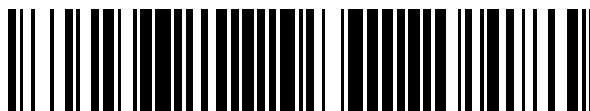


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 697**

51 Int. Cl.:

A01N 37/18 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

C07K 1/00 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07K 17/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

C12P 21/06 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

C12N 15/74 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07867921 .4**

96 Fecha de presentación: **21.12.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2124548**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.12.2009**

54 Título: **Variantes de desintegrina y usos farmacéuticos de los mismos**

30 Prioridad:
26.12.2006 US 871854 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.10.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.10.2012

73 Titular/es:
NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY (50.0%)
No. 1, Sec.4, Roosevelt Road
Taipei, TW y
NATIONAL CHENG KUNG UNIVERSITY (50.0%)

72 Inventor/es:
CHUANG, WOEI-JER;
FU, WEN-MEI;
HUANG, TUR-FU;
HUANG, WENYA;
TANG, CHIH-HSIN y
CHEN, CHIU-YUEH

74 Agente/Representante:
PÉREZ BARQUÍN, Eliana

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).

ES 2 389 697 T3

DESCRIPCIÓN

Variantes de desintegrina y usos farmacéuticos de los mismos

5 **Campo de la Invención**

La presente invención se refiere generalmente a variantes de Rhodostomina, y más específicamente a variantes de Rhodostomina como antagonistas selectivos de integrina $\alpha v \beta 3$ para el tratamiento y prevención de enfermedades asociadas con la integrina $\alpha v \beta 3$.

10

Antecedentes de la Invención

Los huesos son un tejido complejo compuesto de varios tipos de células los cuales están pasando continuamente por un proceso de renovación y reparación denominado "remodelación del hueso". Los dos tipos de células principales responsables de la remodelación del hueso son los osteoclastos, los cuales reabsorben el hueso, y los osteoblastos, los cuales forman el nuevo hueso. La remodelación del hueso ha sido conocida como que es regulada por diferentes hormonas sistémicas (por ejemplo, hormona paratiroides, 1,25-dihidroxi vitamina D₃, hormonas del sexo y calcitonina) y factores locales (por ejemplo, óxido nítrico, prostaglandinas, factores de crecimiento y citocinas) [1].

15

Las integrinas son receptores heterodiméricos de la matriz que anclan las células a los sustratos y transmiten señales derivadas externamente en la membrana del plasma [5]. La integrina $\alpha v \beta 3$ está involucrada en la reabsorción del hueso portada por los osteoclastos, tanto *in vivo* [6] como *in vitro* [7, 8]. Esta molécula de heterodímero reconoce el patrón de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD, SEQ ID NO: 2) contenido en las proteínas de matriz del hueso tales como osteopontina y sialoproteína del hueso [7, 8]. La integrina $\alpha v \beta 3$ se expresa en un osteoclasto [9] y su expresión es modulada por esteroides de reabsorción y citocinas [10]. Basados en los experimentos de bloqueo, la integrina $\alpha v \beta 3$ ha sido identificada como el receptor de adhesión funcional mayor en los osteoclastos. Los inhibidores de la integrina $\alpha v \beta 3$ reducen la capacidad de los osteoclastos para enlazarse y reabsorber el hueso [7, 11]. La integrina $\alpha v \beta 3$ juega un rol principal en la función de los osteoclastos [7, 11, 12] y los inhibidores de esta integrina han sido considerados para prevenir la osteoporosis [11], las metástasis osteolíticas [13] y la hipercalcemia inducida por las malignidades.

20

25

30

Existen varias enfermedades de los huesos que están relacionadas con la osteólisis que es portada por los osteoclastos. La osteoporosis es la más común que es inducida cuando la reabsorción y formación del hueso no están coordinadas, y la rotura del hueso ignora la construcción del hueso. La osteoporosis también es ocasionada por otras condiciones, tales como desequilibrio hormonal, enfermedades y medicamentos (por ejemplo, corticoesteroides o agentes antiepilépticos) [2]. El hueso es uno de los sitios más comunes de metástasis de cánceres de mama, próstata, pulmón y tiroides humanos, así como otros cánceres [3, 4]. La osteoporosis también puede ser el resultado de la deficiencia de estrógenos posteriores a la menopausia. La osteoporosis secundaria puede ser asociada con artritis reumatoide. Las metástasis del hueso muestran un paso único de la reabsorción del hueso osteoclástica que no se ve en las metástasis de otros órganos. Es ampliamente aceptado que la osteólisis que está asociada con el cáncer es portada esencialmente por los osteoclastos, los cuales parecen ser activados y pueden ser activados indirectamente a través de los osteoblastos o directamente por los productos del tumor [4]. Además, la hipercalcemia (concentración de calcio aumentada en la sangre) es una complicación importante de las enfermedades osteolíticas del hueso. Esto ocurre de una manera relativamente frecuente en pacientes con una destrucción extensa del hueso, y es particularmente común en carcinoma de mama, pulmón, renal, del ovario y pancreático, así como en mieloma [4].

35

40

45

Las desintegrinas son una familia de péptidos de bajo peso molecular que contienen RGD que enlaza específicamente las integrinas $\alpha IIb \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha v \beta 3$ expresadas en las plaquetas y otras células que incluyen células del endotelio vascular y algunas células de tumor [14, 15]. Además de su actividad potente antiplaquetas, los estudios de las desintegrinas han revelado nuevos usos en la diagnosis de las enfermedades cardiovasculares y el diseño de agentes terapéuticos en trombosis arterial, osteoporosis, y crecimiento del tumor relacionados con la angiogénesis y metástasis [15]. Se ha descubierto que la Rhodostomina (Rho), una desintegrina derivada del veneno de la *Colloselasma rhodostoma*, inhibe la agregación de plaquetas *in vivo* e *in vitro* [16, 17] a través del bloqueo de la glucoproteína de las plaquetas $\alpha IIb \beta 3$. Además, se reporta la Rhodostomina para inhibir la adhesión de las células de carcinoma de mama y próstata tanto en los huesos mineralizados como desmineralizados de matrices extracelulares de una manera dependiente de la dosis sin afectar la viabilidad de las células del tumor. Además, la Rhodostomina inhibe la migración e invasión de células de carcinoma de mama y próstata [18]. La Rhodostomina también ha mostrado inhibir la adipogénesis y obesidad [19]. Sin embargo, debido a que la Rhodostomina no se enlaza específicamente a las integrinas $\alpha IIb \beta 3$, $\alpha 5 \beta 1$ y $\alpha v \beta 3$, los usos farmacéuticos de la Rhodostomina ocasiona efectos

50

55

secundarios serios. Por ejemplo, cuando se aplica la Rhodostomina en el tratamiento de carcinomas, la inhibición de la agregación de plaquetas es un efecto secundario no deseable. Chang *et al.* (Biochem. J. (2001) 357, 57) describen los efectos de inserciones de alanina adyacentes al bucle RGD de Rhodostomina sobre la unión resultante a la integrina plaquetaria $\alpha\text{IIb}\beta_3$, y destaca la importancia de la posición específica del residuo Pro53 adyacente a la secuencia RGD.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de resolver estas deficiencias y faltas de adecuación, especialmente en relación con elaborar una variante de desintegrina que tenga una selectividad específica a la integrina $\alpha\text{v}\beta_3$.

Compendio de la Invención

De acuerdo con la presente invención, un aspecto de la misma es un polipéptido que es selectivo para la integrina $\alpha\text{v}\beta_3$. El polipéptido exhibe un enlace reducido a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y/o $\alpha_5\beta_1$ comparada con la desintegrina de tipo natural. El polipéptido está codificado por una secuencia de nucleótidos de Rhodostomina modificada que codifica una secuencia de aminoácidos modificada, con un enlace de integrina reducido $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y/o $\alpha_5\beta_1$. El polipéptido puede ser pegilado o conjugado con albúmina.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido que es una variante de Rhodostomina, que comprende un aminoácido seleccionado de la SEQ ID NO: 57-69, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho polipéptido.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido que es codificado por la secuencia de nucleótidos seleccionados de las SEQ ID NOs: 44 a 56.

Otro aspecto de la invención es un polipéptido que exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 5, 50 ó 100 veces en la afinidad al $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y/o $\alpha_5\beta_1$ comparado con la Rhodostomina. En una modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 200 veces en la afinidad a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y/o $\alpha_5\beta_1$ comparada con la Rhodostomina. En otra modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 1000 ó 2000 veces en la afinidad a la integrina $\alpha\text{IIb}\beta_3$ y/o $\alpha_5\beta_1$ comparada con la Rhodostomina. En otra modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 5, 50, 100, 1000 ó 2000 veces en la afinidad a las plaquetas comparada con la Rhodostomina. Todavía en otra modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe una actividad sustancialmente reducida en la prolongación del tiempo de coagulación de la sangre comparado con la Rhodostomina y/o una desintegrina de tipo natural.

Otro aspecto más de la presente invención es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un polipéptido de la presente invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la presente invención es un polipéptido tal como se describe anteriormente para emplear en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada con la integrina $\alpha\text{v}\beta_3$ en un mamífero incluyendo un humano. El polipéptido empleado en el método puede ser pegilado o conjugado con albúmina.

La enfermedad asociada con la integrina $\alpha\text{v}\beta_3$ se selecciona de osteoporosis, crecimiento del tumor del hueso o cáncer y síntomas relacionados con el mismo, crecimiento y metástasis de tumor relacionado con la angiogénesis, metástasis de tumor en el hueso, hipercalcemia inducida por las malignidades, enfermedad del ojo relacionada con la angiogénesis, enfermedad de Paget, artritis reumática, y osteoartritis.

En otro aspecto de la invención, se utiliza un polipéptido de la invención para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad del ojo relacionada con la angiogénesis que incluye, pero no se limita a, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, enfermedades de neovascularización de la córnea, retinopatía neovascularizadora inducida por isquemia, alta miopía, y retinopatía de premadurez.

En otro aspecto más de la invención, se utiliza un polipéptido de la invención para el tratamiento y/o prevención de osteoporosis. La osteoporosis puede estar asociada con una afección patológica seleccionada de deficiencia de estrógenos posmenopausia, osteoporosis secundaria, artritis reumatoide, ovariectomía, enfermedad de Paget, cáncer del hueso, tumor del hueso, osteoartritis, formación aumentada de osteoclastos, y actividad aumentada de osteoclastos. Además, la osteoporosis incluye, pero no se limita a, una osteoporosis inducida por ovariectomía o pérdida del hueso.

También se puede utilizar un polipéptido de la invención para el tratamiento y/o prevención de un cambio fisiológico inducido por ovariectomía en un mamífero incluyendo un humano.

También se puede utilizar un polipéptido de la invención para el tratamiento y/o prevención del crecimiento de células de tumor en los huesos y los síntomas relacionados con el mismo en un mamífero incluyendo un humano.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para la elaboración de un polipéptido de la presente invención, comprendiendo el método los pasos siguientes: (a) transfectar una célula huésped con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido (b) cultivar dicha célula huésped en un medio de cultivo; y aislar dicho polipéptido. El método de la presente invención puede comprender además cultivar la célula huésped en un medio de cultivo libre de aminoácidos; y recolectar el sobrenadante para obtener dicho polipéptido. El método puede comprender además la adición de metanol al medio de cultivo para inducir la expresión del polipéptido en las células huésped. El método puede comprender además el paso de realizar una cromatografía de columna para obtener dicho polipéptido. En una modalidad, el método puede comprender además el paso de realizar una HPLC para obtener el polipéptido aislado.

Otro aspecto de la presente invención, es un polinucleótido que codifica un polipéptido tal como se describe anteriormente.

En otro aspecto de la invención, el polinucleótido comprende una secuencia seleccionada de las SEQ ID Nos: 44-56.

Estos y otros aspectos se podrán apreciar a partir de la siguiente descripción de las diferentes modalidades tomadas en conjunto con los siguientes dibujos.

Los dibujos adjuntos ilustran una o más modalidades de la presente invención y, junto con la descripción escrita sirven para explicar los principios de la misma.

Los objetos y ventajas adicionales de la presente invención serán establecidos en parte en la descripción siguiente, y en parte serán obvios a partir de la descripción o pueden ser aprendidos mediante la práctica de la presente invención. Los objetos y ventajas de la presente invención serán realizados y logrados por medio de los elementos y combinaciones señaladas particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

Deberá quedar entendido que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada son de ejemplo y solamente explicativas y no restringen la presente invención, tal como está reivindicada.

Los dibujos adjuntos los cuales están incorporados y constituyen una parte de esta descripción, ilustran las modalidades de la presente invención y junto con la descripción, sirven para explicar los principios de la presente invención.

Breve Descripción de los Dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra menos impacto de RD y HSA-RD y ARLDDL que la proteína de Rhodostomina en el tiempo de sangrado en los ratones.

La figura 2A son fotografías de los huesos trabeculares que muestran una inhibición de la pérdida de hueso trabecular inducida por la ovariectomía en las ratas tratadas con la proteína PGP. Barra = 1 mm.

La figura 2B son fotografías de los huesos trabeculares teñidos con fosfatasa de ácido resistente al Tartrato (TRAP), que muestran la inhibición del aumento inducido por la ovariectomía en el número de osteoclastos en las ratas tratadas con la proteína PGP. Barra = 100 μ m.

La figura 3 es una gráfica que muestra una inhibición de la activación del osteoclasto inducida por ovariectomía en las ratas tratadas con la proteína RD o alendronato (tratamiento de fármaco), el rebote de la concentración del marcador del osteoclasto durante el período del retiro del fármaco, y la reversa del aumento inducido por la ovariectomía en la actividad del osteoclasto durante la nueva administración con RD o alendronato.

Las figuras de la 4A a la 4D son fotografías de la articulación de la rodilla teñida con safranina-O y hematoxilina que muestran una inhibición de la destrucción de la capa de condrocitos en las ratas artríticas tratadas con la proteína RD. Las flechas indican la capa de condrocitos.

Las figuras de la 5A a la 5C son gráficas que muestran la inhibición de la elevación de la citocina en la sangre en las ratas que padecen osteoartritis tratadas con la proteína RD.

Las figuras de la 6A a la 6C son gráficas que muestran la inhibición de la elevación de la citocina en la sangre en ratones osteoarthríticos tratados con la proteína RD.

La figura 7 es una gráfica que muestra una inhibición del crecimiento del tumor del hueso PC-3 en los ratones SCID tratados con la proteína RD, pero no con alendronato.

5 La figura 8 es una gráfica que muestra una inhibición de la disminución inducida por el tumor en el peso corporal en los ratones SCID tratados con la proteína RD.

10 La figura 9A son fotografías que muestran un crecimiento de tumor esférico visible en la tibia próxima de cada pata después de la inyección intratibial de células PC-3 (mostradas por las flechas en el panel del medio) y una inhibición del crecimiento del tumor del hueso en los ratones SCID tratados con la proteína RD.

La figura 9B son radiografías de los huesos de la tibia que muestran una inhibición de la lesión del hueso osteolítico inducida por las células de tumor PC-3 en los ratones SCID tratados con la proteína RD.

15 La figura 9C es una gráfica de la cuantificación de los datos de la figura 9B que muestra una inhibición de la osteólisis inducida por el tumor PC-3 en los ratones SCID tratados con la proteína RD.

La figura 9D es una gráfica que muestra una inhibición del aumento inducido por el tumor PC-3 en telopéptidos de la terminal C de colágeno tipo I en los ratones SCID tratados con la proteína RD.

20 La figura 9E es una gráfica que muestra una inhibición del aumento inducido por el tumor PC-3 en la concentración de calcio en el suero en los ratones SCID tratados con la proteína RD o alendronato.

La figura 10A es una gráfica que muestra una inhibición del crecimiento del tumor del hueso MDA-MB-231 en ratones rasurados tratados con la proteína RD.

25 La figura 10B es una gráfica que muestra una inhibición del aumento inducido por el tumor del hueso MDA-MB-231 en los telopéptidos de la terminal C de colágeno tipo I en ratones rasurados tratados con la proteína RD.

La figura 10C es una gráfica que muestra una inhibición de la hipercalcemia inducida por el tumor del hueso MDA-MB-231 en ratones rasurados tratados con la proteína RD.

30 La figura 10D es una gráfica que no muestra cambios en las cuentas de células de glóbulos blancos en los ratones rasurados inyectados con células MDA-MB-231 y tratados con la proteína RD.

35 La figura 10E es una gráfica que no muestra cambios en las cuentas de células de glóbulos rojos en los ratones rasurados inyectados con células MDA-MB-231 y tratados con la proteína RD.

La figura 10F es una gráfica que no muestra cambios en las cuentas de plaquetas en los ratones rasurados inyectados con células MDA-MB-231 y tratados con la proteína RD.

40 La figura 11A son fotografías que muestran la densidad de los vasos de glóbulos rojos reducida en los tapones de MATRIGEL™ de los ratones C57BL/6 tratados con RD o RD-albúmina proteína (HSA-RD) en comparación con los ratones de control sin tratar.

45 La figura 11B es una gráfica que muestra un contenido reducido de hemoglobina en los tapones de MATRIGEL™ de los ratones C57BL/6 tratados con RD (cada día, RD/1 día y cada tercer día-RD/2 días) o RD-albúmina (HSA-RD-cada tercer día) que es una proteína en comparación con los ratones de control sin tratar.

50 La figura 12A son fotografías que muestran la angiogénesis en un modelo de ratón de retinopatía de premadurez (ROP), y la angiogénesis reducida en un ratón ROP tratado con la proteína RD (ROP+RD). Las flechas indican los perfiles de vasos sanguíneos (BVPs).

La figura 12B es una gráfica que muestra los BVPs reducidos en un modelo de ratón de retinopatía de premadurez (ROP) tratados con la proteína RD.

55 La figura 13A es una gráfica que muestra una inhibición de la activación del osteoclasto inducido por la ovariectomía en los ratones tratados con proteína RD o albúmina-RD.

La figura 13B es una gráfica que muestra una inhibición de la inactivación de la fosfatasa alcalina (ALP) inducida por la ovariectomía en los ratones tratados con proteína RD o albúmina-RD.

60 La figura 13C es una gráfica que muestra una inhibición de la disminución inducida por la ovariectomía en el BMD.

La figura 13D es una gráfica que muestra una inhibición de la disminución inducida por la ovariectomía en el BMC.

Las figuras de la 14A a la 14D muestran secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 1, y de 57 a 69 de las variantes de Rhodostomina.

Las figuras de la 15A a la 15C muestran secuencias de nucleótidos de las SEQ ID NOs: 43 a 56 de las variantes de Rhodostomina.

Descripción Detallada de la Invención

La presente invención se describe más particularmente en los siguientes ejemplos que pretenden ser únicamente ilustrativos ya que los expertos en la técnica podrán apreciar que se les pueden hacer numerosas modificaciones y variaciones. Varias modalidades de la presente invención se describen ahora detalladamente. Como se usan en la descripción y en las reivindicaciones siguientes, el significado de “un”, “una”, y “el/la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. También, tal y como se usan en la descripción y en las reivindicaciones siguientes, el significado de “en” incluye “en” y “sobre” a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. Adicionalmente, algunos términos utilizados en esta especificación son definidos más específicamente a continuación.

Ahora se hará referencia en detalle a las modalidades actuales (modalidades de ejemplo) incluidas en la presente invención, cuyos ejemplos están ilustrados en los dibujos adjuntos.

Definiciones

Los términos utilizados en esta descripción generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención, y en el contexto específico en el cual es utilizado cada término. Ciertos términos que son utilizados para describir la presente invención, se explican a continuación, o en alguna otra parte de la especificación, para proporcionar una guía adicional al practicante con respecto a la descripción de la presente invención. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. La mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta especificación incluyendo los ejemplos de cualesquiera términos aquí explicados son solamente ilustrativos, y de ninguna manera limitan el alcance y el significado de la presente invención o de cualquier término ejemplificado. La invención no está limitada a diferentes modalidades proporcionadas en esta especificación.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente descripción, tienen el mismo significado generalmente entendido por un experto en la técnica a la cual pertenece la presente invención. En caso de conflicto, prevalecerá el presente documento, incluyendo las definiciones.

Los términos “alrededor”, “aproximadamente”, deberá generalmente significar dentro del 20%, dentro del 10%, dentro del 5, 4, 3, 2, ó 1% de un valor o rango determinado. Las cantidades numéricas proporcionadas son aproximadas, significando que el término “alrededor” o “aproximadamente” puede ser inferido y no manifestado expresamente.

Los términos “polinucleótido”, “nucleótido”, “ácido nucleico”, “molécula de ácido nucleico”, “secuencia de ácido nucleico”, “secuencia de polinucleótido” y “secuencia de nucleótido” son usados de manera intercambiable para referirnos a las formas poliméricas de los nucleótidos de cualquier longitud. Los polinucleótidos pueden comprender desoxiribonucleótidos, ribonucleótidos, y/o sus análogos o derivados. El término incluye variantes. Las variantes pueden incluir inserciones, adiciones, eliminaciones o sustituciones. Las secuencias de nucleótidos se encuentran en una lista en la dirección 5' a 3'.

