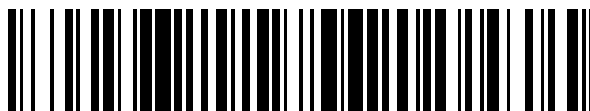


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 457 822**

51 Int. Cl.:

A61K 31/506 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.11.2008 E 08846240 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.03.2014 EP 2217238**

54 Título: **Procedimientos y composiciones de tratamiento de enfermedades proteinúricas**

30 Prioridad:

08.11.2007 US 2445

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.04.2014

73 Titular/es:

**THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION
(100.0%)
55 FRUIT STREET
BOSTON, MA 02114, US**

72 Inventor/es:

REISER, JOCHEN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 457 822 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos y composiciones de tratamiento de enfermedades proteinúricas

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere, en general, al tratamiento de enfermedades proteinúricas con inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$.

Antecedentes de la invención

La pérdida de proteínas por la orina (proteinuria) afecta a casi 100 millones de personas en todo el mundo y es una característica de la disfunción renal de origen glomerular y un factor de riesgo por sí misma tanto para enfermedades renales como extrarrenales ¹. Los podocitos renales y sus pedicelos son un componente clave del sistema de ultrafiltración de los glomérulos, donde comprender la barrera de filtración junto con las células endoteliales y la membrana basal (MBG). Los podocitos se sitúan dentro de los glomérulos del riñón, donde están unidos a la MBG por medio de la integrina $\alpha 3\beta 1$ ^{2,3} y el diestiroglucano α/β ⁴. Los pedicelos de los podocitos están interconectados por el diafragma de hendidura (DH), una unión de adherencia modificada ⁵. Típicamente, las enfermedades renales proteinúricas se asocian con diversos grados de remodelación de la membrana podocitaria (borramiento de los pedicelos y/o alteración del DH) controlados por la redistribución del sistema de microfilamentos podocitarios ⁶. Un trabajo reciente ha mejorado la comprensión del marco molecular subyacente a la estructura podocitaria, en gran medida a través del análisis de síndromes proteinúricos hereditarios y modelos genéticos ⁷. Unos cuantos estudios también sugieren mecanismos para las enfermedades proteinúricas adquiridas, mucho más comunes ^{8,9}. A pesar de estos avances, actualmente no existen tratamientos específicos de célula disponibles para los podocitos. Un concepto emergente para la regulación de la estructura y la función de los podocitos es la regulación del citoesqueleto de los podocitos por proteasas tales como la catepsina L ^{8,10}. La inducción de la catepsina L en podocitos va acompañada por un aumento de la movilidad celular de los podocitos cultivados ¹⁰. El aumento de la movilidad de los podocitos *in vitro* ^{10,11} se demuestra mejor en la dinámica de los pedicelos *in vivo*, donde los podocitos permanecen unidos localmente a la MBG, pero puede presentar modificaciones en la dinámica pedicélica que den lugar a la fusión de los pedicelos. En algunas formas de enfermedades inflamatorias glomerulares tales como la glomerulonefritis semilunar, se he informado de que los podocitos salen de su microentorno hacia zonas de daño glomerular semilunar ¹². El concepto de pedicelos podocitarios dinámicos data de la década de 1970, cuando los lúcidos estudios de Seiler y sus colaboradores demostraron que la infusión de polianiones tales como el sulfato de protamina puede inducir cambios rápidos en la dinámica de los pedicelos y el borramiento de los pedicelos ¹³. Además, este acontecimiento se podía invertir en gran medida mediante la infusión de polianiones tales como la heparina ¹³. Si bien es imposible tomar imágenes continuas de la dinámica de los pedicelos en animales vivos, los resultados de los estudios anteriores apuntan a un sistema de pedicelos podocitarios muy dinámico. Además, el análisis por microscopía electrónica de riñones sanos revela pequeñas zonas de borramiento de los pedicelos, lo que probablemente representa los pedicelos durante la transición. La movilidad de las células cancerosas es otro ejemplo donde las células pueden ser hiperdinámicas o participar en la invasión de tejidos ¹⁴.

El documento WO 2005/117936 A2 describe agonistas y antagonistas del bucle de cisteínas de la integrina $\alpha\beta 3$, incluidos anticuerpos que se unen al dominio del bucle de cisteínas, y el uso de los mismos en el tratamiento de la diabetes y de nefropatías.

40 Baraldi et al. (Nephrology Dialysis Transplantation 1995; 10(7): 1155-1161) describe la regulación por incremento de la integrina $\beta 3$ en glomerulonefritis de progresión rápida mediante la evaluación de los patrones de expresión y distribución de contrarreceptores de integrinas $\alpha\beta 3$ e ICAM-1 y VCAM-1 a partir de muestras renales de pacientes afectados por glomerulonefritis progresiva.

45 Wu et al., (Journal of Clinical Investigation 1994; 94(3): 928-936) describe que la cooperación de leucocitos polimorfonucleares y trombocitos mediada por fibrinógeno durante la glomerulonefritis con complejos inmunitarios en un modelo de rata y que la nefritis nefrotóxica aguda venían acompañadas por un notable aumento de la expresión glomerular de la integrina $\beta 3$.

El documento US 2005/153337 A1 describe composiciones y agentes terapéuticos de ARNi para dirigir agentes de ARNi al riñón.

Sumario de la invención

50 De acuerdo con la invención, se proporcionan determinados inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ para su uso en el tratamiento de un trastorno proteinúrico que comprende administrar a un paciente que los necesite, uno de tales inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ en una cantidad eficaz para reducir o eliminar el trastorno proteinúrico. En un aspecto de la invención, el trastorno proteinúrico es un trastorno proteinúrico renal. En un aspecto de la invención, el trastorno proteinúrico renal se selecciona de una lista que comprende:

55 nefropatía diabética,

- síndromes nefróticos (es decir, insuficiencia renal intrínseca),
síndrome nefríticos,
lesiones tóxicas del riñón,
enfermedades glomerulares, tales como la glomerulonefritis membranosa,
5 glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS),
nefropatía por IgA (es decir, enfermedad de Berger),
nefropatía por IgM,
glomerulonefritis membranoproliferativa,
nefropatía membranosa,
10 nefropatía de cambios mínimos,
nefroesclerosis hipertensiva y
nefritis intersticial.

En determinado modo de realización de la invención, el trastorno proteinúrico renal es la nefropatía diabética.

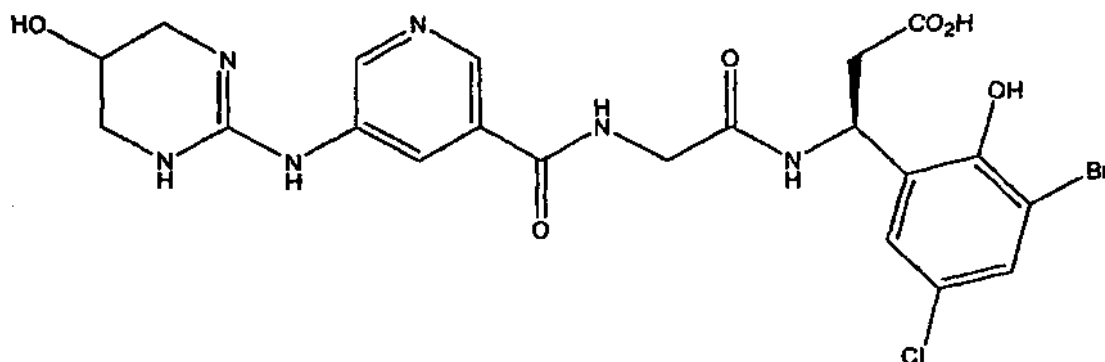
- 15 En otro determinado modo de realización de la invención, el trastorno proteinúrico renal se selecciona de una lista que comprende:

- preeclampsia,
eclampsia,
enfermedades vasculares del colágeno (p. ej., lupus eritematoso sistémico),
deshidratación,
20 ejercicio extenuante,
estrés,
proteinuria ortostática (postural) benigna,
sarcoidosis,
síndrome de Alport,
25 diabetes mellitus,
enfermedad de Fabry,
infecciones (p. ej., VIH, sífilis, hepatitis, infección postestreptocócica),
aminoaciduria,
síndrome de Fanconi,
30 ingesta de metales pesados,
anemia drepanocítica,
hemoglobinuria,
mieloma múltiple,
mioglobinuria,
35 rechazo de órganos,
fiebre hemorrágica del Ébola y
síndrome Nail Patella.

En un aspecto de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un anticuerpo monoclonal frente a $\alpha\beta3$ o un péptido que contiene una secuencia de unión RGD. En un aspecto de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un anticuerpo monoclonal frente a $\alpha\beta3$. En un modo de realización de la invención, el anticuerpo monoclonal frente a $\alpha\beta3$ es anti-CD61.

- 5 En un modo de realización de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un péptido que contiene una secuencia de unión RGD. En determinado modo de realización de la invención, el péptido que contiene una secuencia de unión RGD es ciclo-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val].

En un aspecto de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un compuesto de fórmula:



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En un aspecto de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ se selecciona de entre los compuestos descritos en el presente documento.

Breve descripción de los dibujos

- 15 Los dibujos adjuntos no están concebidos para que sean a escala. En los dibujos, cada componente idéntico o casi idéntico que se ilustra en diversas figuras está representado por la misma referencia numérica. En aras de la claridad, puede que no se indiquen todos los componentes de todos los dibujos. En los dibujos:

Figura 1. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción y un histograma que muestra la inducción de uPAR en podocitos en pacientes proteinúricos y modelos proteinúricos experimentales.

- 20 (a) La proteína uPAR (verde) se expresa en los glomérulos de riñones humanos. En los podocitos se observa algo de uPAR, mostrados por inmunofluorescencia doble con el marcador de podocitos sinaptopodina (synpo, rojo), lo que da lugar a un solapamiento parcial amarillo. (b) Inducción de ARNm de uPAR glomerular en pacientes proteinúricos. Se realizó una RT-PCR cuantitativa en tiempo real en los glomérulos aislados a partir de biopsias humanas. El ARNm de uPAR glomerular está regulado por incremento en la glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS, $n=14$) y la nefropatía diabética (ND, $n=20$). Los valores se representan como la media \pm EEM. $*p<0,05$ para GEFS o ND frente a con (pacientes de control). (c) Inducción de la proteína uPAR en podocitos en modelos de proteinuria de roedor revelada por inmunocitoquímica. Tal como se muestra mediante microscopía confocal, la expresión de uPAR (verde) es baja en los glomérulos de control (con) de rata o ratón y se colocaliza parcialmente con el marcador de podocitos sinaptopodina (synpo, rojo). En los podocitos durante la proteinuria (PAN, LPS, NZB/W F1), la expresión de uPAR está significativamente inducida en los podocitos, lo que da lugar a un solapamiento amarillo con la sinaptopodina (fusión). Aumento original, 600x. Obsérvese que la expresión de uPAR en ratones de Nueva Zelanda negros/blancos (NZB/W) F1 (Lupus) se muestra más segmentada dentro del glomérulo. (d) Análisis de inmuno-oro de uPAR en paredes glomerulares de ratas sanas (control) y diabéticas de 12 meses de edad. Se observa expresión de uPAR en todas las células de los glomérulos, incluidos los podocitos. La expresión de uPAR están significativamente inducida en los pedicelos de las ratas diabéticas. Aumento original, 35.000x. Las flechas negras marcan la expresión de uPAR en los pedicelos podocitarios. CM = célula mesangial, P = podocito, End = célula endotelial, MBG = membrana basal glomerular, EU = espacio urinario, LC = lumen capilar.
- 25
30
35

Figura 2. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción e histogramas que muestra que los podocitos necesitan uPAR para el desarrollo del borramiento de los pedicelos y la proteinuria.

- 40 (a) La morfología de los pedicelos podocitarios es normal en ratones naturales y $uPAR^{-/-}$ inyectados con PBS. El tratamiento con LPS da lugar al borramiento de los pedicelos en los ratones naturales, pero no en los $uPAR^{-/-}$. Aumento original, 31700x.
- (b) El restablecimiento de la expresión de uPAR en ratones $uPAR^{-/-}$ usando la transferencia génica transitoria

de uPAR-ADNc da lugar a la expresión de uPAR en podocitos como demuestra el solapamiento parcial de uPAR con la sinaptopodina (fusión). Aumento original, 600x.

(c) Inmunotransferencia de bandas que muestra las cantidades de uPAR exógena expresada en el hígado y los glomérulos de ratones *uPAR*^{-/-} 14 h después de la administración génica.

5 (d) La administración génica de uPAR-ADNc o un vector vacío no cambia la ultraestructura de los pedicelos podocitarios en ratones *uPAR*^{-/-}. Sin embargo, el tratamiento concomitante con LPS da lugar al borrado de los pedicelos en ratones *uPAR*^{-/-} con restablecimiento de uPAR, pero no en ratones *uPAR*^{-/-} a los que se les administra vector de control. Aumento original, 31700x.

10 (e) Ensayo de Bradford en orina. Aunque los ratones de control y los ratones *uPAR*^{-/-} tratados con PBS no presentan una proteinuria significativa, la inyección de LPS induce una proteinuria significativa en ratones naturales ($0,29 \pm 0,21$ (nat con); $0,82 \pm 0,32$ (nat LPS), * $p < 0,003$) pero no en ratones *uPAR*^{-/-} ($0,25 \pm 0,15$ (*uPAR*^{-/-} con); $0,32 \pm 0,14$ (*uPAR*^{-/-} LPS) o ratones *uPAR*^{-/-} que recibieron plásmidos de control ($0,14 \pm 0,06$ (*uPAR*^{-/-} con); $0,26 \pm 0,15$ (*uPAR*^{-/-} LPS). Estos datos indican que los ratones *uPAR*^{-/-} estaban protegidos de la pérdida de proteínas por la orina. Los ratones *uPAR*^{-/-} reconstituidos con uPAR-ADNc desarrollan proteinuria abundante, pero al igual que los ratones naturales, solamente después de la inyección de LPS ($0,11 \pm 0,11$ (*uPAR*^{-/-} uPAR-ADNc); $0,92 \pm 0,46$ (*uPAR*^{-/-} uPAR-ADNc LPS), * $p < 0,002$). El grado de proteinuria era comparable en ratones naturales y *uPAR*^{-/-} reconstituidos con uPAR-ADNc tratados con LPS. $n=15$ para cada grupo.

20 (f) La expresión podocitaria de uPAR en ratones *uPAR*^{-/-} se logra por transferencia génica de ADNc de uPAR dirigida por podocina (Pod-uPAR) y controlada por tinción de sinaptopodina. Obsérvese la fusión del marcaje de uPAR y la sinaptopodina (fusión).

(g) La expresión endotelial de uPAR en ratones *uPAR*^{-/-} lograda por transferencia génica de ADNc de uPAR dirigida por ICAM-2 (ICAM-2-uPAR) se controla por tinción con el marcador endotelial CD31. Obsérvese la fusión del marcaje de uPAR y el CD31 (fusión).

25 (h) Número de veces que cambia la pérdida de proteínas por la orina en ratones *uPAR*^{-/-} después de la transferencia génica de podocina-uPAR o ICAM-2-uPAR con y sin tratamiento de LPS.

Figura 3. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción e histogramas que muestra que uPAR media la migración de los podocitos.

30 (a) Ensayo en cámara de Boyden multipocillo sobre una superficie recubierta con vitronectina en condiciones normales y en presencia de LPS o PAN. Los podocitos, que migraron aleatoriamente a través de la membrana, se tiñeron con DAPI (azul).

35 (b) En comparación con el control, el tratamiento con LPS y PAN durante 24 h promovió la migración de los podocitos (naturales $41 \pm 3,7$; LPS $72 \pm 5,5$; PAN $67 \pm 4,9$). Naturales: * $P < 0,001$ para LPS frente al control; * $p < 0,002$ para PAN frente al control. La inactivación de uPAR por ARNip redujo fuertemente la migración de los podocitos en comparación con los podocitos naturales en condiciones normales y después del tratamiento con LPS o PAN (uPAR-ARNip $16 \pm 2,4$); (uPAR-ARNip LPS $12 \pm 3,6$; uPAR-ARNip PAN $15 \pm 2,9$). Naturales frente a uPAR-ARNip * $p < 0,001$. (b) Ensayo de herida por raspado sobre una superficie recubierta con vitronectina para evaluar la movilidad podocitaria dirigida. 24 h después del raspado, comenzaron a moverse los podocitos naturales hacia la trayectoria de la herida ($61,37 \pm 8,05$). El tratamiento con LPS ($85,34 \pm 4,1$) o con PAN ($79,31 \pm 3,72$) durante 24 h potenció significativamente la movilidad podocitaria dirigida (* $p < 0,015$ para LPS frente al control); (* $p < 0,025$ para PAN frente al control). Los podocitos que expresaban uPAR-ARNip presentaron defectos en la movilidad dirigida (uPAR-ARNip $17,24 \pm 10,48$); (uPAR-ARNip LPS $28,00 \pm 7,17$); (uPAR-ARNip $22,26 \pm 6,92$). En comparación con los podocitos naturales, los uPAR-ARNip mostraron capacidad de migración hacia la trayectoria de la herida en un plazo de 24 horas (* $p < 0,0024$ para el naturales frente a uPAR-ARNip). Las líneas continuas rojas indican los márgenes iniciales de la herida por raspado. Lo datos se basaron en seis experimentos independientes. Aumento original, 40x.

Figura 4. Es un conjunto de un esquema, una imagen de inmunotinción y un histograma que muestra que uPAR, la integrina $\beta 3$ y la vitronectina son importantes para la proteinuria inducida por LPS.

