

Inhibición del crecimiento tumoral en ratones induciendo coagulación selectiva de los vasos tumorales

Inhibition of tumor growth in mice by selective coagulation of tumor vessels

Federico Ludwig Herrera Alemán*

RESUMEN. El presente estudio se basó en el hecho de que el factor tisular (TF), la proteína humana inductora de la coagulación es el principal disparador de la coagulación sanguínea. El objetivo de este trabajo fue demostrar en un modelo animal la factibilidad de tratar tumores sólidos humanos activando la coagulación e inhibiendo el crecimiento tumoral mediante infarto del mismo. Demostrar que el factor tisular truncado (tTF) recupera su capacidad inductora de la coagulación *In vitro* como *In vivo* y que fusionado al péptido RGD (tTF-RGD) en su carbono terminal hace blanco en marcadores de la angiogenesis presentes en el endotelio vascular tumoral no así en tejidos normales, como un novedoso abordaje en cáncer. Utilizando para la investigación dos líneas tumorales humanas (M21 y CCL-185) xenotransplantadas cada una en grupos de 24 ratones cada vez y distribuidos en grupos de 8 cada uno para las terapias con tTF-RGD, tTF y solución salina, respectivamente; En conclusión este trabajo muestra por primera vez que la caracterización espe-

cífica del tTF-RGD en su carbono terminal le permite activar la coagulación selectiva, trombosis e infarto del tejido tumoral, inhibiendo en 100% el crecimiento de tumores humanos en ratones y sin efectos adversos significativos.

Palabras clave: Coagulación Sanguínea. Integrinas. Neoplasia. Patología. Trombosis.

ABSTRACT. The present study focussed on the fact that the human coagulation inducing protein Tissue Factor is the major initiator of blood coagulation. The aim of this work was to demonstrate the feasibility of treating human solid tumors by targeted human truncated tissue factor (tTF) on tumor vascular endothelium in a mouse model. To demonstrate that the tTF fused protein on his terminal carbon (tTF-RGD) activates coagulation in tumor vasculature *In vitro* and *In vivo* leading to inhibition of tumor growth with the subsequent necrosis and infarction of the tumor tissue by selectively targeted natural markers in angiogenesis which are high expressed in endothelial tumoral cells but not in normal tissues. Using for the experiment two different human cancer cell lines distributed in two groups of 24 mice each and later in 3 groups of 8 mice for therapies with tTF-RGD, tTF and saline

* Médico Hemató-Oncólogo.

Este trabajo fue aceptado por el Decanato de Medicina de la Universidad de Muenster, Alemania y defendido como Tesis doctoral, con el resultado final "Cum-laude", Universidad Westfálica de Muenster, Departamento de Medicina Interna Hematología-Oncología, Unidad de Angiogenesis Muenster-Alemania.
Dirigir Correspondencia a: dirección postal: Marsilius Str. 87, 50937 Colonia-Alemania, Tel 02351 4320046. Correo electrónico e-mail; fludwig05@yahoo.de

solution, respectively; In Conclusion this work shows for the first time that characterization of tTF-RGD on his terminal Carbon allows the protein the effective inhibition of human tumor growth (100%) targeting tTF-RGD fused protein to natural markers of angiogenesis in tumor endothelial cells by means of selective intraluminal blood coagulation in the tumor vasculature without side effects.

Keywords: Blood Coagulation. Integrins. Neoplasm. Pathology. Thrombosis.

INTRODUCCIÓN

A partir de los años 90 el mundo médico científico dirigió las investigaciones contra el cáncer basados en nuevas y novedosas terapias enfocadas a interrumpir el proceso de la angiogenesis tumoral endotelial, impidiendo o interrumpiendo la formación de nuevos vasos. También se realizaron investigaciones que alteraban o destruían, los vasos ya formados, con la subsiguiente necrosis e infarto de tumores sólidos, así como, se estudio el rol de la angiogenesis en tumores no sólidos. La neovascularización es necesaria para la expansión constante del tumor debido a que es el proceso que provee de suficientes nutrientes y oxígeno, así como para la eliminación de productos de desecho. Un fenotipo angiogénico es el requerimiento absoluto para la progresión tumoral.¹⁻³ El factor tisular es el disparador de la cascada de la coagulación en forma fisiológica, basados en este principio los investigadores han logrado hacer blanco con una forma acortada del factor tisular (tTF) en marcadores naturales de las células endoteliales tumorales, generando así la activación selectiva de la coagulación sanguínea en los vasos tumorales, con la subsiguiente necrosis tumoral como un manejo alternativo y novedoso.⁴⁻⁷ El propósito de este trabajo fue demostrar en un modelo animal la factibilidad de tratar tumores sólidos humanos activando la coagulación e inhibiendo el crecimiento tumoral mediante infarto del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de investigación del Departamento de Medicina Interna Hematología-Oncología Unidad de Angiogénesis, de la Universidad

de Muenster-Alemania, durante un período de 3 años entre el 2000 y el 2003.

Líneas celulares y anticuerpos

El adenocarcinoma bronco pulmonar (CCL185) ya descrito⁸ y las células de Melanoma descritas fueron una cortesía del Dr. Silletti, Universidad de California San Diego USA. Anticuerpos anti factor tisular obtenidos por Diagnostic international (Karlsdorf, Germany), la integrina $\alpha_v\beta_3$ y el péptido GRGDSP fueron obtenidos por Chemicon (Temecula, California, USA).

Expresión, purificación y caracterización del tTF y del tTF-RGD

El código de c-DNA del tTF 1-218 y tTF-GRGDAHA 1-218, fueron amplificados por PCR (reacción en cadena de la polimerasa). La secuencia RGD fue ligada al carbono terminal del factor tisular truncado (tTF), esto le permite al tTF-RGD adoptar una orientación perpendicular a la membrana de fosfolípidos de la célula similar al factor tisular nativo (TF). El tTF y tTF-RGD fueron analizados por SDS-PAGE y Western blot. Ver esquema de la unión del tTF-RGD a las integrinas en las células endoteliales en la figura No. 1.

