente a una integrina $\alpha 5\beta 1$. Tales anticuerpos son particularmente útiles cuando se unen a $\alpha 5\beta 1$ con una afinidad al menos un orden de magnitud mayor que con la que se unen a otra integrina, por ejemplo, $\alpha V\beta 3$ o $\alpha V\beta 5$. Un anticuerpo anti-fibronectina puede ser también útil en un método de la invención, particularmente un anticuerpo anti-fibronectina que interfiera con la unión de la fibronectina a la integrina $\alpha 5\beta 1$, pero no a $\alpha V\beta 3$ u otras integrinas.

Tal como se describe en la presente memoria, se usó un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ para detectar regiones de angiogénesis estimulada por factores de crecimiento, como se produce en una afección patológica (véase el Ejemplo I). La presencia o la cantidad de expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ puede identificarse, por ejemplo, en una muestra de tejido, que puede ser una sección histológica obtenida de un tejido u órgano de un individuo bajo sospecha de tener una patología caracterizada, al menos en parte, por angiogénesis no deseada. La identificación de la presencia o nivel de expresión de una integrina $\alpha 5\beta 1$ en la muestra puede realizarse usando métodos de inmunoensayo o inmunohistoquímicos bien conocidos (Harlow y Lane, *ut supra*, 1988). Un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, particularmente un anticuerpo que prevenga la unión del ligando a la integrina $\alpha 5\beta 1$, puede usarse también en un ensayo de búsqueda y selección para identificar agentes que compitan con la unión del ligando a la integrina. Tal como se describe en la presente memoria, tales agentes pueden ser útiles para inhibir la angiogénesis mediada por $\alpha 5\beta 1$.

Los péptidos que se unen específicamente a $\alpha 5\beta 1$ son también útiles como antagonistas de la unión de $\alpha 5\beta 1$ a sus ligandos, incluyendo la fibronectina. Tal como se ha discutido para los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$, un péptido que se une específicamente a $\alpha 5\beta 1$ puede ser útil en un método de la invención cuando el anticuerpo se une a $\alpha 5\beta 1$ con una especificidad al menos aproximadamente dos veces mayor que con la que se une a otra integrina, por ejemplo, $\alpha V\beta 3$; es más útil si tiene una especificidad al menos aproximadamente cinco veces mayor hacia $\alpha 5\beta 1$, y es particularmente útil si tiene al menos aproximadamente una especificidad un orden de magnitud mayor para $\alpha 5\beta 1$ que para una integrina tal como $\alpha V\beta 3$. Como tales, los diversos péptidos que contienen RGD y RLD que se han identificado basándose en su afinidad de unión relativamente alta hacia $\alpha V\beta 3$ o hacia $\alpha V\beta 5$ (WO 95/14714) no se consideran antagonistas peptídicos de la unión de $\alpha 5\beta 1$ a su ligando, tal como se definen en la presente memoria.

El término “péptido” se usa ampliamente en la presente memoria para incluir oligómeros y polímeros de aminoácidos o análogos de aminoácido que están unidos por un enlace peptídico o un análogo de un enlace peptídico. Como tal, el término “péptido” incluye las moléculas comúnmente denominadas péptidos, que contienen generalmente aproximadamente dos a aproximadamente cincuenta aminoácidos, polipéptidos, que contienen generalmente aproximadamente veinte a cincuenta aminoácidos o más, y proteínas, que pueden incluir péptidos o polipéptidos que, por ejemplo, son modificados post-traduccionalmente. Por tanto, los antagonistas peptídicos contienen dos o más aminoácidos, que pueden ser L-aminoácidos o D-aminoácidos, aminoácidos modificados químicamente, que pueden ser aminoácidos existentes en la naturaleza o no existentes en la naturaleza, o análogos de aminoácido. Los péptidos útiles como antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ que reducen o inhiben la angiogénesis pueden identificarse mediante búsqueda y selección de colecciones de péptidos, que pueden prepararse usando métodos bien conocidos de síntesis química (véase, por ejemplo, Koivunen *et al.*, *ut supra* 1993, 1994), o pueden adquirirse de fuentes comerciales.

Un agente que interfiere con la unión de $\alpha 5\beta 1$ a su ligando puede ser también una molécula orgánica pequeña, no peptídica, incluyendo un peptidomimético, que es una molécula orgánica que mimetiza la estructura de un péptido; o un peptoide tal como un peptoide vinílogo. Una molécula orgánica pequeña no peptídica que actúa como antagonista para la interacción específica de la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un ligando, fibronectina, puede ser, por ejemplo, un heterociclo que tenga la estructura general ácido (S)-2-fenilsulfonilamino-3-{{8-(2-piridinilaminometil)}-1-oxa-2-azaspiro-{4,5}-dec-2-enil}carbonilamino}propiónico, como se ejemplifica en la presente memoria por la molécula designada SJ749, que tiene la estructura: ácido (S)-2-{{(2,4,6-trimetilfenil)sulfonil}amino-3-{{7-benciloxicarbonil-8-(2-piridinilaminometil)-1-oxa-2,7-diazaspiro-{4,4}-non-2-en-3-il}carbonilamino}propiónico (véanse los Ejemplos II y IV; Patente de los EE.UU. N° 5.760.029). Tal como se describe en la presente memoria, SJ749 interfirió con la unión de $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina y redujo o inhibió la angiogénesis de manera dependiente de dosis (véase la Figura 2). Pueden identificarse antagonistas adicionales de $\alpha 5\beta 1$ de tipo molécula orgánica pequeña no peptídica útiles en un método de la invención mediante búsqueda y selección, por ejemplo, de derivados de un heterociclo modificados químicamente que tengan la estructura descrita anteriormente, incluyendo derivados de SJ749 modificados químicamente, u otras colecciones de moléculas orgánicas pequeñas no peptídicas (véase más abajo).

Se describen métodos para reducir o inhibir la angiogénesis en un tejido, poniendo en contacto la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el tejido con un agente que interfiere con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un ligando expresado en el tejido, reduciendo o inhibiendo de ese modo la angiogénesis en el tejido. Un agente antagonista particularmente útil interfiere con la unión de $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina, pero no interfiere sustancialmente con la unión específica del ligando a una integrina distinta de la integrina $\alpha 5\beta 1$. Son también de utilidad los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ que no interfieren sustancialmente con la unión específica de una integrina distinta de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando, por ejemplo, la unión de la integrina $\alpha V\beta 3$ a la vitronectina. Tal como se describe en la presente memoria, un agente tal como un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$, un péptido o una molécula orgánica pequeña no peptídica que interfiere con la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando puede reducir o inhibir la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento y la angiogénesis que se produce durante el crecimiento tumoral (véanse los Ejemplos II, III y IV).

Tal como se usa en la presente memoria, la frase “reduce o inhibe”, cuando se usa en referencia a la angiogénesis, significa que la cantidad de formación de nuevos vasos sanguíneos que se produce en presencia de un agente antagonista disminuye por debajo de la cantidad de formación de vasos sanguíneos que se produce en ausencia de un agente antagonista añadido de forma exógena. Los términos “reduce” e “inhibe” se usan juntos porque se admite que la cantidad de angiogénesis puede disminuirse por debajo de un nivel detectable por un método de ensayo particular y, por tanto, puede que no sea posible determinar si la angiogénesis se reduce hasta un nivel muy bajo o se inhibe completamente. No obstante, quedará claro a partir del ensayo particular que se use que, en respuesta a un agente que interfiere con la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando, la angiogénesis en un tejido disminuye por debajo del nivel de angiogénesis en el tejido correspondiente sin tratar. Los métodos para determinar una cantidad de formación de vasos sanguíneos en un tejido, incluyendo los métodos inmunohistoquímicos descritos en la presente memoria (Ejemplo I), son bien conocidos en la técnica.

Un método descrito en la presente memoria es útil, por ejemplo, para reducir o inhibir la angiogénesis en tejido ocular tal como la retina, la mácula o la córnea; en la piel tal como sucede con la psoriasis; en el tejido sinovial; en el hueso; o en el tejido intestinal, interfiriendo con la unión de $\alpha 5\beta 1$ a un ligando tal como la fibronectina en el tejido. Además, un método descrito en la presente memoria es útil para reducir o inhibir la angiogénesis en un neoplasma, que puede ser benigno o maligno, y cuando es maligno, puede ser un neoplasma metastásico. Un agente útil en la puesta en práctica de un método puede ser un péptido, por ejemplo, un péptido que contiene la secuencia de aminoácidos CRRETAWAC (SEC ID N° 1); un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a la integrina $\alpha 5\beta 1$ del mismo; o una molécula orgánica pequeña, no peptídica, por ejemplo, el ácido (S)-2-{{(2,4,6-trimetilfenil)sulfonil}amino-3-{{7-benciloxicarbonil-8-(2-piridinilaminometil)-1-oxi-2,7-diazaspiro-{4,4}-non-2-en-3-il}carbonilamino}propiónico (SJ749). Si se desea, el agente puede enlazarse a una citotoxina tal como la ricina o un fármaco quimioterapéutico para el cáncer, siempre que la unión de la citotoxina no reduzca sustancialmente la capacidad del agente para unirse específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ e interferir con la unión de $\alpha 5\beta 1$ a su ligando.