50 (a) Representación esquemática de uPAR en complejo con la integrina $\alpha v \beta 3$ y la vitronectina. Se ha demostrado que el dominio 2 de uPAR interacciona con la integrina $\alpha v \beta 3$, pero también pueden contribuir otros dominios de uPAR. La asociación de uPAR con la integrina $\alpha v \beta 3$ puede dar lugar a cambios conformacionales de la integrina coherentes con la activación que facilita la unión a ligandos tales como la vitronectina. (b) El análisis de inmuno-oro de uPAR y la integrina $\beta 3$ en pedicelos podocitarios muestra similitudes en su patrón de distribución. Tanto uPAR como la integrina $\beta 3$ se sitúan con frecuencia cerca del diafragma de hendidura (flechas negras). (c) La ausencia de uPAR (véase la fig. 2e), la integrina $\beta 3$ ($\beta 3$) y la vitronectina (Vn) se asocia con una función permeoselectiva renal normal y ausencia de proteinuria después de la estimulación con LPS. En contraste, los ratones con deficiencia en urocinasa (uPA) no presentan proteinuria en condiciones

normales, pero desarrollan pérdida de proteínas por la orina con facilidad tras las administración de LPS. Esto mismo se observa para los ratones *uPAR*^{-/-} tratados con LPS después de la administración génica de uPAR-ADNc (uPAR-NAT) o de un uPAR-ADNc que codifique una uPAR que sea deficiente en la unión a la integrina $\alpha\beta 3$ (uPAR-D262A).

5 **Figura 5. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción y un histograma que muestra que uPAR activa la integrina $\beta 3$.**

10 (a) Doble tinción inmunofluorescente para la integrina $\beta 3$ (verde) y el marcador de podocitos sinaptopodina (synpo, rojo) en glomérulos de ratones naturales y *uPAR*^{-/-} antes y después del tratamiento con LPS usando microscopía confocal (aumento original, 600x). El tratamiento con LPS no cambia la integrina $\beta 3$ podocitaria en ratones naturales y *uPAR*^{-/-}. (b) Citometría de flujo de AP5 en podocitos tratados con LPS en presencia de diversas cantidades de Ca^{2+} . Unidades de intensidad de fluorescencia: EDTA: $3020,64 \pm 302,06$; Ca^{++} 0,1 mM: $3055,76 \pm 400$; Ca^{++} 0,4 mM: $1644,7 \pm 200$; Ca^{++} 1,0 mM: $534,52 \pm 121$; Ca^{++} 2,0 mM: $312,5 \pm 53,45$. (c) igual que (a), pero ahora con el anticuerpo AP5, que reconoce la integrina $\beta 3$ activa. El tratamiento con LPS induce la tinción de AP5 en ratones naturales, pero no en los *uPAR*^{-/-}. (d) Análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal del marcaje de AP5 (rojo) y uPAR (verde) en podocitos con regulación por disminución de uPAR usando ARNip, en podocitos de control y en podocitos que sobreexpresan GFP-uPAR. (f) Ensayo de actividad de las GTPasas pequeñas cdc42 y Rac1 en glomérulos aislados a partir de ratones naturales y *uPAR*^{-/-} antes y después del tratamiento con LPS. En algunos experimentos, se trató a los ratones naturales con LPS y ciclo-RGDfV, que bloquea la integrina $\alpha\beta 3$.

20 **Figura 6. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción e histogramas que muestra que el complejo activo de uPAR-integrina $\alpha\beta 3$ depende de los lípidos y puede ser un objetivo farmacológico para modificar la proteinuria.**

25 (a) Se realizó una centrifugación diferencial en gradiente de sacarosa sobre extractos podocitarios de célula completa de células sanas y tratadas con LPS. Se separó cada fracción y se transfirió con marcador de balsas lipídicas (anti-caveolina) y marcador de ausencia de balsas lipídicas (receptor de antitransferrina), así como anti-uPAR y anti-integrina $\beta 3$. En condiciones normales, preferentemente, uPAR y la integrina $\beta 3$ se asocian con fracciones sin balsas lipídicas. Tanto uPAR como la integrina $\beta 3$ se enriquecen con la fracción de balsas lipídicas después del tratamiento con LPS. (b) Localización de uPAR y la integrina $\beta 3$ (marcaje AP5) en podocitos antes y después del tratamiento con LPS y en presencia del agente hipocolesterolemizante metil- β -ciclodextrina (MBCD). (c) Tinción inmunofluorescente de la integrina $\beta 3$ activa en glomérulos de ratones *uPAR*^{-/-} (con) y de ratones *uPAR*^{-/-} que recibieron ADNc de integrina $\beta 3$ (integrina $\beta 3$) y un ADNc que codificaba la integrina $\beta 3$ con una delección de los aminoácidos 616-690 ($\beta 3\Delta_{616-690}$). Este último confiere actividad constitutiva a la integrina $\beta 3$, que se tiñe intensamente con el anticuerpo Fab WOW-1. (d) La transferencia génica de ADNc que codifica la integrina $\beta 3$ constitutivamente activa, pero no la transferencia génica de un ADNc que codifica la integrina $\beta 3$ normal, es suficiente para provocar proteinuria en ratones *uPAR*^{-/-} incluso en ausencia de LPS (con $0,25 \pm 0,06$); (integrina $\beta 3$ $0,19 \pm 0,05$); (integrina $\beta 3\Delta_{616-690}$ $0,43 \pm 0,09$). * $P < 0,01$ para la integrina $\beta 3$ frente a la $\beta 3\Delta_{616-690}$, ratones inyectados, $n=6$ para cada grupo. (e) La inyección conjunta de LPS y un anticuerpo bloqueante de la integrina $\beta 3$ (anti-CD61) en ratones naturales evita el desarrollo de proteinuria (con PBS $0,12 \pm 0,03$); (LPS + con IgG $0,84 \pm 0,14$); (LPS + anti-integrina $\beta 3$ $0,13 \pm 0,01$). * $P < 0,001$ para LPS + anti-integrina $\beta 3$ frente a con IgG. $n=6$. (f) La coadministración de LPS y anticuerpo anti-CD61 (anti-integrina $\beta 3$) a podocitos cultivados reduce la movilidad podocitaria (LPS + con IgG $88,56 \pm 7,26$); (LPS + anti-integrina $\beta 3$ $54,53 \pm 10,15$). * $p < 0,03$ para LPS + anti-integrina $\beta 3$ frente a con IgG. (g) La inyección de ciclo-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] RGDfV bloquea la integrina $\alpha\beta 3$ y reduce significativamente el grado de proteinuria en ratones tratados con LPS. La inyección de RGDfV reduce la proteinuria de manera dependiente de la dosis (con, $0,2064 \pm 0,038$; ciclo-RGDfV, $0,28 \pm 0,0535$; LPS, $0,924 \pm 0,1055$; LPS + ciclo-RGDfV (1 mg), $0,712 \pm 0,0817$; LPS + ciclo-RGDfV (5 mg), $0,5683 \pm 0,0729$; LPS + ciclo-RGDfV (20 mg), $0,4172 \pm 0,0423$). * $p < 0,013$ para LPS frente a LPS + ciclo-RGDfV.

30 **Figura 7. Es un conjunto de un esquema, imágenes de inmunotinción y un histograma que muestra la inducción de uPAR en podocitos cultivados en respuesta a LPS y PAN.**

35 (a) Representación esquemática de un glomérulo renal y la barrera de filtración glomerular. (b) Inducción de uPAR en podocitos cultivados en respuesta a LPS y PAN. Cuantificación relativa de la inducción de uPAR: Con: $0,31 \pm 0,06$; LPS: $0,49 \pm 0,06$; PAN: $0,61 \pm 0,10$. * $P < 0,025$ para con frente a LPS y * $P < 0,015$ para con frente a PAN. (c) uPAR inducida en podocitos se sitúa preferentemente en el frente delantero de los podocitos migrantes; las flechas indican la localización en la membrana plasmática.

40 **Figura 8. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción que muestra que la vitronectina se expresa en el glomérulo humano y, principalmente, en los podocitos.**

45 (a) La vitronectina (verde) se expresa en el glomérulo humano y, principalmente, en los podocitos, como se muestra por inmunofluorescencia doble con el marcador de podocitos sinaptopodina (synpo, rojo), lo que da lugar a un solapamiento parcial amarillo. Los podocitos pueden producir vitronectina, como se ha probado por

RT-PCR. Los de la vitronectina son los siguientes: Directo: 5' AGT GGA GCA ACA GGA GGA GA 3' Inverso: 5' CAA GGC AAA GTG CTC AAA CA 3' (datos no mostrados).

(b) Inducción de la vitronectina en podocitos en modelos de proteinuria de roedor revelada por inmunocitoquímica. Tal como se muestra mediante microscopía confocal, la expresión de vitronectina (verde) es baja en los glomerulos de control (con) de rata o ratón y se colocaliza parcialmente con el marcador de podocitos sinaptopodina (synpo, rojo). Sin embargo, en condiciones nefróticas (PAN, LPS, NZB/W F1), la expresión de la vitronectina está significativamente inducida en los podocitos, lo que da lugar a un solapamiento amarillo con la sinaptopodina (fusión). Aumento original, 600x. Obsérvese que la expresión de la vitronectina en ratones de Nueva Zelanda negros/blancos (NZB/W) F1 (modelo de glomerulonefritis por Lupus) se muestra más segmentada dentro del glomérulo.

Figura 9. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción y gráficos que muestra la inactivación estable del ARNm de uPAR usando ARNip.

(a) Inactivación estable del ARNm de uPAR usando ARNip. (b) Disminución de los niveles de proteína uPAR en podocitos que expresan ARNip de uPAR. (c) Curso temporal del cierre de heridas en podocitos cultivados. La distancia migrada por las células desde el margen de la herida se relacionó con la anchura de la cicatriz en diferentes puntos temporales. (d) La adición de urocinasa (uPA) a los podocitos cultivados no modificó la movilidad podocitaria.

Figura 10. Es un conjunto de imágenes de inmunotinción que muestra que uPAR interacciona con la integrina $\beta 3$.

(a) Se realizó una co-IP heterogénea en los lisados de células HEK cotransfectadas con uPAR e integrina $\beta 3$ y se transfirieron con anticuerpos HA o Flag. Los resultados demuestran que uPAR interacciona con la integrina $\beta 3$. (b) Se realizó una co-IP heterogénea en los lisados de células HEK cotransfectadas con integrina $\beta 1$ de ratón y uPAR humana de longitud completa o un ADNc de uPAR (uPAR D262A) deficiente en la unión de la integrina $\beta 1$. Después de la transferencia con anticuerpos HA o Flag, los resultados demuestran que uPAR humana de longitud completa (pero no uPAR D262A) interacciona con la integrina $\beta 1$ de ratón.

Figura 11. Es un histograma que muestra el efecto de ciclo-RGDfV sobre la recuperación de la proteinuria.

Descripción detallada

La presente invención se refiere a determinados inhibidores de la integrina $\alpha v \beta 3$ para su uso en procedimientos de tratamiento de enfermedades proteinúricas mediante la administración de tales inhibidores de la integrina $\alpha v \beta 3$. La invención se basa al menos en parte en el descubrimiento de que la inducción de la señalización del receptor de urocinasa en podocitos da lugar al borramiento de los pedicelos y a la pérdida de proteínas por la orina por medio de un mecanismo que incluye la activación dependiente de lípidos de la integrina $\alpha v \beta 3$.

La invención conlleva, al menos en parte, el estudio de moléculas asociadas con la movilidad celular, tales como el receptor activador del plasminógeno de tipo urocinasa (uPAR) ^{15, 16}. uPAR es una proteína con anclaje de glucosulfosfatidilinositol (GPI) que se había reconocido como receptor de proteinasas, pero también se ha implicado en rutas no proteolíticas, principalmente a través de su capacidad para formar complejos con otras proteínas de membrana tales como la integrinas para la transducción de señales ¹⁵. uPAR desempeña papeles importantes durante la cicatrización de heridas, la inflamación y la movilización de células madre, así como en afecciones patológicas graves tales como la infección por VIH-1, la invasión por tumores y la metástasis ¹⁷. Además del papel bien establecido de uPAR en la regulación de la proteólisis pericelular, también participa en la adhesión, la migración, y la proliferación celular por medio de interacciones con proteínas presentes en la matriz extracelular, incluida la vitronectina (Vn) ¹⁸. Más recientemente, se demostró la importancia de la interacciones uPAR-Vn por la necesidad directa de la unión de uPAR a Vn para la inducción suficiente de la señalización posterior dirigida a la movilidad y la morfología celular ¹⁹.

Sin desear quedar vinculados a la teoría, la invención se basa en las observaciones experimentales analizadas en el presente documento que presentan un mecanismo que implica la activación de la integrina $\alpha v \beta 3$ dentro de las balsas lipídicas ²⁴. La inhibición de la función de uPAR/integrina $\alpha v \beta 3$ en los podocitos mejoró el curso de la proteinuria y abre posibilidades novedosas para las intervenciones farmacológicas. El bloqueo de la integrina $\alpha v \beta 3$ reduce la movilidad de los podocitos *in vitro* y la proteinuria en ratones. Los ratones deficientes en uPAR están protegidos de la proteinuria a menos que se exprese una integrina $\beta 3$ constitutivamente activa. La transferencia génica de uPAR en podocitos pero no en células endoteliales confirmó la capacidad de desarrollar la pérdida de proteínas por la orina. Desde el punto de vista mecanístico, puede ser necesario que uPAR active la integrina $\alpha v \beta 3$ en los podocitos, lo que promueve la movilidad celular y la activación de las GTPasas pequeñas cdc42 y Rac1. Durante las enfermedades proteinúricas renales en seres humanos y roedores, se produce inducción de la expresión de uPAR en los podocitos. uPAR es necesaria para la migración de los podocitos y el borramiento de los pedicelos inducido por LPS y la proteinuria en ratones por medio de un mecanismo que incluye la activación dependiente de lípidos de la integrina $\alpha v \beta 3$. Estos descubrimientos definen una ruta de señalización novedosa en podocitos en la que participan uPAR, la integrina $\alpha v \beta 3$ y la Vn. Estos ejemplos también describen un mecanismo por el que se utilizan proteínas expresadas

ampliamente, tales como uPAR, de manera específica de célula para regular mecanismos básicos tales como la filtración en el riñón. La expresión de uPAR está presente en todas las células glomerulares, si bien la expresión de uPAR no es necesaria para la función renal normal en ninguna de estas células, ya que los ratones *uPAR*^{-/-} tienen un comportamiento normal. Es sorprendente la necesidad de uPAR durante el desarrollo del borramiento de los pedicelos podocitarios y la proteinuria, lo que parece indicar que para la remodelación de la barrera de filtración son necesarias rutas inducibles. La acción de uPAR para el desarrollo de la proteinuria deriva de su acción en el podocito, que se demostró usando elementos promotores específicos de célula. uPAR está inducida durante la proteinuria y los ratones *uPAR*^{-/-} están protegidos frente al desarrollo de la proteinuria.

En consecuencia, los compuestos para el uso de la presente invención se usan para tratar trastornos caracterizados por la proteinuria. Tal como se usa en el presente documento, "proteinuria" se refiere a cualquier cantidad de proteína que pasa a través de un podocito, tal como un podocito que ha sufrido daño podocitario. Por ejemplo, el procesamiento de proteínas por podocitos cultivados que se han sometido a redistribución del citoesqueleto de actina y el borramiento de los pedicelos darían lugar a la proteinuria. Tal como se usa en el presente documento, "daño podocitario" se refiere al borramiento de los pedicelos y/o a la redistribución de la actina cortical o a cualquier otro cambio estructural o funcional reversible en los podocitos que dé lugar a la proteinuria. En un sistema *in vivo*, el término "proteinuria" se refiere a la presencia de cantidades excesivas de proteínas séricas en la orina. En determinado modo de realización, la cantidad excesiva de proteína sérica en la orina es mayor de 50, 100, 150 o 200 mg de proteína sérica/día. En un modo de realización preferente, la cantidad de proteína sérica en la orina es mayor de 150 mg/día. La proteinuria es un síntoma característico de mal funcionamiento renal (del riñón), urinario o pancreático, síndromes nefróticos (por ejemplo, proteinuria mayor de 3,5 gramos al día), eclampsia, lesiones tóxicas del riñón, y con frecuencia es un síntoma de la diabetes mellitus. Con la proteinuria grave se puede desarrollar una hipoproteinemia general y da lugar a la disminución de la presión oncótica (ascitis, edema, hidrotórax).

Tal como se usa en el presente documento, un trastorno proteinúrico se refiere a, pero sin limitación: nefropatía diabética, síndromes nefróticos (es decir, insuficiencia renal intrínseca), síndromes nefróticos, lesiones tóxicas del riñón, enfermedades glomerulares tales como la glomerulonefritis membranosa, glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS), nefropatía por IgA (es decir, enfermedad de Berger), nefropatía por IgM, glomerulonefritis membranoproliferativa, nefropatía membranosa, nefropatía de cambios mínimos, nefroesclerosis hipertensiva y nefritis intersticial.

Tal como se usa en el presente documento, en determinados modos de realización, un trastorno proteinúrico se refiere a: preeclampsia, eclampsia, enfermedades vasculares del colágeno (p. ej., lupus eritematoso sistémico), deshidratación, ejercicio extenuante, estrés, proteinuria ortostática (postural) benigna, sarcoidosis, síndrome de Alport, diabetes mellitus, enfermedad de Fabry, infecciones (p. ej., VIH, sífilis, hepatitis, infección postestreptocócica), aminoaciduria, síndrome de Fanconi, ingesta de metales pesados, anemia drepanocítica, hemoglobinuria, mieloma múltiple, mioglobinuria, rechazo de órganos, fiebre hemorrágica del Ébola y síndrome Nail Patella.