Los términos “polipéptido”, “péptido” y “proteína”, utilizados de manera intercambiable para referirnos a una forma polimérica de los aminoácidos de cualquier longitud, los cuales pueden incluir aminoácidos que ocurren de manera natural, aminoácidos codificados y no codificados, modificados químicamente o bioquímicamente, derivados o aminoácidos de diseñador, análogos de aminoácidos, peptidomiméticos y depsipéptidos, y polipéptidos que tienen estructuras cíclicas, bicíclicas, depsicíclicas o depsibicíclicas modificadas. El término incluye proteínas de una sola cadena así como multímeros. El término también incluye proteínas conjugadas a una etiqueta tales como FITC, biotina y radioisótopos, incluyendo pero sin limitarse a ⁶⁴Cu, ⁶⁷Cu, ⁹⁰Y, ⁹⁹mTc, ¹¹¹In, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹³⁷Cs, ¹⁸⁶Re, ²¹¹At, ²¹²Bi, ²¹³Bi, ²²³Ra, ²⁴¹Am y ²⁴⁴Cm; enzimas que tienen productos detectables (por ejemplo, luciferasa, peroxidasa, fosfatasa alcalina, β-galactosidasa, y similares); fluorescentadores y marcas fluorescentes, metales de emisión de fluorescencia, por ejemplo, ¹⁵²Eu, u otros de la serie de lantánidos, los compuestos electroquimioluminiscentes, compuestos quimioluminiscentes, por ejemplo, luminol, isoluminol, o sales de acridinio; moléculas de enlace específicas, por ejemplo, partículas magnéticas, microesferas, nanoesferas y similares. El término también incluye

péptidos conjugados a agentes terapéuticos.

Los términos también incluyen proteínas de fusión, incluyendo pero sin limitarse a, proteínas de fusión de glutatona S-transferasa (GST), proteínas de fusión con una secuencia de aminoácidos heteróloga tal como proteínas bioluminiscentes, por ejemplo, luciferina, o aecuatorina (proteínas fluorescentes verdes), con secuencias heterólogas y homólogas, proteínas de fusión con o sin residuos de metionina de la terminal-N, proteínas pegiladas, y marcadas inmunológicamente, o proteínas marcadas his. Dichas proteínas de fusión también incluyen fusiones a epítopes. Dichas proteínas de fusión pueden comprender multímeros de los péptidos de la presente invención, por ejemplo, homodímeros u homomultímeros, y heterodímeros y heteromultímeros. El término también incluye aptámeros péptidos.

El término "que hibrida específicamente" en el contexto de un polinucleótido se refiere a la hibridación bajo condiciones severas. Las condiciones que aumentan la severidad de ambos ADN/ADN y ADN/ARN en las reacciones de hibridación son ampliamente conocidos y publicados en la técnica. Los ejemplos de las condiciones severas de hibridación incluyen hibridación en cloruro de sodio 4 X/citrato de sodio (SSC), en una temperatura de aproximadamente 65°C a 70°C, o hibridación en 4 X SSC más el 50% de formamida a una temperatura de aproximadamente 42°C a 50°C, seguido por uno o más lavados en 1X SSC, a una temperatura de aproximadamente 65°C a 70°C.

El término "ligando" se refiere a una molécula que se enlaza a otra molécula, incluyendo un receptor.

Una "célula huésped" es una célula individual o cultivo de células las cuales pueden ser o haber sido un receptor de cualquier vector/es recombinante o polinucleótido. Las células huésped incluyen la descendencia de una sola célula huésped, y la descendencia puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento total de ADN) a la célula paterna original debido a la naturaleza, mutación accidental o deliberada y/o cambio. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido de la presente invención. Una célula huésped que comprende un vector recombinante de la presente invención puede ser denominada una "célula huésped recombinante".

El término "tratamiento", cubre cualquier administración o aplicación de remedios para una enfermedad en un mamífero, incluyendo un humano, e incluye la inhibición de la enfermedad, detención de su desarrollo, o liberación de la enfermedad, por ejemplo, ocasionando la regresión, o restauración y reparación de una función perdida, faltante o defectuosa; o estimulando un proceso ineficiente. El término incluye obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, cubriendo cualquier tratamiento de una afección o enfermedad patológica en un mamífero, incluyendo un humano. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma de la misma y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para una enfermedad y/o efecto adverso que se puede atribuir a la enfermedad. Por lo tanto, la presente invención proporciona tanto el tratamiento como la profilaxis. Incluye (1) prevenir que ocurra o recurra la enfermedad en un sujeto el cual puede estar predispuesto a la enfermedad pero todavía no está sintomático, (2) inhibir la enfermedad, tal como deteniendo su desarrollo, (3) detener o terminar la enfermedad o por lo menos sus síntomas asociados, de modo que el huésped ya no sufra de la enfermedad o sus síntomas, tales como ocasionando la regresión de la enfermedad o sus síntomas, por ejemplo, restaurando o reparando una función pérdida, faltante o defectuosa, o estimulando un proceso ineficiente, o (4) mitigando, aliviando o mejorando la enfermedad, o los síntomas asociados con la misma; en donde la mejoría es utilizada en un sentido amplio para referirnos a por lo menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor y/o tamaño del tumor.

Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un material sólido no tóxico, semisólido o líquido, rellenador, diluyente, encapsulante, auxiliar de formulación o excipiente de cualquier tipo convencional. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y compatibles con otros ingredientes de la formulación.

Una "composición" se refiere a una mezcla que generalmente contiene un vehículo, tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable o excipiente que es convencional en la técnica y el cual es el adecuado para administración a un sujeto con fines terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos. Puede incluir un cultivo celular en el cual el polipéptido o polinucleótido está presente en las células o en el medio de cultivo. Por ejemplo, las composiciones para la administración oral pueden formar soluciones, suspensiones, tabletas, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues orales o polvos.

"Enfermedad" se refiere a cualquier padecimiento, infección, enfermedad o síndrome que requiera intervención médica o para la cual es deseable la intervención médica. Dicha intervención médica puede incluir tratamiento, diagnóstico y/o prevención.

Péptidos

Los péptidos de la presente invención pueden ser expresados utilizando métodos conocidos en la técnica. Los métodos basados en las células y métodos libres de células son adecuados para la producción de péptidos de la presente invención. Los métodos basados en las células generalmente comprenden introducir una construcción de ácido nucleico en una célula huésped *in vitro* y cultivar la célula huésped bajo condiciones adecuadas para la expresión, luego recolectar el péptido, ya sea del medio de cultivo o de la célula huésped, (por ejemplo, rompiendo la célula huésped) o ambos. La invención también proporciona métodos para producir un péptido utilizando células libres en métodos de transcripción/traducción *in vitro*, los cuales son bien conocidos en la técnica.

Las células huésped adecuadas incluyen células procarióticas o eucarióticas, incluyendo, por ejemplo, células de bacterias, levadura, hongos, plantas, insectos y mamíferos.

Generalmente, un péptido heterólogo, ya sea modificado o sin modificar, puede ser expresado por sí mismo, como se describió anteriormente, o como una proteína de fusión, y puede no incluir solamente señales de secreción, sino también una secuencia líder de secreción. Una secuencia líder de secreción de la presente invención puede dirigir ciertas proteínas al retículo endoplásmico (ER). El ER separa las proteínas enlazadas a la membrana de otras proteínas. Una vez localizados en el ER, las proteínas pueden ser dirigidas adicionalmente al aparato de Golgi para la distribución a las vesículas, incluyendo vesículas de secreción, la membrana del plasma, lisosomas y otras organelas.

Adicionalmente, se pueden agregar porciones de péptido y/o etiquetas de purificación a los péptidos. Dichas regiones pueden ser eliminadas antes de la preparación final del polipéptido. La adición de las porciones del péptido a los polipéptidos para engendrar secreción o excreción, para mejorar la estabilidad o para facilitar la purificación, entre otras razones, son familiares y técnicas de rutina en el arte. Las etiquetas de purificación adecuadas incluyen, por ejemplo, V5, polihistidinas, avidina y biotina. La conjugación de los péptidos a los compuestos tales como biotina puede ser logrado utilizando las técnicas bien conocidas en el arte. (Hermanson ed. (1996) "Técnicas de Bioconjugado" (Bioconjugate Techniques; Academic Press). También los péptidos pueden ser conjugados con radioisótopos, toxinas, enzimas, etiquetas fluorescentes, oro coloidal, ácidos nucleicos, vinorelbina y doxorubicina utilizando técnicas conocidas en el arte. (Hermanson ed. (1996) "Técnicas de Bioconjugado" (Bioconjugate Techniques; Academic Press; Stefano y asociados (2006)).

Los asociados de fusión adecuados para utilizarse en la presente invención, incluyen por ejemplo, fetuina, albúmina de suero humano, Fc, y/o uno o más de sus fragmentos. También se proporcionan proteínas conjugadas, tales como conjugados de polietilenglicol.

Los péptidos de la presente invención también pueden ser sintetizados químicamente utilizando técnicas conocidas en el arte (ver por ejemplo, la publicación de Hunkapiller y asociados, en Nature, 310: páginas 105 a 111 (1984); Grant ed. (1992) "Péptidos Sintéticos, Una Guía para el Usuario" (Synthetic Peptides, a Users Guide), W.H. Freeman and Co.; la Patente Norteamericana No. 6,974,884)). Por ejemplo, un polipéptido que corresponde a un fragmento de un polipéptido puede ser sintetizado mediante el uso de un sintetizador de péptidos o a través del uso de métodos de fase sólida conocidos en la técnica.

Además, si se desea, los aminoácidos no clásicos o análogos químicos de aminoácidos pueden ser introducidos como una sustitución o adición dentro de la secuencia del polipéptido. Los aminoácidos no clásicos incluyen, pero no están limitados a, los D-isómeros de los aminoácidos comunes, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-aminobutírico, Abu, ácido 2 amino butírico, g-Abu, e-Ahx, ácido 6-amino hexanoico, Aib, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, homocitrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, b-alanina, ácidos fluoro-amino, aminoácidos del diseñador tales como ácidos b-metil amino, aminoácidos Ca-metilo, aminoácidos Na-metilo, y análogos de aminoácidos en general. Además, el aminoácido puede ser D (destrorrotatorio) o L (levorotatorio).

Los polipéptidos de la presente invención pueden ser recuperados y purificados de la síntesis química y los cultivos de células recombinantes por métodos estándar los cuales incluyen, pero no están limitados a, precipitación del sulfato de amonio o etanol, extracción del ácido, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxilapatita y cromatografía de lectina. En una modalidad, se emplea la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") para la purificación. Las técnicas bien conocidas para volver a duplicar la proteína pueden ser empleadas para regenerar la conformación activa cuando el polipéptido es desnaturalizado durante el aislamiento y/o la purificación.

Un péptido o peptidomimético de la presente invención puede ser modificado con o acoplado covalentemente a una o

más de una variedad de polímeros hidrofílicos para aumentar la solubilidad y la vida media en la circulación del péptido. Los polímeros hidrofílicos no proteínicos adecuados para el acoplamiento a un péptido incluyen, pero no están limitados a, polialquiléteres como son ejemplificados por el polietilenglicol y el polipropilenglicol, ácido poliláctico, ácido poliglicólico, polioxialquenos, polivinilalcohol, polivinilpirrolidona, celulosa y derivados de celulosa, dextrano y derivados de dextrano. Generalmente, dichos polímeros hidrofílicos tienen un peso molecular promedio en un rango de aproximadamente 500 a aproximadamente 100,000 daltons, de aproximadamente 2,000 a aproximadamente 40,000 daltons, o de aproximadamente 5,000 a aproximadamente 20,000 daltons. El péptido puede ser derivado con o acoplado de dichos polímeros utilizando cualesquiera métodos establecidos en las publicaciones de Zallipsky, S. (1995) en Bioconjugate Chem., 6: páginas 150 a 165; Monfardini, C., y asociados, (1995) en Bioconjugate Chem, 6: páginas 62 a 69; las Patentes Norteamericanas Nos. 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,617; 4,791,192; 4,179,337, o el Documento WO 95/34326.

En algunas modalidades, un péptido de la presente invención se proporciona en formulación con vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables, de los cuales una gran variedad son conocidos en la técnica. Estos vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticos incluyen los de la lista en los excipientes farmacéuticos de la USP. Los Excipientes USP y NF, Incluidos por Categorías, páginas 2404 a 2406, USP 24 NF 19, Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos de América Inc., Rockville, Md. (ISBN 1-889788-03-1). Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, son fácilmente disponibles para el público. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes ajustadores de pH y reguladores, agentes ajustadores de tonicidad, estabilizadores, agentes de humedecimiento y similares, se pueden conseguir fácilmente para el público.

Los vehículos adecuados incluyen, pero no están limitados a, agua, dextrosa, glicerol, solución salina, etanol, y combinaciones de los mismos. El vehículo puede contener agentes adicionales tales como agentes de humedecimiento o emulsificación, agentes reguladores de pH o adyuvantes los cuales mejoran la efectividad de la formulación. Los vehículos tópicos incluyen petróleo líquido, isopropil palmitato, polietilenglicol, etanol (95%), polioxietileno monolaurato (5%) en agua, sulfato laurilo de sodio (5%) en agua. Otros materiales tales como antioxidantes, humectantes, estabilizadores de viscosidad, y agentes similares pueden ser agregados según sea necesario. Los mejoradores de penetración percutáneos tales como Azono también pueden ser incluidos.

En las formas de dosificación farmacéutica, las composiciones de la presente invención pueden ser administradas en la forma de sus sales farmacéuticamente aceptables, o también pueden ser utilizadas solas o en asociación apropiada, así como en combinación, con otros compuestos farmacéuticamente activos. Las composiciones del asunto materia son formuladas de acuerdo con el modo de administración potencial.

Métodos de Tratamiento

Una enfermedad asociada con la integrina $\alpha v \beta 3$ incluye, pero no está limitada a, osteoporosis, tumor de los huesos o crecimiento de cáncer y síntomas relacionados con los mismos, crecimiento de tumor relacionado con la angiogénesis y metástasis, metástasis del tumor en el hueso, hipercalcemia inducida por malignidades, enfermedades del ojo relacionadas con la angiogénesis, enfermedad de Paget, artritis reumática y osteoartritis.

Los péptidos de la presente invención pueden ser administrados a un sujeto que necesita del tratamiento por medio de una inyección sistémica, tales como una inyección intravenosa; o por inyección o aplicación en el sitio relevante, tal como mediante la inyección directa, o la aplicación directa al sitio cuando el sitio está expuesto en cirugía; o por ejemplo, mediante la aplicación tópica, tal como si la enfermedad se encuentra en la piel.

Los péptidos de la presente invención también pueden ser utilizados como monoterapia. Como alternativa, los péptidos de la presente invención pueden ser utilizados en combinación con regímenes estándar para tratar las enfermedades asociadas con la integrina $\alpha v \beta 3$.

La administración de los agentes puede ser lograda de diferentes maneras, incluyendo vía oral, bucal, nasal, rectal, parenteral, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intraventricular, intracraneal, intratraqueal, intratecal, etc., o de otra manera mediante el implante o inhalación. Por lo tanto, estas composiciones pueden ser preparadas en formulaciones en forma sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como tabletas, cápsulas, polvos, gránulos, ungüentos, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes y aerosoles. Los siguientes métodos y excipientes son únicamente de ejemplo y de ninguna manera se deberán interpretar como una limitación.

Los vehículos excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol o similares, y combinaciones de los mismos. Además, si se desea, el vehículo puede contener cantidades menores de sustancias

auxiliares tales como agentes de humedecimiento o emulsificación, o agentes reguladores de pH. Los métodos actuales para preparar dichas formas de dosificación son conocidos, o los podrán apreciar aquellos expertos en la técnica. La composición o formulación para ser administrada contendrá, en cualquier caso, una cantidad del agente adecuada para lograr la condición deseada en el sujeto que está siendo tratado.

Los péptidos de la presente invención pueden ser formulados en preparaciones para la inyección, disolviendo, suspendiendo o emulsificándolos en un solvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos de ácido sintético alifático, ésteres de ácidos alifáticos más altos o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizadores, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes de emulsificación, estabilizadores y conservadores. Otras formulaciones para la administración oral o parenteral también pueden ser utilizadas, como es convencional en la técnica.

“Desintegrinas” se refiere a una familia de polipéptidos que pueden ser purificados de veneno de víbora, los cuales contienen el ácido arginina-glicina-aspartico (RGD) en la secuencia. Sin estar comprometido por teoría o mecanismo alguno, se considera que los enlaces tripéptidos RGD con alta afinidad a las integrinas para bloquear la interacción de las integrinas con proteínas que contienen RGD. Por lo tanto los desintegrantes bloquean las funciones adhesivas y actúan como inhibidores de agregación de plaquetas.

La abreviatura “Rho” significa “Rhodostomina”, la cual es una desintegrina derivada del veneno de *Colloselasma rhodostoma*. La Rhodostomina no se enlaza específicamente a las integrinas α IIb β 3, α 5 β 1 y α v β 3, y prolonga el tiempo de coagulación de la sangre inhibiendo la agregación de plaquetas a través del bloqueo de la glucoproteína de plaquetas α IIb β 3.

La “variante de desintegrina” o “variante de Rhodostomina” se refiere a una proteína activa funcionalmente, o a un polipéptido o cualquier derivado de los mismos, que comprende una secuencia de aminoácidos derivada o modificada o mutada de una desintegrina de tipo natural, tal como Rhodostomina. Una variante de desintegrina/Rhodostomina funcionalmente activa puede enlazarse específicamente a e inhibir la actividad de la integrina α v β 3. La variante de Rhodostomina de la presente invención puede ser construida mediante cualquier método adecuado para los objetivos de la presente invención, y en una modalidad por medio del método de mutagénesis dirigida en el sitio, y en otra modalidad por un método de reacción de cadena de polimerasa. Las variantes pueden incluir inserciones, adiciones, eliminaciones o sustituciones comparadas con los péptidos. Las variantes de las secuencias de polipéptidos incluyen variantes polimórficas biológicamente activas.

Los péptidos de la presente invención pueden incluir aminoácidos que ocurren de manera natural y de manera no natural. Los péptidos pueden comprender D-aminoácidos, una combinación de aminoácidos D- y L-, y varios aminoácidos de “diseñador” o “sintético” (por ejemplo, aminoácidos β -metilo, aminoácidos C α -metilo, y aminoácidos N α -metilo, etc.) para transportar las propiedades especiales. Adicionalmente, los péptidos pueden ser cíclicos. Los péptidos pueden incluir aminoácidos no clásicos con el objeto de introducir patrones de conformación particulares. Cualesquiera aminoácidos no clásicos conocidos pueden ser utilizados. Los análogos de aminoácidos y peptidomiméticos pueden ser incorporados en un péptido para inducir o favorecer las estructuras secundarias específicas, incluyendo, pero sin limitarse a, LL-Acp (ácido LL-3-amino-2-propenidona-6-carboxílico), un análogo dipéptido que induce un giro- β ; análogos que inducen hojas- β ; análogos que inducen giro- β ; análogos que inducen α -hélice, y análogos que inducen giro- γ ; análogos de giro Gly-Ala; isómeros enlazados a amida; o tetrazol y similares.

Un residuo desamino o descarboxi puede ser incorporado en los extremos terminales del péptido, de modo que no exista una terminal amino o un grupo carboxilo, para disminuir la susceptibilidad a las proteasas o restringir la conformación. Los grupos funcionales de la terminal C incluyen amida, alquilo inferior a amida, amida di- (alquilo inferior), alcoxi inferior, hidroxilo y carboxi, y los derivados de éster inferior de los mismos, y las sales farmacéuticamente aceptables de los mismos.

El término “IC₅₀” o “la concentración media inhibitoria máxima” se refiere a la concentración de Rho y su variante que es requerida para una inhibición del 50% de su receptor. El IC₅₀ es una medida de cuanto Rho o su variante se necesita para inhibir un proceso biológico en un 50%, tal como la afinidad de variante a su receptor.

El término “cantidad terapéuticamente efectiva” como es utilizada se refiere a una cantidad la cual, cuando es administrada a un sujeto vivo, logra un efecto deseado en el sujeto vivo. Por ejemplo, una cantidad efectiva de la variante Rho de la presente invención para la administración a sujetos vivos es una cantidad que previene y/o trata una enfermedad portada por la integrina α v β 3. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y lo podrá asegurar un experto en la técnica utilizando técnicas conocidas. Como se sabe en la técnica, ciertas modificaciones pueden ser necesarias para la administración sistémica contra localizada, la edad, peso corporal, salud general,

sexo, dieta, tiempo de administración, interacción del fármaco y la severidad de la enfermedad y como se podrá ser asegurado por la experimentación de rutina de los expertos en la técnica.