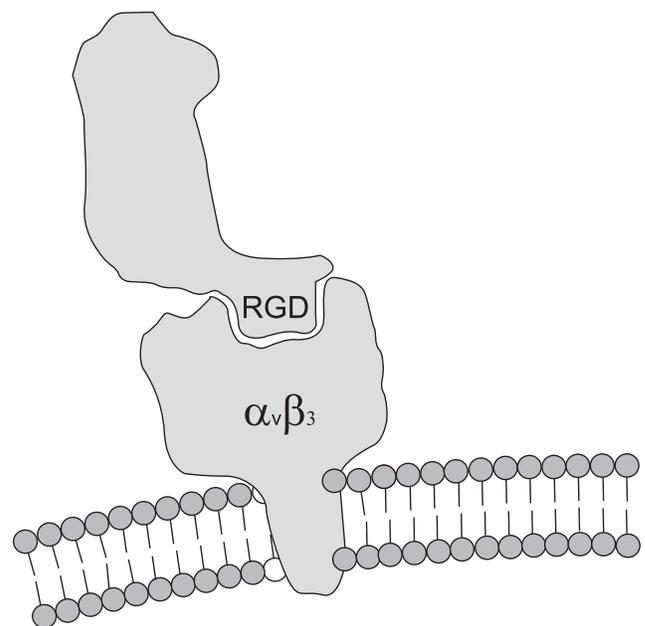


Figura No. 1. Células endoteliales tumorales. Representación esquemática de la unión del tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La $\alpha_v\beta_3$ es expresada selectivamente en alta densidad en las células endoteliales tumorales, pero no en células quiescentes en el tejido normal.

Activación del factor X por tTF y tTF-RGD

La habilidad del tTF y del tTF-RGD para generar la activación proteolítica específica del factor X por el factor VIIa, fue medida de acuerdo a lo ya descrito por Ruf et al.⁹ La constante de disociación aparente (Kd) fue determinada de acuerdo a Stone et al.¹⁰ La Kd fue determinada calculando el FVIIa ligado y no ligado. La actividad del tTF-RGD ligado a células endoteliales micro vasculares (MVEC) fue determinado in vitro usando un test cromogénico para detectar el FXa descrito por Ran et al.⁵

Estudio del receptor purificado y de la unión por citometría de flujo FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)

La unión del tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$ (Chemicon) purificado e inmovilizado, fue analizado con prueba de ELISA (enzyme linked immunoadsorbent assay) técnica descrita antes (11). Los pasos de unión fueron realizados en ausencia y presencia del péptido sintético GRGDSP (Chemicon) como liganda competitiva, tratando de mostrar la especificidad de esta interacción. Subsiguientemente, la unión específica del tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$ en las células endoteliales fue evaluada. En este punto, la diferenciación de la unión con tTF y tTF-RGD biotinilado en células endoteliales en suspensión, fue evaluada mediante FACS. La ficoeritrina-estreptoavidina fue utilizada para detectar la proteína unida.

Modelos Tumorales Xenotransplantados

Todos los procedimientos en animales fueron realizados de acuerdo con las regulaciones alemanas (Tierversuchsgesetz § 8 Abs. 2) y aprobadas específicamente en términos de la licencia del proyecto en las instalaciones de la Universidad Clínica de Muenster, Departamento de Medicina Interna hematología-oncología unidad de angiogenesis.

Células en suspensión (2×10^6 en 100 μ l) del adenocarcinoma humano de pulmón (CCL185) o del melanoma humano (M21) fueron inyectadas subcutáneamente (s.c.) en el flanco anterior derecho de ratones (male BALB/c nude) de entre 9-12 semanas de edad.

Se permitió el crecimiento tumoral en los ratones hasta volúmenes aproximados de 50-100 mm³ (CCL185) y 500-700 mm³ (M21) respectivamente (Grupos de 28 ratones cada uno). En este punto, los ratones fueron asignados al azar en diferentes grupos de experimentación (Grupos de 8 ratones). El primer grupo recibió NaCl 0.9% (100 μ l),

el segundo grupo tTF 30 μ g en 100 μ l NaCl) y el tercer grupo tTF-RGD 30 μ g en 100 μ l NaCl, en inyecciones endovenosas en la cola de los ratones (enmascarado). Dependiendo de la cinética de crecimiento tumoral, las inyecciones fueron repetidas dos veces por semana en cinco dosis para CCL185 y cada día en un total de cinco dosis para M21, repitiendo el mismo experimento dos veces para cada línea celular tumoral.

El tamaño del tumor *In Vivo* fue evaluado usando un pie de rey, midiendo lo largo y lo ancho y desconociendo el tipo de tratamiento de cada uno (enmascarado). El volumen del tumor fue calculado usando la fórmula estándar ($\text{largo} \times \text{ancho}^2 \times \pi/6$). De acuerdo a la licencia del proyecto, los animales fueron sacrificados cuando los tumores fueron demasiado grandes, si los ratones perdieron más del 20% del peso corporal o al presentar signos de dolor.

Fotos representativas de los órganos de los animales y los tumores fueron tomadas al final de cada experimento (datos no mostrados). Después, los ratones fueron sacrificados mediante dislocación cervical y bajo anestesia profunda con CO₂ de acuerdo con los estándares de regulación y licencia del proyecto.

La exsanguinación inmediata fue lograda con NaCl 0.9% más soluciones heparinizadas inyectadas directamente en el ventrículo cardíaco izquierdo, previa disección de ambas venas femorales derecha e izquierda. Los tumores y órganos (corazón, pulmón, hígado, riñón) fueron extraídos y fijados en formalina al 4% antes de ser embebidos en parafina.

Para los estudios de toxicidad, un grupo extra de animales fueron inyectados con una sobredosis de tTF-RGD (50 μ g) examinando luego el corazón, pulmón, riñón e hígado, por signos de trombosis a la hora, a las 4 horas y 24 horas después de la inyección en iguales condiciones.