La invención proporciona también métodos para identificar la presencia de angiogénesis en un tejido, poniendo en contacto una muestra del tejido con un agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, y detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido, identificando así la presencia de angiogénesis en el tejido. El agente puede ser un péptido, un anticuerpo, o una molécula orgánica pequeña, no

peptídica, y puede enlazarse a un marcador detectable, que puede detectarse directamente, o cuya presencia puede detectarse debido a su interacción con un reactivo en particular. Un método así es útil para identificar la presencia de angiogénesis en varios tejidos, incluyendo, por ejemplo, tejidos normales tales como el tejido embrionario o el tejido placentario, tejido de granulación, y un tejido implicado en una afección patológica. Como tal, la invención proporciona además métodos para diagnosticar una afección patológica caracterizada por angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en un tejido en un individuo.

El término “afección patológica” se usa ampliamente en la presente memoria para significar cualquier afección física o fisiológica anómala caracterizada, al menos en parte, por angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en vasos sanguíneos recién formados en un tejido. Tales afecciones patológicas están ejemplificadas por neoplasmas (véase el Ejemplo I), enfermedades oculares tales como la retinopatía diabética y la degeneración macular asociada con neovascularización, enfermedades de la piel tales como la psoriasis y hemangiomas, gingivitis, afecciones artríticas tales como la artritis reumatoide y la osteoartritis, y enfermedades inflamatorias del intestino. Otras afecciones patológicas que pueden responder a un método diagnóstico o de otro tipo de la invención pueden identificarse usando métodos tales como los descritos en el Ejemplo I o conocidos de otro modo en la técnica.

El término “neoplasma” se usa ampliamente en la presente memoria para significar cualquier crecimiento tisular nuevo, patológico. A los efectos de la presente invención, un neoplasma generalmente da como resultado la formación de un tumor, que se caracteriza, en parte, por angiogénesis. Un neoplasma puede ser benigno, por ejemplo, un hemangioma, glioma, teratoma, y similares, o puede ser maligno, por ejemplo, un carcinoma, sarcoma, glioblastoma, astrocitoma, neuroblastoma, retinoblastoma, y similares. El término “tumor” se usa generalmente para referirse a un neoplasma benigno o maligno, y el término “cáncer” se usa generalmente para referirse a un neoplasma maligno, que puede ser o no metastásico. Los neoplasmas malignos que pueden diagnosticarse usando un método de la invención incluyen, por ejemplo, carcinomas tales como el cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer cervical, cáncer de páncreas, cáncer de colon y cáncer de ovario; y sarcomas tales como el osteosarcoma y el sarcoma de Kaposi, siempre que el neoplasma se caracterice, al menos en parte, por angiogénesis asociada con la expresión de $\alpha 5\beta 1$ por los vasos sanguíneos recién formados (véanse los Ejemplos I y III).

Un método de diagnóstico puede realizarse, por ejemplo, obteniendo una muestra del tejido del individuo, en la que, en un individuo que tiene una afección patológica, el tejido presenta angiogénesis; poniendo en contacto la muestra con un agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$; y detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido. Un individuo a diagnosticar o tratar usando un método de la invención puede ser cualquier individuo que presente angiogénesis asociada con la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y, por tanto, puede ser, por ejemplo, un vertebrado tal como un mamífero, incluyendo un humano, perro, gato, caballo, vaca, o cabra; un ave; o cualquier otro animal, particularmente un animal comercialmente importante o un animal doméstico.

Un método para diagnosticar una afección patológica caracterizada por angiogénesis en un tejido en un individuo puede realizarse también administrando un agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un individuo bajo sospecha de tener la afección patológica; y detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido. El agente puede marcarse de forma detectable, por ejemplo, enlazando el agente a un resto, que se selecciona basándose en, por ejemplo, si la unión específica del agente va a detectarse *in vivo* o si se va a retirar un tejido al que se sospecha se une el agente, por ejemplo, por biopsia, y a examinarse *ex vivo*.

Un resto útil para marcar un agente antagonista puede ser un radionucleido, un material paramagnético, un material atenuante de rayos X, una molécula fluorescente, quimioluminiscente o luminiscente, una molécula tal como la biotina, o una molécula que pueda visualizarse tras su reacción con un reactivo en particular, por ejemplo, un sustrato para una enzima o un epítipo para un anticuerpo. El resto puede enlazarse a un agente usando métodos bien conocidos, que se seleccionan, en parte, basándose en la naturaleza química del agente y el resto. Por ejemplo, cuando el resto es una secuencia de aminoácidos tal como una secuencia de hexahistidina (His6), y el agente es un péptido, la secuencia His6 puede sintetizarse como parte del péptido, y el agente marcado con His6 puede identificarse por la unión de un reactivo basado en iones níquel al resto His6. Pueden utilizarse también métodos para enlazar químicamente un resto a un agente (véase, por ejemplo, Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, (Academic Press 1996), que se incorpora a la presente memoria por referencia).

Un agente unido específicamente puede detectarse en un individuo usando un método de adquisición de imágenes *in vivo* tal como la adquisición de imágenes de un radionucleido, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computerizada, o un método de adquisición de imágenes de resonancia magnética, o puede detectarse usando un método *ex vivo*, en el que, tras la administración, se obtiene una muestra del tejido del individuo, y se detecta la unión específica del agente en la muestra. Un agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ en una muestra puede detectarse directamente, por ejemplo, detectando el agente o detectando la presencia de un resto, tal como mediante la detección de la radiactividad emitida por un resto de radionucleido. El agente unido específicamente puede detectarse también indirectamente poniéndolo además en contacto con un reactivo que interactúe específicamente con el agente, o con un resto enlazado al agente, y detectando la interacción del reactivo con el agente o marcador. Por ejemplo, el resto puede detectarse poniéndolo en contacto con un anticuerpo que se una específicamente al resto, particularmente cuando el resto está enlazado al agente. El resto puede ser también, por ejemplo, un sustrato, que se pone en contacto con un enzima que interactúa con él y cambia el resto de tal forma que su presencia puede ser detectada. Tales sistemas de detección indirectos, que incluyen el uso de enzimas tales como la fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, beta-

galactosidasa y similares, son bien conocidos en la técnica y están comercialmente disponibles, como lo están los métodos para incorporar o enlazar el resto en particular a un tipo particular de agente.

5 Se describen también métodos para reducir o inhibir la angiogénesis en un tejido en un individuo, administrando al individuo un agente que interfiere con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un ligando expresado en el tejido, reduciendo o inhibiendo así la angiogénesis en el tejido en el individuo. Como tales, se describen métodos para reducir la gravedad de una afección patológica asociada con angiogénesis en un individuo, administrando al individuo un agente que interfiere con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a un ligando en un tejido asociado con la afección patológica, reduciendo o inhibiendo así la angiogénesis en el tejido, y, en consecuencia, reduciendo la gravedad de la afección patológica.

15 Tal como se usa en la presente memoria, la expresión “reduciendo la gravedad de una afección patológica” significa que se mejoran los signos o síntomas clínicos adversos asociados con la afección patológica. Una reducción en la gravedad de una afección patológica puede detectarse por varios métodos, incluyendo ensayos clínicos rutinarios tales como análisis de sangre, que pueden usarse para determinar niveles relevantes de enzimas o antígenos o anticuerpos en circulación; análisis por adquisición de imágenes, que pueden usarse para detectar un descenso en la tasa de crecimiento o tamaño de un neoplasma, o un procedimiento oftálmico, que puede usarse para identificar una reducción en el número de vasos sanguíneos en la retina de un paciente diabético. Tales ensayos clínicos se seleccionan basándose en la afección patológica particular que se esté tratando. Una reducción en la gravedad de una afección patológica puede detectarse también basándose en comentarios hechos por el paciente que se está tratando, por ejemplo, que un paciente aquejado de artritis sienta menos dolor o tenga una mayor movilidad de las articulaciones, que un paciente con retinopatía diabética o con degeneración macular debida a neovascularización pueda ver más claramente, o similares.

25 Cuando se va a administrar a un individuo vivo un agente que interfiere con la unión específica de una integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando, por ejemplo, para un procedimiento diagnóstico o terapéutico, el agente estará generalmente en forma de composiciones farmacéuticas que comprendan el agente o agentes y un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen soluciones acuosas tales como solución salina tamponada fisiológicamente u otros tampones o disolventes o vehículos tales como glicoles, glicerol, aceites tales como aceite de oliva, o ésteres orgánicos inyectables. La selección de un portador farmacéuticamente aceptable dependerá, en parte, de la naturaleza química del agente, por ejemplo, si el agente es un anticuerpo, un péptido, o una molécula orgánica pequeña, no peptídica.

35 Un portador farmacéuticamente aceptable puede incluir compuestos fisiológicamente aceptables que actúan, por ejemplo, para estabilizar el agente o aumentar su absorción, u otros excipientes según se desee. Los compuestos farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, tales como ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular u otros estabilizantes o excipientes. El experto en la técnica sabrá que la elección de un portador farmacéuticamente aceptable, incluyendo un compuesto farmacéuticamente aceptable, depende, por ejemplo, de la vía de administración del agente y de las características físico-químicas particulares del agente.