El término "antagonista del receptor" se refiere a un ligando de enlace de un receptor que inhibe la función de un receptor bloqueando el enlace de un agonista al receptor, o el cual permite el enlace de un agonista, pero inhibe la capacidad del agonista para activar el receptor.

El término "actividad de bloqueo del receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ o sustancialmente reducido" se refiere a una actividad reducida de por lo menos cinco veces en el bloqueo de receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ comparado con la Rhodostomina del tipo natural. Por ejemplo, para calcular la reducción en la actividad de bloqueo del receptor $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ el IC_{50} de la variante de Rhodostomina para la inhibición del enlace de la integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ a una proteína matriz, tal como fibrinógeno, es comparado con el IC_{50} del Rho.

El término "variante del patrón RGD" se refiere a un péptido que comprende una modificación en la secuencia de aminoácidos que prolonga la secuencia RGD de una secuencia de tipo natural correspondiente, tal como la secuencia que comprende el RGD en la Rhodostomina. Los ejemplos de las "variantes del patrón de RGD", incluyen $^{48}\text{ARGDDP}^{53}$, $^{48}\text{PRLDMP}^{53}$, $^{48}\text{PRIDMP}^{53}$, y $^{48}\text{ARLDDL}^{53}$.

El término "RD" se refiere a la variante de Rhodostomina que tiene una variante $^{48}\text{PRLDMP}^{53}$ del patrón de RGD.

El término "PGP" se refiere a la variante de Rhodostomina que tiene una variante $^{48}\text{PRGDGP}^{53}$ del patrón de RGD.

El término ARLDDL se refiere a una variante de Rhodostomina que tiene una variante $^{48}\text{ARLDDL}^{53}$ del patrón de RGD.

El término "selectividad inhibitoria para la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ relativa con los receptores $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ " se refiere a una selectividad de enlace de la variante hacia la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ sobre los receptores $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$, los cuales son expresados como una proporción del IC_{50} de la variante para la inhibición de los receptores de $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ sobre esa para la inhibición del receptor $\alpha\text{v}\beta 3$.

El término "tiempo de sangrado en la prolongación de la actividad sustancialmente reducido" se refiere a la capacidad reducida para inhibir la coagulación de la sangre de una manera importante estadísticamente según se mide en el experimento de tiempo de sangrado descrito en la descripción.

El término "pegilado-RD" se refiere a un producto pegilado de la proteína RD.

El término "albúmina-RD, o HSA-RD" se refiere a un producto conjugado de albúmina humana de la proteína RD.

REVISIÓN GENERAL DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a variantes de desintegrina que son antagonistas selectivos de la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$. Las variantes de desintegrina tal como los compuestos relacionados con el RD inhiben de manera potente la diferenciación de osteoclastos *in vitro*. También inhiben la actividad de reabsorción del osteoclasto y el aumento inducido por la ovariectomía en la formación del osteoclasto en estudio de animales. Además, el RD inhibe el crecimiento de tumor de las células de cáncer de próstata y mama en los huesos. La hipercalcemia inducida por las malignidades también fue bloqueada de manera efectiva por las proteínas relacionadas con el RD. La enfermedad de Paget (también conocida como *osteitis deformans*) es una enfermedad de los huesos crónica que generalmente da como resultado huesos alargados y deformados debido a la rotura irregular y la formación de tejidos del hueso. Han sido aprobados los bisfosfonatos para el tratamiento de la enfermedad de Paget. La osteoartritis también está relacionada con el aumento en la actividad del osteoclasto. Basados en el mecanismo de acción similar, los derivados de RD deberían también ser efectivos para el tratamiento de estas enfermedades de los huesos. Una inyección intravenosa de RD o PGP en una dosis muy elevada de 30 mg/kg no afecta la sobrevivencia de los ratones ($n = 3$). Además, la administración a largo plazo de PGP (I. V., 0.5 mg/kg/día), durante 6 semanas no afectó el nivel en el suero de la creatinina, GOT, y GPT, lo cual sugiere que no existen efectos secundarios en el riñón ni el hígado. Por lo tanto, el RD y sus derivados son candidatos de fármacos potenciales para el tratamiento de la osteoporosis, tumor de los huesos, hipercalcemia inducida por malignidades, la enfermedad de Paget, artritis reumática, osteoartritis y enfermedad de los ojos relacionados con la angiogénesis.

Muchas clases de veneno de víboras contienen proteínas que comprenden un dominio RGD. Estas proteínas que contienen el dominio RGD son denominadas desintegrinas. Una modificación en la secuencia que prolonga el dominio RGD da como resultado una variante de polipéptido única con una afinidad de enlace reducida a otros tipos

de integrina pero una selectividad aumentada para la integrina $\alpha v\beta 3$. Las variantes de la desintegrina incluida la variante de Rhodostomina resultaron ser posibles candidatos terapéuticos para, entre otros, la osteoporosis, la supresión del crecimiento de tumor en los huesos, y enfermedad de los ojos relacionadas con angiogénesis. Además, las variantes de desintegrina incluyendo las variantes de Rhodostomina que tiene una región de patrón RGD con al menos una sustitución de aminoácidos pueden ser herramientas valiosas para el desarrollo de antagonistas selectivos para la integrina $\alpha v\beta 3$.

Un aspecto de la presente invención es un polipéptido que tiene una actividad antagonista del receptor de integrina $\alpha v\beta 3$ y una actividad reducida de bloqueo del receptor de integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$, comparada con la Rhodostomina del tipo natural. El polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótido de Rhodostomina modificados que codifica una secuencia de aminoácidos modificada la cual da como resultado un polipéptido que tiene una actividad sustancialmente reducida del bloqueo del receptor de integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$. El polipéptido puede ser pegilado o conjugado con albúmina.

Otro aspecto de la presente invención es un polipéptido que es una variante de Rhodostomina, en el cual la Rhodostomina comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de las SEQ ID NOs: 57 a 69 o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho polipéptido.

Otro aspecto de la presente invención es un polipéptido que está codificado por una secuencia de nucleótido seleccionada de las SEQ ID NOs: 44 a 56.

Otro aspecto de la presente invención es un polipéptido aislado que es codificado por un ADN que tiene una secuencia de nucleótidos de Rhodostomina modificados seleccionados de las SEQ ID NOs: 44 a 56. El polipéptido exhibe por lo menos aproximadamente una disminución de 5, 50, o 100 veces en la afinidad al $\alpha IIb\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ comparada con la Rhodostomina. En una modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos aproximadamente una disminución de 200 veces en la afinidad a la integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ comparada con la Rhodostomina. En otra modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 1000 o 2000 veces en la afinidad a la integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ comparada con la Rhodostomina. En otra modalidad de la presente invención, el polipéptido exhibe por lo menos una disminución de aproximadamente 5, 50, 100, 1000, o 2000 veces en la afinidad de las plaquetas comparadas con la Rhodostomina. En otra modalidad más de la presente invención, el polipéptido exhibe una actividad sustancialmente reducida en la prolongación del tiempo de coagulación de la sangre comparada con la Rhodostomina o la desintegrina del tipo natural.

Otro aspecto más de la presente invención es una composición fisiológicamente aceptable que comprende un polipéptido de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Otro aspecto más de la presente invención es una variante de Rhodostomina para utilizar en el tratamiento y/o prevención de enfermedad asociada con la integrina $\alpha v\beta 3$ en un mamífero incluyendo un humano. El método incluye el paso de administrar al mamífero que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido aislado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En este caso el polipéptido tiene la actividad antagonista de integrina del receptor $\alpha v\beta 3$ y una actividad sustancialmente reducida del bloqueo del receptor de integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o integrina $\alpha 5\beta 1$ comparado con la Rhodostomina del tipo natural, y por lo tanto da como resultado el tratamiento y/o prevención de las enfermedades asociadas con la integrina $\alpha v\beta 3$ de mamífero. El polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótidos de Rhodostomina modificados que codifican una secuencia de aminoácido de Rhodostomina modificada la cual da como resultado un polipéptido que tiene una actividad sustancialmente reducida de bloqueo de receptor de integrina $\alpha IIb\beta 3$ y/o integrina $\alpha 5\beta 1$. El polipéptido empleado en el método puede ser pegilado o conjugado con albúmina. El polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID Nos : 57 a 69.

En una modalidad de la presente invención, un polipéptido de la invención es utilizado para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad asociada con la integrina $\alpha v\beta 3$, la cual incluye pero no está limitada a osteoporosis, crecimiento de tumor en los huesos o cáncer y síntomas relacionados con los mismos, crecimiento de tumores relacionados con la angiogénesis y metástasis, metástasis de tumores en los huesos, hipercalcemia inducida por las malignidades, enfermedades de los ojos relacionadas con la angiogénesis, enfermedad de Paget, artritis reumática y, osteoartritis.

En otra modalidad de la presente invención, un polipéptido de la invención es utilizado para el tratamiento y/o prevención de una enfermedad de los ojos relacionada con la angiogénesis, la cual incluye pero no está limitada a, degeneración macular relacionada con la edad, retinopatía diabética, enfermedades de neovascularización de la córnea, retinopatía de la neovascularización inducida por isquemia, miopía alta, y retinopatía de premadurez.

En otra modalidad más de la presente invención, un polipéptido de la invención es utilizado para el tratamiento y/o la prevención de la osteoporosis. La osteoporosis está asociada con un padecimiento patológico seleccionado de deficiencia de estrógenos posmenopausia, osteoporosis secundaria, artritis reumatoide, ovariectomía, enfermedad de Paget, cáncer de los huesos, tumor de los huesos, osteoartritis, formación aumentada de osteoclastos, y actividad aumentada de osteoclastos. Además, la osteoporosis incluye pero no está limitada a una osteoporosis inducida por la ovariectomía o pérdida de los huesos y osteoporosis posmenopáusica o pérdida del hueso.

Otro aspecto más de la presente invención es una variante de Rhodostomina para utilizar en el tratamiento y/o prevención de cambios fisiológicos en un mamífero incluyendo a un humano inducidos por la ovariectomía o la osteoporosis posmenopáusica. El método incluye la administración al mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido aislado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo el cual tiene la actividad antagonista del receptor de integrina $\alpha\beta3$ y la actividad sustancialmente reducida de bloqueo del receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ y/o $\alpha5\beta1$ comparado con la Rhodostomina de tipo natural, y que resulta por lo tanto en el tratamiento y/o en la prevención de cambios fisiológicos inducidos por la ovariectomía en el mamífero. El polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótidos de Rhodostomina modificados que codifica una secuencia de aminoácidos modificados resultante en dicho polipéptido que tiene una actividad sustancialmente reducida de bloqueo del receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ y/o $\alpha5\beta1$ a variante del polipéptido comprende una secuencia de aminoácido seleccionada de las SEQ ID NOs: 57 a 69, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. En otra modalidad, la variante del polipéptido es pegilado o conjugado con albúmina.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para utilizar la variante de Rhodostamina para la inhibición y/o prevención de crecimiento de células de tumor en los huesos y síntomas relacionados con los mismos en un mamífero incluyendo un humano. El método incluye la administración al mamífero que lo necesita de una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido aislado, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, la cual tiene la actividad del antagonista del receptor de integrina $\alpha\beta3$ y una actividad sustancialmente reducida de bloqueo del receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ y/o $\alpha5\beta1$ comparado con una Rhodostomina de tipo natural, y que da por lo tanto, como resultado la inhibición y/o prevención del crecimiento de la célula de tumor en los huesos y los síntomas relacionados con los mismos en el mamífero. El polipéptido es codificado por una secuencia de nucleótidos de Rhodostomina modificada que codifica una secuencia de aminoácidos modificada y como resultado se obtiene dicho polipéptido que tiene una actividad sustancialmente reducida del bloqueo del receptor de integrina $\alpha\text{IIb}\beta3$ y/o $\alpha5\beta1$.

Los síntomas patológicos relacionados con el crecimiento de la célula del tumor en los huesos incluyen una actividad aumentada del osteoclasto, una reabsorción de hueso aumentada, lesión del hueso, hipercalcemia, y pérdida de peso corporal y cualesquiera combinaciones de los mismos. El crecimiento de la célula de tumor en los huesos incluye células de cáncer de los huesos, y células de cáncer convertidas en metástasis que se originan del cáncer de próstata, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer pancreático o cáncer de mieloma.

El polipéptido es una variante de Rhodostomina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 57 a 69, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo. La variante del polipéptido puede ser pegilada o conjugada con albúmina.

Otro aspecto más de la presente invención es un método para la elaboración de un polipéptido de la invención, comprendiendo el método los pasos siguientes: (a) transformar una célula huésped con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido para obtener uno o más de un transformante; (b) seleccionar un transformante que tiene uno o más que una copia de dicha construcción de ADN insertada en el transformante; (c) cultivar el transformante en un medio de cultivo para amplificar la población de células del mismo; (d) recolectar las células del transformante; (e) cultivar las células del transformante recolectadas en un medio de cultivo libre de aminoácidos, y (g) recolectar el sobrenadante para obtener dicho polipéptido.

El paso (e) anteriormente mencionado puede comprender además el paso de agregar metanol al medio de cultivo para inducir la expresión del polipéptido en las células transformantes. En una modalidad, el paso (g) puede comprender además el paso de realizar una cromatografía de columna para obtener dicho polipéptido. En una modalidad adicional, el método anteriormente mencionado puede comprender además el paso de realizar una HPLC para obtener el polipéptido aislado, purificado.

Estos y otros aspectos de la presente invención se describen más adelante de una manera más específica.

Se compraron células RANKL y M-CSF recombinantes humanas de R&D Systems (Minneapolis, MN). Los telopéptidos de la terminal C del equipo de ELISA de colágeno tipo I fueron obtenidos de Cross Laps (Herlev, Dinamarca). Todos los otros químicos fueron obtenidos en Sigma.

EJEMPLO 1

Construcción de ADN que Codifica la Rhodostomina y las Variantes

5 La Rhodostomina fue clonada y expresada en el vector pGEX-2KS [20] como una plantilla. El ADN que codifica el Rho fue compuesto de codones preferencialmente utilizados en *Pichia pastoris*. El ADN de Rho fue amplificado por medio de la reacción de cadena de polimerasa (PCR) con el cebador sentido 5'-GAATICGAATICCATCATCATCATCATCAT CATGGTAAGGAATGTGACTGTICTT-3' (Rho-Pic-1; SEQ ID NO: 3) que tenía un reconocimiento Eco R1 y seis residuos de histidina para facilitar la purificación. El cebador antisentido es 5'-CCGCGGCCGCGGTTCAGTGGTATCTTGGACAGTCAGC-3' (SEQ ID NO:136) ó 5'-CCGCGGCCGCGGTIAGTGGTATCTIGGACAGTCAGC-3' (Rho-Pic-2; SEQ ID NO: 4) con el reconocimiento de Sac II y un codón de detención TCA (o TTA). El producto PCR fue purificado y luego ligado dentro de los sitios *Eco R1* y *Sac II* del vector de recombinación de levadura, pPICZ(XA). El plásmido recombinante fue utilizado para transformar una cepa *DH5α*, y las colonias fueron seleccionadas en placas de agar con poca sal LB (triptona al 1%, extracto de levadura al 0.5%, NaCl 0.5%, agar 1.5% en un pH de 7.0) y 25 µg/ml de antibiótico de Zeocina.

20 Las variantes de Rhodostomina fueron sintetizadas y amplificadas por la reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando una estrategia de oligonucleótidos que se solapan con los cebadores que contienen los sitios de restricción *Eco RI* y *Sac II*. Las secuencias de nucleótidos de diferentes cebadores utilizados para la síntesis o confirmación de las variantes se encuentran en la lista de la tabla 1. La proteína de fusión RD-HSA fue construida utilizando procedimientos similares. El cADN de la albúmina de suero humano fue comprada en Invitrogen, y el gen estructural de albúmina fue fusionado en la terminal N del gen Rho con una secuencia de aminoácidos del enlazador GSGSGS (SEQ ID NO: 137) y con seis residuos de histidina en la terminal N.

TABLA 1

	Cebador	Secuencia	SEQ ID NO:
RLD-1	Sentido	GAATCCCAAGACTTGACATGCCAG	(SEQ ID NO: 5)
RLD-2	Antisentido	CTGGCATGTCAAGTCTTGGGATTC	(SEQ ID NO: 6)
RHD-1	Sentido	AGAATCCCAAGACACGACATGCCAGAC	(SEQ ID NO: 7)
RHD-2	Antisentido	GTCTGGCATGTCTGTCTTGGGATTCT	(SEQ ID NO: 8)
RID-1	Sentido	AGAATCCCAAGAATCGACATGCCAGAC	(SEQ ID NO: 9)
RID-2	Antisentido	GTCTGGCATGTCTGATTCTTGGGATTCT	(SEQ ID NO: 10)
P48A-1	Sentido	TGTAGAATCGCTAGAGGTGACATG	(SEQ ID NO: 11)
P48A-2	Antisentido	CATGTCACCTCTAGCGATTCTACA	(SEQ ID NO: 12)
ARGD-2	Antisentido	GTCACCTCTTGCGATTCTACAG	(SEQ ID NO: 13)
RGDNP-1	Sentido	CAAGAGGTGACAACCCAGACGACAG	(SEQ ID NO: 14)
RGDNP-2	Antisentido	CTGTCGTCTGGGTTGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 15)
RGDDP-1	Sentido	CAAGAGGTGACGACCCAGACGACAG	(SEQ ID NO: 16)
RGDDP-2	Antisentido	CTGTCGTCTGGGTCGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 17)
RGDGP-1	Sentido	CAAGAGGTGACGGTCCAGACGACAGATG	(SEQ ID NO: 18)
RGDGP-2	Antisentido	CATCTGTCGTCTGGACCGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 19)
RGDDL-1	Sentido	CAAGAGGTGACGACCTAGACGACAGATG	(SEQ ID NO: 20)
RGDDL-2	Antisentido	CATCTGTCGTCTAGGTCGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 21)
RGDDM-1	Sentido	CAAGAGGTGACGACATGGACGACAGATG	(SEQ ID NO: 22)
RGDDM-2	Antisentido	CATCTGTCGTCCATGTCGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 23)
RGDDV-1	Sentido	CAAGAGGTGACGACGTAGACGACAGATG	(SEQ ID NO: 24)
RGDDV-2	Antisentido	CATCTGTCGTCTACGTCGTCACCTCTTG	(SEQ ID NO: 25)
α -factor		TATTGCCAGCATTGCTGC	(SEQ ID NO: 26)
5'-AOX1	Sentido	GACTGGTTCCAATTGACAAGC	(SEQ ID NO: 27)
3'-AOX1	Antisentido	GCAAATGGCATTCTGACATCC	(SEQ ID NO: 28)
RLDDL-1	Sentido	CAAGACTTGACGACCTAGAC	(SEQ ID NO: 74)
RLDD-2	Antisentido	GTCGTCAAGTCTTGGGATTC	(SEQ ID NO: 75)
RGDDL-1	Sentido	CAAGACTTGACGACCTAGAC	(SEQ ID NO: 76)
ARLDD-2	Antisentido	GTCGTCAAGTCTTGCGATTC	(SEQ ID NO: 77)

Nota: Cebador del factor- α fue utilizado como un cebador para la elaboración de secuencias; los cebadores 5'-AOX1 & 3'-AOX1 fueron utilizados para revisar la presencia del ADN insertado.

Las reacciones de cadena de polimerasa se llevaron a cabo en una temperatura de 95°C durante 1 minuto, 55°C durante 1 minuto, luego a 72°C durante 1 minuto por 25 ciclos. También una secuencia de cebadores fue utilizada para generar sitios de mutación múltiples. Los productos del PCR fueron separados en gel de agarosa al 2% y visualizados mediante la tinción de bromuro de etidio. Los productos deseados de PCR fueron purificados y luego ligados en los sitios *Eco RI* y *Sac II* del vector de transferencia de levadura pPICZ α A. El plásmido recombinante fue utilizado para transformar una cepa *Escherichia coli* azul XL1 y las colonias seleccionadas en placas de agar que contienen el antibiótico Zeocina. Las colonias XL1-azul de *E. coli* fueron recolectadas, el plásmido de ADN aislado, y la secuencia confirmada por la elaboración de secuencias del inserto. La tabla 2 enumera los ID NOs. de las secuencias del cebador utilizadas para sintetizar los ADN que codifican la Rhodostomina y varias variantes.