Histología

Los análisis histológicos fueron realizados como ya descritos.¹² Resumidamente, el corazón, pulmón, riñón e hígado, fueron extraídos 1 hora, 4 horas y 24 horas después de la inyección de 2.0mg/Kg./peso corporal de tTF-RGD, tTF y solución salina para evaluar la toxicidad del tratamiento. Fijados en formalina al 4% y embebidos en parafina para luego hacer cortes de 4 μ m y transferirlos a lámi-

nas de vidrio. Por lo menos 10 cortes por muestra fueron disponibles para evaluación. Los cortes fueron teñidos con hematoxilina-eosina (H&E) y analizados utilizando un microscopio de luz convencional por signos de necrosis y trombosis en análisis enmascarado. La trombosis sanguínea fue definida como la oclusión completa o incompleta de los vasos intratumorales con presentación de glóbulos rojos empacados.

Para evaluar el efecto del tratamiento, se realizó el mismo procedimiento arriba descrito, con órganos y tumores después de finalizado el tratamiento; fijados en formalina al 4%, embebidos en parafina, finalmente cortes de 4µm para ser teñidos en H&E y buscar bajo microscopio indicios de trombosis y necrosis.

Análisis Estadísticos

Los datos fueron trabajados como media y rangos intercuartiles. Las diferencias en los rangos de crecimiento de los tumores en ratones tratados con tTF-RGD y ratones controles (tTF o NaCl) fueron probados por significancia estadística usando un test no paramétrico (Mann-Whitney rank sum test) para muestras independientes que no asume que el tamaño del tumor sea de distribución normal. Los valores de P de 0.05 o menos fueron considerados significativos. En las gráficas de crecimiento tumoral, los resultados son presentados como media, desviación estándar (SD) y error estándar.

RESULTADOS

Caracterización funcional del tTF y del tTF-RGD

La habilidad del tTF y del tTF-RGD para producir la activación proteolítica específica del factor X (FX) por el factor VIIa (FVIIa) es demostrada por el análisis de Michaelis-Menten. La constante de Michaelis calculada (Km) para el tTF y el tTF-RGD estuvo dentro del rango de 0.15 nM como ha sido reportado en la literatura⁹ (análisis no mostrado). Además la unión de la secuencia del péptido RGD al carbono terminal del tTF no afectó su actividad funcional. Pueden observarse los resultados de la unión del tTF-RGD de hasta 1,4 mOD (densitometría óptica) y los resultados mínimos obtenidos por el tTF. Mostrando así la capacidad de unión del tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La diferencia en la unión entre tTF-RGD y tTF fue significativa ($p < 0.001$) Mann-Whitney-Test (Datos no presentados).

En la figura No. 2b podemos observar la especificidad de la unión del tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$ por saturación, la cual fue del 100 % en comparación con 10 % y 5 % del tTF-RGD inhibido con el péptido sintético GRGDSP en cantidades de 1 mM y 10 mM (micromolar) respectivamente. Demostrando así la dependencia de la fusión del tTF-RGD para la unión a la $\alpha_v\beta_3$. $p < 0.001$, Mann-Whitney test (Datos no presentados).

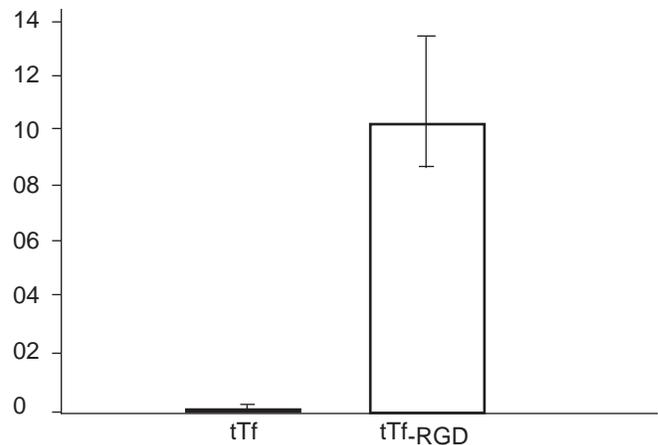


Figura No. 2 A. Unión del tTF y tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La unión de 0.1µM tTF, tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$ inmovilizada, fue detectada con un anticuerpo policlonal contra TF humano mediante ELISA. Los resultados son presentados como media y rango con intercuartiles. La diferencia en la unión entre tTF-RGD y tTF fue significativa ($p < 0.001$, Mann-Whitney-Test). (Datos no presentados).

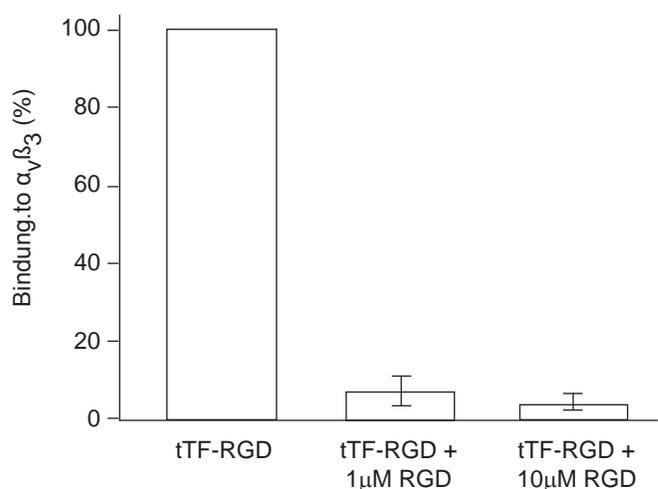


Figura No. 2 B. Especificidad de la unión del tTF-RGD a la integrina $\alpha_v\beta_3$. La unión de tTF-RGD (1µM) a la $\alpha_v\beta_3$ inmovilizada fue significativamente inhibida por el péptido sintético GRGDSP ($p < 0.001$, Mann-Whitney test) para ambas concentraciones de péptidos RGD (datos no presentados).