40 La angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ puede producirse localmente, por ejemplo, en la retina de un individuo aquejado de retinopatía diabética, o puede producirse de forma más sistémica, por ejemplo, en un individuo aquejado de artritis reumatoide o un neoplasma maligno metastásico. Puesto que las regiones de tal angiogénesis pueden estar localizadas o pueden dispersarse de forma más sistémica, el experto en la técnica seleccionará una vía y método particular de administración de un agente que interfiera con la unión específica de una integrina $\alpha 5\beta 1$ con su ligando, por ejemplo, fibronectina, basándose, en parte, en este factor. Por ejemplo, en un individuo aquejado de retinopatía diabética, donde la angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ está localizada en la retina, el agente puede formularse en una composición farmacéutica conveniente para usar como gotas para los ojos, que puedan administrarse directamente en el ojo. En comparación, en un individuo aquejado de un carcinoma metastásico, el agente puede formularse en una composición farmacéutica que se pueda administrar por vía intravenosa, oral o por cualquier otro método que distribuya el agente de forma sistémica. Por tanto, un agente antagonista puede administrarse por varias vías, por ejemplo, por vía intravenosa, oral, o directamente en la región a tratar, por ejemplo, directamente en un tumor neoplásico; mediante gotas para los ojos, cuando la afección patológica implique al ojo; o por vía intrasnovial, cuando la afección implique a una articulación.

55 La cantidad de un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que se administra a un individuo dependerá, en parte, de si el agente se administra a efectos diagnósticos o a efectos terapéuticos. Los métodos para determinar una cantidad eficaz de un agente a administrar para un procedimiento diagnóstico o terapéutico son bien conocidos en la técnica e incluyen las pruebas clínicas de fase I, fase II y fase III. Un agente se administra en una cantidad eficaz, que es la cantidad suficiente para interferir con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando específico en un individuo. Generalmente, un agente antagonista se administra en una dosis de aproximadamente 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal.

65 Tal como se describe en la presente memoria, la administración sistémica de 5 μg de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1/2$ ml de volumen sanguíneo de embrión de pollo, inhibió el 50% de la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento (Ejemplo II). Análogamente, la administración de 120 picomoles de CRRETAWAC (SEC ID N° 1)/2 ml de volumen sanguíneo, y la administración de 15 picomoles de SJ749/2 ml de volumen sanguíneo inhibió la angiogénesis en un 50%. Basándose en estos resultados, el experto en la técnica puede estimar las cantidades de tales agentes requeridas para inhibir eficazmente la angiogénesis en un tejido en un individuo tal como un humano, y pueden usarse pruebas

clínicas rutinarias para determinar las dosificaciones óptimas. Asumiendo, por ejemplo, que un humano tiene un volumen sanguíneo de aproximadamente seis litros, el experto sabrá que puede usarse un intervalo de cantidades inferior o cercano a aproximadamente 15 miligramos de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ en una prueba clínica para determinar una cantidad del agente para ser administrada a un humano. Las estimaciones de una cantidad para ser administrada pueden ajustarse en consecuencia, por ejemplo, cuando el agente se va a administrar localmente.

La cantidad total de un agente antagonista puede administrarse a un sujeto como una dosis única, bien como una toma o por infiltración durante un periodo de tiempo relativamente corto, o puede administrarse usando un protocolo de tratamiento fraccionado, en el que las múltiples dosis se administran durante un periodo de tiempo más prolongado. El experto en la técnica sabrá que la concentración de un agente en particular requerida para proporcionar una cantidad eficaz a una región o regiones de angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en un individuo depende de varios muchos incluyendo la edad y salud general del sujeto así como la vía de administración, el número de tratamientos a administrar, y la naturaleza del agente, incluyendo si el agente es un anticuerpo, un péptido, o una molécula orgánica pequeña no peptídica. A la vista de estos factores, el experto en la técnica ajustará la dosis particular para obtener una cantidad eficaz para interferir eficazmente con la unión específica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con su ligando, permitiendo así la detección del agente en una región de angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ a efectos diagnósticos, o para reducir o inhibir tal angiogénesis a efectos terapéuticos.

Un agente útil para detectar o reducir o inhibir la angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$, o una composición farmacéutica del mismo que contenga el agente, puede usarse para tratar cualquier afección patológica que se caracterice, al menos en parte, por tal angiogénesis. El experto en la técnica sabrá que el agente puede administrarse por varias vías incluyendo, por ejemplo, por vía oral, o parenteral, incluyendo por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea, intraorbital, intracapsular, intrasinoval, intraperitoneal, intracisternal o por absorción pasiva o facilitada a través de la piel usando, por ejemplo, un parche para la piel o iontoforesis transdérmica. Además, el agente puede administrarse mediante inyección, entubación, por un supositorio, por vía oral o tópica, pudiendo esta última ser pasiva, por ejemplo, por aplicación directa de una pomada o polvo que contenga el agente, o activa, por ejemplo, usando un *spray* o inhalador nasal. El agente puede administrarse también como un *spray* tópico, si se desea, en cuyo caso un componente de la composición es un propulsor apropiado. La composición farmacéutica puede incorporarse también, si se desea, a liposomas, microsferas u otras matrices poliméricas (Gregoriadis, *Liposome Technology*, Vol. 1 (CRC Press, Boca Raton, FL 1984), que se incorpora a la presente memoria por referencia). Los liposomas, por ejemplo, que consisten en fosfolípidos u otros lípidos, son portadores no tóxicos, fisiológicamente aceptables y metabolizables que son relativamente simples de preparar y administrar.

Tal como se describe en la presente memoria, los agentes que interfieren con la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando pueden reducir o inhibir la angiogénesis asociada con la expresión de $\alpha 5\beta 1$. Además de los agentes antagonistas ejemplificados, pueden identificarse otros de tales agentes detectando agentes que interfieren con la unión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ a su ligando. Por tanto, la invención proporciona ensayos de búsqueda y selección, que son útiles para identificar un agente que reduce o inhibe la angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en un tejido.

Un ensayo de búsqueda y selección de la invención puede realizarse poniendo en contacto un tejido que presenta angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ con un agente, y detectando una reducción o inhibición de la angiogénesis en el tejido, identificando así un agente que reduce o inhibe la angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$ en un tejido. Un tejido puede ponerse en contacto con el agente *in vivo* o *ex vivo* (véase, por ejemplo, la Patente de los EE.UU. N° 5.622.699). Cuando se realiza un método de búsqueda y selección de la invención usando un formato *in vitro*, éste puede adaptarse a un procedimiento automatizado, permitiendo por tanto ensayos de búsqueda y selección de alto rendimiento para examinar colecciones de moléculas para identificar antagonistas potenciales de $\alpha 5\beta 1$, que puedan reducir o inhibir la angiogénesis asociada con la expresión de $\alpha 5\beta 1$. El tejido puede ser cualquier tejido que sufra angiogénesis asociada con la expresión de integrina $\alpha 5\beta 1$, por ejemplo, tejido neoplásico maligno.

Los métodos para preparar colecciones de moléculas, que pueden someterse a búsqueda y selección usando un método de la invención para identificar antagonistas de $\alpha 5\beta 1$, que reducen o inhiben la angiogénesis asociada con la expresión de $\alpha 5\beta 1$, incluyen, por ejemplo, colecciones de oligonucleótidos (Gold *et al.*, Patente de los EE.UU. N° 5.270.163); colecciones de péptidos (Koivunen *et al.*, *ut supra*, 1993, 1994); colecciones de peptidomiméticos (Blondelle *et al.*, *Trends Anal. Chem.*, 14:83-92 (1995)); colecciones de oligosacáridos (York *et al.*, *Carb. Res.*, 285:99-128, (1996); Liang *et al.*, *Science*, 274:1520-1522, (1996); y Ding *et al.*, *Adv. Expt. Med. Biol.*, 376:261-269, (1995)); colecciones de lipoproteínas (de Kruijff *et al.*, *FEBS Lett.*, 399:232-236, (1996)); colecciones de glicoproteínas o glicolípidos (Karaoglu *et al.*, *J. Cell Biol.*, 130:567-577 (1995)); o colecciones de compuestos químicos que contienen, por ejemplo, fármacos u otros agentes farmacéuticos (Gordon *et al.*, *J. Med. Chem.*, 37:1385-1401 (1994); Ecker y Crook, *Bio/Technology*, 13:351-360 (1995)), incluyendo, por ejemplo, heterociclos que tienen la estructura general del ácido (S)-2-fenilsulfonilamino-3-{{8-(2-piridinilaminometil)}-1-oxa-2-azaspiro-{{4,5}-dec-2-enil}carbonilamino}propiónico (Patente de los EE.UU. N° 5.760.029). Pueden obtenerse también colecciones de diversas moléculas de fuentes comerciales.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar pero no limitar la presente invención.

ES 2 322 723 T3

Ejemplo I

La integrina $\alpha 5\beta 1$ se expresa durante la angiogénesis

5 Este Ejemplo proporciona evidencia inmunohistoquímica de que $\alpha 5\beta 1$ se expresa en asociación con los vasos sanguíneos recién formados en varios tumores humanos y de ratón.

Se fijaron durante 1 hora en acetona secciones congeladas de 5 μm de mama y colon normales humanos, carcinoma de colon, carcinoma de mama, xenotransplantes de tumor humano en ratones CB17-SCID hembra de seis
10 semanas (Charles River; Wilmington MA), y tumores de mama de ratones Mtag, se secaron al aire y se rehidrataron durante 5 min en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las secciones se bloquearon durante 2 h en suero de cabra normal al 8% en PBS y se incubaron con: 1) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo policlonal anti-cola citoplasmática de $\alpha 5\beta 1$ (AB1928P; Pharmingen, Inc.; San Diego CA) y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal murino anti-CD31 humano (PECAM; MA-3100; Endogen); 2) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 5\beta 1$ y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo de conejo
15 anti-factor de von Willebrand (016P; Biogenex; San Ramon CA); ó 3) 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo monoclonal anti-péptido de unión celular de fibronectina (784A2A6; Chemicon, Inc.; Temecula CA) y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-factor de von Willebrand (016P) en albúmina de suero bovino (BSA) al 2% en PBS durante 2 h a temperatura ambiente (RT).