Tal como se usa en el presente documento, en determinados modos de realización, un trastorno proteinúrico se refiere a diabetes, hipertensión, nefropatías, nefropatía de cambios mínimos, glomerulonefritis membranosa, glomeruloesclerosis focal segmentaria, nefropatía diabética, glomerulonefritis postinfecciosa, glomerulonefritis mesangioproliferativa, nefropatía asociada a VIH, nefropatía por IgA y cardiovascularopatías.

A nivel celular, la pérdida de proteínas por la orina va acompañada de una redistribución estructural de las células podocitarias. La ultrafiltración renal se sitúa dentro del glomérulo renal, una combinación de vasos sanguíneos y células. Las células podocitarias altamente especializadas realizan el trabajo de filtración y son las células objetivo principales en las nefropatías. Los podocitos pueden reorganizar su esqueleto a base de actina de manera muy dinámica. Esta reorganización determina la integridad de la barrera de ultrafiltración del riñón. La reorganización del citoesqueleto de actina en los pedicelos podocitarios desde las fibras tensoras hasta la actina cortical da lugar al borramiento de los pedicelos podocitarios y al desarrollo de la pérdida de proteínas por la orina. El daño de los podocitos lo pueden causar muchas afecciones y factores, incluidos el LPS y el aminonucleósido de purina (PAN). Estas modificaciones dan lugar al daño continuo del riñón y, con el tiempo, a un deterioro de la función renal. La presente invención se basa en parte en el sorprendente descubrimiento de la significación funcional de la activación de la integrina $\alpha\beta3$ como efector posterior para el aumento de la movilidad de los podocitos y el borramiento de los pedicelos.

Las integrinas pertenecen a la familia de los receptores transmembranarios heterodiméricos de clase I, que desempeñan un papel importante en numerosos procesos de adhesión célula-matriz y célula-célula (Tuckwell et al., 1996, Symp. Soc. Exp. Biol. 47). Se pueden dividir en aproximadamente en tres clases: la integrinas pi, que son receptores para la matriz extracelular, las integrinas $\beta2$, que se pueden activar en leucocitos y entran en funcionamiento durante los procesos inflamatorios, y la integrinas αv , que influyen en la respuesta celular en la cicatrización de heridas y otros procesos patológicos (Marshall y Hart, 1996, Semin. Cancer Biol. 7, 191).

La integrina $\alpha\beta3$, llamada también receptor de vitronectina, media la adhesión a una multiplicidad de proteínas plasmáticas y ligandos, proteínas de la matriz extracelular, proteínas de la superficie celular, de la que la mayoría contienen la secuencia de aminoácidos Arg-Gly-Asp (RGD), tales como, por ejemplo, la fibronectina o la vitronectina.

- Los péptidos solubles que contienen RGD pueden inhibir la interacción de cada una de estas integrinas con los ligandos naturales correspondientes. Se ha demostrado la acción antagonista de la integrina $\alpha\beta 3$ para una multiplicidad de compuestos, tales como anticuerpos monoclonales anti- $\alpha\beta 3$, péptidos que contienen la secuencia RGD, proteínas naturales que contienen RGD (p. ej., desintegrinas) u compuestos de bajo peso molecular (FEBS Letts 1991, 291, 50-54; J. Biol. Chem. 1990, 265, 12267-12271; J. Biol. Chem. 1994, 269, 20233-20238; J. Cell Biol 1993, 51, 206-218; J. Biol. Chem. 1987, 262, 17703-17711; Bioorg. Med. Chem. 1998, 6, 1185-1208).
- Los ligandos ventajosos del receptor de la integrina $\alpha\beta 3$ se unen al receptor de la integrina $\alpha\beta 3$ con una afinidad aumentada en al menos un factor de 10, preferentemente al menos un factor de 100.
- Se describen algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ en los documentos WO 97/08145 A1, WO 00/48996 A2, WO 06/043930 A1, US 2002/072500, US 2005/043344, US 2002/045645, US 2002/099209, US 2005/020505, US 2002/072518, US 2002/077321, US 2004/043994, US 2003/069236 y US 2003/144311.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son sulfonamidas peptídicas que tienen la fórmula (I): R^1 -Arg-X-Asp-Leu-Asp-Ser-Leu-Arg- R^2 , en la que R^1 indica H, acetilo o acilo y R^2 indica -OH, OR^3 , NHR^3 , $N(R^3)_2$, R^3 indica alquilo, aralquilo, arilo, Het y X indica un aminoácido, en la que A indica $(CH_2)_n$, R^4 indica H, alquilo, aralquilo o arilo y n indica 1, 2, 3, 4, 5 o 6, y el aminoácido está unido a la Arg adyacente por medio de un enlace peptídico del grupo α -amino y al grupo α -amino del Asp adyacente por medio de un enlace peptídico del grupo α -carboxilo como se describe en la solicitud de patente de EE. UU. N.º 2006/0148716 A1.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son derivados de fluoro-alquil-ciclopéptidos como se describe en el documento WO 2004/011487 A2.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son compuestos miméticos de péptidos que contienen una secuencia RGD como se describe en el documento WO 2005/007654 A1 y en la patente de EE. UU. N.º 6.451.972.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son antagonistas del receptor de la integrina $\alpha\beta 3$ basados en un elemento estructural bicíclico; se describen en los documentos WO 99/06049, WO 99/05107, WO 98/14192, WO 97/24124, WO 97/24122 y WO 96/26190.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son compuestos descritos en la publicación de EE. UU. N.º 2004/0063934.
- Algunos inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ de la invención incluyen proteínas y péptidos aislados. Tal como se usa en el presente documento con respecto a polipéptidos, proteínas o fragmentos de los mismos, "aislado" significa separado de su entorno de origen y presente en cantidad suficiente para permitir su identificación o uso. Aislado, en referencia a una proteína o un polipéptido, significa, por ejemplo: (i) producido de forma selectiva por clonación de la expresión o (ii) purificado por cromatografía o electroforesis. Las proteínas o los polipéptidos aislados pueden ser sustancialmente puros, aunque no lo son necesariamente. El término "sustancialmente puro" significa que las proteínas o los polipéptidos no tiene, esencialmente, otras sustancias con las que se pueden encontrar en la naturaleza o en sistemas *in vivo* en un grado práctico y apropiado para el uso pretendido. Se pueden producir polipéptidos sustancialmente puros por técnicas bien conocidas en la técnica. Dado que se puede mezclar una proteína aislada con un vehículo farmacéuticamente aceptable en una preparación farmacéutica, la proteína puede comprender solamente un pequeño porcentaje en peso de la preparación. No obstante, la proteína está aislada en cuanto que se ha separado de las sustancias con las que puede estar asociada en sistemas vivos, es decir, aislada de otras proteínas.
- Los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ de la invención se pueden producir usando cualquiera de los procedimientos y técnicas conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ se pueden purificar a partir de una fuente que expresa de forma natural la proteína, se pueden aislar a partir de un huésped recombinante que se ha modificado para que exprese el mutante deseado o un fragmento del mismo, o se pueden sintetizar usando técnicas de síntesis de proteínas conocidas en la técnica. El experto en la técnica puede adaptar fácilmente una variedad de técnicas con el fin de obtener inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ que sean péptidos, proteínas o fragmentos de los mismos.
- Otros agente que son inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ incluyen, pero sin limitación, moléculas pequeñas y otros fármacos, incluidos fármacos conocidos, que evitan (es decir, reducen o inhiben un aumento adicional) de la activación de la integrina. Los agentes de este tipo se pueden identificar usando procedimientos de cribado rutinarios. Por ejemplo, se pueden identificar inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ de la presente invención usando los procedimientos y ensayos descritos en el presente documento. El cribado puede ser un cribado aleatorio o puede ser un cribado de diseño fundamentado. Para el cribado aleatorio, se seleccionan posibles inhibidores al azar y se somete a ensayo su capacidad de producir el efecto fisiológico deseado. Por ejemplo, se puede ensayar la capacidad de los posibles moduladores de reducir de forma selectiva o específica la cantidad o la velocidad de activación de la integrina $\alpha\beta 3$. Para someter a ensayo los posibles inhibidores se puede emplear cualquier técnica o procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica.
- Los procedimientos de cribado que usan un diseño fundamentado emplean los mismos tipos de procedimientos de cribado, pero comienzan con un conjunto de compuestos que se ha diseñado para maximizar específicamente su

función. Para el diseño o la selección fundamentados, se pueden seleccionar los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ basándose, por ejemplo, en el dominio de unión RGD. Para la selección o el diseño fundamentados, se puede emplear cualquier técnica o procedimiento adecuado conocido por los expertos en la técnica. Por ejemplo, un experto en la técnica puede adaptar fácilmente los procedimientos disponibles en la actualidad para generar agentes farmacéuticos que se puedan unir a una secuencia peptídica específica de la integrina $\alpha\beta 3$ o de uPAR, lo que impide su interacción y la transducción de señales e inhibe de este modo la actividad de la integrina $\alpha\beta 3$. Se describen ejemplos ilustrativos de estos procedimientos disponibles, por ejemplo, en Hurby et al., "Application of Synthetic Peptides: Antisense Peptides", en Synthetic Peptides, A User's Guide, W. H. Freeman, N.Y., págs. 289-307 (1992); Kaspczak et al., Biochemistry 28:9230 (1989); y en Harlow, Antibodies, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1990).

En un aspecto de la invención, los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ son anticuerpos monoclonales anti-CD61 y fragmentos de anticuerpo que se pueden unir a la integrina $\alpha\beta 3$ y, en consecuencia, actuar como inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$. Los anticuerpos de la presente invención incluyen anticuerpos policlonales y monoclonales, así como fragmentos de anticuerpo y derivados que contienen el dominio de unión a antígeno pertinente de los anticuerpos. Preferentemente, estos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo se usan en los modos de realización de diagnóstico y tratamiento de la presente invención.

Tal como se usa en el presente documento, "trata un trastorno proteinúrico" incluye evitar el desarrollo de la proteinuria, reducir o inhibir la proteinuria, ralentizar la progresión y/o cualquier otro efecto deseado sobre la proteinuria. De acuerdo con la invención, los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ se pueden administrar antes de la aparición de la proteinuria, después de la aparición de la proteinuria o como parte de cualquier pauta terapéutica, por ejemplo, que incluya medicamentos contra el cáncer.

Los procedimientos de la invención están concebidos para que engloben el uso de más de un medicamento distinto junto con el inhibidor de la integrina $\alpha\beta 3$. Como ejemplo, cuando sea apropiado, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta 3$ se puede administrar tanto con un agente quimioterápico como con un agente antidiabético o un agente inmunoterápico.

La invención también engloba ensayos de diagnóstico para determinar la presencia de un trastorno caracterizado por la proteinuria en un sujeto. Este aspecto de la invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la activación de la integrina $\alpha\beta 3$ aumenta en podocitos dañados o proteinúricos. En el procedimiento, se determina una cantidad de actividad de la integrina $\alpha\beta 3$ en una célula podocitaria. Esa cantidad se compara con un umbral predeterminado o con un nivel de control. Se determina un trastorno caracterizado por la proteinuria cuando la cantidad de actividad de la integrina $\alpha\beta 3$ es mayor que el umbral predeterminado. Tal como se usa en el presente documento, "umbral predeterminado o un nivel de control" se refiere a los niveles de actividad de la integrina $\alpha\beta 3$ en podocitos normales, sanos, es decir, podocitos que no están afectados por el daño podocitario o la proteinuria. Las células podocitarias pueden estar dentro de una muestra biológica. La muestra biológica puede ser, por ejemplo, una muestra de biopsia de tejido proteinúrico. Tal como se usa en el presente documento, actividad se refiere a la expresión, así como a la actividad bioquímica como se describe en el presente documento.

La detección de integrina $\alpha\beta 3$ en células podocitarias se puede llevar a cabo fácilmente por procedimientos ordinarios de inmunotinción o inmunocitométricos, conocidos fácilmente por los expertos en la técnica. Tal como se usa en el presente documento, "inmunotinción" se refiere a una técnica de aplicación de tintes coloreados o fluorescentes a tejidos en preparación para su exploración al microscopio. Se puede realizar el ensayo usando microscopía electrónica de inmuno-oro.

En un modo de realización, los ensayos de diagnóstico se realizan en células y/o muestras de tejido en las que no se pueden detectar fácilmente cambios morfológicos del citoesqueleto de actina por ningún otro procedimiento inmunocitométrico. Por ejemplo, un trastorno de este tipo sería la nefropatía de cambios mínimos. El término nefropatía de cambios mínimos proviene del concepto de que los cambios morfológicos de los podocitos solamente son visibles al microscopio electrónico. La detección de la proteinuria en pacientes con nefropatía de cambios mínimos por procedimientos inmunocitométricos resultaría ventajosa porque proporciona facilidad y rapidez en la detección.

Los procedimientos inmunocitométricos se pueden realizar usando anticuerpos marcados. Se dice que un anticuerpo está "marcado de forma detectable" si el anticuerpo, o fragmento del mismo, está unido a una molécula que se puede identificar, visualizar o localizar usando procedimientos conocidos. Las marcas detectables adecuadas incluyen marcas de radioisótopos, marcas enzimáticas, marcas de isótopos no radioactivos, marcas fluorescentes, marcas de afinidad, marcas quimioluminiscentes y agentes de contraste para resonancia magnética nuclear.

Los ejemplos ilustrativos de marcas enzimáticas adecuadas incluyen, pero sin limitación, luciferasa, malato deshidrogenasa, nucleasa estafilocócica, delta-5-esteroide isomerasa, alcohol deshidrogenasa de levaduras, alfa-glicerol fosfato deshidrogenasa, triosa fosfato isomerasa, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, asparaginasa, glucosa oxidasa, beta-galactosidasa, ribonucleasa, ureasa, catalasa, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, glucoamilasa y acetilcolinesterasa.

- Los ejemplos de marcas de radioisótopos incluyen, pero sin limitación, ^3H , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^{51}Cr , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{152}Eu , ^{90}Y , ^{67}Cu , ^{217}Ci , ^{211}At , ^{212}Pb , ^{47}Sc , ^{109}Pd , etc. ^{111}In es un isótopo preferente cuando se usa la formación de imágenes *in vivo*, ya que evita el problema de la deshalogenación del anticuerpo monoclonal marcado con ^{125}I o ^{131}I por el hígado. Además, este radionucleótido tiene una energía de emisión gamma favorable para la formación de imágenes (Perkins et al., Eur. J. Nucl. Med. 10:296-301 (1985); Carasquillo et al., J. Nucl. Med. 28:281-287 (1987)). Por ejemplo, ^{111}In acoplado a anticuerpos monoclonales con 1-(p-isotiocianatobencil)-DPTA ha demostrado poca incorporación en tejidos no tumorales, en particular el hígado, y, por lo tanto, potencia la especificidad de la localización de tumores (Esteban et al., J. Nucl. Med. 28:861-870 (1987)).
- Los ejemplos ilustrativos de marcas de isótopos no radioactivos adecuadas incluyen, pero sin limitación, ^{157}Gd , ^{55}Mn , ^{162}Dy , ^{52}Tr y ^{56}Fe .
- Los ejemplos ilustrativos de marcas fluorescentes adecuadas incluyen, pero sin limitación, una marca de ^{152}Eu , una proteína fluorescente (incluida la proteína verde fluorescente (GFP), la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP), la proteína amarilla fluorescente potenciada (YFP) y la proteína cian fluorescente potenciada (ECFP), una marca de fluoresceína, una marca de isotiocianato, una marca de rodamina, una marca de ficoeritrina, una marca de ficocianina, una marca de alofocianina, una marca de o-ftaldehído y una marca de fluorescamina.
- Los ejemplos ilustrativos de marcas quimioluminiscentes incluyen una marca de luminal, una marca de isoluminal, una marca de éster de acridinio aromático, una marca de imidazol, una marca de sal de acridinio, una marca de éster de oxalato, una marca de luciferina, una marca de luciferasa una marca de acuorina.
- Los ejemplos ilustrativos de agentes de contraste para resonancia magnética nuclear incluyen núcleos de metales pesados paramagnéticos tales como Gd, Mn y Fe.
- Se contempla que el acoplamiento de una o más moléculas a anticuerpos incluya muchos mecanismos químicos, por ejemplo, unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión por coordinación y formación de complejos.
- La unión covalente se puede llevar a cabo por condensación directa de cadenas laterales existentes o por la incorporación de moléculas formadoras de puentes externas. Muchos agentes bivalente o polivalente son útiles en el acoplamiento de moléculas de proteína a otras proteínas, péptidos o funciones de amina, etc. Por ejemplo, la literatura está repleta de agentes de acoplamiento tales como carbodiimidas, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilendiaminas. No se pretende que esta lista sea exhaustiva de los diversos agentes de acoplamiento conocidos en la técnica, sino que sea ejemplar de los agentes de acoplamiento más comunes.
- De acuerdo con los procedimientos de la invención los inhibidores de la integrina $\alpha\text{v}\beta3$ se administran en preparaciones farmacéuticamente aceptables. Al administrarlas, las preparaciones farmacéuticas de la invención se aplican en cantidades farmacéuticamente aceptables y en composiciones farmacéuticamente aceptables. El término "farmacéuticamente aceptable" significa un material no tóxico que no interfiere con la eficacia de la actividad biológica de los principios activos. Estas preparaciones pueden contener de forma rutinaria sales, agentes tamponadores, conservantes, vehículos compatibles y, opcionalmente, otros agentes terapéuticos. Cuando se usen en medicina, las sales deberán ser farmacéuticamente aceptables, pero se pueden usar de forma conveniente sales que no son farmacéuticamente aceptables para preparar las sales farmacéuticamente aceptables de las mismas y no se excluyen del alcance de la invención.
- Tal como se usa en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "vehículo fisiológicamente aceptable" incluye todas las sales, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares que sean fisiológicamente compatibles. Preferentemente, el vehículo es adecuado para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea, parenteral, por vía oral, espinal o epidérmica (p. ej., por inyección o infusión). En función de la vía de administración, el compuesto activo, es decir, el inhibidor de la integrina $\alpha\text{v}\beta3$, puede estar recubierto con un material para proteger el compuesto de la acción de ácidos y otras condiciones naturales que pueden inactivar el compuesto. Preferentemente, el vehículo es estéril.
- Una sal mantiene la actividad biológica deseada del compuesto original y no confiere efectos toxicológicos no deseados (véase, p. ej., Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66: 1-19). Los ejemplos de este tipo de sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como los ácidos alifáticos mono y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletiendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.
- Las composiciones farmacéuticas pueden contener agentes tamponadores adecuados, incluidos: ácido acético en una sal; ácido cítrico en una sal; ácido bórico en una sal; y ácido fosfórico en una sal. Las composiciones farmacéuticas también pueden contener, opcionalmente, conservantes adecuados, tales como: cloruro de benzalconio; clorobutanol; parabenos y timerosal.

Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar convenientemente en formas farmacéuticas unitarias y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la técnica de la farmacia. Todos los procedimientos incluyen la etapa de asociar el agente activo con un vehículo que constituye uno o más ingredientes accesorios. En general, las composiciones se preparan asociando uniforme e íntimamente el compuesto activo con un vehículo líquido, un vehículo sólido finamente dividido o ambos, y después, si es necesario, conformando el producto.

Las composiciones adecuadas para administración por vía parenteral comprenden convenientemente una preparación estéril acuosa o no acuosa de los compuestos, que preferentemente es isotónica con la sangre del receptor. Esta preparación se puede formular de acuerdo con procedimientos conocidos usando agentes de dispersión o humectantes y agentes de suspensión adecuados. La preparación inyectable estéril también puede ser una solución o suspensión inyectable estéril en un diluyente o disolvente no tóxico parenteralmente aceptable, por ejemplo, como una solución en 1,3-butanodiol. Entre los vehículos y disolventes aceptables que se pueden emplear están el agua, la solución de Ringer y la solución isotónica de cloruro sódico. Además, convencionalmente se emplean aceites fijos estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este propósito, se puede emplear cualquier aceite fijo suave, incluidos mono o diglicéridos sintéticos. Además, en la preparación de inyectables se pueden usar ácidos grasos tales como el ácido oleico. Se pueden encontrar formulaciones de vehículo adecuadas para su administración oral, subcutánea, intravenosa, intramuscular, etc. en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA.

Los compuestos activos se pueden preparar con vehículos que protegerán el compuesto contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluidos implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biocompatibles biodegradables, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Muchos procedimientos para la preparación de formulaciones de este tipo están patentados o los conocen en general los expertos en la técnica. Véase, p. ej., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

Por lo tanto, la presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden uno o más inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$. Estas composiciones farmacéuticas se pueden administrar por vía oral, rectal, parenteral, intratecal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, tópica (como mediante polvos, pomadas, gotas o parche transdérmico), bucal o como un pulverizador oral o nasal. Tal como se usa en el presente documento, el término "parenteral" se refiere a modos de administración que incluyen la inyección y la infusión intravenosa, intramuscular, intratecal, intraperitoneal, intrasternal, subcutánea e intraarticular. Un experto reconocerá que la elección de un modo de administración en particular se puede realizar de forma empírica basándose en consideraciones tales como el estado de enfermedad concreto que se trata; el tipo y el grado de respuesta que se quiere lograr; el agente o composición específicos empleados; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración y la velocidad de excreción del agente o composición; la duración del tratamiento; los fármacos usados en combinación o de forma coincidente con la composición específica; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para su inyección parenteral pueden comprender soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes de su uso. Los ejemplos ilustrativos de vehículos, diluyentes, disolventes o excipientes acuosos y no acuosos adecuados incluyen, pero sin limitación, agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), carboximetilcelulosa y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva) y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. Se puede mantener la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

Las composiciones de la presente invención pueden contener también conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. Se puede garantizar la prevención de la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, ácido fenolsórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro de sodio y similares. Se puede inducir la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable mediante la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como el monoestearato de aluminio y la gelatina.

En algunos casos, con el fin de prolongar el efecto del agente terapéutico, es deseable ralentizar la absorción a partir de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto se puede lograr con el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con escasa solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución, que, a su vez, depende del tamaño del cristal y la forma cristalina. De forma alternativa, la absorción retardada de un fármaco administrado por vía parenteral se logra al disolver o suspender el fármaco en un vehículo oleaginoso.

Las formas inyectables de absorción lenta se preparan formando matrices microencapsuladas del fármaco en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. En función de la proporción de fármaco y polímero y de

la naturaleza del polímero empleado en particular, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Las formulaciones inyectables de absorción lenta también se preparan incluyendo el fármaco en liposomas o microemulsiones que sean compatibles con los tejidos del organismo.

- 5 Las formas farmacéuticas sólidas para su administración oral incluyen, pero sin limitación, cápsulas, comprimidos, pastillas, polvos y gránulos. En estas formas farmacéuticas sólidas, preferentemente, los compuestos activos están mezclados con al menos un excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable tal como citrato de sodio o fosfato dicálcico y/o a) cargas o diluyentes tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol y ácido silícico, b) aglutinantes tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y goma arábiga, c) humectantes tales como glicerol, d) agentes disgregantes tales como agar, carbonato de calcio, almidón de patata o mandioca, ácido alginico, determinados silicatos y carbonato de sodio, e) agentes retardantes de la disolución, tales como parafina, f) aceleradores de la absorción tales como compuestos de amonio cuaternario, g) agentes humectantes tales como, por ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol, h) absorbentes tales como caolín y arcilla de bentonita, e i) lubricantes tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y mezclas de los mismos. En el caso de las cápsulas, los comprimidos y las pastillas, la forma farmacéutica también puede comprender agentes tamponadores, según convenga.

También se pueden emplear composiciones sólidas de tipo similar como cargas en cápsulas de gelatina rellenas blandas y duras, usando excipientes tales como lactosa (azúcar de la leche), así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

Las formas farmacéuticas sólidas de comprimidos, grageas, cápsulas, pastillas y gránulos se pueden preparar con recubrimientos y cubiertas tales como recubrimientos entéricos y otros recubrimientos bien conocidos en la técnica de la formulación farmacéutica. Opcionalmente, pueden contener agentes opacificantes y también pueden tener una composición que libere el/los principio(s) activo(s) solamente, o de forma preferente, en una parte determinada del tubo digestivo, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos ilustrativos de composiciones de inclusión que se pueden usar incluyen sustancias poliméricas y ceras.

Los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ activos también pueden estar en forma microencapsulada, según convenga, con uno o más de los excipientes mencionados anteriormente.

Las formas farmacéuticas líquidas para su administración oral incluyen, pero sin limitación, emulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de los compuestos activos, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, dimetilformamida, aceites (en particular, aceites de semilla de algodón, cacahuete, maíz, germen de trigo, oliva, ricino y sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfurílico, polietilenglicoles y ésteres de ácidos grasos de sorbitano y mezclas de los mismos.

Además de diluyentes inertes, las composiciones orales también pueden contener adyuvantes tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión y agentes edulcorantes, aromatizantes y perfumantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes como, por ejemplo, alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de sorbitano y polioxietilensorbitol, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar y goma tragacanto y mezclas de los mismos.

En algunos modos de realización de la invención, el inhibidor de la integrina $\alpha\beta 3$ se administra en forma de liposomas. Como saben los expertos en la técnica, en general, los liposomas se obtienen a partir de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas. Los liposomas están formados por cristales líquidos mono- o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico fisiológicamente aceptable y metabolizable que pueda formar liposomas. Las presentes composiciones en forma de liposomas pueden contener, además del inhibidor de la integrina $\alpha\beta 3$, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferentes son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. En la técnica se conocen procedimientos para formas liposomas. Véase, p. ej., Prescott, ed., METHODS IN CELL BIOLOGY, volumen XIV, Academic Press, Nueva York, N.Y. (1976), pág. 33 y siguientes.

Un experto apreciará que se pueden determinar las cantidades eficaces de los agentes terapéuticos usados en los procedimientos de la invención de forma empírica y se pueden emplear en forma pura o, cuando exista tal forma, en forma de sal, éste o profármaco farmacéuticamente aceptable. Los agentes terapéuticos se pueden administrar en composiciones en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. Se entenderá que, cuando se administren a un paciente humano, el uso diario total de los agentes y composiciones de la presente invención lo decidirá el facultativo encargado del caso dentro del alcance del criterio médico razonable. El nivel específico de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente en particular dependerá de una variedad de factores, incluidos el tipo y el grado de respuesta que se quiere lograr; el agente o composición específicos

empleados; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento de la administración, la vía de administración y la velocidad de excreción del agente o composición; la duración del tratamiento; los fármacos (tales como un agente quimioterápico) usados en combinación o de forma coincidente con la composición específica; y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

5 En la técnica se conocen bien técnicas de determinación de la dosificación. Por ejemplo, se obtienen resultados satisfactorios mediante la administración oral de dosificaciones terapéuticas del orden de desde 0,05 hasta 10 mg/kg/día, preferentemente de 0,1 a 7,5 mg/kg/día, más preferentemente de 0,1 a 2 mg/kg/día, administrados una vez o, divididos en dosis, de 2 a 4 veces al día. Con la administración por vía parenteral, por ejemplo, por gotero o infusión i.v., se pueden usar dosificaciones del orden de desde 0,01 hasta 5 mg/kg/día, preferentemente de 0,05 a 10 mg/kg/día y más preferentemente de 0,1 a 1,0 mg/kg/día. Por tanto, las dosificaciones diarias adecuadas para 10 pacientes son del orden de desde 2,5 hasta 500 mg por vía oral, preferentemente de 5 a 250 mg por vía oral, más preferentemente de 5 a 100 mg por vía oral o del orden de desde 0,5 hasta 250 mg por vía i.v., preferentemente de 2,5 a 125 mg por vía i.v. y más preferentemente de 2,5 a 50 mg por vía i.v.

15 La administración de los agentes de la presente invención puede ser con fines profilácticos o terapéuticos. Cuando se administra de forma profiláctica, se administra el agente antes de cualquier daño, es decir, proteinuria o daño podocitario. La administración profiláctica del agente sirve para evitar o reducir la velocidad de aparición de los síntomas. Cuando se administra de forma terapéutica, se proporciona el agente al aparecer (o después) los síntomas de la enfermedad real. La administración terapéutica del agente sirve para reducir la gravedad y la duración de la proteinuria.

20 Las composiciones de la invención se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" es la cantidad de cualquiera de las composiciones proporcionadas en el presente documento que sola, o junto con dosis adicionales, produce la respuesta deseada, p. ej., reduce o elimina la proteinuria. Esto puede implicar simplemente ralentizar la progresión de la enfermedad temporalmente aunque, más preferentemente, implica detener la progresión de la enfermedad de forma permanente. Esto se puede controlar por procedimientos rutinarios. La respuesta deseada al 25 tratamiento de la enfermedad o afección también puede ser retardar la aparición o incluso evitar la aparición de la enfermedad o afección. Una cantidad que es eficaz puede ser una cantidad de un inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ solo que produce el resultado terapéutico deseado. Una cantidad que es eficaz también es la cantidad de un inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ en combinación con otro agente que produce el resultado deseado.

30 Estas cantidades dependerán, por supuesto, de la afección tratada en particular, la gravedad de la afección, los parámetros del paciente individual, incluidos la edad, el estado físico, la talla y el peso, la duración del tratamiento, la naturaleza de tratamientos concurrentes (si los hay), la vía de administración específica y factores similares dentro del conocimiento y la pericia del facultativo. Estos factores son bien conocidos por los expertos en la técnica y se pueden abordar simplemente con experimentación rutinaria. En general, se prefiere que se use la dosis máxima de los componentes individuales o combinaciones de los mismos, es decir, la dosis segura más alta de acuerdo con el 35 criterio médico razonable. Los expertos en la técnica entenderán, no obstante, que un paciente puede insistir en una dosis más baja o una dosis tolerable por motivos médicos, motivos psicológicos o por prácticamente cualquier otro motivo.

40 Las dosis de inhibidores de la integrina $\alpha\beta3$ administradas a un sujeto se pueden escoger de acuerdo con diferentes parámetros, en particular de acuerdo con el modo de administración usado y el estado del sujeto. Otros factores incluyen el periodo de tratamiento deseado. En el caso de que la respuesta del sujeto sea insuficiente a las dosis iniciales aplicadas, se pueden emplear dosis más altas (o dosis de mayor eficacia por una vía de administración diferente, más localizada) en la medida que permita la tolerancia del paciente.

45 Con base en la composición, se puede administrar la dosis de forma continua, tal como por bombeo continuo, o a intervalos periódicos. Un experto en la técnica puede determinar los intervalos de tiempo deseados para varias dosis de una composición en particular sin experimentación excesiva. El experto en la técnica conocerá otros protocolos para la administración de las composiciones proporcionadas, en los que la cantidad de dosis, la pauta de administración, los sitios de administración, el modo de administración y similares pueden variar con respecto a lo anterior.

50 La administración de composiciones inhibitoras de la integrina $\alpha\beta3$ a mamíferos que no son seres humanos, p. ej., con fines de prueba o fines terapéuticos veterinarios, se lleva a cabo sustancialmente en las mismas condiciones que se describen anteriormente.

55 Las composiciones para el uso de la presente invención tiene utilidades terapéuticas y de diagnóstico *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas se pueden administrar a células en cultivo, p. ej., *in vitro* o *ex vivo*, o a un sujeto, p. ej., *in vivo*, para tratar, evitar o diagnosticar una variedad de trastornos. Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" se usa indistintamente con el término "paciente" y se pretende que incluya seres humanos y animales no humanos, incluidos, pero sin limitación, un perro, un gato, un caballo, una vaca, un cerdo, una oveja, una cabra o un primate, p. ej., un mono. Los pacientes preferentes incluyen un paciente humano que tiene un trastorno proteinúrico, incluidos trastornos caracterizados por la proteinuria como se describe en el presente documento.

Tal como se usa en el presente documento, "un paciente que o necesita" se refiere a cualquier paciente que está afectado por un trastorno caracterizado por la proteinuria. En un aspecto de la invención, "un paciente que lo necesita" se refiere a cualquier paciente que puede tener, o presenta riesgo de tener, un trastorno caracterizado por la proteinuria. En un modo de realización de la invención, "un paciente que lo necesita" es un paciente que tiene, puede tener o presenta riesgo de tener, cáncer, precáncer, cáncer resistente o cáncer metastásico. En otro modo de realización de la invención más, "un paciente que lo necesita" es un paciente que tiene, puede tener o presenta riesgo de tener, un trastorno cognitivo, tal como enfermedad de Alzheimer o demencia.

Las composiciones proporcionadas de la presente invención se pueden usar junto con otras modalidades de tratamiento terapéuticas. Estos otros tratamientos incluyen intervenciones quirúrgicas, radiación, criocirugía, termotratamiento, tratamiento hormonal, quimioterapia, vacunas e inmunoterapia.

Se puede cribar la actividad de los agentes y moléculas candidatos que pueden ser inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ usando el mismo tipo de ensayos descritos en el presente documento (p. ej., los ensayos descritos en la sección de ejemplos). Con el uso de estos ensayos, se pueden identificar inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ adicionales.

Existen procedimientos eficaces para identificar agentes farmacológicos o compuestos o prototipos moleculares como inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$. En general, los procedimientos de cribado implican realizar ensayos de los compuestos que inhiben el nivel de actividad de la integrina $\alpha\beta 3$. Como entenderá un experto en la técnica, los procedimientos de cribado pueden medir el nivel de unión entre las moléculas directamente, tal como con el uso de los procedimientos empleados en los ejemplos. Además, se pueden utilizar procedimientos de cribado que miden un efecto secundario de los inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$, por ejemplo, el nivel de proteinuria en una célula o muestra de tejido.

Se pueden usar una amplia variedad de ensayos para agentes farmacológicos, incluidos ensayos *in vitro* marcados de unión proteína-proteína, ensayos electroforéticos de desplazamiento de la movilidad, inmunoensayos, ensayos basados en células tales como cribados de dos o tres híbridos, ensayos de expresión, etc. Los elementos del ensayo comprenden un agente farmacológico candidato. Típicamente, se ensayan una pluralidad de mezclas en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferente a la diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como control negativo, es decir, a concentración cero del agente o a una concentración de agente por debajo de los límites de detección del ensayo.

Se contempla que se pueden realizar ensayos basados en células como se describe en el presente documento usando muestras de células y/o células cultivadas. También son útiles las células y los tejidos de biopsias, así como líneas celulares cultivadas.

Se pueden obtener posibles inhibidores de la integrina $\alpha\beta 3$ a partir de una amplia variedad de fuentes, incluidas colecciones de compuestos naturales o sintéticos. Por ejemplo, existen numerosos medios disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de biomoléculas y compuestos orgánicos, que incluyen la expresión de oligonucleótidos aleatorizados, colecciones combinatorias orgánicas sintéticas, colecciones de presentación en fagos de péptidos aleatorios, y similares. De forma alternativa, están disponibles o se producen fácilmente colecciones de compuestos naturales en forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales. Adicionalmente, las colecciones y los compuestos naturales y producidos sintéticamente se pueden modificar fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Además, se pueden someter agentes farmacológicos conocidos a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales de los agentes.

También se pueden incluir en la mezcla una variedad de otros reactivos. Estos incluyen reactivos tales como sales, tampones, proteínas neutras (p. ej., albúmina), detergentes, etc. que se pueden usar para facilitar la unión óptima proteína-proteína y/o proteína-ácido nucleico. Un reactivo de este tipo también puede reducir las interacciones inespecíficas o de fondo de los componentes de la reacción. También se puede usar otros reactivos que mejoran la eficacia del ensayo, tales como agentes antimicrobianos, y similares.