Estudio de la unión del tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$ In Vitro.

La unión específica del tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$ inmóvil es presentada en un experimento de unión al receptor purificado (figuras 4 a-b). La unión de nuestra proteína fusionada a la $\alpha_v\beta_3$ inmóvil fue dosis dependiente y saturable. La especificidad de la interacción de dependencia del RGD es regulada por la competencia fría usando el péptido sintético GRGDSP. En presencia de 10-100 folios de molaridad en exceso del péptido sintético RGD no marcado, nuestra proteína fusionada mostró una capacidad no significativa de unión a la $\alpha_v\beta_3$, confirmando la selectividad del péptido. (Figura No. 2 A-B).

Subsiguientemente, la unión específica del tTF-RGD a los receptores en las células endoteliales (MVEC) fue evaluada por FACS. La diferenciación de unión del tTF y tTF-RGD biotinilado en células endoteliales en suspensión se muestra en la gráfica 5A. Como resultado, la medición de la intensidad de fluorescencia fue ocho folios más alta para tTF-RGD comparado a tTF. Más aun, la unión de 0,1 μM tTF-RGD a las células endoteliales fue reducida en un 75 % en presencia de 1 μM del péptido sintético GRGDSP. Estos resultados muestran la dependencia del RGD en la fusión del tTF-RGD a los receptores en las células endoteliales tales como las integrinas $\alpha_v\beta_3$ o $\alpha_v\beta_5$. (Ver figura No. 3 A-B).

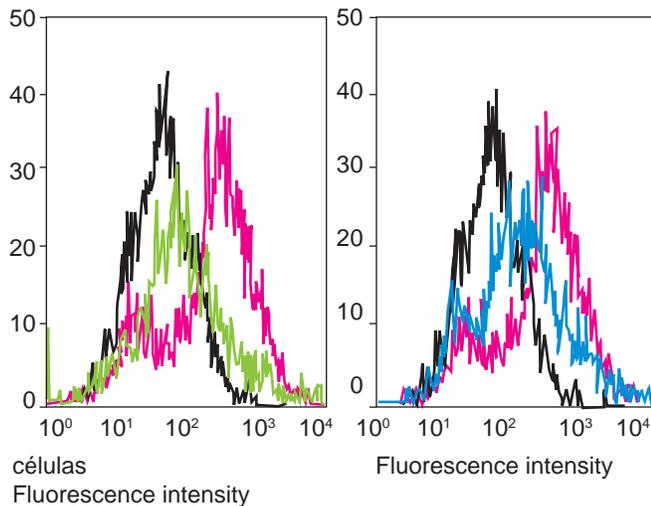
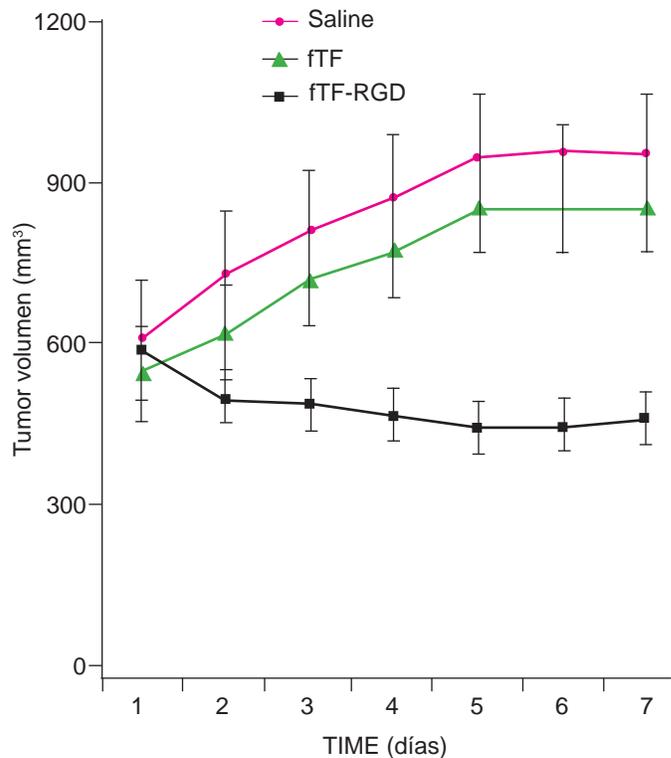


Figura No. 3 Gráfica de la unión del tTF y tTF-RGD a las células endoteliales humanas (HUVEC). A) Análisis con FACS de las células endoteliales que fueron incubadas 2) con 0,1 μM tTF 3) con 0,1 μM tTF-RGD. Por 60 min. a 4°C B) Con la adición de 1 μM GRGDSP, la unión del tTF-RGD fusionado a células endoteliales se redujo en un 75% debido a inhibición competitiva 4). La línea 1 en A y B muestra los controles negativos.

Actividad antitumoral del tTF-RGD en el Melanoma humano

La actividad antitumoral del tTF-RGD fue determinada en ratones BALB/c nude, cargando tumores de entre 300-700 mm^3 con células de melanoma (M21). Los controles y el tTF-RGD fueron administrados i.v., cinco veces a intervalos de 24 horas. El resultado conjunto de dos experimentos independientes cada uno con un total de 24 ratones repartidos en grupos de 8 es presentado en la Figura No. 4).

Durante el tratamiento, los tumores mostraron signos macroscópicos de necrosis antes de las 24 horas del inicio de tratamiento, similar a los resultados de otros grupos.^{4,7} Además, los estudios histológicos revelaron cantidades substanciales de vasos tumorales que estaban trombosados, con-



(Figura No. 4) Gráfica de la actividad anti-tumoral del tTF-RGD en el crecimiento de tumores (M21) en ratones. La actividad anti-tumoral del tTF-RGD fusionado fue determinado en BALB/c nude mice cargando tumores de 400-700 mm^3 para Melanoma 21. Los controles y el tTF-RGD fueron administrados i.v. cinco veces, a intervalos de 24 horas. El crecimiento tumoral al cuarto día de tratamiento fue significativamente retardado ($P=0,005$) en comparación con tTF y solución salina. El peso tumoral en el grupo tratado con tTF-RGD fue significativamente menor ($P=0,005$) (Datos no mostrados).

firmando la impresión macroscópica de necrosis tumoral masiva.