TABLA 2

Cebadores para la síntesis de los ADN que codifican Rhodostomina y varias variantes

Cebador Sentido	Cebador Antisentido	Variante de Rhodostomina
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 4	(Rho) ⁴⁸ PRGDMP ⁵³
SEQ ID NO: 16	SEQ ID NO: 13	Variante ⁴⁸ ARGDDP ⁵³
SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 13	Variante ⁴⁸ ARGDDV ⁵³
SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 71	Variante ⁴⁸ ARGDDL ⁵³
SEQ ID NO: 20	SEQ ID NO: 21	Variante ⁴⁸ PRGDDL ⁵³
SEQ ID NO: 72	SEQ ID NO: 73	Variante ⁴⁸ ARGDDM ⁵³
SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 23	Variante ⁴⁸ PRGDDM ⁵³
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 6	Variante ⁴⁸ PRLDMP ⁵³
SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 75	Variante ⁴⁸ PRLDDL ⁵³
SEQ ID NO: 76	SEQ ID NO: 77	Variante ⁴⁸ ARLDDL ⁵³
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 10	Variante ⁴⁸ PRIDMP ⁵³
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 8	Variante ⁴⁸ PRHDMP ⁵³
SEQ ID NO: 14	SEQ ID NO: 15	Variante ⁴⁸ PRGDNP ⁵³
SEQ ID NO: 18	SEQ ID NO: 19	Variante ⁴⁸ PRGDGP ⁵³

EJEMPLO 2

Proteínas de Expresión y Purificación de la Rhodostomina y las Variantes

La expresión de la proteína de Rhodostomina y sus variantes en *Pichia* fue realizada de acuerdo con los protocolos del equipo *Pichia* EasyComp™ con modificaciones menores. Brevemente, un total de 10 µg de plásmidos que contienen el ADN que codifica la Rhodostomina o sus variantes fueron purificadas y digeridas con Sac I para linealizar los plásmidos. La cepa de *Pichia* X33 fue transformada con las construcciones linealizadas por un método de choque de calor, utilizando un equipo de *Pichia* EasyComp™ que se consigue en Invitrogen®. El transformante integrado en el lugar 5' AOX1 por un solo cruce. El PCR fue utilizado para analizar los integrantes de *Pichia* para determinar si el gen Rho ha sido integrado dentro del genoma de *Pichia* y las células fueron lisadas por medio de Lyticase (Sigma). Las colonias fueron seleccionadas en placas de agar con un contenido de YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, glucosa al 2% y agar 2%) y 100 µg/ml de Zeocina. Un número de clones con copias múltiples de las inserciones del gen Rho fueron seleccionadas para recolectar el clon que tiene la expresión más alta de la proteína Rho.

El Rho recombinante y sus variantes fueron producidos de la siguiente manera: las colonias seleccionadas fueron cultivadas en un medio YPD (extracto de levadura al 1%, peptona al 2%, y dextrosa al 2%) con un contenido de 100 µg/ml Zeocina a una temperatura de 30°C. Después de 48 horas, las células fueron recolectadas y sometidas a centrifugación y se cultivaron en 1 litro de un medio de metanol mínimo (con un contenido de base de nitrógeno de levadura del 1.34% con sulfato de amonio sin aminoácidos y 4 x 10⁻⁵ % de biotina). Se agregó un total de metanol al 1% una vez cada 24 horas para inducir la expresión del Rho o la variante durante 2 días. El sobrenadado fue recolectado mediante centrifugación y dializado dos veces contra 5 litros de regulador A (5 mM EDTA, 8M urea y 10

mM regulador Na-fosfato, pH 7.7). La solución final fue cargada en una columna de quelación de níquel y eluida con un gradiente de 200 mM de imidazol. La Rhodostomina recombinante y sus variantes fueron purificadas adicionalmente por HPLC (HPLC C18 de fase inversa). El Rho recombinante purificado tenía una pureza mayor del 95% juzgada por el SDS-PAGE de tricina.

El Rho y sus variantes fueron sometidos posteriormente al análisis de espectrometría de masa de electrorociado para revisar el peso molecular. La secuencia de aminoácidos de los patrones RGD del Rho y sus variantes se muestran en la tabla 3.

TABLA 3

SEQ ID NO.	Patrón RGB y Variantes del mismo	Abreviatura
2	⁴⁹ Arg-Gly-Asp ⁵¹	⁴⁹ RGD ⁵¹
29	⁴⁸ Pro-Arg-Gly-Asp-Met-Pro ⁵³ (Tipo natural)	⁴⁸ PRGDMP ⁵³
30	⁴⁸ Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Pro ⁵³	⁴⁸ ARGDDP ⁵³
31	⁴⁸ Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Val ⁵³	⁴⁸ ARGDDV ⁵³
32	⁴⁸ Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Leu ⁵³	⁴⁸ ARGDDL ⁵³
33	⁴⁸ Pro-Arg-Gly-Asp-Asp-Leu ⁵³	⁴⁸ PRGDDL ⁵³
34	⁴⁸ Ala-Arg-Gly-Asp-Asp-Met ⁵³	⁴⁸ ARGDDM ⁵³
35	⁴⁸ Pro-Arg-Gly-Asp-Asp-Met ⁵³	⁴⁸ PRGDDM ⁵³
36	⁴⁸ Pro-Arg-Leu-Asp-Met-Pro ⁵³	⁴⁸ PRLDMP ⁵³ (RD)(RLD)
36	⁴⁸ Pro-Arg-Leu-Asp-Met-Pro ⁵³ (pegilado)	* ⁴⁸ PRLDMP ⁵³ -5K
37	⁴⁸ Pro-Arg-Leu-Asp-Asp-Leu ⁵³	⁴⁸ PRLDDL ⁵³
38	⁴⁸ Ala-Arg-Leu-Asp-Asp-Leu ⁵³	⁴⁸ ARLDDL ⁵³
39	⁴⁸ Pro-Arg-Ile-Asp-Met-Pro ⁵³	⁴⁸ PRIDMP ⁵³ (RID)
40	⁴⁸ Pro-Arg-His-Asp-Met-Pro ⁵³	⁴⁸ PRHDMP ⁵³
41	⁴⁸ Pro-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro ⁵³	⁴⁸ PRGDNP ⁵³
42	⁴⁸ Pro-Arg-Gly-Asp-Gly-Pro ⁵³	⁴⁸ PRGDGP ⁵³ (PGP)

*⁴⁸PRLDMP⁵³-5K se refiere a ⁴⁸PRLDMP⁵³ pegilado.

EJEMPLO 3**Efectos del RD y sus Derivados en el Tiempo de Sangrado**

La medición del tiempo de sangrado fue realizado de la siguiente manera: Los ratones fueron anestesiados con tricloroacetaldehído (200 mg/kg), y el tiempo de sangrado fue medido por un método descrito anteriormente, como modificaciones menores [21]. Se inyectaron solución salina y proteína por ruta intravenosa a través de la vena de la cola del ratón (macho ICR, con un peso corporal promedio de entre 23.5 ± 1.8 g). Un corte rápido de 0.5 mm de la punta de la cola del ratón se hizo 5 minutos después de la inyección. La cola entonces fue sumergida inmediatamente en un vaso de precipitación lleno de solución salina, mantenido a una temperatura de 37°C, y el tiempo de sangrado fue medido.

La figura 1 muestra los efectos de las proteínas RD y ARLDDL en el tiempo de sangrado de la cola de los ratones. El tiempo de sangrado de la cola fue medido 5 minutos después de la administración intravenosa de la solución salina, RD, ARLDDL, Rhodostomina (0.6 mg/kg por cada uno) del HSA-RD (5 mg/kg). La inyección intravenosa de

Rhodostomina (0.5 mg/kg) ejerció un efecto pronunciado al prolongar el tiempo de coagulación de los ratones. Sin embargo, ambos RD y ARLDDL (0.5 mg/kg), los cuales ejercieron selectividad para la integrina $\alpha\beta 3$, solamente afectaron ligeramente el tiempo de coagulación de los ratones comparados con la Rhodostomina. Los resultados se expresan como el promedio $\pm$ S. E. M (n = 6).

EJEMPLO 4

Ensayo de Agregación de Plaquetas

Se recolectaron muestras de sangre venosa (9 partes) de donadores sanos quienes no habían recibido medicamento alguno durante por lo menos dos semanas en citrato de sodio al 3.8 % (1 parte). Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 150 x g por 10 minutos para obtener un plasma rico en plaquetas (PRP) y se permitió que reposara durante 5 minutos, y se recolectaron PRP. El plasma deficiente de plaquetas (PPP) fue preparado de la sangre restante mediante centrifugación a 2000x g durante 25 minutos. La cuenta de plaquetas PPP fue medida en un analizador hematológico y diluida a 250,000 plaquetas/ μ l. Una solución de 190 μ l de PRP y 10 μ l de cualquiera de Rho o el regulador PBS fue incubada durante 5 minutos en un agregómetro Hema Tracer 601 a una temperatura de 37°C. Se agregaron adicionalmente diez microlitros de 200 μ M de difosfato de adenosina (ADP) para revisar las respuestas de la agregación de plaquetas por la transmisión de luz.

EJEMPLO 5

Ensayo de Inhibición de la Adhesión Celular

Los ensayos de inhibición de la adhesión celular se realizaron como se describió anteriormente [27]. Brevemente, los depósitos de las placas de 96 depósitos Imulon-2 de microtitulación (Costar, Corning, E.U.A.) fueron recubiertos con 100 μ l de solución salina regulada por fosfato (PBS: 10 mM de regulador de fosfato, 0.15M NaCl, pH 7.4) con un contenido de sustratos en una concentración de 50 a 500 nM, e incubado durante la noche a una temperatura de 4°C. Los sustratos y las concentraciones de recubrimientos fueron fibrinógeno (Fg) 200 μ g/ml, vitronectina (Vn) 50 μ g/ml, y fibronectina (Fn) 25 μ g/ml. Los sitios de enlace de la proteína no específicos fueron bloqueados mediante la incubación de cada depósito con 200 μ l de la albúmina de suero bovino al 1% desnaturalizada con calor (BSA, Calbiochem) a temperatura ambiente (25°C) durante 1.5 horas. El BSA desnaturalizado con calor fue descartado y cada depósito fue lavado dos veces con 200 μ l de PBS.

Las células de ovario de hámster Chino (CHO) que expresan las integrinas $\alpha\beta 3$ (CHO- $\alpha\beta 3$) y $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (CHO- $\alpha\text{IIb}\beta 3$) fueron mantenidas en 100 μ l de Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM). Las células del ovario del hámster Chino (CHO) que expresan las integrinas $\alpha\beta 3$ (CHO- $\alpha\beta 3$) y $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (CHO- $\alpha\text{IIb}\beta 3$) fueron proporcionadas amablemente por el Dr. Y. Takada (Scripps Research Institute). Las células de la eritroleucemia humana K562 fueron compradas de ATCC y cultivadas en el medio RPMI-1640 con un contenido de suero fetal bovino al 5%. Las células CHO y K562 que se cultivan en la fase log fueron desmontadas por medio de tripsinización y utilizadas en el ensayo en cantidades de 3×10^5 y 2.5×10^5 células/ml, respectivamente. La Rho y sus variantes fueron agregadas a las células cultivadas e incubadas a una temperatura de 37°C, CO₂ 5% durante 15 minutos. La Rho y sus variantes fueron utilizadas como inhibidores en las concentraciones de 0.001 a 500 μ M. Las células tratadas entonces fueron agregadas a las placas recubiertas y se hicieron reaccionar a una temperatura de 37°C, CO₂ 5% durante 1 hora. La solución de incubación fue entonces descartada y las células no adheridas fueron eliminadas lavando dos veces con 200 μ l de PBS. Las células enlazadas fueron cuantificadas por medio de la tinción de cristal violeta. Brevemente, el depósito fue fijado con 100 μ l de formalina al 10% durante 10 minutos y secado. Cincuenta microlitros de cloruro de metilrosanilina al 0.05% entonces fueron agregados dentro del depósito a temperatura ambiente durante 20 minutos. Cada depósito fue lavado con 200 μ l de agua destilada cuatro veces y secado. La coloración se llevó a cabo agregando 150 μ l de solución de color (alcohol al 50% y 0.1% de ácido acético). La absorbancia resultante se leyó en 600 nm y las lecturas fueron correlacionadas con el número de células que se adhirieron. La inhibición fue definida como % de inhibición = $100 - [\text{OD}_{600} (\text{variante de Rhodostomina-muestra tratada}) / \text{OD}_{600} (\text{muestra sin tratar})] \times 100$.

EJEMPLO 6

Efectos Inhibitorios del RD y sus Derivados en las Integrinas $\alpha\beta 3$, $\alpha\text{IIb}\beta 3$, y $\alpha 5\beta 1$

El IC₅₀ del RD y sus derivados en el enlace de integrina fueron obtenidos mediante un ensayo de adhesión de células que se describen en el Ejemplo 5 anterior. Brevemente, las proteínas de matriz tales como la fibronectina, vitronectina, o fibrinogen, fueron recubiertas en una concentración fija en placas de microtitulación, como se describió en el Ejemplo 5, y se les agregaron Rho y sus variantes a las células que expresan la integrina en diferentes concentraciones en un rango de 0.001 a 500 μ M para obtener un IC₅₀. A un IC₅₀ menor, una mayor especificidad o

potencia de la variante.

La modificación del patrón RGD del Rho tiene efectos únicos en las actividades biológicas de los Rho: la actividad para inhibir el enlace de las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ o $\alpha 5\beta 1$ a las proteínas de matriz fue reducida y la selectividad a la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ fue aumentada como resultado de la modificación de la secuencia. La tabla 4 muestra el resultado de IC_{50} para la inhibición de la adherencia de células por Rho y sus derivados.

TABLA 4
Inhibición de la adhesión de células ECM por el RD y sus derivados

		IC_{50} (nM)		
Variante del patrón RGD				
y SEQ ID NO:		$\alpha\text{IIb}\beta 3$ / Fg	$\alpha\text{v}\beta 3$ / Fg	$\alpha 5\beta 1$ / Fn
⁴⁸ PRGDMP ⁵³ (29)		21.0 ± 11.2 (17 ^a)	13.0 ± 5.7 (20)	256.8 ± 87.5 (21)
⁴⁸ ARGDDP ⁵³ (30)		850.9 ± 322.6 (3)	45.3 ± 17.4 (3)	5044.5 ± 1554.5 (3)
⁴⁸ ARGDDV ⁵³ (31)		255.2 ± 107.2 (3)	15.8 ± 5.5 (3)	213.1 ± 74.4 (3)
⁴⁸ ARGDDL ⁵³ (32)		1518.1 ± 740.4 (4)	41.3 ± 16.0 (5)	526.7 ± 200.3 (5)
⁴⁸ PRGDDL ⁵³ (33)		1224.0 ± 231.2 (4)	76.0 ± 16.0 (4)	3017.0 ± 801.5 (3)
⁴⁸ ARGDDM ⁵³ (34)		627.2 ± 317.6 (3)	49.0 ± 19.2 (6)	350.8 ± 81.0 (4)
⁴⁸ PRGDDM ⁵³ (35)		1117.8 ± 379.7 (3)	211.0 ± 91.3 (5)	4047.3 ± 1784.3 (4)
⁴⁸ PRLDMP ⁵³ (36)		2219.8 ± 996.9 (6)	35.0 ± 14.1 (5)	3043.3 ± 1117.6 (4)
⁴⁸ PRLDMP ⁵³ -5K		2408.0 ± 1090.0 (2)	114.8 ± 51.1 (4)	>3730 (3)
⁴⁸ PRLDDL ⁵³ (37)		>5880 (3)	342.3 ± 110.1 (3)	>5880 (4)
⁴⁸ ARLDDL ⁵³ (38)		59217.8 ± 966.4 (3)	36.8 ± 12.8 (3)	23171.0 ± 925.5 (3)
⁴⁸ PRIDMP ⁵³ (39)		>5880 (2)	119.9 ± 19.7 (3)	>5880 (3)
⁴⁸ PRHDMP ⁵³ (40)		2109.0 ± 810.0 (3)	131.6 ± 35.3 (3)	>5880 (3)
⁴⁸ PRGDNP ⁵³ (41)		185.0 ± 61.7 (4)	24.8 ± 13.1 (5)	357.0 ± 80.6 (3)
⁴⁸ PRGDGP ⁵³ (42)		2591.0 ± 572.2 (3)	204.1 ± 87.0 (3)	3462.0 ± 1525.5 (4)

⁴⁸PRGDMP⁵³ (29) se refiere al patrón RGD de Rho y comprende una secuencia de aminoácidos establecida por la SEQ ID NO: 29; ⁴⁸PRLDMP⁵³ (36) se refiere a la variante del patrón RGD del RD y comprende una secuencia de aminoácidos establecida por la SEQ ID NO: 36.

^a Los números representan los números de experimentos.

Las variantes de Rhodostomina tienen una afinidad mucho más baja a la $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y/o $\alpha 5\beta 1$ comparada con el Rho (Tabla 4). Por ejemplo, como se muestra en la tabla 4, el IC_{50} del RD (es decir, PRLDMP), la inhibición de las integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ aumentó más de 104 y 10 veces, respectivamente, comparada con la del Rho. Además, el IC_{50} del ARLDDL de la inhibición de integrinas $\alpha\text{IIb}\beta 3$ y $\alpha 5\beta 1$ aumentó más de 2000 veces comparada con la del Rho. El IC_{50} del RD pegilado y el RD conjugado de albúmina humana en el enlace $\alpha\text{IIb}\beta 3$ aumentó 113.7 y 129.9 veces, respectivamente, comparado con el del Rho (Tabla 5). Por lo tanto, las afinidades de las variantes a las plaquetas fueron reducidas marcadamente comparadas con las del Rho (Tabla 5).

EJEMPLO 7**Efectos del RD y sus Derivados en la Osteoclastogénesis**

5 Los osteoclastos son miembros de la familia especializada de monocito/macrófago que diferencia los precursores hematopoyéticos de la médula ósea. Los cultivos de precursores de osteoclastos en la presencia de M-CSF (20 ng/ml) y sRANKL (50 ng/ml) durante 8 días se indujeron la formación de osteoclastos maduros grandes con núcleos múltiples, los cuales fueron caracterizados por la adquisición de marcadores fenotípicos maduros, tales como TRAP. El método de osteoclastogénesis de las células hematopoyéticas cultivadas de la médula ósea y los efectos del RD y sus derivados en la osteoclastogénesis fueron investigados de la siguiente manera.

15 Las células de médula ósea fueron preparadas eliminando los fémurs de ratas SD de 6 a 8 semanas y lavando la cavidad de la médula ósea con α -MEM el cual fue suplementado con 20 mM HEPES y FCS inactivado por calor al 10%, 2 mM-glutamina, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 μ g/ml). Las células no adherentes (células hematopoyéticas) fueron recolectadas y utilizadas con precursores de los osteoclastos después de 24 horas. Las células fueron sembradas en 1×10^6 células/depósito (0.5 ml) y en las placas de 24 depósitos en la presencia del RANKL soluble recombinante humano (50 ng/ml) y M-CSF murino (20 ng/ml). El medio de cultivo fue reemplazado cada 3 días. La formación de osteoclastos fue confirmada por un ensayo de fosfatasa de ácido resistente al tartrato (TRAP) en el día 8. Brevemente, las células adherentes fueron fijadas con formaldehído al 10% en solución salina regulada por fosfato durante 3 minutos. Después del tratamiento con etanol/acetona (50:50 v/v) por 1 minuto, la superficie de las células fue secada al aire e incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente en un regulador de acetato (acetato de sodio 0.1 M, pH 5.0) con un contenido de fosfato AS-MX de naftol al 0.01% (Sigma) y 0.03% de violeta rojo rápido en sal LB (Sigma) en la presencia de 50 mM de tartrato sódico. Las células positivas-TRAP iguales a los osteoclastos de cada depósito fueron calificadas contando el número de células positivas TRAP y multinucleadas que contienen más de tres núcleos.

25 Los derivados de RD inhibieron de manera marcada la diferenciación de los osteoclastos, los cuales fueron relacionados con sus actividades inhibitorias en la $\alpha\text{v}\beta 3$ (Tabla 5). Por otra parte, AKGDWN (SEQ ID NO:138) y el PRGEMP (SEQ ID NO: 139) fueron menos eficaces para inhibir la integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ y la diferenciación de osteoclastos (Tabla 5).

TABLA 5

Inhibición de Agregación de Plaquetas, adhesión de Células y Osteoclastogénesis por RD y sus Derivados

	Agregación de plaquetas	av β 3	a5 β 1	allb β 3	Osteoclastogénesis
Rhodostomina	83	13	257	21	5.52
ARGDDL	455	41	527	1518	8.02
PGP	283	24	4000	500	5.76
RD	433	35	3043	2220	3.32
RID	448	120	>5850	>5850	5.82
PRGDDL	396	76	3017	1224	3.15
ARLDDL	10380	37	23171	59217	
PRPDDL(SEQ ID NO: 140)	3530	188	21381	13590	
AKGDWN	138	96637	>119000	69	78400
PRGEMP	4908	>17850	>5950	>59500	68200
RD-pegilado	398	115	>5880	2408	3.88
HSA-RD	438	45	>5880	2750	6.68

EJEMPLO 8**Osteoporosis Inducida por Ovariectomía**

Las ratas Sprague-Dawley hembras (de 3 meses de edad, de 270 a 290 g) o ratones ICR (de 4 semanas de edad, de 22 a 28 g) fueron utilizados para este estudio. Las ratas o ratones fueron ovariectomizadas (OVX) bilateralmente bajo anestesia de tricloroacetaldehído y las ratas de control se estimuló que estuvieran operadas (Simuladas) para comparación. Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas a temperatura ambiente ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) y un ciclo de 12 horas de luz-oscuridad. Los animales fueron alimentados con Purina Laboratory Rodent Diet (PMI; St. Louis, MO) (calcio 0.95%) y agua ad libitum. Los pesos corporales de las ratas fueron registrados semanalmente.