El prerrequisito para producir polipéptidos nativos intactos usando *E. coli* es el uso de un promotor regulable fuerte y un sitio de unión a ribosomas eficaz. Los promotores que se pueden usar con este fin incluyen el promotor del bacteriófago sensible a la temperatura λp_L , el promotor *tac* inducible con IPTG o el promotor T7. Se han descrito numerosos plásmidos con estructuras promotoras adecuadas y sitios de unión a ribosomas eficaces, tales como, por ejemplo, pKC30 (λp_L ; Shimatake y Rosenberg, *Nature* 292:128 (1981), pKK173-3 (*tac*, Amann y Brosius, *Gene* 40:183 (1985)) o pET-3 (promotor T7 (Studier y Moffat, *J. Mol. Biol.* 189:113 (1986)).

Se conocen de la técnica anterior una serie de otros sistemas de vector adecuados para expresar el ADN en *E. coli* y se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)).

Los expertos en la técnica conocen cepas de *E. coli* adecuadas que se adaptan de forma específica a un vector de expresión en particular (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)). Se conocen el funcionamiento experimental de los experimentos de clonación, la expresión de los polipéptidos en *E. coli* y el procesamiento y la purificación de los polipéptidos y se describen, por ejemplo, en

Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989). Además de procariotas, también se pueden usar microorganismos eucariotas tales como levaduras.

Para la expresión en levaduras se usan, por ejemplo, el plásmido YRp7 (Stinchcomb et al. *Nature* 282:39 (1979); Kingsman et al., *Gene* 7: 141 (1979); Tschumper et al., *Gene* 10:157 (1980)) y el plásmido YEp13 (Bwach et al., *Gene* 8:121-133 (1979)). El plásmido YRp7 contiene el gen TRP1, que proporciona un marcador de selección para un mutante de levaduras (p. ej., N.º de la ATCC 44076) que no puede crecer en medio sin triptófano. La presencia del defecto TRP1 como una característica de la cepa de levadura usada, constituye entonces una ayuda eficaz para detectar la transformación cuando se lleva a cabo el cultivo sin triptófano. Esto mismo se cumple con el plásmido YEp13, que contiene el gen de levadura LEU-2, que se puede usar para completar un mutante LEU-2-menos.

10 Otros genes marcadores adecuados para levaduras incluyen, por ejemplo, el gen URA3 y el HIS3. Preferentemente, los vectores híbridos de levaduras contienen también un inicio de replicación y un gen marcador para un huésped bacteriano, en particular *E. coli*, de modo que la construcción y la clonación de los vectores híbridos y sus precursores se pueden llevar a cabo en un huésped bacteriano. Otras secuencias de control de la expresión adecuadas para la expresión en levaduras incluyen, por ejemplo, las del gen PHO3 o el PHO5.

15 Otras secuencias promotoras adecuadas para vectores de levadura contienen la región flanqueante en 5' de los genes de la ADH I (Ammerer, *Methods of Enzymology* 101:192-210 (1983)), la 3-fosfoglicerato cinasa (Hitzeman et al., *J Biol. Chem.* 255:2073 (1980)) u otras enzimas glucolíticas (Kawaski y Fraenkel, *BBRC* 108:1107-1112 (1982)) tales como la enolasa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la hexocinasa, la piruvato descarboxilasa, la fosfofructocinasa, la glucosa-6-fosfato isomerasa, la fosfoglucosa isomerasa y la glucoquinasa. Al construir plásmidos de expresión adecuados, también se pueden insertar las secuencias de terminación asociadas con estos genes en el vector de expresión en el extremo 3' de la secuencia que se va a expresar, con el fin de permitir la poliadenilación y la terminación del ARNm.

25 En general, es adecuado cualquier vector que contenga un promotor y un origen de replicación y secuencias de terminación compatibles con levaduras. Por tanto, también se pueden usar vectores híbridos que contengan secuencias homólogas al ADN plasmídico 2 μ de levaduras. Estos vectores híbridos se incorporan por recombinación dentro de las células de plásmidos 2 μ existentes o se replican de forma autónoma.

30 Por supuesto, además de las levaduras, se pueden usar otros sistemas eucariotas para expresar los polipéptidos de acuerdo con la invención. Dado que con frecuencia son necesarias modificaciones postraduccionales tales como la formación de puentes disulfuro, la glucosilación, la fosforilación y/o la oligomerización, para la expresión de proteínas eucariotas biológicamente activas por medio de ADN recombinante, puede ser deseable expresar el ADN no sólo en líneas celulares de mamíferos, sino también en líneas celulares de insectos.

Los prerequisites funcionales de los sistemas de vector correspondientes comprenden, en particular, un promotor adecuado, señales de terminación y poliadenilación, así como elementos que hagan posible llevar a cabo la replicación y la selección en líneas celulares de mamíferos.

35 Son promotores particularmente adecuados los promotores específicos de podocitos. Un promotor específico de podocitos es aquel que se expresa exclusivamente en podocitos, tal como el promotor de la podocina.

40 Para la expresión de las moléculas de ADN, es particularmente deseable usar vectores que se puedan replicar tanto en células de mamíferos como en procariotas tales como *E. coli*. Los vectores derivados de sistemas víricos tales como el SV40, el virus de Epstein-Barr, etc., incluyen, por ejemplo, pTK2, pSV2-dhfv, pRSV-neo, pKO-neo, pHyg, p205, pHEBo, etc. (Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1989)).

45 Después de la transformación en células huésped adecuadas, p. ej., células CHO, se pueden obtener las correspondientes células transformadas con ayuda de marcadores seleccionables (timidina cinasa, dihidrofolato reductasa, proteína verde fluorescente, etc.) y se aíslan los polipéptidos correspondientes después de su expresión. Se conocen las células huésped adecuadas para los vectores, al igual que las técnicas para la transformación (microinyección, electroporación, procedimiento de fosfato de calcio, etc.), como se describe, por ejemplo, en Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, N.Y. (1989).

50 Para clonar los fragmentos de ADN correspondientes en sistemas procariotas o eucariotas, se puede cortar el vector seleccionado, por ejemplo, con una endonucleasa de restricción y, opcionalmente, después de la modificación del vector linealizado formado de este modo, se inserta una secuencia de control de la expresión provista de los correspondientes extremos de restricción. En el extremo 3' (en la dirección de la traducción) la secuencia de control de la expresión contiene la secuencia de reconocimiento de una endonucleasa de restricción, de modo que el vector que ya contiene la secuencia de control de la expresión se digiere con dicha enzima de restricción y se puede insertar la molécula de ADN, provista de extremos que encajen. Es ventajoso escindir el vector que ya contiene la secuencia de control de la expresión con una segunda endonucleasa de restricción dentro del vector de ADN e insertar la molécula de ADN provista de los extremos correctos en el fragmento de vector producido. Las técnicas necesarias se describen, por ejemplo, por Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press. N.Y. (1989).

Los vectores de expresión se caracterizan por que se inserta un ADN provisto de los extremos correspondientes y que codifica un derivado funcional o un fragmento de la proteína en un ADN vector cortado con endonucleasas de restricción y que contiene las secuencias de control de la expresión descritas a modo de ejemplo, de tal modo que las secuencias de control de la expresión regulan la expresión del ADN insertado. Por supuesto, los agentes peptídicos y de anticuerpo de la presente invención que se obtienen por la expresión de ADN recombinante o a partir de la molécula receptora original, también se pueden derivatizar por procedimientos químicos o enzimáticos.

También forman parte del alcance de la invención kits que comprenden las composiciones de la invención e instrucciones para su uso. Los kits pueden contener además al menos un reactivo adicional, tal como un agente quimioterápico.

Un kit puede comprender un transportador que esté compartimentalizado para recibir en confinamiento estrecho en el interior del mismo uno o más medios de recipiente o una serie de medios de recipiente tales como tubo de ensayo, viales, frascos, botellas, jeringuillas o similares. Un primer medio de recipiente o serie de medios de recipiente de los mencionados puede contener uno o más de los inhibidores de la integrina $\alpha\beta3$ o vectores recombinantes para la expresión de los mismos. Un segundo medio de recipiente o serie de medios de recipiente pueden contener un segundo agente terapéutico, tal como un fármaco citotóxico o anticuerpos frente a la integrina $\alpha\beta3$ (o un fragmento de los mismos).

Se pueden preparar kits para su uso en los procedimientos terapéuticos de la invención que contengan los inhibidores de la integrina $\alpha\beta3$ conjugados con otros compuestos o sustancias. Los componentes de los kits se pueden envasar en medio acuoso o en forma liofilizada. Cuando se usan los inhibidores de la integrina $\alpha\beta3$ o fragmentos de los mismos en los kits en forma de conjugados en los que se une una marca o un resto terapéutico, tal como un ion de un metal radioactivo o un resto de fármaco terapéutico, los componentes de tales conjugados se pueden suministrar en forma totalmente conjugada, en forma de intermedios o como restos por separados que conjugará el usuario del kit.

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos.

25 Ejemplos

Ejemplo 1: Modificación de la función de barrera del riñón por el receptor de urocinas

En este ejemplo, se analizó el papel del uPAR en la regulación de la estructura y la función de los podocitos durante condiciones normales y de enfermedad. Se expuso a ratones deficientes en uPAR²⁰, uPA²¹, Vn²² e integrina $\beta3^{23}$ a lipopolisacárido (LPS), un tratamiento que se sabe que provoca borramiento de los pedicelos y proteinuria⁹. Se demuestra que el uPAR es prescindible para la filtración renal normal, pero necesario en podocitos, aunque no en células endoteliales, para la pérdida de permeoselectividad renal en nefropatías en seres humanos y roedores. La señal proteinúrica derivada del uPAR en podocitos depende de la urocinasas y es necesaria para el borramiento de los pedicelos podocitarios y la proteinuria inducida por LPS.

Resultados

35 Inducción de uPAR en enfermedades proteinúricas en seres humanos y roedores

En primer lugar, se probó si la proteína uPAR se expresa en glomérulos humanos (**fig. 1a**) y se descubrió expresión en muchas células glomerulares, incluidos los podocitos, que se identifican por marcaje con sinaptopodina²⁵. A continuación, se estudió la expresión del ARNm de uPAR en nefropatías proteinúricas humanas (**fig. 1b**). Se realizó una PCR cuantitativa en tiempo real usando glomérulos aislados a partir de biopsias de riñones humanos²⁶. Se analizó la expresión de uPAR en muestras de ARN de pacientes sin enfermedades glomerulares (con, $n=8$) y en pacientes con glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS, $n=14$) y nefropatía diabética (ND, $n=20$), ambas afecciones con borramiento de los pedicelos podocitarios y proteinuria⁶. Se descubrió un nivel bajo de expresión glomerular de ARNm de uPAR en pacientes sin enfermedades glomerulares (**fig. 1b**). Por el contrario, los pacientes con GEFS demostrada por biopsia presentaban un aumento significativo de la expresión glomerular de uPAR (GEFS $0,35 \pm 0,17$ frente a con $0,14 \pm 0,02$, $**p<0,05$), (**fig. 1b**). Se descubrió una inducción aún más fuerte de la expresión glomerular de ARNm de uPAR ($0,69 \pm 0,21$ frente a con $0,14 \pm 0,02$, $*p<0,012$) en pacientes con nefropatía diabética (**fig. 1b**).

Para probar qué células del glomérulo presentan un aumento de la expresión de uPAR, se estudió la ubicación del uPAR en el riñón en tres modelos animales diferentes de proteinuria inducible y borramiento de pedicelos podocitarios, incluidos el modelo de nefrosis de aminonucleósido de puromicina en rata (PAN)²⁷, el modelo de ratón de síndrome nefrótico transitorio inducido por LPS⁹ y el modelo murino NZB/W F1 de lupus eritematoso sistémico (LES)²⁸. Con el uso de inmunofluorescencia y microscopía confocal, se descubrió una expresión baja de uPAR en glomérulos de ratos o ratones de control (**fig. 1c**). El uPAR se localizó parcialmente en podocitos, como indicó la tinción inmunofluorescente doble con sinaptopodina²⁵. Por el contrario, la expresión de la proteína uPAR en los tres modelos de proteinuria se encontraba significativamente aumentada en células glomerulares, incluidos los podocitos, como demostró el patrón de tinción amarilla aumentada resultante del solapamiento con la sinaptopodina (**fig. 1c**). Cabe destacar que en el modelo de ratón NZB/W F1 de lupus, se observó uPAR de forma preferente en zonas

nefríticas del glomérulo con una distribución más segmentaria. Recientemente, se ha informado de una distribución de este tipo en glomerulonefritis murina donde los podocitos pueden poblar semilunas celulares¹². Además del marcaje de uPAR glomerular, también se descubrió expresión de uPAR en células tubulares proximales que se mostraron sin cambios en condiciones normales y de enfermedad (datos no mostrados). También se observó un

5 aumento de la expresión de la proteína uPAR en podocitos cultivados tratados con LPS y PAN (**fig. 7b**), donde el uPAR se encontraba de forma preferente en la membrana celular (**fig. 7c**). El análisis del ligando de uPAR Vn reveló una tinción destacada de Vn en podocitos de riñón humano (**fig. 8a**). Se detectó una inducción del marcaje de Vn en podocitos de ratas PAN, así como de ratones LPS y con lupus en comparación con los controles (**fig. 8b**). En general, los perfiles de expresión para Vn en podocitos fueron similares al patrón que se observó para uPAR.

10 Para definir la ubicación subcelular de uPAR dentro de las células glomerulares, incluidos los podocitos, se analizó la ubicación de uPAR en animales sanos y diabéticos (**fig. 1d**), dado que la inducción del ARNm de uPAR es más intensa durante la nefropatía diabética en seres humanos (**fig. 1b**). Se llevaron a cabo un análisis de inmuno-oro semicuantitativo de uPAR y microscopía electrónica de transmisión en las paredes glomerulares de ratas diabéticas sanas y diabéticas de 3 meses y 12 meses de edad en las que se indujo una hiperglucemia por inyección de estreptozotocina²⁹. En condiciones normales, se observó expresión de uPAR en todos los tipos celulares del

15 glomérulo (**tabla 1**), incluidos los podocitos (**fig. 1d**). El análisis morfométrico reveló una distribución homogénea del uPAR en podocitos y células mesangiales y endoteliales (**tabla 1**). Las ratas diabéticas de 12 meses de edad presentaron un aumento del marcaje de uPAR en todas las células de la pared glomerular (**fig. 1e**). La expresión endotelial de uPAR es más intensa en aspectos de la membrana luminal y basal en comparación con los controles.

20 Resulta interesante el hecho de que uPAR podocitaria estaba aumentada en ratas diabéticas de 3 y 12 meses, pero solamente en aspectos de la membrana basal de los pedicelos. Las células mesangiales expresaban niveles altos de uPAR sin diferencias entre condiciones normales y de enfermedad.

El uPAR es necesario en podocitos para el borramiento de los pedicelos y la proteinuria

25 Para investigar si uPAR tiene un papel directo en la regulación de la estructura y la función de los pedicelos podocitarios, se comparó a continuación la morfología de los pedicelos de ratones naturales y *uPAR*^{-/-}³⁰ antes y después de la administración de LPS. Desde el punto de vista morfológico, no se observaron diferencias entre la estructura de los pedicelos podocitarios en ratones naturales y *uPAR*^{-/-} (**fig. 2a, con**). Sin embargo, 24 h después de la inyección de LPS, se observó borramiento de los pedicelos podocitarios en ratones naturales, pero no en los *uPAR*^{-/-} (**fig. 2a, LPS**), lo que apunta a una relación funcional entre el desarrollo de borramiento de los pedicelos podocitarios y la expresión de uPAR. Para probar si la protección frente al borramiento de los pedicelos inducido por LPS se podría superar al restablecer la uPAR glomerular en ratones *uPAR*^{-/-}, se utilizó el protocolo de administración

30 génica del que se informa anteriormente para administrar uPAR-ADNc^{31, 32, 8}. 24 h después de la administración génica de un plásmido que codifica uPAR pero no de un control de vector vacío, se observó expresión de uPAR en células glomerulares, incluidos los podocitos, de ratones *uPAR*^{-/-}, como se confirmó por marcaje inmunofluorescente doble de uPAR y sinaptopodina (**fig. 2b**). Para realizar un seguimiento de los niveles de expresión de uPAR después de la administración génica, de realizaron inmunotransferencias. 14 h después de la administración génica de uPAR, se observó proteína uPAR en el hígado y, a niveles de expresión más bajos, en extractos glomerulares (**fig. 2c**). El restablecimiento de uPAR sí cambió la morfología de los pedicelos podocitarios (**fig. 2d, con**). Sin embargo, la administración concomitante de LPS y uPAR-ADNc en ratones *uPAR*^{-/-} dio lugar al borramiento de los pedicelos (**fig. 2d, LPS**), de modo similar a los animales naturales tratados con LPS (**fig. 2a, LPS**). Por el contrario, no se

40 observaron cambios en los pedicelos en ratones *uPAR*^{-/-} que habían recibido control de vector, ni siquiera después de la coadministración de LPS (**fig. 2d, LPS**).