La alta selectividad del tTF-RGD para los vasos tumorales, es demostrada por el hecho de que la trombosis y necrosis visible, no ocurrió en tejidos normales como el corazón, riñón, hígado y pulmón.

Actividad anti-tumoral del tTF-RGD en el crecimiento de tumores CCL185 en ratones

Determinamos la actividad antitumoral de la proteína tTF-RGD en ratones BALB/c/nude, cargando 100 mm³ del tumor CCL185. Debido al crecimiento lento del tumor en el experimento, la proteína fusionada y los controles fueron administrados cinco veces a intervalos de 3-4 días. El resultado conjunto de dos experimentos independientes con un total de 24 ratones repartidos en grupos de 8 son presentados en la Figura No. 5).

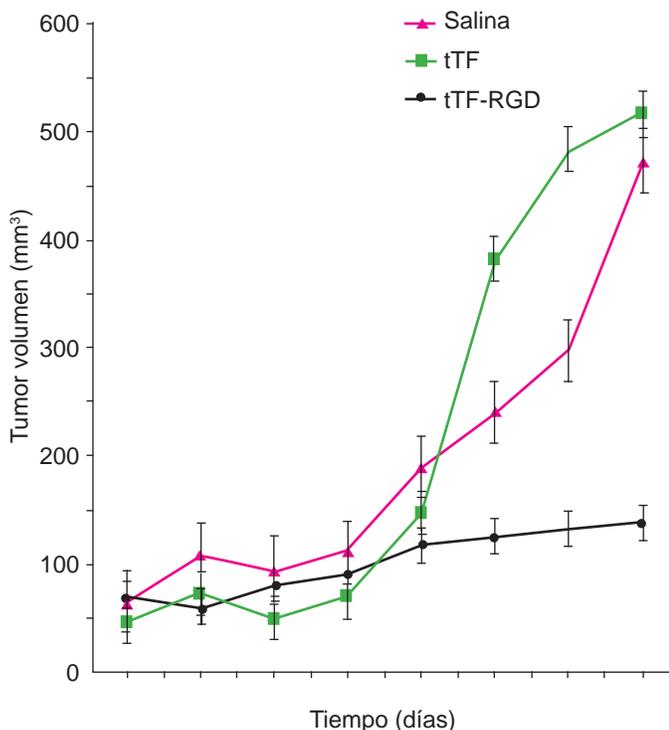


Figura No. 5. Gráfica de la actividad anti-tumoral del tTF-RGD en los tumores CCL-185. La actividad antitumoral del tTF-RGD fusionado, fue determinado en BALB/c nude mice, cargando tumores entre 50 - 100 mm³ (CCL185). La proteína y los controles fueron administrados a intervalos de 3-4 días. Después de la cuarta inyección, pudimos mostrar una inhibición significativa del crecimiento tumoral en comparación a los grupos control P = 0,005.

Todos los animales fueron histológica y microscópicamente analizados después del tratamiento. Los ratones en el grupo control (tTF y NaCl) no mostraron signos de trombosis, tampoco necrosis (ver foto en Figura No. 6).

Los estudios microscópicos revelaron necrosis y muerte del tejido tumoral (ver foto en Figura No. 7 A-B). La alta selectividad del tTF-RGD para los vasos tumorales es demostrada por el hecho de que no ocurrió trombosis ni necrosis visible en tejidos normales como el corazón, riñón, hígado y pulmón (ver foto en Figura No. 7 C-D). Para probar el modo de acción, de que la oclusión trombótica realmente ocurre, el siguiente experimento fue realizado: La línea celular humana de melanoma (M-21) fue inyectado en el flanco de dos ratones (balb/c/nude mice) después que los tumores alcanzaron volúmenes de aproximadamente 500 mm³, se inyectaron 2.0 mg/kg/peso corporal de tTF-RGD ó 0,9 % NaCl iv. en la cola. Ver foto

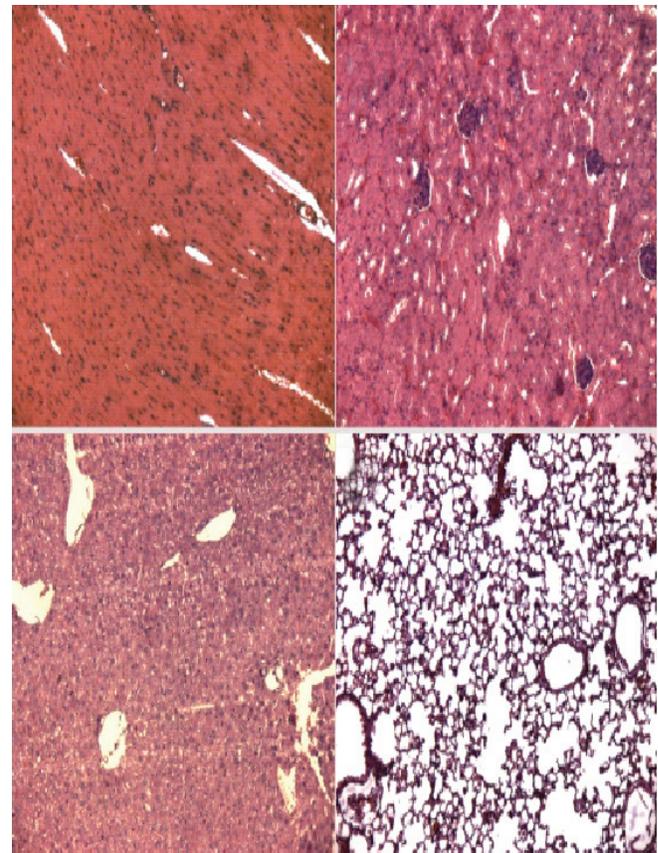


Figura No. 6. Foto representativa en H&E de cortes de corazón (A), riñón (B), hígado (C) y pulmón (D). 1 hora después de inyectar 4 mg/kg/peso corporal de tTF-RGD en los ratones. No se observó trombosis o necrosis visible en los distintos órganos. (Magnificación x 200).

del tumor en el ratón después de 20 minutos de inyectar el tTF-RGD (izquierda) y NaCl 0.9 % (derecha) respectivamente. (Ver Figura No. 8 A).