EJEMPLO 9**Análisis de la Densidad Mineral del Hueso (BMD) y el Contenido (BMC)**

Al final del experimento, las ratas o ratones fueron sacrificados mediante decapitación. Se removieron la tibia y el fémur, se eliminó el tejido suave, y se midieron la longitud y peso de la tibia y el fémur con un calibrador de precisión (± 0.05 mm) como lo describe Weinreb y asociados, [26]. Los BMD y BMC de la tibia fueron medidos con un absorciómetro de rayos-X de energía doble (DEX, XR-26; Norland, Fort Atkinson, WI). El modo adaptado a las mediciones de objetos pequeños fue adoptado. Ver la publicación de Chih-Hsin y asociados, "Mejora de la Fibrillogénesis de Fibronectina y la Formación del Hueso Mediante el Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos por Medio de la Trayectoria Dependiente-C de la Cinasa de Proteína en los Osteoblastos de las Ratitas" (Enhancement of Fibronectin Fibrillogenesis and Bone Formation by Basic Fibroblast Growth Factor via Protein Kinase C-Dependent Pathway in Rat Osteoblasts), Mol. Pharmacol. 66: páginas 440 a 449, (2004). El coeficiente de

variación de 0.7% fue calculado de las mediciones diarias de BMD en un fantasma lumbar con más de 1 año [22, 23]. La tibia y el fémur completos fueron explorados y se midió el BMD y BMC por un absorciómetro.

EJEMPLO 10

Histomorfometría del Hueso

Las tibias fueron fijadas en un formaldehído al 4% y luego descalcificadas con EDTA al 12% y deshidratadas en una serie ascendente de solución de etanol y acetona, e incrustados en parafina. Se cortaron secciones en serie (5 mm) longitudinalmente, y fueron teñidas con solución de hematoxilina-eosina de Mayer. Las imágenes de las placas de crecimiento y la tibia próxima fueron fotografiadas utilizando un microscopio Olympus. El volumen del hueso fue medido utilizando un software de análisis de imagen (Image-pro plus 3.0) en el esponjoso secundario, el cual fue localizado bajo el esponjoso primario y caracterizado por una red trabecular más grande. Para medir el número de osteoclastos, las secciones fueron teñidas con fosfatasa de ácido resistente al tartrato (TRAP).

EJEMPLO 11

Prueba Biomecánica de Doblado de Tres Puntos

Las propiedades mecánicas de los tejidos del hueso fueron medidas realizando una prueba de doblado de tres puntos en un sistema de prueba en el material (MTS-858, MTS System Inc., Minneapolis, MN). La distancia de los dos puntos de soporte fue de 20 milímetros y la deformación fue de 1 mm/min. Las gráficas de carga/deformación fueron cargadas a una computadora y analizadas por el software Team 490 (versión 4.10, Nicolet Instrument Technologies Inc., Madison, WI). Los parámetros transversales fueron medidos a partir de las fotografías y utilizados en el cálculo del momento de inercia transversal. El momento de inercia transversal fue calculado bajo el supuesto de que las secciones cruzadas tenían forma elíptica [24]:

$$I = \pi[(ab^3 \times (a \times 2t)(b \times 2t)^3) / 64]$$

en donde a es el ancho de la sección transversal en la dirección media lateral, b es el ancho de la sección transversal en la dirección anteroposterior, y t es el promedio del espesor cortical. Todos estos parámetros fueron obtenidos utilizando el software de imagen Image Pro Plus 3.0 para Windows (Media Cybernetics, Silver Spring, MD). El esfuerzo máximo, el esfuerzo final, y el módulo elástico (módulo de Young) fueron calculados utilizando las siguientes ecuaciones [25]:

$$\sigma = FLc/4I$$

$$E = F/d \times L^3/48I$$

en donde σ es el esfuerzo final, c es la distancia del centro de masa (igual a $\frac{1}{2} b$ como se describió anteriormente), F es la carga aplicada (N), d es el desplazamiento (mm), y L es la distancia entre los dos puntos de soporte del aditamento de doblado (mm). Además, las energías del esfuerzo último fueron medidas calculando las áreas respectivas bajo la curva de deformación-esfuerzo.

EJEMPLO 12

Inhibición de la pérdida de hueso inducida por OVX mediante los derivados de RD en los ratones

Para examinar los efectos de los derivados de RD en la pérdida de huesos, se indujo osteoporosis en los ratones hembra mediante una ovariectomía (OVX), como se describe en el Ejemplo 8. Los ratones sometidos a OVX mostraron una disminución en el BMD y BMC del cuerpo total. El tratamiento con derivados de RD (I.M., 1.5 mg/kg/días alternados) o alendronato (p.o., 1.5 mg/kg/días alternados) durante 2 semanas inhibieron la pérdida de BMD y BMC (Tabla 6). La concentración de sangre en el telopéptido de la terminal C de colágeno puede reflejar la actividad osteoclástica. Como se muestra en la Tabla 6, los derivados de RD o el alendronato también inhibieron el aumento inducido por la ovariectomía en la actividad del osteoclasto (Tabla 6). Pareció que algunos de los derivados de RD eran mucho más efectivos que el alendronato. Además, el tratamiento con RD (I.M., 1.5 mg/kg) una vez por semana durante 2 semanas también inhibió la pérdida de BMD y BMC (Tabla 6). Estos datos indican que el RD y sus derivados pueden inhibir la osteoporosis en intervalos de dosificación más largos.

TABLA 6**Inhibición de pérdida del hueso inducida por OVX mediante RD y sus derivados en ratones**

	BMD (g/cm ²)	BMC (g)	Telopéptido de la terminal -C de cadena COL(1) α 1 (ng/ml)
<u>(Día alternado)</u>			
Simulado	0.095 $\pm$ 0.001	0.649 $\pm$ 0.011	395 $\pm$ 11.9
OVX	0.075 $\pm$ 0.002*	0.517 $\pm$ 0.007*	686 $\pm$ 12.1*
OVX+RD	0.091 $\pm$ 0.001§	0.627 $\pm$ 0.008§	391 $\pm$ 8.3§
OVX+PGP	0.092 $\pm$ 0.001§	0.621 $\pm$ 0.006§	372 $\pm$ 24.2§
OVX+ARGDDL	0.093 $\pm$ 0.001§	0.624 $\pm$ 0.007§	389 $\pm$ 16.4§
OVX+RID	0.091 $\pm$ 0.001§	0.622 $\pm$ 0.004§	391 $\pm$ 12§
OVX+Rhodostomina	0.090 $\pm$ 0.001§	0.619 $\pm$ 0.006§	397 $\pm$ 13.6§
OVX+PRLDDL	0.091 $\pm$ 0.002§	0.563 $\pm$ 0.056§	410 $\pm$ 25.1§
OVX+Alendronato	0.086 $\pm$ 0.002§	0.607 $\pm$ 0.051§	504 $\pm$ 19.6§
OVX+RD-pegilado	0.092 $\pm$ 0.002§	0.629 $\pm$ 0.008§	398 $\pm$ 9.2§
<u>(Una vez/semana)</u>			
OVX+RD	0.085 $\pm$ 0.002§	0.582 $\pm$ 0.009§	533 $\pm$ 27.4§
OVX+RD-pegilado	0.087 $\pm$ 0.005§	0.595 $\pm$ 0.009§	538 $\pm$ 19.8§

Los valores son promedios $\pm$ E.S.

*Comparado con el grupo simulado, $p < 0.05$

§Comparado con el grupo OVX, $p < 0.05$

EJEMPLO 13**Inhibición de pérdida del hueso inducida por la ovariectomía mediante los derivados de PGOP y RD en las ratas**

El PGP (un derivado de RD) fue seleccionado para examinar con mayor detalle la protección de la pérdida de hueso inducida por OVX (ovariectomía) en las ratas. Las ratas hembra adultas (3 meses de edad) fueron ovariectomizadas, como en el Ejemplo 8, y se midieron los volúmenes del hueso 6 semanas después de la ovariectomía, como en los Ejemplos del 9 al 11. Se mostró que la proteína PGP inhibió tanto la disminución del volumen del hueso inducida por la ovariectomía como el aumento del número de osteoclastos.

Como se muestra en la figura 2A, comparada con las ratas operadas-simuladas (Simuladas), la ovariectomía (OVX) ocasionó una pérdida importante en el hueso trabecular. Sin embargo, el tratamiento con PGP (IV, 0.3 mg/kg/día o IM, 1.5 mg/kg/días alternados) inhibió de manera importante la pérdida inducida por ovariectomía del hueso

trabecular en el esponjoso secundario.

En la figura 2B, la tinción con fosfatasa de ácido resistente al tartrato (TRAP) mostró que los osteoclastos fueron localizados predominantemente alrededor del hueso trabecular, y que el PGP inhibió el aumento inducido por la OVX en la formación de osteoclastos.

Las ratas OVX también mostraron un aumento en el peso corporal al final del experimento. El tratamiento con PGP (IV, 0.3 mg/kg/día o IM, 1.5 mg/kg/días alternados) inhibió de manera importante el aumento inducido por OVX en el peso corporal.

Las ratas también mostraron una disminución en el peso húmedo, BMD y BMC tanto en el fémur como en la tibia 6 semanas después de la ovariectomía (Tabla 7). El tratamiento con el PGP (ya sea I.V. o I.M.) inhibió la reducción en peso húmedo, BMD y BMC tanto de la tibia como el fémur en las ratas OVX. La histomorfometría demostró que la ovariectomía ocasionó la pérdida del hueso trabecular en el esponjoso secundario (figura 2). El tratamiento con PGP marcó la pérdida invertida del volumen del hueso (figura 2 y Tabla 7). Además, la tinción con TRAP demostró que los osteoclastos fueron localizados predominantemente alrededor del hueso trabecular y aumentaron OVX el número de osteoclastos. La administración a largo plazo del PGP antagonizó con la formación de osteoclástica inducida por OVX (figura 2 y Tabla 7). El nivel en el suero del telopéptido de la terminal C del colágeno refleja la actividad del osteoclasto. Se descubrió que el valor aumentó de manera marcada en el grupo OVX comparado con el del grupo Simulado, mientras que el tratamiento con PGP antagonizó de manera efectiva con el aumento inducido por OVX en la actividad de los osteoclastos (Tabla 7).

TABLA 7**Inhibición de la Pérdida del Hueso Inducida por la Ovariectomía mediante la proteína PGP en las Ratas**

	Simulado (n=22)	OVX (n=22)	OVX+PGP(IV) (n=13)	OVX+PGP(I M) (n=12)
Longitud de hueso, mm				
Tibia	4.04±0.01	4.04±0.01	4.05±0.01	4.04±0.01
Fémur	3.62±0.01	3.62±0.02	3.60±0.02	3.64±0.02
Peso húmedo, mg				
Tibia	755.5±6.3	647.5±8.5*	735.8±8.5§	740.6±8.7§
Fémur	946.0±10.9	850±9.9*	904.9±10.2§	904.0±13.5§
BMD, g/cm²				
				0.111±0.002
Tibia	0.108±0.002	0.099±0.015*	0.109±0.002§	§
				0.136±0.002
Fémur	0.131±0.012	0.126±0.003*	0.130±0.002§	§
BMC, g				
				0.316±0.009
Tibia	0.301±0.011	0.269±0.011*	0.286±0.010§	§
				0.437±0.009
Fémur	0.420±0.005	0.369±0.011*	0.422±0.013§	§
Volumen del hueso, %	18.1±1.5	9.4±1.5*	14.3±1.5§	16.8±1.8§
N.Oc/BS (No/mm)	1.77±0.09	2.06±0.17*	1.83±0.10§	1.81±0.09§
Telopéptido de la terminal-C de colágeno (n=5 por cada uno)				
	230±5.1	459±18.4*	259±22.8§	221±15.1§

5 ALP, fosfatasa alcalina; N.Oc/BS, número de osteoclastos/mm de superficie del hueso. Los valores son promedios ± E.S.

*Comparado con el grupo simulado, p<0.05

§Comparado con el OVX del grupo OVX, p<0.05

10 Una prueba de doblado de tres puntos fue realizada en el fémur para examinar la actividad mecánica del hueso. Comparada con el grupo operado Simulado, la carga máxima, la carga final, el módulo de Young y el esfuerzo final disminuyeron en las ratas OVX. El tratamiento con PGP exhibió una protección contra la disminución en la fuerza del hueso inducida por OVX (Tabla 8). Estos resultados sugieren que los fármacos de proteína similares al PGP pueden

inhibir de manera marcada la pérdida de hueso ocasionada por la ovariectomía.

TABLA 8
Aumento en las propiedades biomecánicas mediante la proteína PGP en ratas OVX

	Simulado (n=22)	OVX (n=22)	OVX+PGP (IV) (n=13)	OVX+PGP (IM) (n=12)
Carga máxima, N	132.7±4.8	112.1±4.3*	123.9±4.9§	129.8±7.9§
Carga final, N	85.5±3.7	70.4±3.1*	81.9±2.2§	83.2±2.5§
Módulo de Young, GPa	203.7±3.6	185.5±3.3*	194.0±3.0§	199.9±6.2§
Energía para el esfuerzo final, mJ/mm³	5.9±0.4	3.5±0.3*	4.9±0.8§	5.1±0.9§

Los valores son promedios ± E.S.

*Comparado con el grupo Simulado, p<0.05

§Comparado con el OVX del grupo OVX, p<0.05

EJEMPLO 14

El postratamiento de la proteína RD exhibió una activación del osteoclasto inducida por el OVX

Para examinar el efecto terapéutico dinámico de los derivados de RD en la actividad de los osteoclastos *in vivo*, la osteoporosis se indujo en las ratas hembra mediante ovariectomía y los telopéptidos de la terminal C de colágeno tipo I fueron medidos de la sangre a intervalos diferentes. Comparados con las ratas simuladas operadas (Simulados), la ovariectomía (OVX) ocasionó un aumento importante en la actividad de los osteoclastos. La medición del nivel del suero del telopéptido de la terminal C de la cadena COL(1) α 1 mostró un aumento en la actividad de osteoclastos en las ratas OVX. El telopéptido de la terminal C del colágeno tipo I aumentó de un nivel basal de 361 ± 25.6 (n=15) a 708 ± 50.7 ng/ml (n=15) 28 días después de la ovariectomía.

El RD o el alendronato entonces fueron tratados posteriormente un mes después de la ovariectomía. El tratamiento posterior con RD (I.M., 1.5 mg/kg/días alternados) o el alendronato (p.o., 1.5 mg/kg/días alternados) invirtieron el aumento inducido por la ovariectomía en la actividad de los osteoclastos, y el RD fue mucho más efectivo que el alendronato (figura 3). La actividad del osteoclasto fue recuperada después con el retiro del RD o el tratamiento de alendronato. La recuperación de la actividad del osteoclasto fue mucho más rápida en el grupo tratado con alendronato que con el grupo tratado con RD. Sin embargo, la nueva aplicación de RD inhibió de manera efectiva el aumento inducido por la ovariectomía en la actividad de osteoclastos. El valor de los osteoclastos en respuesta al tratamiento con RD fue mucho más bajo que la respuesta al tratamiento con alendronato (figura 3). Estos resultados indican que las proteínas relacionadas con el RD tienen efectos terapéuticos en la pérdida de los huesos ocasionados por la activación de los osteoclastos inducida por la ovariectomía.

Después del segundo período del tratamiento del fármaco, las ratas fueron sacrificadas, y fueron medidos el BMD y BMC de la tibia y el fémur. Como se muestra en la Tabla 9, el tratamiento posterior del RD invirtió de manera efectiva el efecto de pérdida del hueso de la ovariectomía. Con respecto a la conservación del volumen del hueso, el RD fue más efectivo que el alendronato.

TABLA 9**El postratamiento de RD inhibe la pérdida de hueso inducida por OVX en las ratas**

	Simulado	OVX	RD	Alendronato
Longitud del hueso, mm				
Tibia	4.04±0.03	4.05±0.03	4.01±0.03	4.02±0.05
Fémur	3.69±0.03	3.68±0.02	3.71±0.06	3.68±0.05
Peso húmedo, mg				
Tibia	766.6±19.9	661±18.2*	749±20.1§	712.1±10.1§
Fémur	1002.6±17.4	861±10.7*	985.3±9.8§	912.4±10.9§
BMD, g/cm²				
Tibia	0.114±0.003	0.101±0.002*	0.113±0.009§	0.108±0.002§
Fémur	0.137±0.002	0.121±0.002*	0.135±0.004§	0.131±0.003§
BMC, g				
Tibia	0.315±0.013	0.272±0.006*	0.299±0.011§	0.289±0.009§
Fémur	0.442±0.012	0.391±0.008*	0.441±0.018§	0.401±0.017§
Volumen del hueso, %	18.1±1.2	7.9±2.1*	16.3±2.7§	12.1±1.3§

5 BMD es la abreviatura de la densidad mineral del hueso; BMC es la abreviatura del contenido mineral del hueso.
Los valores son promedios ± E.S.

*Comparado con el grupo Simulado, p<0.05

§Comparado con el OVX del grupo OVX, p<0.05

RD: Inyección Intramuscular (1.5 mg/kg/días alternados)

10 Alendronato: p.o. (1.5 mg/kg/días alternados)
n=5 para cada grupo

EJEMPLO 15**15 Inhibición del daño de los condrocitos por el RD en los animales osteoarthríticos**

Se obtuvo, mediante cirugía solamente, un modelo de animal con osteoartritis de las rodillas derechas de las ratas Sprague-Dawley macho. La cirugía comprendió la transacción de la ligación cruciforme anterior y la meniscectomía parcial media. Después de la cirugía, la proteína RD fue administrada por medio de la ruta intramuscular (1.5 mg/kg/días alternados) o inyección local en la articulación (una vez/semana) hasta el último día cuando las ratas fueron sacrificadas 6 semanas después de la cirugía. Cada articulación fue incrustada en cera de parafina, seccionada y teñida con safranina-O al 0.1% y hematoxilina. Como se muestra en la figura 4B, la capa de condrocitos en la articulación de la rodilla derecha estaba dañada por la artritis y el RD en cualquier inyección intramuscular (figura 4D) o aplicación local (figura 4C) inhibió la destrucción de la capa de condrocitos.

EJEMPLO 16**Inhibición de la elevación de citocina en la sangre por el RD en ratas con osteoartritis**

5 Las ratas con osteoartritis fueron generadas mediante cirugía como se describió anteriormente. Seis semanas después de la cirugía, se obtuvo el suero para medir el nivel en la sangre de las citocinas. Como se muestra en las figuras de la 5A a la 5C, los niveles en el suero de las citocinas, tales como la proteína reactiva-c, IL-1 β e IL-6, aumentó en las ratas osteoarthriticas, y la administración de RD inhibió de manera marcada la elevación de citocinas inducida por la osteoartritis.

EJEMPLO 17**Inhibición de la elevación de citocina en la sangre por el RD en ratones con osteoartritis**

15 Los ratones con osteoartritis fueron generados mediante cirugía como se describió anteriormente. Seis semanas después de la cirugía, el suero fue obtenido para medir el nivel de citocinas. Como se muestra en las figuras de la 6A a la 6C, los niveles en el suero de citocinas, tales como la proteína reactiva-c, IL-1 α e IL-6 aumentó en los ratones osteoarthriticos, y la administración de RD inhibió de manera marcada la elevación de citocinas inducida por la osteoartritis.