Para estudiar las consecuencias funcionales de la reconstitución de uPAR sobre el desarrollo de la proteinuria, se analizó la excreción de proteínas por la orina de ratones naturales, *uPAR*^{-/-} y *uPAR*^{-/-} con uPAR reconstituido antes y después de la inyección de LPS (**fig. 2e**). Si bien los ratones de control tratados con PBS y los ratones *uPAR*^{-/-} no mostraron proteinuria significativa, la inyección de LPS indujo una proteinuria significativa en ratones naturales, pero no en los *uPAR*^{-/-} y los *uPAR*^{-/-} que recibieron plásmidos de control. Estos datos indican que los ratones *uPAR*^{-/-} estaban protegidos de la pérdida de proteínas por la orina. Lo más importante, los ratones *uPAR*^{-/-} reconstituidos con uPAR-ADNc desarrollan proteinuria abundante pero, al igual que los ratones naturales, únicamente después de la

50 inyección de LPS (**fig. 2e**). El grado de proteinuria era comparable en ratones naturales y *uPAR*^{-/-} reconstituidos con uPAR-ADNc tratados con LPS. En resumen, estos datos parecen indicar con fuerza que se requiere uPAR para el desarrollo de la proteinuria inducida por LPS en ratones.

Aunque parece que lo más lógico es que uPAR ejerza sus efectos sobre el desarrollo de la proteinuria al orquestar el borramiento de los pedicelos podocitarios, seguía pareciendo posible aun así que la uPAR de células endoteliales glomerulares contribuyera también. Por tanto, se llevó a cabo la transferencia génica de ADNc de uPAR bajo el control de dos promotores específicos de células, lo que permitió la expresión específica de células en podocitos (podocina-uPAR)³³ o células endoteliales (ICAM2-uPAR)³⁴ (**fig. 2f**). Se realizó un seguimiento de la expresión de uPAR específica de tipo celular por marcaje de inmunofluorescencia doble con sinaptopodina o el marcador endotelial CD31³⁵ (**fig. 2g**). Mientras que la expresión de uPAR en podocitos era necesaria para la proteinuria inducida por LPS, la expresión de uPAR en células endoteliales se asoció con la resistencia a LPS. Estos resultados demuestran que la uPAR podocitaria es necesaria y suficiente para la proteinuria inducida por LPS.

uPAR orquesta la movilidad podocitaria

Para comenzar a comprender la función de uPAR en los podocitos, se consideró el papel de uPAR en la movilidad celular¹⁶. El borramiento de los pedicelos podocitarios puede representar un acontecimiento de movilidad que da lugar a la extensión de los pedicelos podocitarios sobre la MBG. Por tanto, se estudió la movilidad podocitaria en podocitos cultivados antes y después de la inactivación estable de uPAR usando ARNip estable. Se confirmó la eficacia del uPAR-ARNip tanto por RT-PCR semicuantitativa (**fig. 9a**) como por transferencia de bandas Western (**fig. 9b**). Después, se usó un ensayo en cámara de Boyden multipocillo modificado para evaluar la migración aleatoria de podocitos diferenciados en colágeno de tipo I (datos no mostrados) y Vn, un compañero de unión conocido de uPAR¹⁰ que está inducido en glomérulos proteinúricos (**fig. 8b**). El tratamiento con LPS o PAN durante 24 h promovió significativamente la migración de los podocitos naturales (**fig. 3a, b**). Por el contrario, la inactivación de uPAR redujo significativamente el número de podocitos migrantes en condiciones normales y después del tratamiento con LPS o PAN (**fig. 3a, b**). Estos resultados demuestran que los podocitos migran en mayor número en respuesta a LPS o PAN y que se requiere uPAR para la migración de células podocitarias.

A continuación, se analizó el papel de uPAR en la movilidad espacial de los podocitos usando un ensayo de herida por raspado modificado¹¹. Se contaron los podocitos migrados en diferentes puntos temporales y se relacionó la distancia migrada por las células desde el margen de la herida con la anchura total de la cicatriz. En comparación con las células de control, el tratamiento con LPS o PAN promovió significativamente el cierre de la herida de los podocitos después de 24 h (**fig. 3c, d**), un descubrimiento que también se obtuvo con un patrón similar en los puntos temporales de 12, 24 y 48 h (**fig. 9c**). La adición de urocinasa externa no modificó la migración direccional de los podocitos (**fig. 9d**), pero la inactivación de uPAR redujo fuertemente la movilidad dirigida de los podocitos antes y después de la administración de LPS o PAN, dejando la herida despoblada en gran medida (**fig. 3c, d**), (**fig. 9c**). Conjuntamente, estos datos parecen indicar que uPAR es importante para la migración podocitaria tanto aleatoria como dirigida.

uPAR activa la integrina $\alpha\beta3$ en los podocitos

Dado que uPAR es una proteína con anclaje GPI sin cola citoplásmica, en general, se cree que la transducción de señales desde uPAR implica interacciones laterales con proteínas de la membrana tales como las integrinas¹⁶. Más recientemente, un artículo de Madsen et al. describió que la adhesión y la migración celular inducida por uPAR requería la unión de Vn, lo que se puede producir independientemente de las interacciones de uPAR con las integrinas¹⁹. La movilidad de los podocitos sobre Vn se potencia de manera dependiente de uPAR (**fig. 3**) y la Vn se induce en los glomérulos durante la proteinuria (**fig. 8b**). Por tanto, parecía posible que un complejo uPAR-Vn o un complejo uPAR-Vn-integrina facilite la movilidad de los podocitos y promueva el borramiento de los pedicelos en respuesta al LPS. Las integrinas pueden estar en conformación inactiva o activa³⁶ (**fig. 4a**). La última la estimula la asociación con agonistas de interacción tales como el dominio 3 de uPAR, que es importante para la interacción de la integrina $\alpha5\beta1$ ^{37, 38}. Recientemente, Degryse y sus colaboradores identificaron una secuencia de interacción con integrinas en el dominio 2 de uPAR que actúa como un nuevo epítipo quimiotáctico que activa rutas de señalización dependientes de $\alpha\beta3$ ³⁹. Dados los descubrimientos de uPAR y Vn en el glomérulo, los autores estaban especialmente interesados en la integrina $\alpha\beta3$ receptora de Vn³⁶. De hecho, la localización de integrina $\alpha\beta3$ en pedicelos podocitarios (**fig. 4b**)³¹ y la distribución de uPAR (**fig. 4b**) eran similares. Además, uPAR interacciona con la integrina $\beta3$ (**fig. 10a**). Por tanto, se estableció la hipótesis de que la integrina $\alpha\beta3$ puede proporcionar una relación funcional entre uPAR, la migración de podocitos y el desarrollo de proteinuria. La delección genética de la integrina $\beta3$ o del ligando de la integrina $\alpha\beta3$ Vn dio lugar a la protección frente a la proteinuria cuando se produce la exposición a LPS (**fig. 4c**). Esto significa que tanto la Vn como la integrina $\beta3$ son necesarias para la proteinuria inducida por LPS, pero ambas son prescindibles para el desarrollo y la función renales normales (**fig. 4c**). Dada la extensión del interactoma de uPAR publicado y la importancia de la integrina $\alpha3\beta1$ en el desarrollo de los podocitos⁴⁰, también se ha analizado la posible contribución de la integrina $\alpha3\beta1$ en la cascada de señalización de uPAR en podocitos y se ha utilizado un ADNc para uPAR que codifica el mutante de uPAR D262A que no puede unirse a la integrina $\alpha3\beta1$ en seres humanos³⁸ y ratones (**fig. 10b**). La expresión de este tipo de uPAR en podocitos dio lugar al desarrollo de proteinuria inducida por LPS, lo que respalda la idea de que las señales de uPAR en podocitos se producen de forma preferente a través de la integrina $\alpha\beta3$. Dado que la uPAR está implicada en rutas dependientes e independientes de la urocinasa¹⁶, también se estudió la contribución de la urocinasa en las rutas de proteinuria dependientes de uPAR. Se utilizaron ratones $uPA^{-/-}$ y se les trató con LPS. Resulta interesante el hecho de que estos ratones desarrollaron proteinuria, lo que parece indicar que no se requiere uPA para los efectos de uPAR mediados por LPS sobre la barrera de filtración del riñón (**fig. 4c**).

Los ratones $uPAR^{-/-}$, integrina $\beta3^{-/-}$ y $Vn^{-/-}$ no presentan fenotipos renales observables en condiciones normales, lo que parece indicar que la señalización de uPAR en podocitos no es necesaria para la filtración glomerular normal. Por otra parte, todas estas moléculas son necesarias para el desarrollo de la pérdida de proteínas por la orina. Con base en esto, se dedujo que los cambios en la activación de la integrina $\alpha\beta3$ en condiciones de enfermedad pueden ser una causa del aumento de la movilidad de los podocitos y del borramiento de los pedicelos después de la administración de LPS. Para investigar esta idea, se estudió a continuación la expresión de la integrina $\beta3$ total y activa en secciones de riñón de ratones naturales y $uPAR^{-/-}$. Se visualizó la expresión total de la integrina $\beta3$ en podocitos por marcaje doble de la integrina $\beta3$ con el marcador podocitario sinaptopodina en ratones naturales y $uPAR^{-/-}$ antes y después de la inyección de LPS (**fig. 5a**). La expresión de la integrina $\beta3$ en podocitos permaneció

sin cambios en ratones naturales y *uPAR*^{-/-} antes y después de la administración de LPS (**fig. 5a**). A continuación, se estudió la presencia de la forma activa de la integrina β3, que se puede detectar con el uso del anticuerpo AP5, bien definido. Este anticuerpo reconoce un epítipo N-terminal de la integrina β3 que únicamente es accesible cuando la integrina está en su conformación activa⁴¹. Para probar si el AP5 podía detectar la integrina β3 activa en podocitos, se evaluó en primer lugar el efecto de cationes divalentes sobre el patrón de unión del AP5 a la integrina β3 por citometría de flujo en podocitos cultivados normales (datos no mostrados) y tratados con LPS (**fig. 5b**). Se observó un patrón de unión de AP5 similar, dependiente del calcio, como se informa anteriormente para la unión de AP5 a la integrina β3 en otras células⁴². La inmunofluorescencia de la integrina β3 activa con el anticuerpo AP5 en los glomérulos parece indicar una actividad inicial baja de la integrina β3 en ratones naturales y *uPAR*^{-/-} en condiciones normales. Este descubrimiento sugiere que la integrina αvβ3 presenta una actividad inicial baja incluso en ausencia de uPAR. El tratamiento de ratones naturales con LPS se asoció con una fuerte inducción del marcaje de los podocitos con AP5 (**fig. 5c, nat + LPS**). Esta inducción no se observó en ratones *uPAR*^{-/-} tratados con LPS (**fig. 5c, uPAR^{-/-} + LPS**). También se observó la localización conjunta del marcaje de AP5 en sitios de sobreexpresión de uPAR en podocitos, pero no en podocitos en los que uPAR se encontraba regulada por disminución con el uso de ARNip (**fig. 5d**). Como lectura adicional de la integrina β3 activa, se analizó la actividad de las GTPasas pequeñas cdc42 y Rac1 en lisados glomerulares de ratones naturales y *uPAR*^{-/-} antes y después de la administración de LPS (**fig. 5e**)⁴³. La actividad de Rac1 se encontraba aumentada en ratones naturales tratados con LPS, pero no en los *uPAR*^{-/-} (**fig. 5e, panel superior**). Se observó un patrón de inducción similar para la actividad de cdc42 (**fig. 5e, panel inferior**). Cabe destacar que no se puede detectar la actividad de RhoA en condiciones normales y de enfermedad ni en ratones naturales ni *uPAR*^{-/-} (datos no mostrados). En algunos experimentos, se coinyectó a ratones naturales con LPS y ciclo-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] (ciclo-RGDfV). Este tratamiento inhibió la inducción de Rac1 y cdc42 activas en los glomérulos de ratones tratados con LPS (**fig. 5e**). Conjuntamente, estos descubrimientos respaldan el concepto de que la uPAR es necesaria para la activación de la integrina αvβ3 podocitaria después del tratamiento con LPS.

A continuación, se estudiaron los posibles compartimentos subcelulares donde se pueden asociar entre sí uPAR y la integrina β3. Los estudios apuntan a que muchos aspectos de la membrana de los pedicelos podocitarios, sí como el DH, son ricos en colesterol⁴⁵ y varias proteínas del DH como la podocina y la nefrina se asocian con balsas lipídicas⁴⁶. Las balsas lipídicas de la membrana plasmática ayudan a compartimentalizar los acontecimientos de transducción de señales dentro de las diferentes regiones²⁴ y se sabe que uPAR, como proteína con anclaje GPI, se encuentra en compartimentos de membrana ricos en lípidos¹⁶. Los autores se plantearon si uPAR y la integrina β3 se asocian dentro de las balsas lipídicas en los podocitos. Por lo tanto, se realizaron ensayos en gradiente de densidad de sacarosa de extractos celulares completos de podocitos cultivados antes y después de la administración de LPS (**fig. 6a**). Se descubrió que uPAR y la integrina β3 se asocian principalmente con las fracciones que no son balsas lipídicas en los podocitos de control. Sin embargo, 24 h después de la administración de LPS, tanto uPAR como la integrina β3 se encontraban más enriquecidas con la fracción de balsas lipídicas (**fig. 6a**). La asociación funcional de uPAR y la integrina β3 dentro de las balsas lipídicas se confirmó además por la observación de que la alteración de las balsas lipídicas usando metil-β-ciclodextrina (MBCD)⁴⁷ anulaba la activación de la integrina β3 en respuesta al LPS en podocitos cultivados, como reveló la disminución de la tinción de AP5 (**fig. 6b**). Estos datos parecen indicar que uPAR puede activar la integrina β3 dentro de dominios ricos en lípidos de la membrana plasmática podocitaria.

La interferencia farmacológica con la integrina αvβ3 modifica la proteinuria en ratones

Si la activación de la integrina αvβ3 es una señal posterior importante que media los acontecimientos celulares inducidos por uPAR en los podocitos que dan lugar a la proteinuria, la expresión de una integrina β3 constitutivamente activa debería ser suficiente para inducir la proteinuria incluso en ausencia de uPAR. Por lo tanto, se utilizó un ADNc de integrina β3 que codifica una proteína que carece de los aminoácidos 616 a 690 de la región carboxiloterminales del ectodominio de β3. Esta mutación confiere actividad constitutiva de la proteína β3 y se expresa en la superficie celular⁴⁸. Se realizó la transferencia génica de esta construcción de integrina β3 activa en ratones *uPAR*^{-/-}. 24 h después de la administración génica de la integrina β3 activa, se realizó un seguimiento de la actividad de la integrina β3 en podocitos por marcaje inmunofluorescente doble de sinaptodina y anticuerpo WOW-1. Se sabe que el anticuerpo WOW-1 reconoce la proteína β3 constitutivamente activa⁴⁹. Los ratones *uPAR*^{-/-} positivos para marcaje WOW-1 en el podocito (**fig. 6d**) desarrollaron proteinuria (**fig. 6d**), mientras que sus hermanos de camada que recibieron integrina β3 normal o control de vector presentaban un marcaje bajo en los podocitos con anticuerpo WOW-1 y ninguna respuesta proteinúrica (**fig. 6d**).

También se realizaron experimentos de bloqueo con un anticuerpo que inhibía la función de la integrina β3. Los ratones naturales coinyectados con LPS y un anticuerpo monoclonal anti-integrina β3 no consiguieron desarrollar proteinuria en respuesta al LPS (**fig. 6e**). Este anticuerpo de bloqueo también consiguió reducir significativamente la movilidad de los podocitos durante el curso del tratamiento con LPS *in vitro* (**fig. 6f**), lo que conecta el aumento de la movilidad de los podocitos *in vitro* con el desarrollo de la proteinuria *in vivo*.

Por último, se usaron diferentes concentraciones de ciclo-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val] (ciclo-RGDfV) para bloquear específicamente la integrina αvβ3. Se inyectó ciclo-RGDfV en ratones naturales tratados con LPS (**fig. 6g**). Aunque la administración de ciclo-RGDfV en ratones sanos no tuvo efecto, los ratones que recibieron LPS y ciclo-RGDfV mostraron un curso atenuado de la proteinuria de manera dependiente de la dosis en comparación con los ratones

de control que habían recibido únicamente LPS. Estos datos demuestran que la actividad de la integrina $\alpha\beta 3$ es importante para el desarrollo de la proteinuria y abren posibilidades novedosas para la modulación de la proteinuria por la interferencia de la integrina $\alpha\beta 3$ en podocitos.

Procedimientos

5 Anticuerpos:

En este estudio se usaron los siguientes anticuerpos: anti-integrina $\beta 3$ activa (AP5), (GTI); fragmento de unión a antígeno anti-WOW-1 (Fab)⁴⁹ (cedido amablemente por Sanford Shattil, La Jolla CA); anticuerpo de bloqueo anti-CD61 (BD Pharmagen); anti-CD31 (ER-MP12) y anti-Vn (H-270), anti-uPAR (FL-290) (Santa Cruz Biotechnology, Inc); anti-uPAR-1 (R&D Systems); anti- α -tubulina (Calbiochem); anti-integrina $\beta 3$ (Chemicon International); anti-CD61 (Sigma); anti-caveolina (Sigma); anti-GAPDH (Sigma); anti-Flag (Sigma); anti-HA (Sigma); anti-receptor de transferrina y anti-caveolina (Sigma); anticuerpo monoclonal de ratón anti-sinaptopodina (G1), anticuerpo policlonal de conejo anti-sinaptopodina (NT), (Peter Mundel, Nueva York).