El tumor se encogió y tornó negro, indicando necrosis tumoral masiva después de la inyección del tTF-RGD.

Los ratones fueron sacrificados 60 minutos después de la inyección y se extrajo el tumor para estudio histológico. Podemos observar áreas de hemorragia en los ratones con tumores tratados con tTF-RGD, en contraste con la apariencia vital de los ratones con tumores tratados con solución salina (Figura No. 8 B-C).

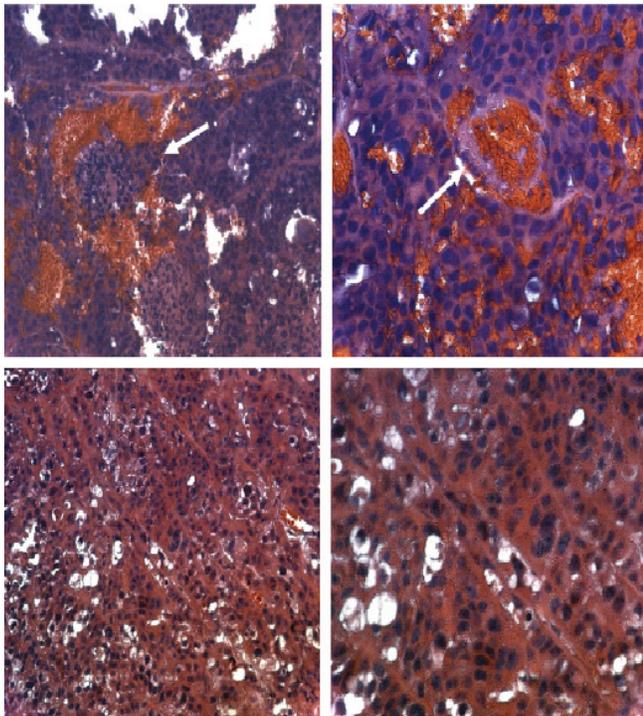


Figura No. 7. Foto representativa en hematoxilina / eosina (H&E), cortes del melanoma maligno en ratones cargando el tumor; 1 hora después de haber inyectado tTF-RGD (A y B) y NaCl (C y D) i.v. en la cola de los ratones. Los vasos sanguíneos en los tumores tratados con tTF-RGD aparecen trombosados (ver flechas). En el área que rodea la oclusión, puede observarse extensa necrosis de las células tumorales. No así los tumores tratados con NaCl. Las fotos son de áreas representativas del tumor (A y C: aumento x 200; B y D aumento x 400).



Figura No. 8. Foto representativa del melanoma maligno A) en ratones, 20 minutos después de inyectar el tTF-RGD (izquierda) y 0.9 % NaCl (derecha) respectivamente. El tumor se encogió y tornó negro (izquierda), indicando la aparente necrosis tumoral masiva después de inyectar tTF-RGD. B) muestra áreas de hemorragia en el tumor de los ratones tratados con tTF-RGD, en contraste con la apariencia vital de los ratones con tumores tratados con solución salina al 0.9 % (NaCl) (C).

DISCUSIÓN

En publicación reciente definimos y describimos con detalle los mecanismos de algunas de las nuevas terapias en cáncer, específicamente aquellas que hacen blanco del Factor Tisular en receptores específicos situados en el endotelio vascular tumoral.¹³

Los reportes iniciales sobre la inducción selectiva de trombosis intratumoral usando tTF fusionado a anticuerpos o fragmento de anticuerpos dirigidos a marcadores naturales o artificiales de la angiogenesis tumoral, mostraron una eficacia impresionante en términos de inhibición del crecimiento tumoral. El primer reporte por Huang et al,⁴ con la inducción dirigida de la coagulación sanguínea intraluminal en vasos tumorales y usando un marcador artificial de la angiogenesis generó gran interés por ver si

la misma estrategia podría ser utilizada en modelos tumorales transportando marcadores naturales de la angiogénesis. El segundo reporte con esta estrategia haciendo blanco del VCAM-1 fue menos impresionante, pues sólo observó un 50 % de reducción del crecimiento tumoral.⁵ El tercer reporte por Nilson et al,⁶ haciendo blanco de la secuencia del dominio ED-B de la fibronectina en vasos tumorales con crecimiento agresivo, observó una erradicación completa del tumor en un 30 % de los ratones tratados, finalmente, los animales no fueron curados.

Un cuarto reporte por Peisheng Hu et al¹⁴ muestra los resultados de 3 proteínas distintas fusionadas al Factor Tisular que inducen trombosis de los vasos tumorales; el chTNT-3/tTF que hace blanco en los antígenos expuestos en áreas necróticas del tumor, el chTV-1/tTF hace blanco en un antígeno vascular, la fibronectina y el RGD/tTF similar a la proteína fusionada construida en nuestro estudio.