EJEMPLO 18**Inyección intratibia de células de cáncer de próstata o mama en ratones**

25 Se utilizaron ratones macho con Deficiencia Inmunológica Combinada Severa (SCID) o ratones macho BALB/c-nu/nu con un peso entre 20 y 22 gramos (6 semanas de edad), criados en un aislador de animales (rejillas IVC) bajo condiciones específicas libres de patógenos (SPF) a una temperatura de 22°C $\pm$ 2°C. Las células de adenocarcinoma de próstata humana PC-3 o las células de cáncer de mama humana MDA-MB-231 (células 1 x 10⁶ en 15 ml de solución estéril de PBS) fueron inyectadas en la médula ósea tanto en la tibia derecha como izquierda de los ratones SCID o los ratones rasurados en el día 1, respectivamente. En el día 11, los animales fueron asignados de manera aleatoria en tres grupos y la administración de las sustancias de prueba fueron iniciadas. El RD (1.5 mg/kg) fue administrado mediante inyección intramuscular (IM) y el alendronato (1.5 mg/kg) fue administrado por inyección subcutánea (SC), una vez al día por un total de 15 dosis (5 días si, 2 días no por 3 semanas). El peso corporal y la condición de crecimiento del tumor fueron observadas y registradas cada semana durante el período del experimento. Después de un mes, los ratones fueron sacrificados y el peso de las patas traseras fue medido. El peso de las patas de control fue restado para reflejar el peso relativo del tumor. Además, las muestras de sangre fueron recolectadas al final del experimento para la cuenta de glóbulos rojos de la sangre (RBC) y los glóbulos blancos de la sangre (WBC) y plaquetas, y para la medición de telopeptidos de la terminal C de colágeno tipo I (CTX) y la concentración de calcio en el suero.

40 Con el objeto de determinar la osteólisis del hueso, se tomaron radiografías en una unidad generadora de rayos-X suaves (Young-kid Enterprise Co., Ltd., Taipei, Taiwán). Los animales fueron anestesiados profundamente con monohidrato de tricloroacetaldéhid, acostados en una posición propensa en una película de elaboración de imagen Kodak Scientific Imaging (13 x 18 cm), y se realizó la exposición a los rayos-X en 45 kV por 5 segundos. El grado de osteólisis fue medido utilizando el software de análisis de imagen (Image-pro plus 3.0).

EJEMPLO 19**Inhibición del crecimiento del tumor en el hueso e hipercalcemia**

50 El crecimiento de las células de tumor en el hueso está relacionado con la actividad de reabsorción del hueso. El efecto de la proteína RD en el crecimiento del tumor de las células de cáncer de la próstata en el hueso fue examinado de esta manera. Las células PC-3 (1 x 10⁶) fueron inyectadas localmente dentro de las cavidades de la médula ósea de ambas tibias de los ratones SCID. El RD o el alendronato fue administrado 10 días después de la implantación de las células de tumor. El RD en 1.5 mg/kg fue administrado por la ruta intramuscular (IM) mientras que el alendronato fue administrado en 1.5 mg/kg por inyección subcutánea (SC), una vez al día por un total de 15 dosis (5 días si y 2 no por tres semanas). La hinchazón de las patas traseras fue calculada para reflejar el crecimiento del tumor en el día 33. El peso corporal fue medido en el período del experimento. Los resultados indicaron que el RD en una dosis de 1.5 mg/kg ocasionó una inhibición importante en la hinchazón inducida por la célula del tumor en las patas traseras en el día 33 (43.8 $\pm$ 4.1%, n=21-22) (figura 7). Sin embargo, la administración subcutánea del alendronato en una cantidad de 1.5 mg/kg no inhibió el crecimiento del tumor en las patas (figura 7).

La figura 8 muestra el efecto del RD en la disminución del peso corporal en respuesta al crecimiento del tumor en los ratones SCID. Los ratones de control sin tratamiento mostraron una disminución en el peso corporal al final del experimento. El tratamiento con RD previno la pérdida del peso corporal ocasionado por el crecimiento del tumor. El alendronato fue utilizado como control positivo.

La figura 9 muestra la inhibición del crecimiento del tumor y la lesión del hueso osteolítico por medio del RD en los ratones SCID. Con el objeto de determinar la osteólisis del hueso, se tomaron radiografías por una unidad de generación de rayos-X suave. En la figura 9A, se tomaron fotografías 33 días después de la inyección intratibial de las células PC-3. Un tumor esférico visible creció de la tibia próxima. El tratamiento con RD (I.M., 1.5 mg/kg/días alternados) inhibió el crecimiento del tumor. En la figura 9B, las radiografías tomadas en el día 33 revelaron que las lesiones osteolíticas aparecieron en la tibia inyectada con células cancerosas y el tratamiento de RD inhibió la osteólisis. La figura 9C muestra la cuantificación de los datos. La figura 9D muestra que el RD inhibió un aumento inducido por el tumor en los telopeptidos de la terminal C del colágeno tipo I (un marcador de la actividad para el osteoclasto) utilizando el método de ELISA. La figura 9E demuestra que el RD y el alendronato (1.5 mg/kg/días alternados) también inhibieron el aumento inducido por el tumor en la concentración de calcio en el hueso (es decir, hipercalcemia). *: $p < 0.05$, comparado con el control. #: $p < 0.05$, comparado con el grupo inyectado con PC-3.

El cáncer de mama tiene una predilección fuerte para la presentación de metástasis en los huesos. La figura 10 muestra una inhibición del crecimiento del tumor por el RD en los ratones desnudos. Las células de cáncer de mama humanas MDA-MB-231 (1×10^6) fueron inyectadas localmente en la médula ósea en las cavidades de ambas tibias de los ratones desnudos. El RD (I.M., 1 mg/kg/día) fue administrado 10 días después de la implantación de la célula de tumor por un total de 14 días. El tratamiento con RD (I.M., 1.5 mg/kg/día) por 2 semanas inhibió el aumento inducido por MDA-MB-231 en el crecimiento del tumor en el hueso (figura 10A). Además, el RD también previno el aumento inducido por el tumor en la actividad del osteoclasto (figura 10B) y la hipercalcemia (figura 10C), pero no afectó las cuentas en la sangre de RBC, WBC y las plaquetas (figuras de la 10D a la 10F). *: $p < 0.05$, comparado con el control. #: $p < 0.05$, comparado con el grupo inyectado con MDA-MB-231.

EJEMPLO 20

Pegilación de la proteína RD

Un producto pegilado o una conjugación con albúmina puede prolongar la duración y disminución de la antigenicidad de un fármaco de proteína. Con el objeto de minimizar la antigenicidad y prolongar la duración de la proteína RD, la proteína RD pegilada fue preparada de la manera siguiente: proteína RD (4 mg) en 20 mM de NaCNBH₃ en un pH 5 se hizo reaccionar con 5 mM de PEGk5-propionaldehído (O-Metil-O'-[2-(6-oxocaproilamino)etil]polietilenglicol 5,000) (Sigma) a una temperatura de 4°C durante 12 horas. La proteína RD pegilada fue purificada mediante HPLC C18 de fase inversa. El rendimiento final de la proteína RD pegilada después de la purificación fue mayor del 60%.

Como se muestra en la Tabla 6, el RD pegilado inhibió la diferenciación de osteoclastos. Además, el tratamiento con el RD pegilado (I.M., 1.5 mg/kg, una vez por semana) durante 2 semanas inhibió la pérdida de BMD y BMC (Tabla 6). Estos datos indican que el RD pegilado no perdió su actividad *in vivo*.

EJEMPLO 21

Ensayos Antiangiogénesis del Tapón MATRIGEL™

Se ha reportado que la integrina $\alpha v \beta 3$ está relacionada con la angiogénesis. Si la proteína RD puede inhibir la angiogénesis entonces fue investigada utilizando ensayos de angiogénesis del tapón MATRIGEL™ como se describieron anteriormente con modificaciones menores [32]. Brevemente, un alícuota (500 μ l) de MATRIGEL™ (Becton Dickinson Lab.) con un contenido de 200 ng/ml de VEGF fue inyectado de manera subcutánea en la región dorsal de los ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad. El MATRIGEL™ formó rápidamente un tapón. El RD fue administrado de manera intramuscular (3 mg/kg) diariamente (RD/1d) o cada tercer día (RD/2d o HSA-RD) antes del sacrificio. Después de 8 días, los tapones fueron tomados y fotografiados (figura 11A). Los nuevos vasos fueron cuantificados midiendo la hemoglobina de los tapones como una indicación de la formación de vasos sanguíneos con el método Drabkin y el equipo del reactivo Drabkin 525 (Sigma) (figura 11B). Como se muestra en las figuras 11A y 11B, la proteína RD fue efectiva para inhibir la angiogénesis utilizando los ensayos de tapón del MATRIGEL™. *: $P < 0.05$ contra el grupo de control.

EJEMPLO 22**Ensayo de Enlace del Radioligando: Especificidad de las proteínas relacionadas con el RD**

5 Para determinar si el RD y sus derivados se enlazan al PGP a otros receptores aparte de la integrina $\alpha v \beta 3$, el RD y sus derivados PGP fueron utilizados para analizar la especificidad activada hacia los receptores cuyos ligandos son proteínas (ensayados por MDS Pharma Services, Taipei, Taiwán).

10 Como se muestra en la Tabla 10, el RD y PGP no afectaron la actividad de enlace de la calcitonina, endotelina ET_A, endotelina ET_B, insulina, leptina, canal de sodio, factor de crecimiento de transformación β (TGF- β), factor de necrosis de tumor (TNF) y factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) a sus receptores respectivos. Esto indica que las proteínas relacionadas con el RD ejercen una actividad de enlace selectiva hacia la proteína $\alpha v \beta 3$ activada *in vivo*.

TABLA 10**El ensayo de enlace de las proteínas RD y PGP**

Objetivo	Inhibición	
	RD	PGP
Calcitonina	4%	-6%
Endotelina ET _A	26%	-3%
Endotelina ET _B	10%	-7%
Insulina	-6%	-8%
Leptina	1%	2%
Canal de Sodio (Sitio 2)	2%	-14%
TGF- β	14%	-10%
TNF	4%	20%
VEGF	-14%	19%

TGF- β : factor de crecimiento de transformación- β

TNF: factor de necrosis del tumor

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular

EJEMPLO 23**Inhibición de la angiogénesis por el RD en el modelo de ratón de retinopatía de premadurez**

20

Un modelo de animal de retinopatía por premadurez en los ratones fue generado utilizando la angiogénesis inducida hipóxica como se describe en la publicación de Wilkinson-Berka y asociados [28]. Brevemente, los ratones de siete días y su madre fueron alojados en cámaras selladas con un contenido de O₂ al 75% y aire. Los ratones permanecieron en la cámara durante cinco días (período hiperóxico, P7 a P12), y entonces fueron alojados en el aire

de la habitación por siete días adicionales (período angiogénico inducido hipóxico, postnatal 12 días a postnatal 19 días, o P12 a P19). El RD (2 µg) fue administrado por medio de la ruta intravítrea en 12 días y los ratones fueron sacrificados en el día 19.

- 5 Se trazaron tres secciones de uno de los ojos de cada animal, se desparafinizaron, y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los perfiles del vaso sanguíneo (BVPs) fueron contados en la retina interior, e incluidos los vasos adherentes a la membrana del límite interior. El conteo se realizó en un fotomicroscopio (Leica) en una magnificación de 100x.
- 10 Como se muestra en la figura 12A, la proteína RD inhibió la angiogénesis en un modelo de ratón de retinopatía de premadurez (ROP). La figura 12B muestra los BVPs reducidos en un modelo de ratón de retinopatía de premadurez (ROP) tratado con proteína RD. La angiogénesis fue cuantificada mediante el conteo de los perfiles de vasos sanguíneos (BVPs) en la retina interior y que se extiende dentro de la cavidad vítrea de tres secciones teñidas con hematoxilina y eosina. El grupo ROP tratado con RD (2 µg) (por ejemplo, ROP+RD) redujo aproximadamente el 46% de la angiogénesis comparada con el grupo ROP tratado con vehículo (ROP). (n=7 para cada grupo ROP; n=2 para el grupo simulado). Los datos se presentan como Promedio±DE. #: p<0.01, comparado con el grupo simulado. **: p<0.001, comparado con el grupo ROP.

EJEMPLO 24

Inhibición de la osteoporosis inducida por ovariectomía mediante el RD conjugado con albúmina

- 20 El efecto del RD conjugado con albúmina en la osteoporosis fue examinado en ratas hembra ovariectomizadas. El RD conjugado con albúmina de suero humano (por ejemplo, RD-albúmina) fue administrado como lo indican las flechas mostradas en las figuras 13A y 13B. Los datos para el RD fueron incorporados en las figuras de la 13A a la 13D para comparación. Los niveles en el suero del péptido en la terminal C de colágeno tipo I y la fosfatasa alcalina (ALP) fueron medidos como indicadores de osteoclastos y actividad de osteoblastos, respectivamente. El BMD y BMC también fueron medidos cada 2 semanas, como se muestra en las figuras 13C y 13D. El tratamiento de RD-albúmina (15 mg/kg/semana) redujo de manera marcada el osteoclasto, pero aumentó las actividades ALP, de una manera reversible.

EJEMPLO 25

Inhibición de la artritis reumatoide con el RD

- 35 La artritis reumatoide es una enfermedad inflamatoria sistémica crónica de etiología desconocida caracterizada por la hiperplasia sinovial invasiva que conduce a la destrucción progresiva de la articulación. Los osteoclastos, derivados de la descendencia de monocitos/macrófagos, juegan un rol crucial en la destrucción subcondral del hueso en la artritis reumatoide. Los estudios radiográficos han mostrado que en la artritis reumatoide, la osteopenia del hueso subcondral y la erosión del hueso comienza en una etapa temprana de la enfermedad, y generalmente son exacerbadas [29]. Los osteoclastos reabsorbentes del hueso son observados en la interfase erosiva de sinovio/hueso [30]. Una revisión reciente explica el rol de los osteoclastos en la artritis reumatoide [31]. Por lo tanto, las proteínas relacionadas con RD, las cuales inhiben de manera marcada las funciones del osteoclasto, pueden ser útiles en el tratamiento de la artritis reumatoide.

- 45 Se administraron inyecciones intradérmicas/subcutáneas (SC) de colágeno bovino tipo II (2 mg/ml en un adyuvante incompleto de Freund) a la ratas Lewis. Conforme las ratas desarrollan la enfermedad reumatoide, son divididas de manera aleatoria en varios grupos de estudio. El tratamiento es iniciado en el primer día cuando los signos clínicos de la artritis son visibles claramente, como lo evidencia, por ejemplo, la hinchazón de la articulación del tobillo. Después de la medición del volumen de las patas, las ratas son sacrificadas, y las articulaciones del tobillo y la rodilla son recolectadas para el examen del cambio histopatológico.

- 50 Las figuras de la 14A a la 14D muestran las secuencias de aminoácidos de Rho y sus variantes, SEQ ID NOs: 1, y 57 a 69, respectivamente. Las figuras de la 15A a la 15C muestran las secuencias de nucleótidos de variantes de Rhodostomina, SEQ ID NOs: 43 a 56.

- 55 La descripción anterior de las modalidades de ejemplo de la presente invención ha sido presentada solo con propósitos de ilustración y descripción y no pretende ser exhaustiva o limitar la presente invención de las formas precisas descritas. Son posibles muchas modificaciones y variaciones a la luz de las enseñanzas anteriores.

- 60 Otras modalidades de la presente invención podrán ser apreciadas por los expertos en la técnica a partir de la

consideración de la descripción y la práctica de la presente invención aquí descrita. Se pretende que la descripción y los ejemplos sean considerados solamente como ejemplos.

Lista de Referencias

- [1] van't Hof RJ, Ralston SH. (2001) Óxido nítrico y hueso. *Immunology* 103: páginas 255 a 261.
- 5 [2] Goltzman D. (2002) Descubrimientos, fármacos y enfermedades del esqueleto. *Nat Rev Drug Discov* 1: páginas 784 a 796.
- [3] Yoneda T, Williams PJ, Hiraga T, Niewolna M, Nishimura RA. (2001) Clon osteófilo que exhibe diferentes propiedades biológicas de la célula de cáncer de mama humana paternas MDA-MB-231 y un clon encefalófilo *in vivo* e *in vitro*. *J Bone Miner Res* 16: páginas 1486 a 1495.
- 10 [4] Mundy G.R. (2002) Metástasis en los huesos: causas, consecuencias y oportunidades terapéuticas. *Nat Rev Cancer* 2: páginas 584 a 593.
- [5] Miyauchi AJ, Álvarez EM, Greenfield A, Teti M, Grano S, Colucci A, Zamboni-Zallone FP, Ross SL, Teitelbaum, Cheresch D. (1991) Conocimiento de la osteopontina y péptidos relacionados por una integrina $\alpha\nu\beta 3$ estimulan las señales celulares inmediatas en los osteoclastos. *J Biol Chem* 266: páginas 20369 a 20374.
- 15 [6] Crippes BA, Engleman VW, Settle SL, Delarco J, Ornberg RL, Helfrich MH, Horton MA, Nickols GA. (1996) El anticuerpo para la integrina $\beta 3$ inhibe la reabsorción del hueso portada por los osteoclastos en las ratas tiroparatiroidectomizadas. *Endocrinology* 137: páginas 918 a 924.
- [7] Horton MA, Taylor ML, Arnett TR, Helfrich MH, (1991) Los péptidos Arg-gly-asg (RGD) y el anticuerpo 23C6 del receptor de antivitronectina inhiben la reabsorción de dentina, y la difusión de las células por los osteoclastos. *Exp*
- 20 *Cell Res* 195: páginas 368 a 375.
- [8] Ross FP, Alvarez JI, Chappel J, Sander D, Butler WT, Farach-Carson MC, Mintz KA, Robey PG, Teitelbaum SL, Cheresch DA. (1993) Interacciones entre la osteopontina de las proteínas de la matriz del hueso y la sialoproteína del hueso y los osteoclastos de la integrina $\alpha\nu\beta 3$ potencializan la reabsorción del hueso. *J Biol Chem* 268: páginas 9901 a 9907.
- 25 [9] Inoue M, Teitelbaum SL, Hurter L, Hruska K, Seftor E, Hendrix M, Ross FP. (1995) El GM-CSF regula la expresión de las integrinas $\alpha\nu\beta 3$ y $\alpha\nu\beta 5$ funcionales de una manera recíproca durante la osteoclastogénesis. *J Bone Miner Res* 10: página S163a. (Resumen).
- [10] Mimura H, Cao X, Ross FP, Chiba M, Teitelbaum SL, (1994) La 1,25(OH)2D3 vitamina D3 activa transcripcionalmente el gen de la subunidad de la integrina $\beta 3$ en precursores avariados de osteoclastos.
- 30 *Endocrinology* 134: páginas 1061 a 1066.
- [11] Engleman VW, Nickols GA, Ross FP, Horton MA, Griggs DW, Settle SL, Ruminiski PG, Teitelbaum SL. (1997) Un antagonista peptidomimético de las integrinas alfa(v)beta3 que inhibe la reabsorción del hueso *in vitro* y previene la osteoporosis *in vivo*. *J Clin Invest* 99: páginas 2284 a 2292.
- [12] Nakamura I, Tanaka H, Rodan GA, Duong LT. (1998) La equistatina inhibe la migración de los osteoclastos prefusión móridos y la formación de células similares a osteoclastos multinucleados. *Endocrinology* 139: páginas
- 35 5182 a 5193.
- [13] Mundy G.R. (1991) Mecanismos de la destrucción del hueso osteolítico. *Bone-Suppl*: páginas S1 a S6.
- [14] Gould RJ, Polokoff MA, Friedman PA; Huang TF, Holt JC, Cook JJ, Niewiarowski S. (1990) Desintegrinas: una familia de proteínas inhibidoras de integrina de venenos de víboras. *Proc Soc Exp Biol Med* 195: páginas 168 a
- 40 171.
- [15] Huang TF. (1998) ¿Qué nos han enseñado las víboras a cerca de las integrinas? *Cell Mol Life Sci.* 54: páginas 527 a 540.
- [16] Huang TF, Ouyang C, Teng CM. (1990) La Rhodostomina, un péptido de veneno de víbora y su fragmento inhibe la agregación de plaquetas activando como antagonistas del receptor de fibrinógenos. 11.^{er} Congreso
- 45 Internacional de Trombosis; Ljubljana, Yugoslavia, Resumen 141.
- [17] Yeh CH, Peng HC, Yang RS, Huang TF. (2001) La Rhodostomina, una desintegrina de veneno de víbora, inhibe la angiogénesis promovida por el factor de crecimiento básico de fibroblastos, y suprime el crecimiento del tumor por un bloqueo de $\alpha\nu\beta 3$ selectivo de las células del endotelio. *Mol Pharmacol* 59: páginas 1333 a 1342.
- [18] Yang, R.S., Tang, C.H., Chuang, W.J., Huang, T.H., Peng, H.C., Huang, T.F. y Fu, W.M. (2005) La inhibición de la formación del tumor por la desintegrina de veneno de víbora. *Toxicon* 45: páginas 661 a 669.
- 50 [19] Lin y asociados, 2005, *Biochemical Pharmacology* 70: páginas 1469 a 1478.
- [20] Chang y asociados, (1993) *Biochem Biophys Res Commun* 190: páginas 242 a 249.
- [21] Dejana E, Villa S, de Gaetano G. (1982) Tiempo de sangrado en las ratas: una comparación de condiciones experimentales diferentes. *Thromb Haemost* 48: páginas 108 a 111.
- 55 [22] Yang RS, Wang SS, Lin HJ, Liu T K, Hang YS, Tsai KS. (1998) Efectos diferenciales del contenido mineral del hueso y el área del hueso en la fuerza vertebral en un modelo de cerdo. *Calcif Tissue Int* 63: páginas 86 a 90.
- [23] Tang CH, Yang RS, Huang TH, Liu SH, Fu WM. (2004) Mejora de la fibrillogénesis de fibronectina y la formación del hueso mediante el factor básico de crecimiento de fibroblastos por medio de la cinasa de proteína de la trayectoria dependiente de C en los osteoblastos de las ratas. *Mol Pharmacol* 66: páginas 440 a 449.
- 60 [24] Turner CH, Akhter MP, Heaney RP. (1992) Los efectos del agua fluorinada en la resistencia del hueso.