20 Las secciones se lavaron mojándolas seis veces en PBS de nueva aportación y se incubaron en diluciones 1:400-1:600 de anti-FICT de conejo obtenido en cabra y 1:400-1:600 de anti-rodamina de ratón obtenido en cabra durante 1 h a RT (anticuerpos secundarios absorbidos transversalmente; Biosource International; Camarillo CA). Los cortes se lavaron, y los cubreobjetos se pusieron sobre una gota de Fluoromount-G (Southern Biotechnology Associates; Birmingham AL) antes del análisis de imágenes digitales con iluminación fluorescente usando una cámara CCD
25 superenfriada.

El análisis de las secciones congeladas de carcinoma de colon y carcinoma de mama humanos para detectar la expresión del marcador de células endoteliales CD31 (PECAM) y la integrina $\alpha 5\beta 1$ por inmunohistoquímica en dos
30 colores indicó que los vasos tumorales que daban positivo para CD31 (teñidos en rojo) daban también positivo para la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (teñidos en verde); los vasos que daban positivo para ambas moléculas aparecían amarillos por fotomicrografía. Los grandes vasos con lúmenes, así como los vasos pequeños y grandes sin lúmenes evidentes se tiñeron positivamente respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$ y CD31. Las secciones de carcinoma de ovario y pancreático mostraron patrones similares de expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en los vasos sanguíneos. En comparación, los vasos sanguíneos que dieron positivo respecto a CD31 presentes en secciones de colon y mama humanos normales
35 dieron negativo respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$, como dieron otros vasos sanguíneos en otros tejidos adultos normales, incluyendo la piel. Estos resultados demuestran que la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ está regulada por incremento en la vasculatura tumoral y que la mayoría de los vasos sanguíneos en estas secciones tumorales dan positivo respecto a la expresión de $\alpha 5\beta 1$. Los resultados demuestran además que $\alpha 5\beta 1$ no se expresa de manera significativa en los vasos sanguíneos en tejidos adultos normales.

40 Los tejidos tumorales se tiñeron también con anticuerpos dirigidos frente a fibronectina (teñidos en rojo) y Factor de von Willebrand (teñidos en verde), que es otro marcador de vasos sanguíneos. El examen de las secciones congeladas de carcinoma de mama y carcinoma de colon, así como de mama y colon humanos normales indicó que la matriz extracelular que rodea los vasos tumorales daba positivo respecto a la expresión de fibronectina. En
45 comparación, los vasos sanguíneos en tejidos normales expresaban poca, o prácticamente nada de fibronectina. Las secciones de carcinoma de ovario y pancreático mostraron patrones similares de expresión de fibronectina en los vasos sanguíneos.

Notablemente, la expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y su ligando, la fibronectina estaban reguladas por incremento de
50 manera coordinada en muchos de los mismos vasos sanguíneos en las secciones de tumores humanos. Esta expresión coordinada de estas moléculas en tejidos tumorales humanos es indicativa de una interacción funcional positiva entre estas proteínas. La expresión de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina se observó también en la vasculatura tumoral en modelos animales de neoplasia, incluyendo xenotransplantes tumorales de melanoma M21L humano en ratones SCID y tumores de mama espontáneos en el ratón PyV (véase Guy *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 12:954-961 (1992), que
55 se incorpora a la presente memoria por referencia, en relación con el modelo de ratón PyV). Por tanto, la expresión significativamente elevada de la integrina $\alpha 5\beta 1$ y la fibronectina se asocia con la vasculatura en tumores espontáneos y en tumores humanos y murinos inducidos experimentalmente en comparación con los tejidos normales.

60 Ejemplo II

$\alpha 5\beta 1$ y fibronectina se requieren para la angiogénesis

Este ejemplo demuestra que la fibronectina y el receptor de fibronectina, la integrina $\alpha 5\beta 1$, están implicados en
65 angiogénesis en tumores y en la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento.

A. Métodos

1. Ensayo de Adhesión Celular

5 Se mantuvieron células HT29 integrina $\alpha 5\beta 1^+$, células de carcinoma de colon integrina $\alpha 5\beta 1^-$ (Varner *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 6:725-740 (1995)), y fibroblastos de embrión de pollo (CEFs, del inglés “chick embryo fibroblasts”) en DMEM rico en glucosa suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, del inglés “fetal bovine serum”) y gentamicina. Se mantuvieron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs, del inglés “human umbilical vein endothelial cells”) en medio M199 que contenía bicarbonato sódico, HEPES, heparina, suplemento de crecimiento de células endoteliales, FBS al 20% y gentamicina. Los medios de cultivo y reactivos eran de Irvine Scientific (Irvine, CA).

15 Se revistieron los pocillos de placas de cultivo de 48 pocillos (Costar, Inc.) con 1 $\mu\text{g/ml}$ de vitronectina, 2 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (fibroblastos de embrión de pollo y HUVECs) ó 10 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina (células HT29- $\alpha 5^+$) durante 1 h a 37°C, y a continuación se bloquearon con BSA desnaturalizado por calor al 2% en PBS durante 1 h. Se añadieron 50.000 células en 250 μl de tampón de adhesión a pocillos por triplicado que contenían 250 μl de una solución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función (NKI-SAM-1, JBS5 ó IIA1), 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueador de función (HA5 ó VC5; Pharmingen, Inc.; San Diego CA), péptidos cíclicos 10 μM (Koivunen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210 (1993); Koivunen *et al.*, *J. Cell Biol.* 124:373380 (1994)), SJ749 0-10 μM (ácido (S)-2-[(2,4,6-trimetilfenil)sulfonyl]amino-3-[7-benciloxycarbonil-8-(2-piridinilaminometil)-1-oxa-2,7-diazaspiro-[4,4]-non-2-en-3-il]carbonilamino}propiónico), 50 $\mu\text{g/ml}$ de LM609, un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 3$ bloqueador de función, 50 $\mu\text{g/ml}$ de P4C10, un anticuerpo anti- $\beta 1$ bloqueador de función, 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo monoclonal anti-dominio de unión celular de fibronectina ó 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo monoclonal anti-extremo N-terminal de fibronectina en tampón de adhesión (solución salina equilibrada de Hanks, HBSS (del inglés “Hanks balanced salt solution”), tamponada con HEPES, que contenía BSA al 1%, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 2 mM y MnCl_2 0,2 mM).

30 Se dejó que las células se adhirieran a las placas durante 20 min a 37°C. Las células no adherentes se retiraron lavando cada pocillo cuatro veces con 500 μl de tampón de adhesión templado. Las células adherentes se fijaron a continuación durante 15 min con paraformaldehído al 3,7% en PBS y se tiñeron con solución de violeta cristal al 2%. Después de lavar mucho con agua para retirar el exceso de violeta cristal, las placas se secaron durante una noche. El violeta cristal se sometió a extracción por incubación durante 15 min en ácido acético al 10% y se determinó la absorbancia a 562 nm como un indicador del número de células unidas. Cada experimento se realizó por triplicado, con muestras por triplicado para cada condición. Los datos se presentaron como un porcentaje de la adhesión mostrada por el control positivo (medio de adhesión solo) +/- el error estándar de la medida.

2. Ensayos de Migración Celular

40 El lado inferior de insertos Transwell de 8 μm de poro (Costar, Inc.) se revistió con 2 $\mu\text{g/ml}$ de fibronectina, colágeno (Collaborative Biomedical Products; Bedford MA) o sin proteína durante 1 h y se bloqueó con BSA al 2% en PBS durante 1 h. Los insertos se colocaron a continuación en placas de cultivo de 24 pocillos que contenían 500 μl de tampón de migración en la cámara inferior. Se añadieron 25.000 HUVECs en 50 μl de tampón de migración (medio M199 tamponado con HEPES que contenía BSA al 1%, MgCl_2 2 mM, CaCl_2 2 mM y MnCl_2 0,2 mM) a la cámara superior de los insertos por duplicado que contenían 50 μl de una solución de 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función (NKI-SAM-1, JBS5 ó IIA1), 50 $\mu\text{g/ml}$ de un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueador de función (HA5 ó VC5), ó 50 $\mu\text{g/ml}$ de LM609 (un anticuerpo anti- $\alpha V\beta 3$ bloqueador de función) en tampón de migración, o tampón de migración solo.

50 Se dejó que las células migraran desde la cámara superior a la inferior durante 4 h a 37°C. Las células no migratorias se retiraron de la superficie superior frotando el lado superior con una punta absorbente, y las células que habían migrado al lado inferior del inserto Transwell se fijaron durante 15 min con paraformaldehído al 3,7% en PBS y se tiñeron a continuación con una solución de violeta cristal al 2%. Después de lavar mucho con agua para retirar el exceso de violeta cristal, se contó el número de células que habían migrado en tres campos de alta potencia (200X) representativos por inserto. Los datos se presentaron como el número de células que migraba +/- el error estándar de la medida.