Animales y tratamientos:

15 Todos los estudios con animales fueron aprobados por el Subcommittee on Research Animal Care del Massachusetts General Hospital. Se obtuvieron ratones $uPAR^{-/-}$ y ratones $uPA^{-/-}$ con una base mixta del 75 % de C57BL/6 y el 25 % de 129 Swiss de la Universidad de Lovaina, Bélgica; se obtuvieron ratones $Vn^{-/-}$ (C57BL/6) del Dr. David Ginsburg, de la Universidad de Michigan; se obtuvieron ratones integrina $\beta 3^{-/-}$ (C57BL/6) del Dr. Raghuram Kalluri, de Boston. Se adquirieron ratones C57BL/6 y 129 Swiss de Jackson Laboratory (Bar Harbor). Se utilizó el modelo de ratón de LPS como se describe anteriormente⁹. Se usó la inducción de B7-1 como control de la eficacia del LPS. Se estableció el modelo de nefrosis de PAN en rata mediante una sola inyección intraperitoneal de puromicina (15 mg/100 g de peso corporal, Sigma-Aldrich) en ratas Sprague-Dawley como se describe anteriormente²⁷. Se adquirieron ratones NZB/W F1 de Jackson Laboratory y se analizaron después de 20 semanas, cuando ya estaban presentes la proteinuria y la glomerulonefritis por lupus. Como modelo de rata de nefropatía diabética, se usaron ratas Sprague Dawley tratadas con estreptozotocina. Se indujo un estado hiperglucémico mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (50-70 mg/kg peso corporal, en tampón citrato 10 mmol/l, a pH 4,5). Se desarrolló el estado hiperglucémico en un plazo de 48 h y se mantuvo durante el tiempo de vida de los animales. Se fue necesario administrarles insulina. Se evaluó la glucosuria con tiras reactivas de Uriscan TM (YD Diagnostics, VWR, Montreal, QC, Canadá) y la glucemia con el sistema de control AccuSoft (Roche Diagnostics, Laval, QC, Canadá). Al final de estudio, los valores de glucemia eran de $4,3 \pm 0,53$ y $8,5 \pm 0,7$ mmol/l para los animales normoglucémicos de 3 meses de edad y de 12 meses de edad, respectivamente, y de $21,2 \pm 0,9$ y $33,9 \pm 4,0$ mmol/l para los animales diabéticos de 3 meses de edad y de 12 meses de edad, respectivamente.

35 **Pacientes:** Se analizaron glomérulos microdisecionados de 34 pacientes con enfermedades proteinúricas y 8 sujetos de control. Se estratificó a los pacientes de acuerdo con su diagnóstico histológico en glomeruloesclerosis focal y segmentaria (GEFS; $n=14$) y nefropatía diabética (ND, $n=20$). Para las biopsias de control, se tomó tejido renal de biopsias renales pretrasplante durante el tiempo de isquemia fría de 7 donantes vivos y 1 fallecido ($n=8$).

40 **PCR cuantitativa en tiempo real:** Se realizó la RT-PCR en tiempo real de TaqMan como se indica anteriormente²⁶. En resumen, se usaron reactivos de ensayo TaqMan prerrevelados comercialmente disponibles (Applied Biosystems) para el análisis del ARNm de uPAR. Se relacionó la expresión del ARNm de uPAR con la del de la sinaptopodina, que se usó como gen de referencia de podocitos. Con el uso de este planteamiento, se contrarrestó el factor de confusión de las modificaciones en la proporción del número de células podocitarias por células glomerulares totales, y solamente se integró en el análisis el ARN del compartimento podocitario del glomérulo, como se demostró recientemente²⁶.

45 **Inmunohistoquímica:** Se fijaron las biopsias glomerulares humanas en acetona fría y se tiñeron con anticuerpos anti-uPAR, un anticuerpo anti-Vn y un anticuerpo monoclonal anti-sinaptopodina siguiendo protocolos estándar⁸. Se recogieron riñones de ratón o rata y se congelaron de forma instantánea. La fijación y el seccionamiento se realizaron siguiendo protocolos estándar⁸. Para la tinción inmunofluorescente doble, se bloquearon secciones durante 30 min a temperatura ambiente y se incubaron con anticuerpos dirigidos contra: la sinaptopodina (G1.NT), la integrina $\beta 3$ (AP5, WOW-1), uPAR, Vn, CD31. Después de lavarlas con PBS, se incubaron las secciones con anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos apropiados (Molecular Probes) durante 50 min. Posteriormente, se lavaron las secciones con PBS y H₂O y se montaron para su análisis con un microscopio confocal (Bio-Rad Laboratories). Para el marcaje con WOW-1, se inyectó a ratones $uPAR^{-/-}$ con construcciones de integrina $\beta 3$ natural o $\beta 3_{\Delta 616-690}$. 14 h después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se congelaron los riñones de forma inmediata. Se cortaron las criosecciones a 4 μ m y se fijaron con acetona fría durante 10 min antes de incubarlas con Fab WOW-1 durante 1 h. Después de lavarlas con PBS, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario, anti-Fab de ratón conjugado con 488 (Invitrogen) durante 50 min y se analizaron por microscopía confocal.

Se inmunomarcaron los podocitos cultivados como se describe anteriormente⁸.

Microscopía electrónica de transmisión (MET), microscopía inmunoeléctronica (MIE) y morfometría: La MET y la MIE se realizaron de acuerdo con los protocolos estándar⁸. Para la morfometría del marcaje uPAR a través de

la pared glomerular, se usaron tejido renales de animales hiperglucémicos de 3 y 12 meses de edad con los correspondientes animales normoglucémicos de edad coincidente (3-4 animales por grupo). Se tomaron como muestra trozos pequeños de corteza renal del animal anestesiado (uretano, 1 g por kg de peso corporal). Las muestras de tejido se fijaron inmediatamente por inmersión en solución de peryodato-lisina-paraformaldehído, se deshidrataron en metanol graduado y se incluyeron en Lowicryl, siguiendo los protocolos descrito anteriormente⁵².

Para el marcaje de inmuno-oro, se incubaron las cuadrículas portadoras de las secciones tisulares ultrafinas en una gota de una solución saturada de metaperyodato de sodio durante 10 min, se lavaron con agua destilada, se transfirieron a una gota de glicina 0,15 M durante 10 min y se lavaron con PBS. Después, se incubaron las cuadrículas en una gota de ovoalbúmina al 1 % durante 5 min y se transfirieron al anticuerpo anti-uPAR diluido (1:10) durante la noche a 4 °C. Se lavaron las cuadrículas con PBS y se incubaron en una gota de complejo de proteína A-oro durante 30 min a temperatura ambiente. Después, se lavaron las cuadrículas con PBS (3 x 5 min) y agua destilada (1 x 5 min), se secaron y se contrastaron con acetato de uranilo. Se evaluó la especificidad de los inmunomarcajes con experimentos de control, omitiendo la etapa de anticuerpo específico, reemplazándolo con PBS.

Se registraron micrografías de glomérulos renales inmunomarcados (> 20 micrografías por animal y punto temporal), se imprimieron y se evaluaron por medio de técnicas morfométricas⁵². Se midió la longitud de las membranas endoteliales luminal y adluminal, la de las membranas podocitarias basal y apical y la de las células mesangiales; después de contó el número de partículas de oro asociadas a cada uno de esos dominios de membrana para calcular la densidad de marcaje. Los resultados se expresan como el número de partículas de oro por μm de membrana (valores medios \pm EEM). Las medidas se realizaron por planimetría directa y el recuento de partículas usando un sistema de procesamiento de imágenes (Videoplan 2, Carl Zeiss Inc., Toronto, Canadá).

Ensayo de actividad GTPasa:

Se midió la actividad de la familia Rho de GTPasas pequeñas en lisados glomerulares mediante un kit de ensayo de activación de Rho/Rac/Cdc42 (Cell Biolabs, INC.) siguiendo el protocolo del fabricante. Se obtuvieron glomérulos aislados de ratones naturales y *uPAR*^{-/-}, algunos de ellos tratados con LPS (t=0) y con RGDfV cada 8 horas durante 24 horas mediante una técnica de cribado estándar²⁵. Se usaron 2 mg de lisado glomerular para preparar el control positivo o negativo incubando con 10 μl de GTPyS o GDP, respectivamente. Para el ensayo de interacción (*pull-down*) de GTPasas pequeñas se incubó la misma cantidad (2 mg) de lisados de glomérulo de diferentes tratamientos con 40 μl de suspensión de perlas de agarosa con rotectina RBD o PAK PBD durante 1 h a 4 °C. Después de lavarlas 3 veces con tampón de ensayo 1x, se recogieron las perlas y se resuspendieron en tampón de muestra LDS. Se calentaron las muestras durante 10 min a 70 °C antes de la SDS-PAGE. Después de la electroforesis y la transferencia de proteínas, se bloquearon las membranas con leche al 5 % y se incubaron con anticuerpos anti-Rho, anti-Rac y anti-Cdc42 durante 1 h, seguido de la incubación con anticuerpo secundario y la detección con ECL (Pierce). Para cargar el control, se aplicaron 100 μg de lisados glomerulares de diferentes tratamientos y se realizó la inmunotransferencia con los mismos anticuerpos anti-Rho, anti-Cdc42 y anti-Rac usados anteriormente.

Administración génica *in vivo*:

Se introdujeron plásmidos de uPAR-ADNc en un ratón *uPAR*^{-/-} usando el sistema de administración génica *in vivo* TransIT (Mirus) como se describe anteriormente^{32, 8}. Para la administración génica se usaron los ADNc y las construcciones de vector siguientes: uPAR; uPAR mutada D262A³⁸ (cedido amablemente por Y Wei y HA Chapman, Universidad de California, San Francisco); integrina $\beta 3$ y la forma constitutivamente activa de la integrina $\beta 3$, D616-690 ($\beta 3\Delta_{616-690}$)⁴⁸; vector promotor de la podocina p2.5³³ (cedido amablemente por el Dr. LB Holzman, de la Universidad de Michigan) para Pod-uPAR; vector promotor de ICAM-2³⁴ para ICAM-2-uPAR. Se analizó la expresión en los tejidos como se describe anteriormente⁸.

ARNip: Se construyó ARNip de uPAR de ratón (directo: CTTCTGAAGTGTGCAACTA) y se insertó en un vector pARN-H1.2/Neo (Genescript). Se realizó la transfección estable con podocitos manteniéndolos a 33 °C con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se seleccionaron los clones positivos con G418 (Sigma-Aldrich) a 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para otros experimentos con ARNip de uPAR, se cultivaron células en condiciones no permisivas durante 10-14 días antes de proceder con los experimentos de migración.

Citometría de flujo:

Para determinar la actividad de AP5 en podocitos de ratón, se cultivaron células en condiciones no permisivas durante 10 días. Después, se desechó el medio y se lavaron las células suavemente con PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} . Después, se expusieron las células a LPS justo antes de incubarlos con diversas cantidades de calcio en presencia de 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de AP5 durante 1 h: EDTA 1mM, PBS sin Ca^{2+} ni Mg^{2+} ; CaCl_2 0,1 mM; CaCl_2 0,4 mM; CaCl_2 1 mM; CaCl_2 2 mM. Después, se recogieron las células por raspado celular, se lavaron y se sometieron a análisis por citometría de flujo.

Cultivo celular y transfección transitoria:

Se sembraron células HEK 293 en una placa de cultivo de 100 mm y se mantuvieron a 37 °C en DMEM con FBS al

10 %. Al llegar a una confluencia del 90 %, se transfectaron las células con construcciones que codifican uPAR o la integrina $\beta 3$ con Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 24 h después de la transfección, se recogieron las células para otros experimentos. Se diferenciaron podocitos naturales cultivándolos a 37 °C durante al menos 10 días (10 días para la transfección y el ensayo de migración, 14 días para otros experimentos).

5 **Bandas Western y coimmunoprecipitación:**

Para la transferencia de bandas Western, se lisaron podocitos o glomérulos extraídos en tampón RIPA que contenía un cóctel de inhibidores de proteasas. Se centrifugó el lisado durante 20 min a 12.000 rpm y el sobrenadante obtenido se usó posteriormente. Se realizó un ensayo de Bradford para garantizar una cantidad de carga igual. Se separaron las proteínas y después se transfirieron a una membrana de PVDF. Después de 30 min de bloqueo con leche al 5 %, se incubó la membrana con anticuerpo primario durante 1 h, seguido del anticuerpo secundario durante la noche a 4 °C. Después de lavarla, se visualizó la membrana con un kit de detección de inmunotransferencia de bandas por quimioluminiscencia (Pierce).

Para la co-IP, se cotransfectaron células HEK con construcciones que codificaban uPAR e integrina $\beta 3$ durante 24 h. Después, se lisaron las células en tampón RIPA con un cóctel de inhibidores de proteasas. Se incubó el lisado con 25 μ l de perlas de agarosa con Flag o HA (Sigma) a 4 °C durante la noche después de una limpieza previa. Después, se lavaron las perlas 5 veces con tampón RIPA y se eluyeron por calefacción a 70 °C durante 10 min. Después de una breve centrifugación, los sobrenadantes quedaron listos para la transferencia de bandas Western.

Ensayo de migración:

Se analizó la migración de los podocitos usando una cámara de quimiotaxis de 12 pocillos (Neuro Probe) de acuerdo con el protocolo del fabricante. En resumen, se trataron podocitos diferenciados con 50 μ g/ml de LPS o PAN durante 24 h y después se recogieron para el ensayo de migración. Se recubrieron las placas inferiores con vitronectina o colágeno de tipo I, mientras que se cargaron las placas superiores con el mismo número de células (5×10^4) suspendidas en medio. Se incubó la cámara a 37 °C durante 4 h antes de extraer la membrana y teñirla con diamidino fenilindol (DAPI). Se contó el número promedio de células migradas en cuatro campos en seis experimentos independientes.

Para estudiar el movimiento direccional de los podocitos, se realizó un ensayo de cicatrización de heridas. Brevemente, se sembraron los podocitos en cubreobjetos recubiertos con Vn o colágeno de tipo I y se cultivaron durante 10 días a 37 °C antes de tratarlos con LPS o PAN durante 12-48 h. Para crear una herida por raspado de aproximadamente 0,1 cm de ancho, se presionó con el extremo estrecho de la punta de una pipeta P1000 de forma perpendicular a través de la monocapa. Después, se lavaron los cubreobjetos dos veces con PBS y se incubaron en medio. Después de la incubación, se fijaron las células con PFA al 2 % y se teñieron con DAPI para su análisis. Se calculó la distancia migratoria de las células con el promedio de la distancia desde el borde de la herida hasta lo máximo migrado por una célula en cinco zonas de borde distintas.

Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa:

Se recubrió el lisado de podocitos con un gradiente de sacarosa por etapas y se centrifugó durante 20 h a 120.000 g a 4 °C en un rotor basculante. Se recogieron 10 fracciones (de 1 ml cada una) comenzando por la parte superior y se analizaron por transferencia de bandas Western con marcadores de balsas y de zonas que no son balsas, así como anticuerpos frente a uPAR y $\beta 3$.

Bloqueo de la integrina $\beta 3$ en animales:

Se inyectó ciclo-RGDfV (Biomol) en ratones a 1, 5 y 20 mg por kg de peso corporal por vía i.v. en ratones cada 8 h tres veces. Los ratones de control recibieron la misma cantidad de PBS en su lugar o el péptido de control ciclo-RAD (Biomol) (datos no mostrados). Inmediatamente después de la primera inyección, se inyectaron por vía intraperitoneal 200 μ g de LPS en cada ratón para inducir la proteinuria. 24 h después de la inyección de LPS, se recogió la orina para un ensayo de Bradford.

Para el bloqueo de la integrina $\beta 3$ con el anticuerpo CD61, se repartieron los ratones aleatoriamente en tres grupos ($n=3$ para cada grupo) y se les inyectó PBS solo (control), LPS+anti-CD61 o LPS+isotipo IgG. Se les administró el anticuerpo 4 h después de la inyección de LPS a través de la vena de la cola, con una concentración final de 10 μ g/ml. Se recogió la orina en los puntos temporales de 0, 4 y 24 h y se analizó mediante un ensayo de Bradford. Los datos representados en la figura se basan en la muestra obtenida después de 24 h.

50 **Análisis estadístico:**

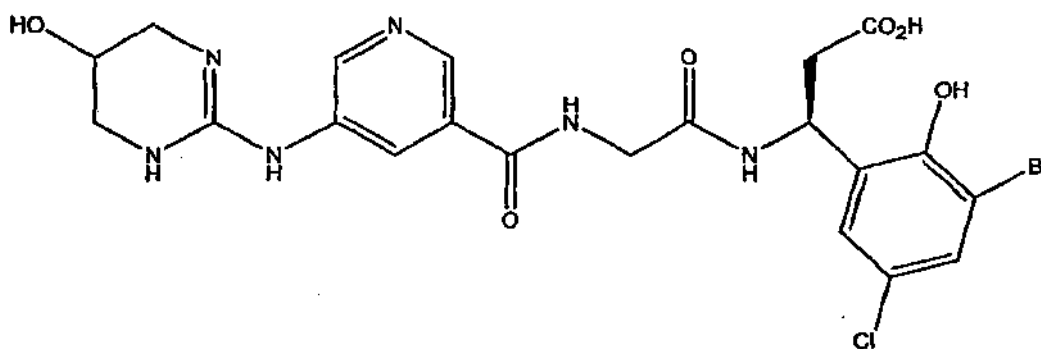
Se realizaron análisis estadísticos con el uso de la prueba de la t de Student para datos emparejados o para datos independientes cuando fuera apropiado, y se rechazó la hipótesis de nulidad al nivel de 0,05. Se presentaron los valores como la media \pm DE, a menos que se indicara lo contrario. Las comparaciones estadísticas para los experimentos morfométricos se realizaron usando la prueba de la t de Student y las pruebas de la U de Mann-Whitney.

Ejemplo 2: Efecto del ciclo-RGDFV sobre la recuperación de la proteinuria

5 El siguiente ejemplo demostró que la cicloRGDFv también reduce la proteinuria ya existente (**fig. 11**). A ratones B6 se les inyectó LPS dos veces (0, 24 h) con LPS para inducir y mantener la proteinuria. 48 h después de la primera inyección, se les administró ciclo-RGD (n=6) (25 mg/kg de peso corporal) a través de la vena de la cola. Los controles (n=5) recibieron la misma cantidad de PBS. Se recogió orina a las 0, 48 h y 66 h para un ensayo de Bradford. El diagrama muestra el número de veces que cambia la proteína urinaria en el punto temporal de 66 h, *p<0,014.