- Orthop Res 10: páginas 581 a 587.
- [25] Turner CH, Burr DB. (1993) Mediciones biomecánicas básicas del hueso: un tutorial. Bone 14: páginas 595 a 608.
- 5 [26] Weinreb M, Rodan GA, Thompson DD. (1991) Depresión de la actividad osteoblástica en los miembros inmovilizados de ratas lactantes. J Bone Miner Res 6: páginas 725 a 731.
- [27] Zhang, X. P., Kamata, T., Yokoyama, K., Puzon-McLaughlin, W., y Takada, Y. (1998) Interacción específica del dominio similar a la desintegrina recombinante de MDC-15 (metargidina, ADAM-15) con la integrina alfa/beta3. J Biol Chem 273: páginas 7345 a 7350.
- 10 [28] Wilkinson-Berka, J.L., Alousis, N.S., Kelly D.J., y asociados (2003) inhibición de COX-2 y la angiogénesis de la retina en un modelo de ratón de retinopatía de premadurez. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: páginas 974 a 979.
- [29] van der Heijde DM, van Leeuwen MA, van Riel PL, van de Putte LB: Progresión radiográfica en radiografías de manos y pies durante los primeros 3 años de la artritis reumatoide medida de acuerdo con el método de Sharp (modificación de van der Heijde). J Rheumatol 1995; 22: páginas 1792 a 1796.
- 15 [30] Sakae Tanaka (2007) Ejes de señalización en la biología de los osteoclastos y la activación terapéutica en el Sistema RANKL/RANK/OPG. Am. J. Nephrol. 27: páginas 466 a 478.
- [31] Sato K, Takayanagi H. (2006) Osteoclastos, artritis reumatoide y osteoinmunología. Curr Opin Rheumatol 18: páginas 419 a 426.
- 20 [32] Passaniti A, Taylor RM, Pili R, Guo Y, Long PV, Haney JA, Pauly RR, Grant DS, Martin GR (1992) Un método cuantitativo simple para evaluar la angiogénesis y los agentes antiangiogénicos utilizando membranas de base reconstituidas, heparina, y factor de crecimiento de fibroblastos. Lab Invest 67: páginas 519 a 528.

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido selectivo para la integrina $\alpha v\beta 3$, en donde el polipéptido es una variante de una Rhodostomina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada de las SEQ ID Nos: 57-69, o una sal farmacéuticamente aceptable de dicho polipéptido.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NOs: 65.
3. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 44-56.
4. El polipéptido de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido es codificado por un polinucleótido que comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 52.
5. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde el polipéptido exhibe una disminución de por lo menos aproximadamente 50 veces en afinidad al $\alpha 11b\beta 3$ comparado con la Rhodostomina.
6. El polipéptido según la reivindicación 1, en donde dicho el polipéptido exhibe una disminución de por lo menos aproximadamente 5 veces en afinidad al $\alpha 5\beta 1$ comparado con la Rhodostomina.
7. El polipéptido según cualesquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicho polipéptido es conjugado con albúmina o pegilado.
8. Una composición fisiológicamente aceptable que comprende el polipéptido según cualesquiera de las reivindicaciones 1-7, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
9. El polipéptido de cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para utilizar en el tratamiento y/o prevención de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en pérdida de hueso inducida por osteoporosis, osteoartritis, cáncer del hueso, retinopatía, artritis reumatoide y una enfermedad relacionada con la angiogénesis.
10. El polipéptido para utilizar según la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 65.
11. El polipéptido para utilizar según la reivindicación 9, en donde dicho polipéptido es conjugado con albúmina o pegilado.
12. Un método para elaborar un polipéptido según cualesquiera de las reivindicaciones 1-7, el cual comprende los pasos de:
 - a. transfectar una célula huésped con un polinucleótido que codifica dicho polipéptido;
 - b. cultivar dicha célula huésped en un medio de cultivo; y
 - c. aislar dicho polipéptido.
13. Un polinucleótido que codifica el polipéptido según cualesquiera de las reivindicaciones 1-7.
14. El polinucleótido según la reivindicación 13, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos seleccionada de las SEQ ID NOs: 44 a 56.
15. El polinucleótido según la reivindicación 13, en donde el polinucleótido comprende una secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO:52.