Comparando las tres estrategias haciendo blanco con el tTF en áreas tumorales, el autor demostró que el chTNT-3 y el chTV-1 fueron encontrados los vehículos más efectivos. Interesantemente el RGD/tTF por si mismo no generó un efecto anti-tumoral significativo. Los autores explican esto por el hecho de que el receptor para el RGD, la $\alpha_v\beta_3$, es mayormente asociada a células endoteliales durante su génesis, sabiendo que esto ocurre principalmente en capilares y pequeños vasos recién formados y no en vasos maduros y de mayor tamaño. Más aún, ellos mantienen que los receptores del RGD tienen una muy baja afinidad por la liganda en comparación con interacciones antígeno-anticuerpo, explicando así los resultados menos impresionantes obtenidos con dicha proteína.¹⁴

Los anticuerpos pegados a proteínas dependen altamente de la formulación apropiada, para prevenir agregados proteicos asociados a efectos adversos. Más aún, estos estudios no eliminan los efectos adversos causados por reacciones inmunológicas y hasta aquí, tampoco las proteínas con anticuerpos pegados al tTF han sido evaluadas en animales no inmunocomprometidos. Candidatos prometedores para hacer blanco con el tTF a la vascularidad tumoral sin las contrariedades mencionadas arriba, incluyen fusiones con péptidos pequeños y selectivos para los marcadores naturales del endotelio tumoral.¹⁵ Las integrinas $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ así como otras, han sido identificadas como marcadores del endotelio activado y parecen jugar un rol crucial en el desarrollo y angiogénesis tumoral.¹⁶⁻²⁰ Las proteínas fusio-

nadas al RGD, que se pegan a estas ligandas endoteliales han sido identificadas como agentes prometedores para hacer blanco en el endotelio tumoral.⁸ El tamaño pequeño tamaño del RGD en comparación con los anticuerpos previamente mencionados y fusionados al tTF repercutió en importantes ventajas.

En este estudio mostramos la habilidad del tTF y el tTF-RGD de provocar la activación proteolítica específica del FX por el FVIIa. La constante de Michaelis (Km) para el tTF y el tTF-RGD está dentro del rango de 0,15 nM, como ha sido reportado en la literatura, demostrando la eficacia de nuestro tTF para activar la coagulación. La unión específica del tTF-RGD en su mayor parte a la $\alpha_v\beta_3$ inmóvil, es mostrada con el método de unión al receptor purificado. La unión fue dosis dependiente y saturable. La especificidad de la interacción dependiente del RGD es marcada por competitividad usando el péptido sintético GRGDSP. En presencia de 10-100 folios de molaridad en exceso del péptido RDG sintético no marcado, nuestra proteína fusionada mostró una capacidad de unión a la $\alpha_v\beta_3$ no significativa, sugiriendo así la especificidad de unión del tTF-RGD a la $\alpha_v\beta_3$.

La actividad anti-tumoral del tTF-RGD fue determinada en ratones (BALB/c nude mice) cargando tumores M21 (melanoma maligno) de entre 500-700 mm³ y tumores CCL-185 (cáncer pulmonar) de entre 50-100 mm³. El crecimiento tumoral fue inhibido significativamente en comparación con los tratamientos con tTF únicamente y solución salina. Más aún, el peso de los tumores fue significativamente más bajo en los grupos tratados con tTF-RGD en comparación con los grupos control. Los grupos controles no mostraron ninguna diferencia con significancia estadística en el tratamiento con el factor tisular (tTF) únicamente o con solución salina, tampoco signos de oclusión vascular o necrosis. Confirmando que es necesario hacer blanco con el tTF-RGD para el efecto anti-tumoral. En nuestro estudio, la inyección de la proteína fusionada tTF-RGD a través de las venas de la cola de los ratones muestra la eficacia de esta in vivo sin efectos adversos significativos.

La inhibición efectiva del crecimiento tumoral puede ser explicada por el hecho de que los receptores para el RGD, las ligandas $\alpha_v\beta_3$ y $\alpha_v\beta_5$ están asociados con células endoteliales en fase de angiogénesis. Más aun, porque para un efecto óptimo, el tTF necesita hacer blanco en la superficie luminal del endotelio tumoral en todas las regiones de

la masa tumoral, debido a que la activación plaquetaria, la interacción de factores de la coagulación, o ambas ocurren más eficientemente en la pared luminal.²⁰ El mecanismo de trombosis vascular con el reagente es claramente entendido ya que los receptores para el RGD están localizados sobre la pared luminal de los vasos tumorales.^{5,6}

De acuerdo a lo anterior y basados en la estructura de cristal del complejo tTF-FVIIa ya conocida,²¹ la fusión del RGD con el tTF permite que el tTF-RGD adopte una orientación perpendicular a la membrana de fosfolípidos del endotelio celular, similar a la forma nativa del TF. Por otro lado, la fusión del péptido al carbono terminal del tTF, no resulta en una reacción estéril para la interacción del tTF con el FVIIa y su substrato el Factor X (FX), como si parece ser el caso para RGD-tTF de Hu et al¹⁴ donde el péptido es fusionado al amino proximal del tTF. Por ello, el tTF-RGD es expresado de tal forma que el péptido continúe ligado al carbono terminal del tTF.

Nuestro estudio muestra en un 100% la inhibición selectiva in vivo de tumores humanos xenotransplantados en ratones y tratados en forma endovenosa con la proteína tTF-RGD, como una novedosa terapia en cáncer así como la efectiva activación de la coagulación por el factor tisular en su forma inactiva (tTF) al hacer contacto con la superficie endotelial. También mostramos la efectividad de la proteína fusionada en su carbono terminal (tTF-RGD) para pegarse a sus receptores (las integrinas) in vitro y in vivo en el endotelio vascular tumoral no así en tejidos sanos.

Todavía hay mucho que investigar, hacen falta estudios con marcadores naturales tumorales más efectivos, más selectivos y mejorar los resultados en el tratamiento de cáncer así como iniciar fases clínicas de investigación con aquellos abordajes prometedores. Dichas moléculas podrían ser también utilizadas para hacer blanco selectivo con agentes citotóxicos como la Doxurubicina en el tejido endotelial tumoral y no únicamente las células tumorales, potenciando así el efecto anti-tumoral.

El presente estudio fue aceptado por el decanato de Medicina de la Universidad de Muenster y defendido por su servidor como Tesis doctoral, con el resultado final "Cum laude", Universidad Westfálica de Muenster, departamento de Medicina interna hematología-oncología, unidad de Angiogenesis Muenster-Alemania.