3. Ensayo *in ovo* de angiogénesis en membranas corioalantoicas de pollo (CAM)

60 Se miraron al trasluz huevos de pollo con embriones de diez días de edad (McIntyre Poultry; Ramona CA) para iluminar los vasos sanguíneos bajo la cáscara y se identificó un área con un mínimo de vasos sanguíneos pequeños. Se separó la CAM de la cáscara del huevo en este área picando un pequeño agujero en la cáscara mineralizada y aplicando presión a la membrana interna subyacente de la cáscara. Este procedimiento dio como resultado que un bolsillo de aire se desplazara desde el fondo del huevo al área identificada forzando que una región circular de la CAM de aproximadamente 2 cm de diámetro se separara de la cáscara. Se cortó una ventana en la cáscara de huevo y se colocó sobre la CAM un disco filtrante de 5 mm de diámetro pretratado con acetato de cortisona que se había saturado con 1 $\mu\text{g/ml}$ de bFGF, VEGF, $\text{TNF}\alpha$, IL-8 (Genzyme, Inc.; Cambridge MA) o solución salina. La ventana en la cáscara se selló con cinta adhesiva y el huevo se incubó durante cuatro días.

Se aplicó un intervalo de 0-25 μg en 25 μl de anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función o un anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueador de función de control, 0-25 μM en 25 μl de péptido cíclico (CRRETAWAC; SEC ID N° 1) o péptido de control mezclado (CATAERWRC; SEC ID N° 2; Koivunen *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:20205-20210 (1993); Koivunen *et al.*, *J. Cell Biol.* 124:373380 (1994)), 0-25 μM en 25 μl de SJ749, una molécula pequeña de control inactiva o 25 μl de solución salina al filtro saturado con factor de crecimiento 24 horas después. Se aplicaron también tópicamente a la CAM anticuerpos anti-fibronectina (25 μg en 25 μl).

Se aplicó fibronectina, vitronectina y fragmentos de fibronectina (59 pmol en un volumen final de 25 μl) a CAMs estimuladas o no estimuladas. Se inyectaron también por vía intravenosa antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ peptídicos o de tipo molécula pequeña (a una concentración final en suero de 0-25 μM) en la circulación del pollo 24 h después. Las CAMs se recolectaron el cuarto día de estimulación. Se contaron los puntos de ramificación de los vasos sanguíneos en el área del disco filtrante de 5 mm con una ampliación 30 X en modo "a ciegas" como un indicador cuantitativo independiente del tamaño de los brotes vasculares en respuesta a los factores de crecimiento. La angiogénesis se caracteriza por el brote de nuevos vasos en respuesta a factores de crecimiento. Por tanto, el recuento de los puntos de ramificación de los vasos sanguíneos es un medio cuantitativo útil para obtener un índice angiogénico (Brooks *et al.*, en "Methods in Molecular Biology" (Humana Press 1999)). Se usaron al menos diez embriones por grupo de tratamiento. Cada experimento se realizó un mínimo de tres veces.

Los datos se evaluaron con respecto al número medio de puntos de ramificación de los vasos sanguíneos por grupo de tratamiento +/- el error estándar de la medida. Los análisis estadísticos se realizaron usando el test t de Student. Las CAMs representativas de cada grupo de tratamiento se fotografiaron con una ampliación 10X. En algunos casos, el tejido de la CAM extirpado del huevo se congeló en OCT (Baxter; McGraw Park IL) en nitrógeno líquido, se cortó en secciones de 5 μm , se secaron al aire y se procesaron para realizar el análisis inmunohistoquímico como se describe en el Ejemplo I, aunque sin fijación.

4. Ensayos de Unión de Ligando al Receptor Integrina

Los receptores integrina $\alpha V\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ purificados de placenta humana se obtuvieron de Chemicon International. La integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ de plaquetas se purificó de plaquetas según procedimientos establecidos. Los receptores se utilizaron para revestir (100 μl /pocillo) placas de unión de alta capacidad Costar (3590) durante una noche a 4°C. Se eliminó la solución de revestimiento y las placas se lavaron una vez con tampón de bloqueo/unión (B/B, del inglés "blocking/binding") (Tris HCl 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CaCl₂ 2mM, MgCl₂ 1 mM, MnCl₂ 1 mM y BSA al 1%).

Se aplicaron 110 μl de tampón B/B durante 60 min a RT. Se añadieron 30 μl de ligando proteico de matriz extracelular biotinilado (fibronectina para la integrina $\alpha 5\beta 1$, vitronectina para la integrina $\alpha V\beta 3$ y fibrinógeno para la integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$) más 50 μl de SJ749 en tampón B/B, o bien tampón B/B solo a cada pocillo, y se incubó durante 25 min a RT. Las placas se lavaron dos veces con tampón B/B y se incubaron 1 h a RT, con fosfatasa alcalina anti-biotina (100 μl /pocillo) en tampón B/B. Finalmente, las placas se lavaron dos veces con B/B y a continuación se añadieron 100 μl de sustrato de la fosfatasa (1,5 mg/ml). La reacción se detuvo por adición de NaOH 2N (25 μl /pocillo), y el color desarrollado se leyó a 405 nm.

B. Resultados

1. El anticuerpo específico para el dominio de unión celular de la fibronectina inhibe la adhesión y migración de las células que expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina *in vitro* e inhibe la angiogénesis *in vivo* en CAMs

Dado que se localizó fibronectina en los vasos sanguíneos que expresaban la integrina $\alpha 5\beta 1$ en tumores y tejidos tratados con factores de crecimiento, se evaluaron los efectos de la fibronectina y de anticuerpos anti-fibronectina bloqueadores de función sobre la angiogénesis.

Se usó un ensayo de adhesión celular *in vitro* para determinar, primero, si un anticuerpo dirigido frente al péptido del dominio central de unión celular (anticuerpo anti-CBP) o un anticuerpo frente a un péptido N-terminal de la fibronectina (anticuerpo anti-NT) de fibronectina humana y de pollo inhibía la adhesión celular a fibronectina. El anticuerpo anti-CBP inhibió significativamente la adhesión a fibronectina de las células positivas respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$, incluyendo células de carcinoma de colon HT29 $\alpha 5\beta 1^+$, CEFs, y HUVECs. La adhesión de HUVECs se bloqueó en un 70 +/- 3% por el anticuerpo anti-CBP. En comparación, el anticuerpo anti-NT fue ineficaz para bloquear la adhesión celular a fibronectina. Estos resultados demuestran que el dominio CBP de la fibronectina se requiere para la adhesión de las células que expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$.

Los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de tipo anticuerpo monoclonal bloqueador de función, pero no los anticuerpos monoclonales anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ de control (no bloqueadores de función) de control, inhibieron selectivamente la adhesión de HT29 $\alpha 5^+$ (100 +/- 6%), CEF (89,7 +/- 3,4%), y HUVEC (72 +/- 2,5%) a fibronectina pero no inhibieron la adhesión a vitronectina; sin embargo, LM609, un anticuerpo específico anti- $\alpha V\beta 3$ inhibió la adhesión de las células a vitronectina. Estos resultados demuestran que la unión de $\alpha 5\beta 1$ a fibronectina se requiere para la adhesión de las células que expresan $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina.

Como la angiogénesis depende en parte de la migración e invasión de las células endoteliales, se evaluó también la capacidad de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ para bloquear la migración de las HUVECs. La migración de las HUVECs sobre la fibronectina se inhibió significativamente (87 +/- 2%) por los anticuerpos bloqueadores de función dirigidos frente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, mientras que este anticuerpo no afectó a la migración de las células endoteliales sobre otras proteínas de la matriz, incluyendo el colágeno. Estos resultados demuestran que la integrina $\alpha 5\beta 1$ está también implicada en la migración celular mediada por fibronectina.

Los roles de la fibronectina y de $\alpha 5\beta 1$ en la angiogénesis *in vivo* se examinaron usando el ensayo de las CAMs. Para evaluar el rol de la fibronectina en la angiogénesis *in vivo*, se estimularon CAMs de embriones de diez días de edad con bFGF o VEGF. Veinticuatro horas después, se aplicaron anticuerpos anti-fibronectina directamente a las CAMs, y a continuación, dos días después, las CAMs se extirparon y los vasos sanguíneos se cuantificaron contando los puntos de ramificación de los vasos.

El anticuerpo anti-CBP inhibió el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos inducido por bFGF en un 75 +/- 10% (p=0,002), mientras que el anticuerpo anti-NT tuvo sólo un efecto mínimo (34 +/- 15% de inhibición, p=0,02). El anticuerpo anti-CBP inhibió también la angiogénesis por VEGF en un 71 +/- 7% (p=0,02), como hizo el anticuerpo anti-NT (89 +/- 17% de inhibición, p=0,035). A diferencia de los anticuerpos anti-fibronectina, los anticuerpos bloqueadores de función dirigidos frente a vitronectina no tuvieron un efecto significativo sobre la angiogénesis. Estos resultados indican que el dominio de unión celular de la fibronectina juega un rol crítico en la angiogénesis, y que el dominio N-terminal de la fibronectina puede contribuir también algo a la angiogénesis.

Para demostrar adicionalmente una asociación funcional entre la fibronectina y la estimulación de la angiogénesis, se aplicaron directamente fibronectina y vitronectina a las CAMs de los embriones de diez días de edad en presencia o ausencia de factores de crecimiento. En ausencia de adición de factores de crecimiento, ni la fibronectina ni la vitronectina promovieron la angiogénesis. Se aplicaron cantidades equimolares de fibronectina humana intacta, un fragmento de 120 kD de fibronectina con el dominio de unión celular que contiene RGD o un fragmento de fibronectina quimotrópico C-terminal de 40 kD carente del dominio de unión celular que contiene RGD (Chemicon; Temecula CA) a CAMs estimuladas con bFGF y se examinó la angiogénesis.