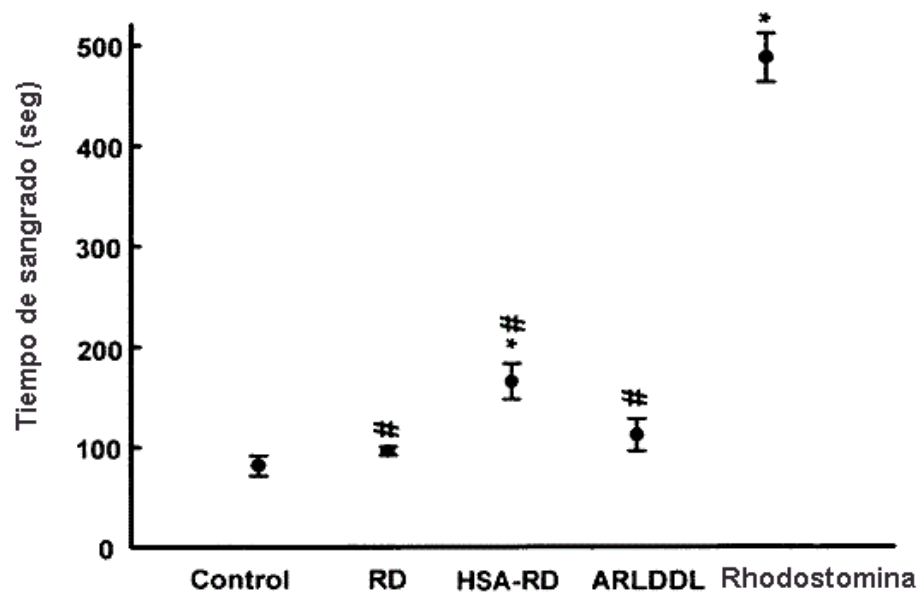


FIG. 1

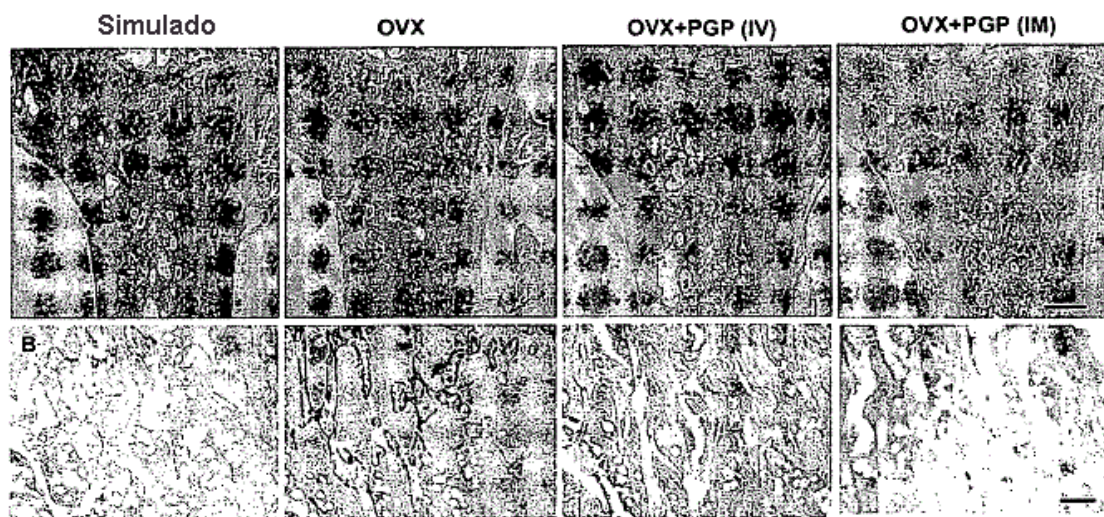


FIG. 2

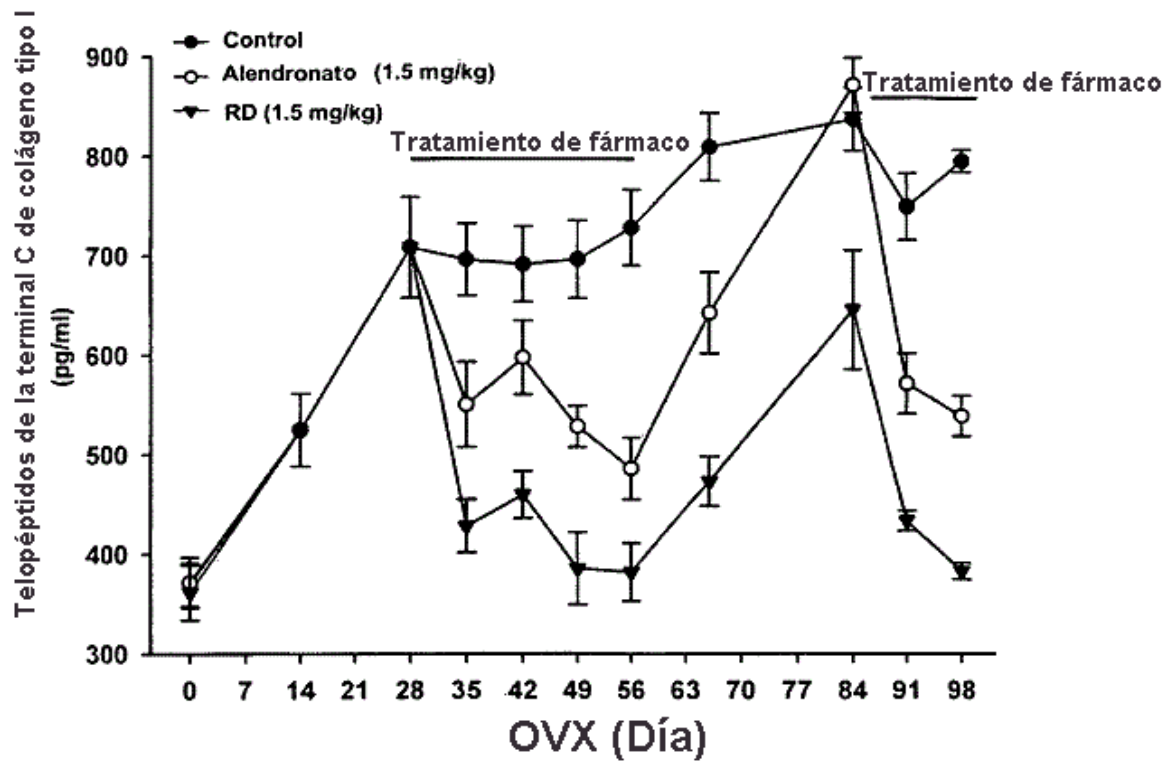


FIG. 3

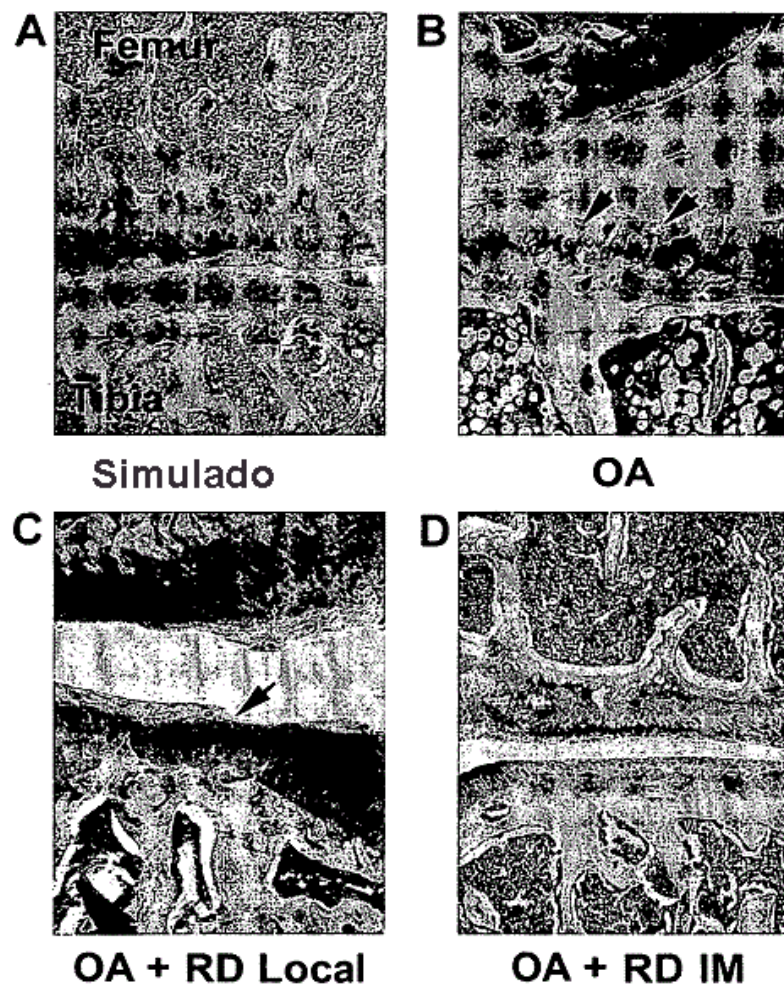


FIG. 4

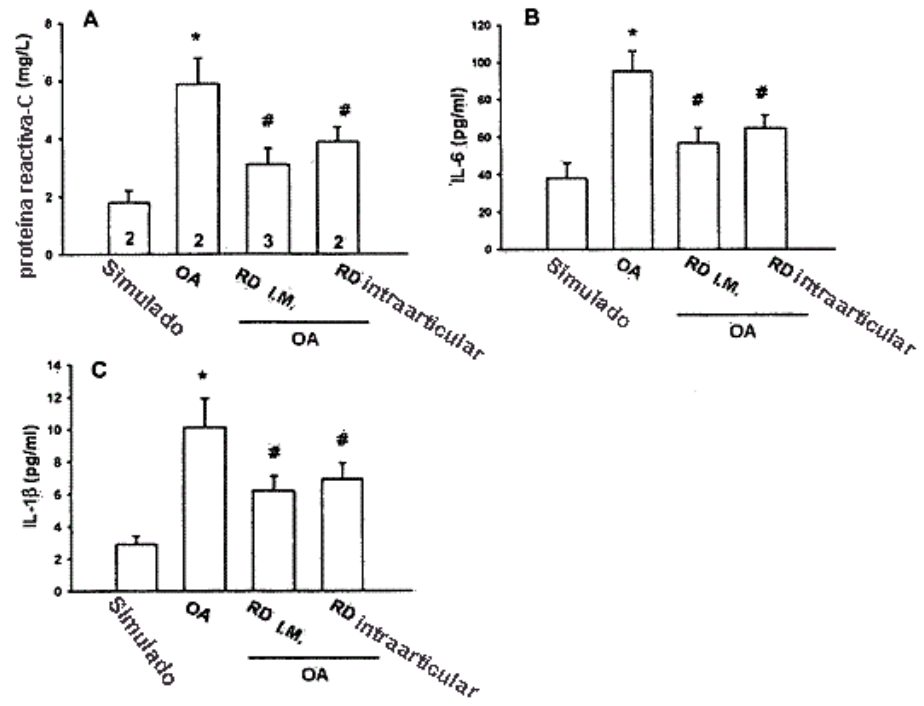


FIG. 5

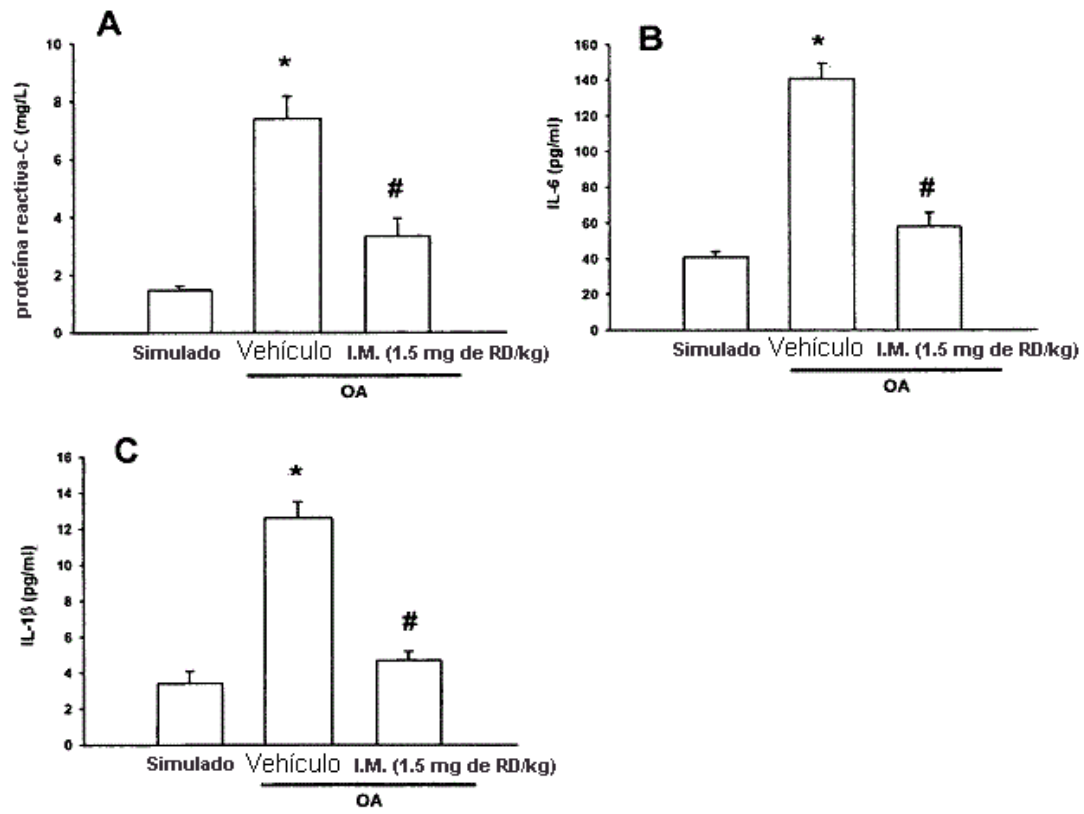


FIG. 6

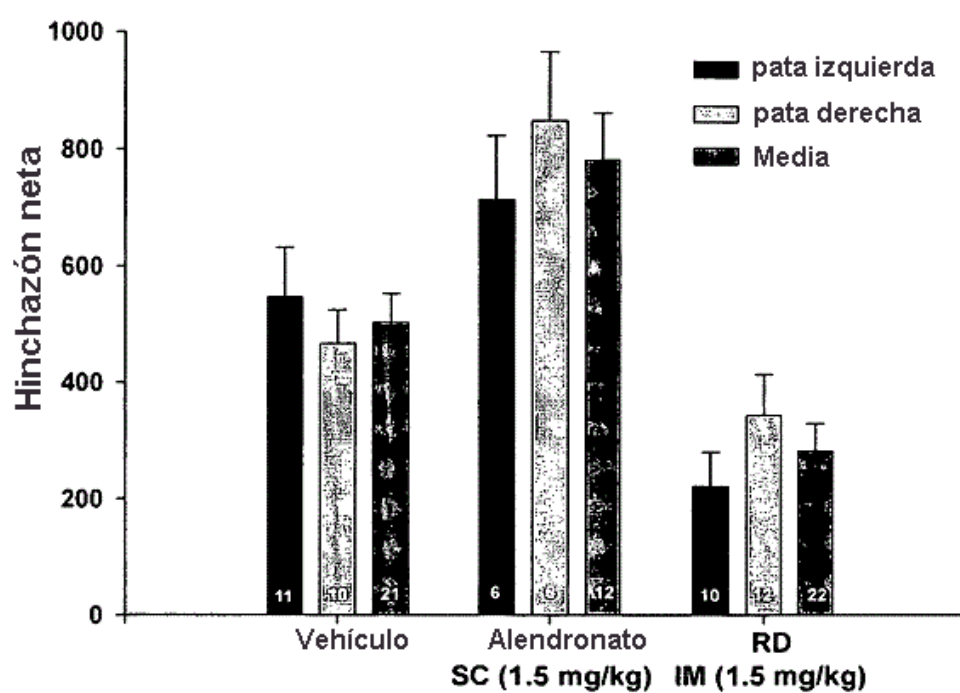


FIG. 7

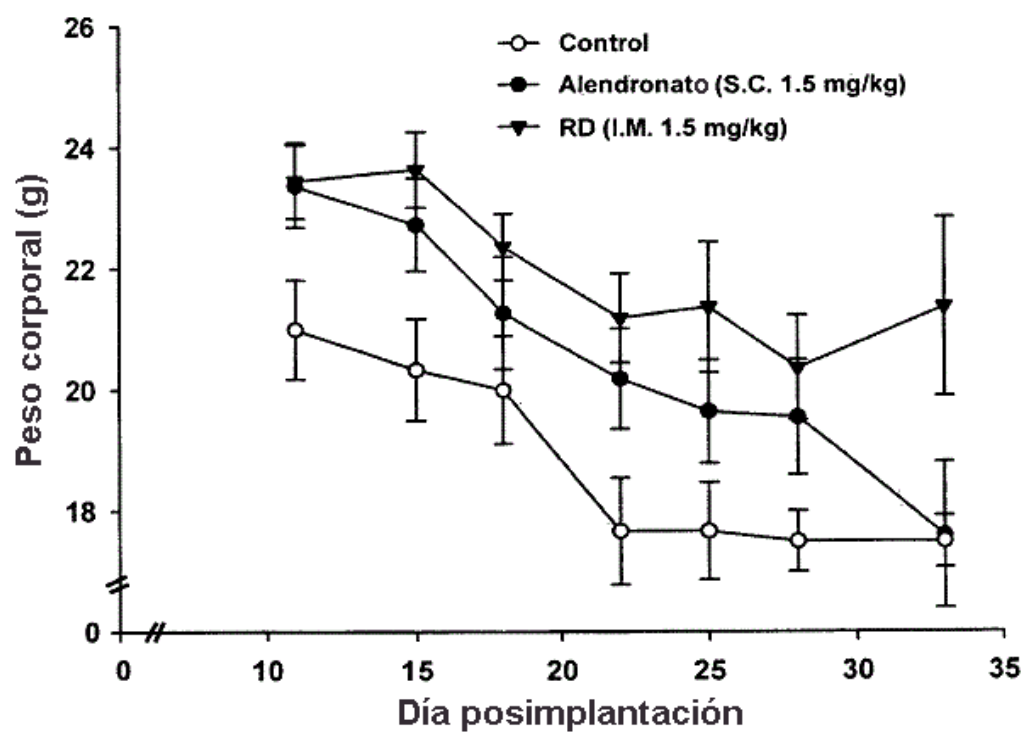


FIG. 8

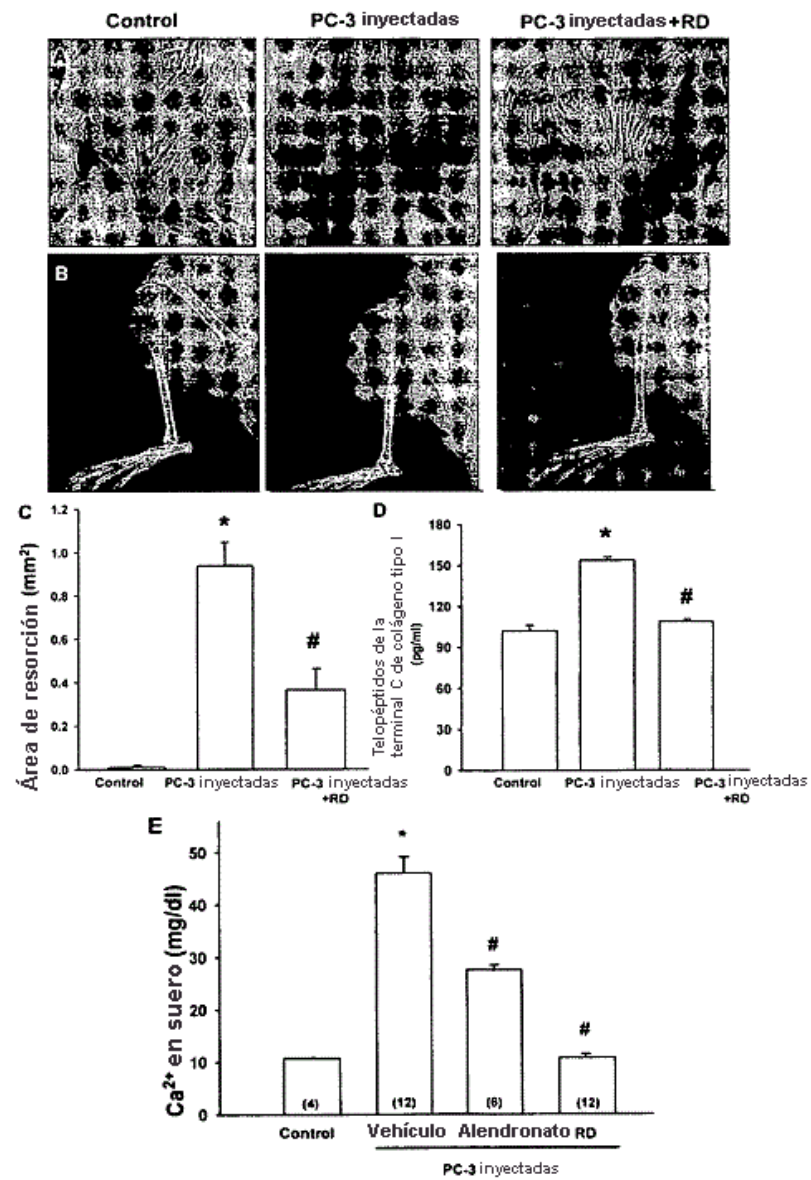


FIG. 9

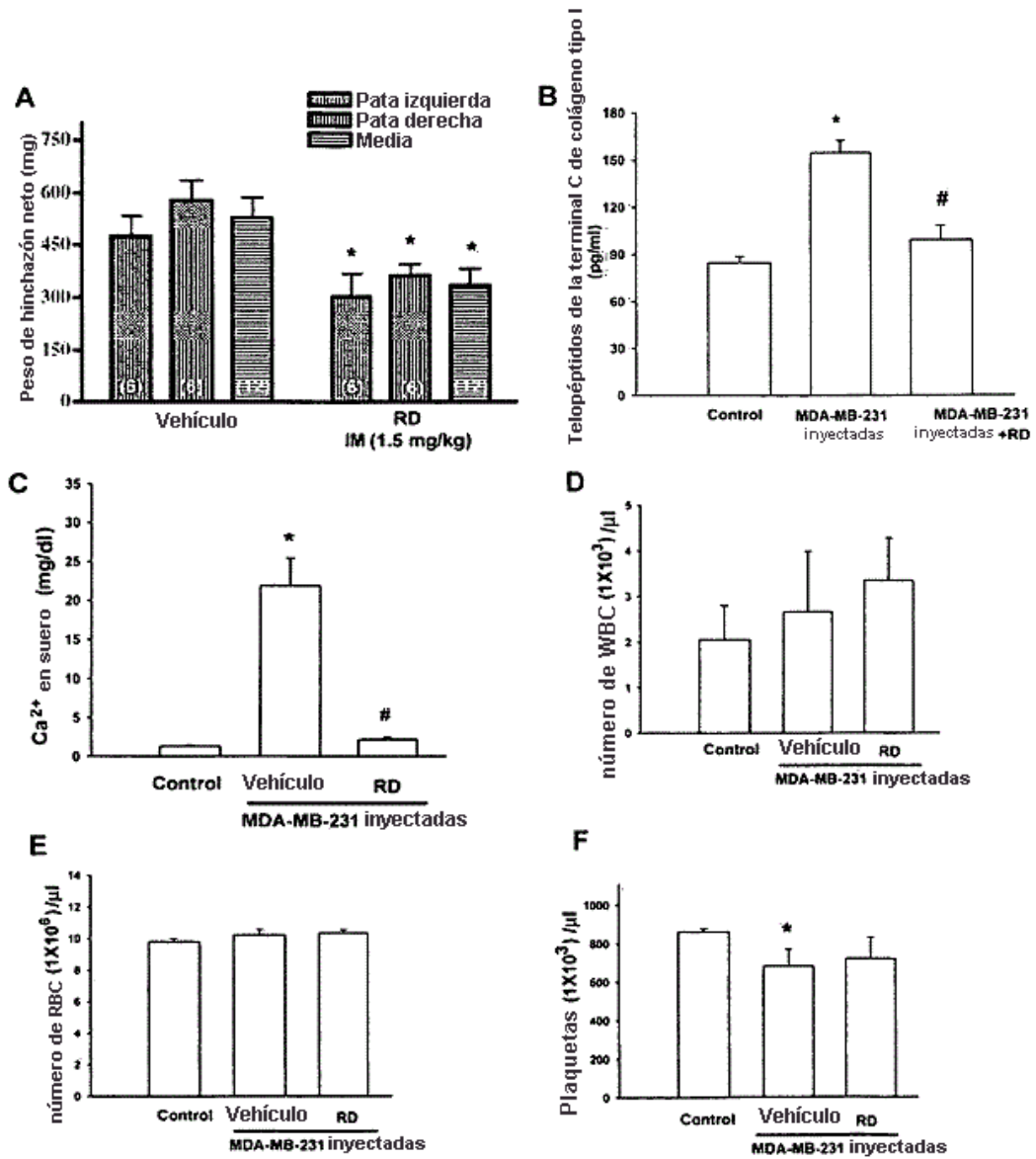
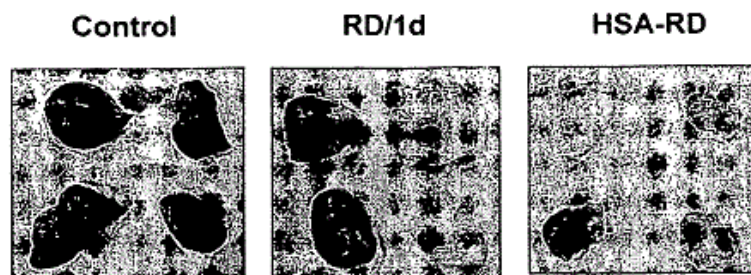


FIG. 10

(A)



(B)

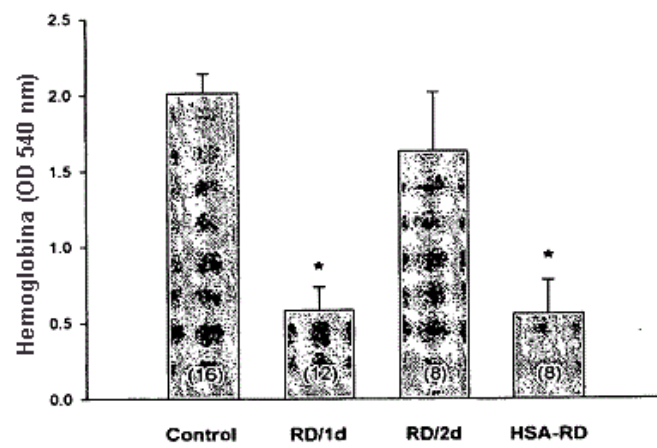


FIG. 11

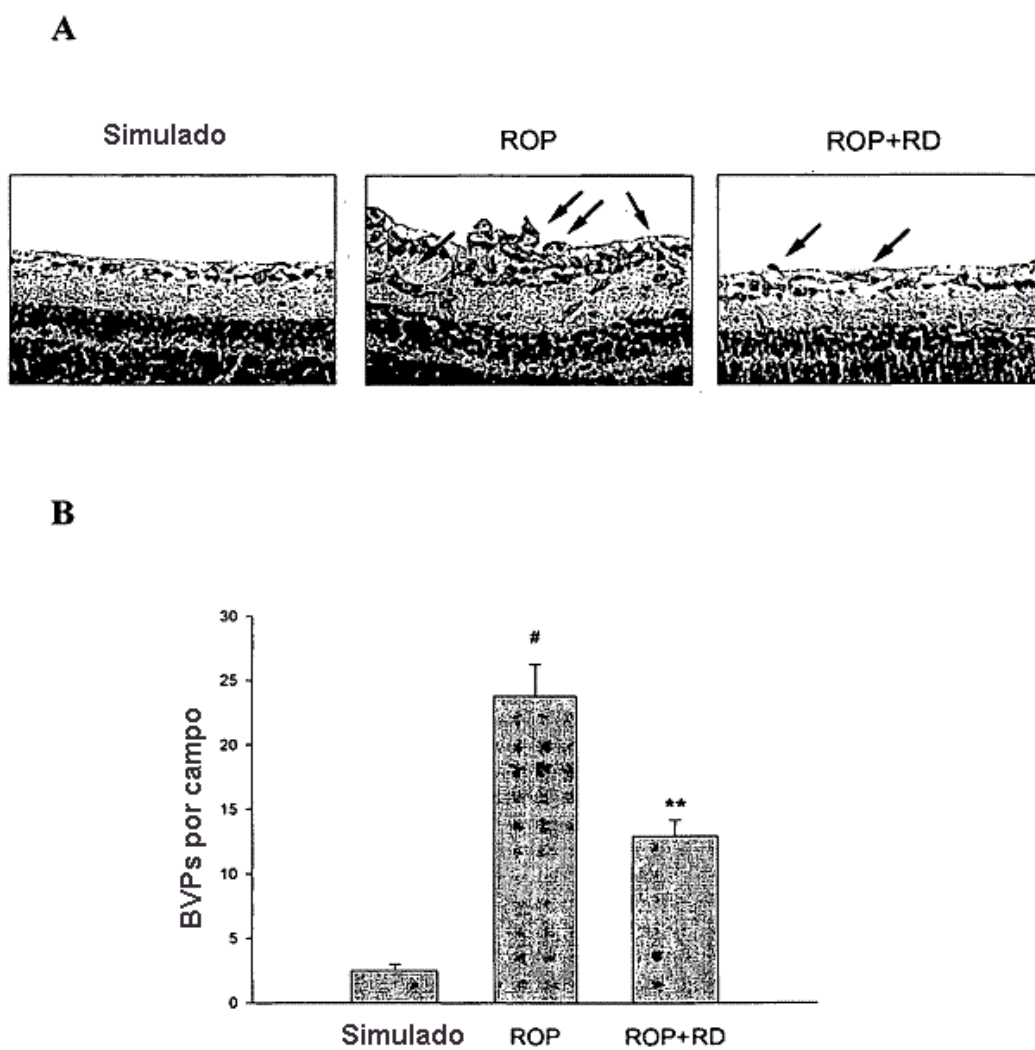


FIG. 12

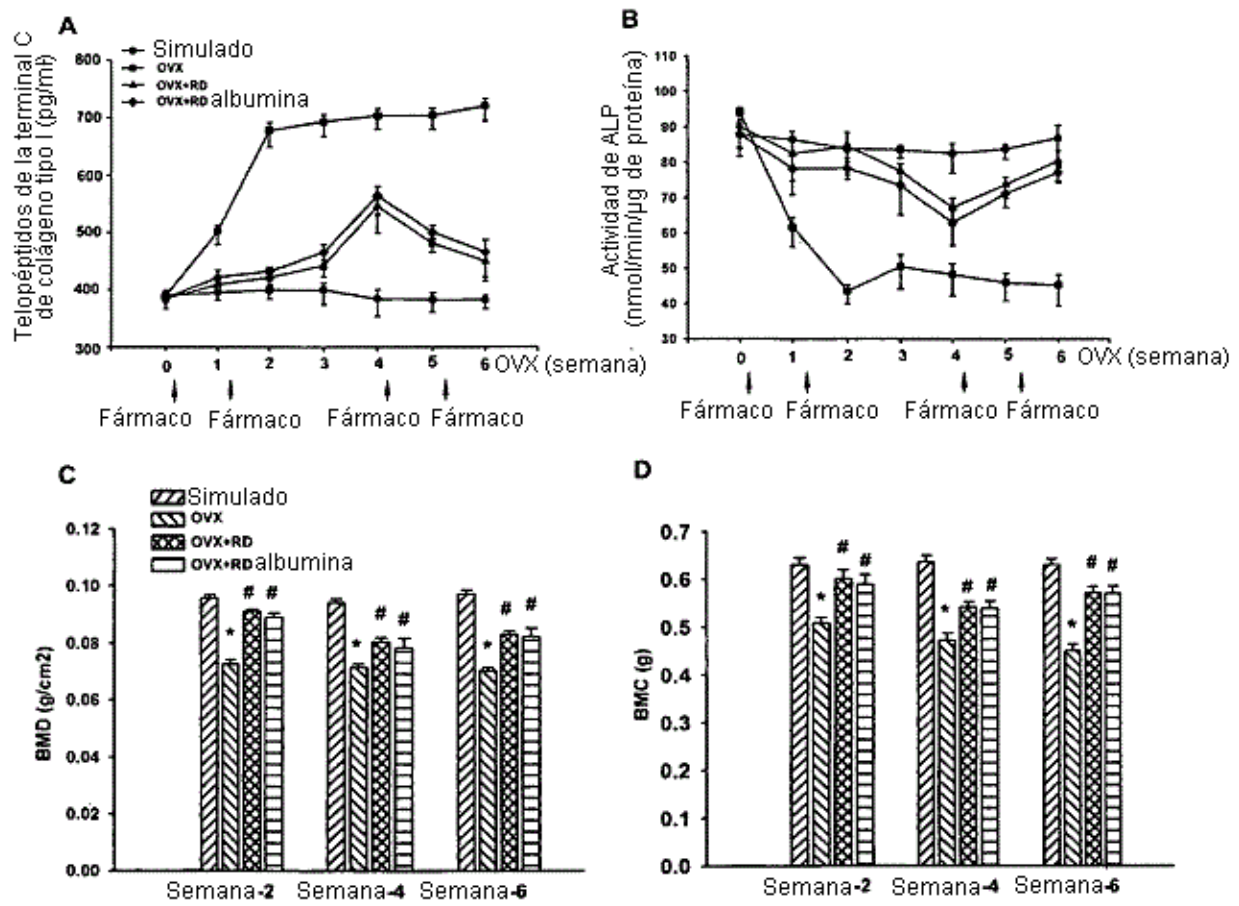


FIG. 13

SEQ ID NO: 1:

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Gly Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 57

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Ala
Arg Gly Asp Asp Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 58

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Ala
Arg Gly Asp Asp Val Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 59

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Ala
Arg Gly Asp Asp Leu Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

FIG. 14A

SEQ ID NO: 60

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Gly Asp Asp Leu Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 61

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Ala
Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 62

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Gly Asp Asp Met Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 63

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Leu Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

FIG. 14B

SEQ ID NO: 64

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
 Arg Leu Asp Asp Leu Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
 Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 65

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Ala
 Arg Leu Asp Asp Leu Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
 Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 66

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
 Arg Ile Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
 Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 67

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
 Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
 Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
 Arg His Asp Met Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
 Pro Arg Tyr His

FIG. 14C

SEQ ID NO: 68

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Gly Asp Asn Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

SEQ ID NO: 69

Gly Lys Glu Cys Asp Cys Ser Ser Pro Glu Asn Pro Cys Cys Asp Ala
Ala Thr Cys Lys Leu Arg Pro Gly Ala Gln Cys Gly Glu Gly Leu Cys
Cys Glu Gln Cys Lys Phe Ser Arg Ala Gly Lys Ile Cys Arg Ile Pro
Arg Gly Asp Gly Pro Asp Asp Arg Cys Thr Gly Gln Ser Ala Asp Cys
Pro Arg Tyr His

FIG. 14D

SEQ ID NO: 43

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCAAGAGGT GACATGCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 44

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CGCAAGAGGT GACGACCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 45

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CGCAAGAGGT GACGACGTAG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 46

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CGCAAGAGGT GACGACCTAG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 47

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCAAGAGGT GACGACCTAG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 48

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . .60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAATGTAA GTTCTCTAGA . .120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CGCAAGAGGT GACGACATGG ACGACAGATG TACTGGTCAA .180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

FIG. 15A

SEQ ID NO: 49

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGAGGT GACGACATGG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 50

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGACTT GACATGCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 51

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGACTT GACGACCTAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 52

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CGCAAGACTT GACGACCTAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 53

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGAATC GACATGCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 54

GGTAAGGAAT GTGACTGTTT TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . . 60
 TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
 GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGACAC GACATGCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
 TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

FIG. 15B

SEQ ID NO: 55

GGTAAGGAAT GTGACTGTTC TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . 60
TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGAGGT GACAACCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

SEQ ID NO: 56

GGTAAGGAAT GTGACTGTTC TTCTCCAGAA AACCCATGTT GTGACGCTGC TACTTGTAAG . . 60
TTGAGACCAG GTGCTCAATG TGGTGAAGGT TTGTGTTGTG AACAAATGTAA GTTCTCTAGA . . 120
GCTGGTAAGA TCTGTAGAAT CCCAAGAGGT GACGGTCCAG ACGACAGATG TACTGGTCAA . 180
TCTGCTGACT GTCCAAGATA CCAC . 204

FIG. 15C