Agradecimiento a todos los que directa e indirectamente colaboraron con este proyecto, durante el periodo 2000 – 2003, principalmente a: Dra. Teresa Padró, Sandra Ruiz, Dr. Wolfgang E. Berdel, PhD. Dr. Rolf M. Mesters, Westfaelische Wilhelm Universitaet Muenster, Alemania.

Abreviaciones utilizadas;

c-DNA	complemento de ADN
CCL-185	Células de adenocarcinoma de pulmón
Elisa	Enzyme linked immunoadsorbent assay
FX	Factor X de la coagulación
FVIIa	Factor FVIIa
Kd	Constante de disociación
FACS	Fluorescence activated cell sorting
H&E	Hematoxilina-eosina
MVEC	Células endoteliales de ratón
M-21	Células de Melanoma
HUVEC	Células endoteliales humanas
mOD	Densitometría óptica
mM	Micromolar
nM	Nanomolar
NaCl	Cloruro de sodio
PCR	Cadena de reacción de polimerasa
SD	Desviación estandar
tTF	Factor tisular truncado
tTF-RGD	Péptido RGD unido al tTF

REFERENCIAS

- 1.- Padró T, Bieker R, Ruiz S, Steins M, Retzlaff S, Bürger H, Büchner T, Kessler T, Herrera F, Kienast J, Müller-Tidow C, Serve H, Berdel WE, and Mesters RM. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its cellular receptor KDR (VEGFR-2) in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1302-1310.
- 2.- Bieker R, Padró T, Kramer J, Steins M, Kessler T, Retzlaff S, Herrera F, Kienast J, Berdel WE, Mesters RM. Overexpression of basic fibroblast growth factor and autocrine stimulation in acute myeloid leukemia. *Cancer Research* Nov 2003; 1:63;7241-7246.
- 3.- Folkman J, Watson K, Ingber D, and Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339: 58-61.
- 4.- Huang X, Molema G, King S, Watkins L, Edgington T. S, and Thorpe P. E. Tumor infarction in mice by antibody-directed

- targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Science* 1997; 275: 547-550.
- 5.- Ran S, Gao B, Duffy S, Watkins L, Rote N, and Thorpe P E. Infarction of solid Hodgkin's tumors in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature. *Cancer Res* 1998; 58: 4646-4653.
 - 6.- Nilsson F, Kosmehl, H, Zardi L, and Neri, D. Targeted delivery of tissue factor to the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, mediates the infarction of solid tumors in mice. *Cancer Res* 2001; 61: 711-716.
 - 7.- Liu C, Huang H, Donate F, Dickinson C, Santucci R, El-Sheikh A, Vessella R, and Edgington T S. Prostate-specific membrane antigen directed selective thrombotic infarction of tumors. *Cancer Res* 2002; 62: 5470-5475.
 - 8.- Topp M S, Koenigsmann M, Mire-Sluis A, Oberberg D, Eitelbach F, von Marschall Z, Notter M, Reufi B, Stein H, Thiel E, and Berde, W E. Recombinant human interleukin-4 inhibits growth of some human lung tumor cell lines in vitro and in vivo. *Blood* 1993; 82: 2837-2844.
 - 9.- Ruf W, Rehemtulla A, Morrissey J H, and Edgington, T S. Phospholipid-independent and -dependent interactions required for tissue factor receptor and cofactor function. *J Biol Chem* 1991; 266: 16256.
 - 10.- Stone M. J, Ruf W, Miles D J, Edgington T S, and Wright P E. Recombinant soluble human tissue factor secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and refolded from *Escherichia coli* inclusion bodies: glycosylation of mutants, activity and physical characterization. *Biochem J*, 1995; 310 (Pt 2): 605-614.
 - 11.- Silletti S, Kessler, T, Goldberg J, Boger D L, and Cheresch D A. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha v beta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 119-124.
 - 12.- Padro T, Ruiz S, Bieker R, Burger H, Steins M, Kienast J, Buchner T, Berdel W E, and Mesters R M. Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000; 95: 2637-2644.
 - 13.- Herrera F, y Contreras CR, Nuevos Abordajes en Cancer dirigiendo el Factor Tisular a blancos vasculares tumorales. *Revista Médica hondurena* 2004; 72:145-154.
 - 14.- Peisheng Hu, Jianghua Yan, Jahangir Sharifi, Thomas Bai, Leslie A, Khawli and Alan L Epstein, Comparison of Three Different Targeted Tissue Factor Fusion Proteins for inducing Tumor Vessel Thrombosis. *Cancer Research* 2003; 63: 5046-5053.
 - 15.- Boger D L, Goldberg J, Sillett, S, Kessler T, and Cheresch D A. Identification of a novel class of small-molecule antiangiogenic agents through the screening of combinatorial libraries which function by inhibiting the binding and localization of proteinase MMP2 to integrin alpha(V)beta(3). *J Am Chem Soc* 2001; 123: 1280-1288.
 - 16.- Reynolds L E, Wyder L, Lively J C, Taverna D, Robinson S D, Huang X, Sheppard D, Hynes R O. and Hodivala-Dilke, K. M. Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking beta3 integrin or beta3 and beta5 integrins. *Nat Med* 2002; 8: 27-34.
 - 17.- Hynes R. O. Integrins: versatility modulation and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69: 11-25.
 - 18.- Brooks P C, Clark R A, and Cheresch D A. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 1994; 264: 569-571.
 - 19.- Brooks P C, Montgomery A M, Rosenfeld M, Reisfeld R A, Hu T Klier G, and Cheresch D A. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell* 1994; 79: 1157-1164.
 - 20.- Bader B L, Rayburn H, Crowley D, and Hynes R O. Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. *Cell* 1998; 95: 507-519.
 - 21.- Morrissey J H, Macik B G., Neuenschwander, P. F., and Comp, P. C. Quantitation of activated factor VII levels in plasma using a tissue factor mutant selectively deficient in promoting factor VII activation. *Blood* 1993; 81: 734-744.