La fibronectina intacta intensificó la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento al menos en un 46 +/- 11% (p=0,04). El fragmento de unión celular de 120 kD de la fibronectina intensificó también significativamente la angiogénesis (65 +/- 20%; p=0,05); en comparación, el fragmento de 40 kD de la fibronectina no tuvo un efecto significativo. Además, los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ invirtieron este proceso, demostrando que la angiogénesis intensificada por fibronectina era dependiente de la actividad de la integrina $\alpha 5\beta 1$ (véase más abajo). La aplicación de vitronectina a CAMs estimuladas con bFGF no tuvo efectos sobre el número de vasos. La adición de fibronectina o vitronectina a CAMs estimuladas con VEGF tampoco potenció el efecto angiogénico de VEGF. Estos resultados demuestran que la fibronectina y la integrina $\alpha 5\beta 1$ de las células endoteliales tienen roles funcionales en la angiogénesis inducida por factores de crecimiento.

Se examinó también la capacidad de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ para afectar a la angiogénesis inducida por factores de crecimiento en la CAM de pollo. Veinticuatro horas después de estimular la angiogénesis con bFGF, se aplicaron anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ directamente al disco filtrante saturado con factores de crecimiento o se inyectaron por vía intravenosa en la circulación embrionaria. Los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de tipo anticuerpo bloquearon la angiogénesis inducida por bFGF en la CAM al menos en un 88 +/- 6% (p=0,01), mientras que los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueadores de función de control no tuvieron un efecto significativo. Las aplicaciones de los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueadores de función o de control a CAMs no estimuladas no tuvo efecto sobre el número o integridad de los vasos sanguíneos presentes en el área de aplicación. Análogamente, el anticuerpo anti- $\alpha V\beta 3$ también bloqueó la angiogénesis inducida por bFGF en un 65 +/- 10% (p=0,008).

Los distintos factores de crecimiento pueden inducir rutas selectivas de angiogénesis que activan o utilizan integrinas distintas. Por ejemplo, la integrina $\alpha V\beta 3$ participa en las rutas de angiogénesis inducida por bFGF y TNF α , mientras que $\alpha V\beta 5$ participa en las rutas inducidas por VEGF y TGF α . Por consiguiente, se examinó adicionalmente el rol de otras integrinas en la angiogénesis inducida por factores de crecimiento.

Cuando la angiogénesis se estimuló con TNF α ó IL-8, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloquearon la angiogénesis en un 70,4 +/- 12% (p=0,04) y 85 +/- 4,8% (p<0,0001) de media, respectivamente, y, en algunos experimentos, los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ inhibieron la angiogénesis inducida por TNF α e IL-8 hasta en un 99 +/- 5% (p=0,005). Análogamente, los antagonistas de la integrina $\alpha V\beta 3$ de tipo anticuerpo bloquearon la angiogénesis inducida por TNF α e IL-8 en un 93,6 +/- 6,2% (p=0,004) y un 77 +/- 5,2% (p=0,0001), respectivamente. Sin embargo, cuando la angiogénesis se indujo con VEGF, los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de tipo anticuerpo no pudieron bloquear la angiogénesis, mientras que el anticuerpo anti- $\alpha V\beta 5$ bloqueaba la angiogénesis inducida por VEGF en un 99 +/- 0,1% (p=0,004). Cuando los anticuerpos anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ y anti-integrina $\alpha V\beta 3$ se aplicaron en combinación a CAMs estimuladas con bFGF, no se observaron efectos inhibidores aditivos o sinérgicos, sugiriendo que estas integrinas participan en la misma ruta angiogénica.

Estos resultados demuestran que la interacción de la integrina $\alpha 5\beta 1$ con el dominio de unión celular de la fibronectina está implicada en la angiogénesis inducida por factores de crecimiento *in vivo*, y que un anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$

puede interferir con tal angiogénesis. Los resultados indican también que la integrina $\alpha 5\beta 1$ regula la misma ruta de angiogénesis que $\alpha V\beta 3$ y que esta ruta es distinta de la regulada por $\alpha V\beta 5$.

2. *Los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ de tipo molécula orgánica pequeña peptídica y no peptídica inhiben la adhesión y migración de las células que expresan la integrina $\alpha 5\beta 1$ a la fibronectina in vitro e inhiben la angiogénesis in vivo en CAMs*

Se examinó también la capacidad de los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de tipo molécula orgánica pequeña peptídica y no peptídica para interferir con las interacciones de las células con la fibronectina y con la angiogénesis inducida por factores de crecimiento.

Los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ que no son de tipo anticuerpo inhibieron potencialmente la adhesión celular a la fibronectina. El antagonista peptídico cíclico selectivo de la integrina $\alpha 5\beta 1$, CRRETAWAC (SEC ID N° 1), inhibió significativamente la adhesión de las células de carcinoma de colon HT29 $\alpha 5^-$, CEFs y HUVECs a la fibronectina, pero no a la vitronectina, mientras que un péptido “mezclado” de control (CATAERWRC; SEC ID N° 2) tuvo poco efecto sobre la adhesión celular a la fibronectina o la vitronectina. CRRETAWAC (SEC ID N° 1), pero no el péptido de control, interfirió también con la migración de las células endoteliales sobre la fibronectina, pero no sobre otras proteínas de la matriz extracelular tales como el colágeno. El antagonista peptídico cíclico de $\alpha 5\beta 1$ también bloqueó significativamente la angiogénesis inducida por bFGF (90 +/- 6%; $p < 0,0001$), mientras que los péptidos de control no inhibieron la angiogénesis. Los antagonistas peptídicos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ no bloquearon la angiogénesis inducida por VEGF.

El antagonista de tipo molécula orgánica pequeña no peptídica selectivo para $\alpha 5\beta 1$, SJ749, bloqueó la adhesión de estas células a la fibronectina de manera dependiente de la concentración (con una semiconcentración inhibitoria máxima de 0,8 mM para las células HT29 $\alpha 5^+$; Figura 1), pero fue ineficaz para bloquear la adhesión celular a la vitronectina u otros ligandos de la matriz extracelular. SJ749 también inhibió selectivamente la unión del ligando a $\alpha 5\beta 1$ y fue sustancialmente menos eficaz para bloquear la unión del ligando a $\alpha V\beta 3$ y otras integrinas. El antagonista de la integrina $\alpha 5\beta 1$ de tipo molécula orgánica pequeña no peptídica fue también muy eficaz para bloquear la migración de las células endoteliales sobre la fibronectina, pero no sobre otras proteínas de la matriz como el colágeno. SJ749 también bloqueó la angiogénesis inducida por bFGF en CAMs de pollo de manera dependiente de la dosis cuando se aplicó por vía tópica, o bien sistémica (Figura 2), mientras que las moléculas no peptídicas de control no inhibieron la angiogénesis, incluso con la dosis más alta probada. Igual que los otros antagonistas de $\alpha 5\beta 1$, SJ749 no bloqueó la angiogénesis inducida por VEGF.

Estos resultados demuestran que los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ de tipo péptido y molécula orgánica pequeña no peptídica interfieren significativa y selectivamente con la función de la $\alpha 5\beta 1$ humana y de pollo, análogamente a los anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$. Más específicamente, la administración sistémica de antagonistas de tipo anticuerpo, péptido y molécula pequeña no peptídica inhibieron la angiogénesis inducida por factores de crecimiento con unas IC_{50} de aproximadamente 5 μg , 120 pmoles y 15 pmoles, respectivamente, por cada 2 ml de volumen sanguíneo de los embriones de pollo. Estos resultados confirman también que el receptor de fibronectina, la integrina $\alpha 5\beta 1$, contribuye a la angiogénesis inducida por factores de crecimiento en la CAM.

Ejemplo III

Los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis inducida por factores de crecimiento en piel humana en ratones SCID

Este ejemplo demuestra que los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis en piel humana cultivada en ratones SCID.

El injerto de pieles humanas en ratones SCID se realizó como se ha descrito previamente (Brooks *et al.*, *J. Clin. Invest.* 96:1815-1822 (1995)). Se injertó en ratones SCID un trozo de 8 mm x 13 mm de piel de prepucio neonatal humano. Las muestras recientes de prepucio neonatal humano se obtuvieron de la Red Cooperativa de Tejidos Humanos del National Institutes of Health y se almacenaron en medio RPMI-1640 suplementado con suero bovino fetal al 2% y gentamicina al 1%.

Cuatro semanas después del injerto, después de que la piel hubiera cicatrizado completamente, se inyectaron por vía intradérmica en el centro de cada injerto de piel 50 μl de Matrigel con los factores de crecimiento agotados (Becton Dickinson; Bedford MA) reconstituido con 1 $\mu g/ml$ de factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), con 1 $\mu g/ml$ de bFGF que contenía 25 $\mu g/ml$ de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función o con 1 $\mu g/ml$ de bFGF que contenía 25 $\mu g/ml$ de anticuerpo monoclonal anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueador de función. Tres días después, la piel humana se extirpó del ratón. Los bordes se observaban fácilmente dado que la piel humana era rosa y sin pelo; la piel del ratón se cubrió con sarro blanco. La piel humana se incrustó en medio de congelación, se congeló y se seccionó. Las secciones se tiñeron para detectar la presencia de vasos sanguíneos humanos con anti-CD31, como se describe en los análisis inmunohistoquímicos de densidades de los vasos sanguíneos. Los datos se presentaron como los números medios de vasos sanguíneos positivos respecto a CD31 por campo microscópico 100X, +/- el error estándar de la medida. Los análisis estadísticos se realizaron usando el test t de Student.

Se inyectó por vía intradérmica en el prepucio neonatal humano injertado en ratones SCID membrana basal con los factores de crecimiento agotados impregnada con bFGF en presencia o ausencia de anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueadores de función y de control. Se realizó el análisis de la piel humana después de tres días para detectar la presencia de vasos sanguíneos humanos positivos respecto a CD31. La adición de anticuerpo anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función bloqueó selectivamente la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento, y redujo el número de vasos sanguíneos positivos respecto a CD31 por campo de alta potencia en un 94 +/- 4,7% (P= 0,006).

Estos resultados demuestran que la integrina $\alpha 5\beta 1$ tiene un rol funcional en la respuesta angiogénica a los factores de crecimiento de los vasos sanguíneos humanos, y que un antagonista de la unión de $\alpha 5\beta 1$ puede reducir o inhibir la angiogénesis estimulada por factores de crecimiento en piel humana.

Ejemplo IV

Los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inhiben el crecimiento tumoral

Este ejemplo demuestra que los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ inhiben la angiogénesis en tumores humanos en un sistema modelo con CAM.

El ensayo de tumores de CAM de pollo se realizó depositando diez millones de células tumorales sobre la superficie de una CAM, y cultivando las células durante una semana. Los tumores resultantes se extirparon y cortaron en fragmentos de 50 mg. Estos fragmentos se depositaron sobre CAMs adicionales y se trataron por vía tópica al día siguiente con 25 μg en 25 μl de anti- $\alpha 5\beta 1$ o anti- $\alpha 5\beta 1$ no bloqueador de función de control, o por vía sistémica mediante inyección intravenosa con una concentración final en suero de péptidos cíclicos 25 μM ó SJ7549 25 μM y péptido mezclado de control 25 μM ó molécula pequeña inactiva 25 μM o 25 μl de solución salina (el volumen sanguíneo del embrión de pollo es aproximadamente 2 ml). Cuarenta y ocho horas después, se extirparon las CAMs del huevo y se contó el número de vasos sanguíneos que entraban en los tumores (como puntos de ramificación de los vasos sanguíneos).

Los datos se presentaron como el número medio de vasos sanguíneos por grupo de tratamiento (+/- el error estándar de la medida). Cada grupo de tratamiento incorporó al menos diez tumores por experimento. Los tumores representativos se fotografiaron con una ampliación 10X. Los tumores se extirparon del huevo y se determinó el peso tumoral para cada tumor. Los datos se presentaron como peso tumoral medio por grupo de tratamiento (+/- el error estándar de la medida). Los análisis estadísticos se realizaron usando el test t de Student.

Se cultivaron células de carcinoma de colon HT29 que no expresaban $\alpha 5\beta 1$ sobre las CAMs de embriones de diez días de edad. Estas células tumorales secretan varios factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo VEGF, TGF α , TGF β , TNF α , e IL-8 (Anzano *et al.*, *Cancer Res.* 49:2898-2904 (1989); Varner *et al.*, *ut supra*, 1995; Ellis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 273:1052-1057 (1998)). Se usaron células tumorales que dieron negativo respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$ para distinguir los potenciales efectos antitumorales de los efectos antivascularización de los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$.

El tratamiento con los anticuerpos bloqueadores de función, pero no de control, redujo significativamente (70 +/- 10%, p=0,02) el número de vasos sanguíneos asociados a los tumores. No se observó una diferencia morfológica o cuantitativa significativa entre los tumores tratados con solución salina y anticuerpo de control o sus vasos sanguíneos asociados. Además, el tratamiento con anticuerpos anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueadores de función dio como resultado la regresión tumoral. Los tumores tratados con anti- $\alpha 5\beta 1$ eran un 32% más pequeños que los tumores tratados con el control (p=0,02).

La administración intravenosa de inhibidores peptídicos cíclicos de la integrina $\alpha 5\beta 1$ e inhibidores de tipo molécula pequeña no peptídica de la integrina $\alpha 5\beta 1$ también indujo la regresión tumoral sobre la CAM, mientras que los tumores tratados con el péptido del control o el no péptido de control continuaron aumentando de tamaño. Los tumores tratados con inhibidores peptídicos y no peptídicos eran un 31% y un 51% más pequeños que los tumores tratados con el control, respectivamente (p=0,003). Las células tumorales siguieron dando negativo respecto a la integrina $\alpha 5\beta 1$ a lo largo del experimento, indicando que los efectos antitumorales se basaban en el alcance de los vasos sanguíneos asociados con el tumor.

Se examinó también el efecto de los antagonistas de $\alpha 5\beta 1$ sobre la angiogénesis tumoral en células de carcinoma escamoso Hep 3 $\alpha 5\beta 1^+$. El tratamiento de los tumores con anti- $\alpha 5\beta 1$ bloqueador de función dio como resultado la regresión del tumor, siendo los tumores un 45% más pequeños que los tumores de control (p=0,046). No se observaron diferencias morfológicas o cuantitativas significativas entre los tumores tratados con solución salina y anticuerpo de control.

Estos resultados demuestran que dirigirse a la integrina $\alpha 5\beta 1$ de las células vasculares inhibe la angiogénesis tumoral y el crecimiento tumoral, y que los antagonistas de la integrina $\alpha 5\beta 1$ son inhibidores potentes del crecimiento tumoral y la angiogénesis inducida por el tumor.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo para usar en la reducción o inhibición de la angiogénesis en un tejido por un método que comprende poner en contacto la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el tejido con dicho agente, reduciendo o inhibiendo de ese modo la angiogénesis en el tejido.
- 10 2. El agente de la reivindicación 1, en la que el tejido comprende tejido ocular; piel; tejido sinovial; hueso; o un neoplasma.
3. El agente de la reivindicación 2, en la que el tejido ocular es retina, mácula o córnea.
4. El agente de la reivindicación 2, en la que el tejido es un neoplasma maligno.
- 15 5. El agente de la reivindicación 4, en la que el neoplasma maligno es un neoplasma maligno metastásico, o un carcinoma.
- 20 6. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en las que el agente está unido a una citotoxina.
7. El agente de la reivindicación 6, en la que la citotoxina es un fármaco quimioterapéutico contra el cáncer.
8. Un método para identificar la presencia de angiogénesis en un tejido, que comprende los pasos de:
- 25 (a) poner en contacto una muestra del tejido con un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, agente que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo, y
- (b) detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido, identificando de ese modo la presencia de angiogénesis en el tejido.
- 30 9. El método de la reivindicación 8, en el que el agente comprende además un marcador detectable.
10. El método de la reivindicación 8, en el que detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido comprende los pasos de:
- 35 (a) poner en contacto el agente, que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, con un reactivo que interactúa específicamente con el agente, y
- 40 (b) detectar la interacción del reactivo, detectando de ese modo la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido.
11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el tejido se selecciona del grupo que consiste en tejido embrionario y tejido placentario.
- 45 12. El método de la reivindicación 8, en el que el tejido comprende tejido de granulación.
13. El método de la reivindicación 8, en el que el tejido está implicado en una afección patológica.
- 50 14. El método de la reivindicación 13, en el que la afección patológica comprende un neoplasma.
15. El método de la reivindicación 13, en el que el tejido comprende tejido ocular.
16. Un método para diagnosticar una afección patológica **caracterizada** por angiogénesis en un tejido en un individuo, que comprende los pasos de:
- 55 (a) poner en contacto (i) una muestra del tejido que se ha obtenido del individuo, en el que, en un individuo que tiene la afección patológica, el tejido presenta angiogénesis; con (ii) un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$, agente que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo; y
- 60 (b) detectando la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido, diagnosticando de ese modo una afección patológica **caracterizada** por angiogénesis en el individuo.
- 65 17. El método de la reivindicación 16, en el que la afección patológica implica al ojo.
18. El método de la reivindicación 17, en el que la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética y degeneración macular por neovascularización.

ES 2 322 723 T3

19. El método de la reivindicación 16, en el que la afección patológica implica a la piel.

20. El método de la reivindicación 19, en el que la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en un hemangioma y psoriasis.

21. El método de la reivindicación 16, en el que la afección patológica implica a una articulación.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en artritis reumatoide y osteoartritis.

23. El método de la reivindicación 16, en el que la afección patológica implica un neoplasma.

24. El método de la reivindicación 23, en el que el neoplasma es un neoplasma maligno.

25. El método de la reivindicación 24, en el que el neoplasma maligno es un neoplasma maligno metastásico, o un carcinoma.

26. El método de la reivindicación 25, en el que el carcinoma se selecciona del grupo que consiste en carcinoma de mama, carcinoma de colon, carcinoma de ovario, y carcinoma pancreático.

27. Un agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha 5\beta 1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha 5\beta 1$ de dicho anticuerpo para usar en el diagnóstico de una afección patológica **caracterizada** por angiogénesis en un tejido en un individuo, por un método que comprende los pasos de:

(a) administrar dicho agente antagonista de $\alpha 5\beta 1$ a un individuo bajo sospecha de tener la afección patológica; y

(b) detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido, diagnosticando de ese modo una afección patológica **caracterizada** por angiogénesis en el individuo.

28. El agente de la reivindicación 27, en la que el agente está marcado de forma detectable.

29. El agente de la reivindicación 28, en la que la detección de la unión específica del agente se realiza usando un método de adquisición de imágenes *in vivo*.

30. El agente de la reivindicación 28, en la que el agente marcado de forma detectable comprende el agente enlazado a un marcador seleccionado del grupo que consiste en un radionucleido, un material paramagnético y un material atenuante de rayos X.

31. El agente de la reivindicación 29, en la que el método de adquisición de imágenes *in vivo* se selecciona del grupo que consiste en adquisición de imágenes de un radionucleido, tomografía por emisión de positrones, tomografía axial computerizada, y adquisición de imágenes por resonancia magnética.

32. El agente de la reivindicación 28, en la que detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido comprende los pasos de:

(a) obtener una muestra del tejido del individuo; y

(b) detectar la unión específica del agente en la muestra.

33. El agente de la reivindicación 27, en la que detectar la unión específica del agente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ asociada con un vaso sanguíneo en el tejido comprende los pasos de:

(a) obtener una muestra del tejido del individuo;

(b) poner en contacto el agente que se une específicamente a la integrina $\alpha 5\beta 1$ con un reactivo que interactúa específicamente con el agente; y

(c) detectar la interacción del reactivo con el agente, diagnosticando de ese modo una afección patológica **caracterizada** por angiogénesis en el individuo.

34. El agente de la reivindicación 27, en la que el individuo es un humano.

35. El agente según la reivindicación 1, en la que dicho tejido está en un individuo y dicho método comprende administrar al individuo dicho agente.

36. El agente de la reivindicación 35, en la que el individuo es un humano.

ES 2 322 723 T3

37. El agente según la reivindicación 1, en la que dicho tejido está asociado con una afección patológica asociada con angiogénesis y dicho método comprende administrar dicho agente al individuo.

38. El agente de la reivindicación 37, en la que la afección patológica es un neoplasma.

39. El agente de la reivindicación 38, en la que el neoplasma es un neoplasma maligno.

40. El agente de la reivindicación 39, en la que el neoplasma maligno es un neoplasma maligno metastático, o un carcinoma.

41. El agente de la reivindicación 40, en la que el carcinoma se selecciona del grupo que consiste en un carcinoma de mama, un carcinoma de colon, un carcinoma de ovario y un carcinoma pancreático.

42. El agente de la reivindicación 39, en la que el neoplasma maligno se selecciona del grupo que consiste en sarcoma, un mesotelioma, un teratocarcinoma, un astrocitoma, y un glioblastoma.

43. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 42, en las que el individuo es un humano.

44. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, que es para administración intravenosa.

45. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43, que es para administración oral.

46. El agente de la reivindicación 38, en la que el agente es para administrar en un neoplasma.

47. El agente de la reivindicación 37, en la que la afección patológica está asociada con el ojo.

48. El agente de la reivindicación 47, en la que la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en retinopatía diabética y degeneración macular por neovascularización.

49. El agente de la reivindicación 47 ó 48, que es para administrar en forma de gotas para los ojos.

50. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40, en las que la afección patológica está asociada con una articulación.

51. El agente de la reivindicación 50, que es para administrar por vía intrasinovial.

52. El agente de una cualquiera de las reivindicaciones 37 a 51, que es para administrar en una dosis de 0,0001 a 100 mg/kg de peso corporal.

53. El uso de un agente antagonista de $\alpha5\beta1$ que comprende un anticuerpo anti-integrina $\alpha5\beta1$ o un fragmento de unión a integrina $\alpha5\beta1$ de dicho anticuerpo para la fabricación de un medicamento para usar en la reducción o inhibición de angiogénesis en un tejido por un método que comprende poner en contacto la integrina $\alpha5\beta1$ en el tejido con dicho agente, reduciendo o inhibiendo de ese modo la angiogénesis en el tejido.

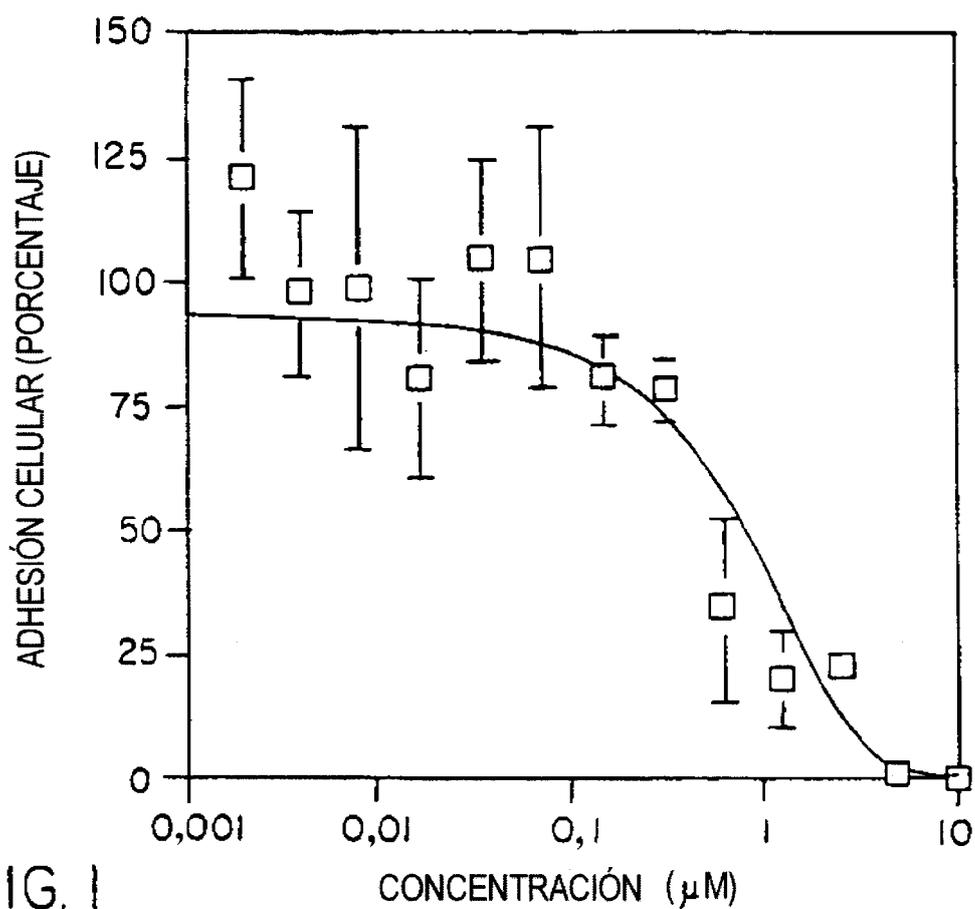


FIG. 1

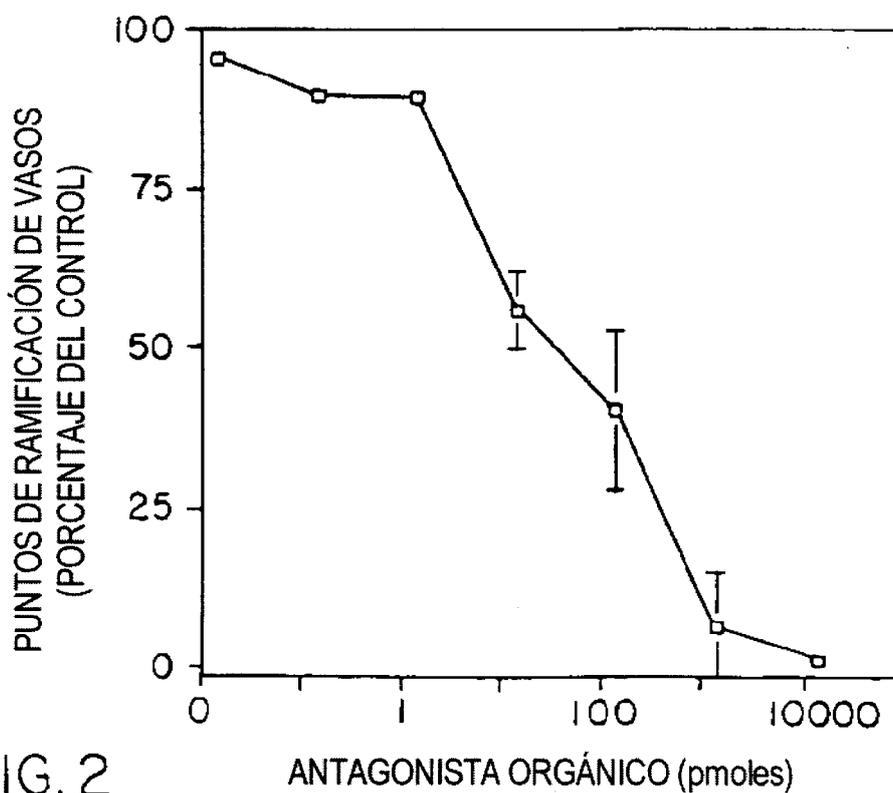


FIG. 2

ES 2 322 723 T3

LISTA DE SECUENCIAS

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA

5 <120> MÉTODOS PARA DETECTAR E INHIBIR ANGIOGÉNESIS

<130> 6627PCTVARNER11

<140> PCT

10 <141> 07-05-1999

<150> 60/084,850

<151> 08-05-1998

15

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 2.0

20

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

25

<213> Secuencia Artificial

<220>

30

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 1

Cys Arg Arg Glu Thr Ala Trp Ala Cys

35

1

5

<210> 2

<211> 9

40

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45

<223> Descripción de la Secuencia Artificial: PÉPTIDO SINTÉTICO

<400> 2

Cys Ala Thr Ala Glu Arg Trp Arg Cys

50

1

5

55

60

65