Ejemplo 3: Efecto de S247 sobre la recuperación de la proteinuria

10 El siguiente ejemplo demuestra que la S247 también reduce la proteinuria ya existente. A ratones B6 se les inyecta dos veces (0, 24 h) con LPS para inducir y mantener la proteinuria. 48 h después de la primera inyección, se les administra S247 (n=6) (25 mg/kg de peso corporal) a través de la vena de la cola. Los controles (n=5) recibieron la misma cantidad de PBS. Se recogió orina a las 0, 48 h y 66 h para un ensayo de Bradford. En el punto temporal de 66 h se observa que la S247 reduce la proteína urinaria.



S247

15 **Tabla 1**

Análisis cuantitativo de la expresión de uPAR y la localización en glomérulos sanos y diabéticos. uPAR está inducida en pedicelos podocitarios de ratas diabéticas de 3 y 12 meses de edad.

Tabla 1 Análisis morfométrico de uPAR

	Membrana endotelial luminal	Membrana basal endotelial	Membrana podocitaria luminal	Membrana basal podocitaria	Membrana mesangial
SANAS 3 meses	0,26 ± 0,06* (216,01 µm)**	0,20 ± 0,05 (213,89 µm)	0,24 * 0,03 (576,86 µm)	0,19 ± 0,03 (258,95 µm)	0,38 ± 0,05 (196,62 µm)
SANAS 12 meses	0,23 ± 0,08 (144,63 µm)	0,18 ± 0,04 (141,51 µm)	0,27 ± 0,05 (288-68 µm)	0,19 ± 0,05 (138,03 µm)	0,30 ± 0,06 (240,94 µm)
DIABÉTICAS 3 meses	0,38 ± 0,05§ (212,17 µm)	0,27 ± 0,06 (210,15 µm)	0,33 ± 0,03 (519,05 µm)	0,29 ± 0,04§ (267,88 µm)	0,42 ± 0,06 (213,83 µm)
DIABÉTICAS 12 meses	0,36 ± 0,09§ (219,79 µm)	0,37 ± 0,08§ (234,75 µm)	0,24 ± 0,06 (586,03 µm)	0,27 ± 0,03§ (256,68 µm)	0,41 ± 0,08 (253,73 µm)
CONTROL de ESPECIFICIDAD	0,02 ± 0,01 (95,06 µm)	0,05 ± 0,03 (89,29 µm)	0,05 ± 0,04 (133,65 µm)	0,04 ± 0,03 (75,57 µm)	0,07 ± 0,03 (172,70 µm)

* partículas por µm o membrana ** extensión total de membrana medida

§ Significativamente diferente del valor correspondiente en animales sanos *p<0,005, n=3 animales para cada punto temporal

Referencias

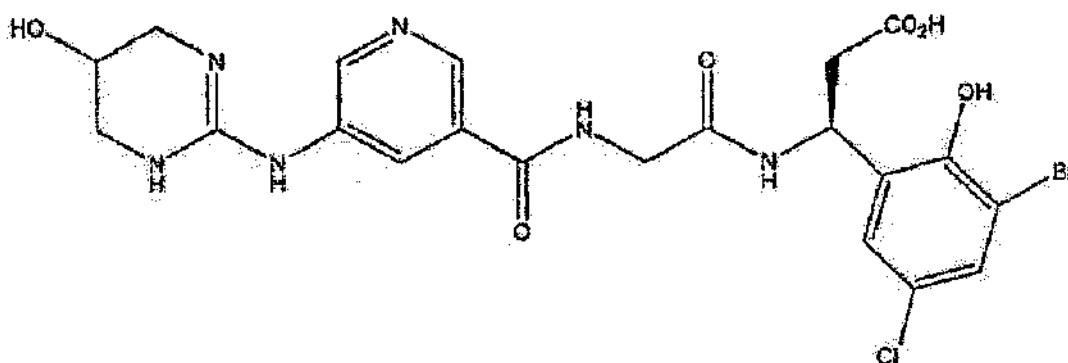
1. Zandi-Nejad, K., Eddy, A.A., Glassock, R.J. y Brenner, B.M. Why is proteinuria an ominous biomarker of progressive kidney disease? *Kidney Int Suppl*, S76-89 (2004).
- 5 2. Kerjaschki, D. et al. A beta 1-integrin receptor for fibronectin in human kidney glomeruli. *Am J Pathol* 134, 481-9 (1989).
3. Kreidberg, J.A. Functions of alpha3beta1 integrin. *Curr Opin Cell Biol* 12, 548-53. (2000).
4. Regele, H.M. et al. Glomerular expression of dystroglycans is reduced in minimal change nephrosis but not in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol* 11, 403-12 (2000).
- 10 5. Reiser, J., Kriz, W., Kretzler, M. y Mundel, P. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11, 1-8 (2000).
6. Durvasula, R.V. & Shankland, S.J. Podocyte injury and targeting therapy: an update. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15,1-7 (2006).
7. Tryggvason, K., Patrakka, J. y Wartiovaara, J. Hereditary proteinuria syndromes and mechanisms of proteinuria. *N Engl J Med* 354, 1387-401 (2006).
- 15 8. Sever, S. et al. Proteolytic processing of dynamin by cytoplasmic cathepsin L is a mechanism for proteinuric kidney disease. *J Clin Invest* 117, 2095-2104 (2007).
9. Reiser, J. et al. Induction of B7-1 in podocytes is associated with nephrotic syndrome. *J Clin Invest* 113, 1390-7 (2004).
- 20 10. Reiser, J. et al. Podocyte Migration during Nephrotic Syndrome Requires a Coordinated Interplay between Cathepsin L and {alpha}3 Integrin. *J Biol Chem* 279,34827-34832 (2004).
11. Asanuma, K. et al. Synaptopodin orchestrates actin organization and cell motility via regulation of RhoA signalling. *Nat Cell Biol* (2006).
12. Moeller, M.J. et al. Podocytes populate cellular crescents in a murine model of inflammatory glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 15, 61-7 (2004).
- 25 13. Seiler, M.W., Venkatachalam, M.A. y Cotran, R.S. Glomerular epithelium: structural alterations induced by polycations. *Science* 189, 390-3 (1975).
14. Gadea, G., de Toledo, M., Anguille, C. y Roux, P. Loss of p53 promotes RhoA-ROCK-dependent cell migration and invasion in 3D matrices. *J Cell Biol* 178, 23-30 (2007).
15. Wei, Y. et al. Regulation of integrin function by the urokinase receptor. *Science* 273, 1551-5 (1996).
- 30 16. Blasi, F. y Carmeliet, P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 932-43 (2002).
17. Alfano, M., Sidenius, N., Panzeri, B., Blasi, F. y Poli, G. Urokinase-urokinase receptor interaction mediates an inhibitory signal for HIV-1 replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 8862-7 (2002).
18. Wei, Y. et al. Identification of the urokinase receptor as an adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem* 269, 32380-8 (1994).
- 35 19. Madsen, C.D., Ferraris, G.M., Andolfo, A., Cunninghara, O. y Sidenius, N. uPAR-induced cell adhesion and migration: vitronectin provides the key. *J Cell Biol* 177, 927-39 (2007).
20. Dewerchin, M. et al. Generation and characterization of urokinase receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 97, 870-8 (1996).
- 40 21. Carmeliet, P. et al. Biological effects of disruption of the tissue-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator, and plasminogen activator inhibitor-1 genes in mice. *Ann N Y Acad Sci* 748, 367-81; discusión 381-2 (1995).
22. Zheng, X., Saunders, T.L., Camper, S.A., Samuelson, L.C. y Ginsburg, D. Vitronectin is not essential for normal mammalian development and fertility. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 12426-30 (1995).
- 45 23. Sund, M. et al. Function of endogenous inhibitors of angiogenesis as endothelium-specific tumor suppressors. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 2934-9 (2005).
24. Simons, K. y Toomre, D. Lipid Rafts and Signal Transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 31-39. (2000).

25. Mundel, P. et al. Synaptopodin: an actin-associated protein in telencephalic dendrites and renal podocytes. *J Cell Biol* 139, 193-204 (1997).
26. Schmid, H. et al. Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int* 64, 356-60 (2003).
- 5 27. Nakamura, T., Ebihara, I., Shirato, I., Tomino, Y. y Koide, H. Modulation of basement membrane component gene expression in glomeruli of aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 64, 640-7 (1991).
28. Kelley, V.E. y Cavallo, T. An ultrastructural study of the glomerular slit diaphragm in New Zealand black/white mice. *Lab Invest* 35, 213-20 (1976).
- 10 29. Mauer, S.M. et al. Effects of kidney and pancreas transplantation on streptozotocin-induced malignant kidney tumors in rats. *Cancer Res* 34, 1643-5 (1974).
30. Rijnveld, A.W. et al. Urokinase receptor is necessary for adequate host defense against pneumococcal pneumonia. *J Immunol* 168, 3507-11 (2002).
31. Mayer, G., Boileau, G. y Bendayan, M. Furin interacts with proMT1-MMP and integrin alphaV at specialized domains of renal cell plasma membrane. *J Cell Sci* 116, 1763-73 (2003).
- 15 32. Moller, C.C. et al. Induction of TRPC6 Channel in Acquired Forms of Proteinuric Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* (2006):
33. Moeller, M.J., Sanden, S.K., Soofi, A., Wiggins, R.C. y Holzman, L.B. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis* 35, 39-42 (2003).
- 20 34. Velasco, B. et al. Vascular gene transfer driven by endoglin and ICAM-2 endothelial-specific promoters. *Gene Ther* 8, 897-904 (2001).
35. Zeisberg, E.M. et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13, 952-61 (2007).
36. Arnaout, M.A., Mahalingam, B. y Xiong, J.P. Integrin structure, allostery, and bidirectional signaling. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 381-410 (2005).
- 25 37. Chaurasia, P. et al. A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth. *J Biol Chem* 281,14852-63 (2006).
38. Wei, Y. et al. Urokinase receptors are required for alpha 5 beta 1 integrin-mediated signaling in tumor cells. *J Biol Chem* 282, 3929-39 (2007).
- 30 39. Degryse, B., Resnati, M., Czekay, R.P., Loskutoff, D.J. y Blasi, F. Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new avβ3 integrin inhibitors. *J Biol Chem* 280, 24792-803 (2005).
40. Kreidberg, J.A. et al. Alpha 3 beta 1 integrin has a crucial role in kidney and lung organogenesis. *Development* 122, 3537-47 (1996).
- 35 41. Pelletier, A.J., Kunicki, T. y Quaranta, V. Activation of the integrin alpha v beta 3 involves a discrete cation-binding site that regulates conformation. *J Biol Chem* 271, 1364-70 (1996).
42. Honda, S. et al. Topography of ligand-induced binding sites, including a novel cation-sensitive epitope (AP5) at the amino terminus, of the human integrin beta 3 subunit. *J Biol Chem* 270,11947-54 (1995).
43. Dormond, O., Foletti, A., Paroz, C. y Ruegg, C. NSAIDs inhibit alpha V beta 3 integrin-mediated and Cdc42/Rac-dependent endothelial-cell spreading, migration and angiogenesis. *Nat Med* 7, 1041-7 (2001).
- 40 44. Cai, W. y Chen, X. Anti-angiogenic cancer therapy based on integrin alphavbeta3 antagonism. *Anticancer Agents Med Chem* 6, 407-28 (2006).
- 45 45. Orci, L., Singh, A., Amherdt, M., Brown, D. y Perrelet, A. Microheterogeneity of protein and sterol content in kidney podocyte membrane. *Nature* 293, 646-7 (1981).
46. Schwarz, K. et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108, 1621-9 (2001).
47. Keller, P. y Simons, K. Cholesterol is required for surface transport of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* 140, 1357-67 (1998).

48. Butta, N. et al. Disruption of the beta3 663-687 disulfide bridge confers constitutive activity to beta3 integrins. *Blood* 102, 2491-7 (2003).
49. Pampori, N. et al. Mechanisms and consequences of affinity modulation of integrin alpha(V)beta(3) detected with a novel patch-engineered monovalent ligand. *J Biol Chem* 274, 21609-16 (1999).
- 5 50. de Jong, P.E. y Brenner, B.M. From secondary to primary prevention of progressive renal disease: the case for screening for albuminuria. *Kidney Int* 66, 2109-18 (2004).
51. Silberman, S., Janulis, M. y Schultz, R.M. Characterization of downstream Ras signals that induce alternative protease-dependent invasive phenotypes. *J Biol Chem* 272, 5927-35 (1997).
- 10 52. Gugliucci, A. y Bendayan, M. Reaction of advanced glycation endproducts with renal tissue from normal and streptozotocin-induced diabetic rats: an ultrastructural study using colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 43, 591-600 (1995).

REIVINDICACIONES

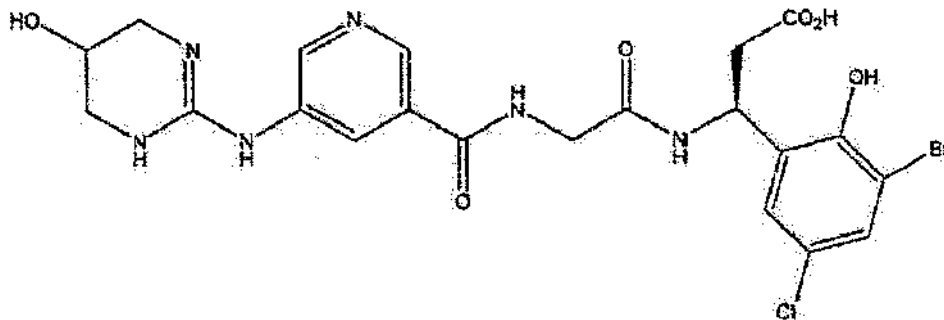
1. Un inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso en el tratamiento de un trastorno proteinúrico que comprende administrarlo a un paciente que lo necesita en una cantidad eficaz para reducir o eliminar el trastorno proteinúrico, en el que el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es
- 5 (a) un anticuerpo monoclonal anti-CD61;
- (b) un péptido que contiene una secuencia de unión RGD; o
- (c) un compuesto de fórmula



- 10 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.
2. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el trastorno proteinúrico es un trastorno proteinúrico renal.
3. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el trastorno proteinúrico renal se selecciona del grupo que consiste en:
- 15 nefropatía diabética,
- insuficiencia renal intrínseca,
- síndrome nefríticos,
- lesiones tóxicas del riñón,
- enfermedades glomerulares, tales como la glomerulonefritis membranosa,
- 20 glomeruloesclerosis focal segmentaria (GEFS),
- nefropatía por IgA,
- nefropatía por IgM,
- glomerulonefritis membranoproliferativa,
- nefropatía membranosa,
- 25 nefropatía de cambios mínimos,
- nefroesclerosis hipertensiva y
- nefritis intersticial.
4. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en el que el trastorno proteinúrico renal es la nefropatía diabética.
- 30 5. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en el que el trastorno proteinúrico renal se selecciona del grupo que consiste en:
- preeclampsia,

- eclampsia,
 enfermedades vasculares del colágeno,
 deshidratación,
 ejercicio extenuante,
 5 estrés,
 proteinuria ortostática (postural) benigna,
 sarcoidosis
 síndrome de Alport,
 diabetes mellitus,
 10 enfermedad de Fabry,
 infecciones,
 aminoaciduria,
 síndrome de Fanconi,
 ingesta de metales pesados,
 15 anemia drepanocítica,
 hemoglobinuria,
 mieloma múltiple,
 mioglobinuria,
 rechazo de órganos,
 20 fiebre hemorrágica del Ébola y
 síndrome Nail Patella.

6. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ reduce la movilidad de los podocitos.
 7. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un anticuerpo monoclonal anti-CD61.
 8. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un péptido que contiene la secuencia de unión RGD.
 9. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el péptido que contiene la secuencia de unión RGD es ciclo - [[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val].
 30 10. El inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el inhibidor de la integrina $\alpha\beta3$ es un compuesto de fórmula:



o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

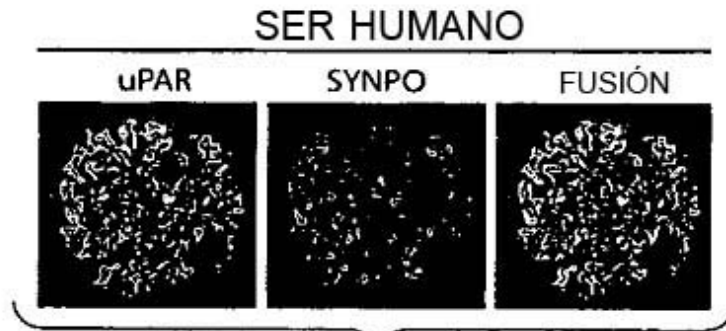


Fig. 1A

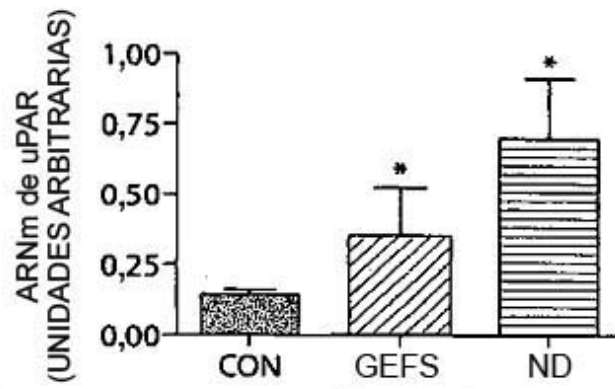


Fig. 1B

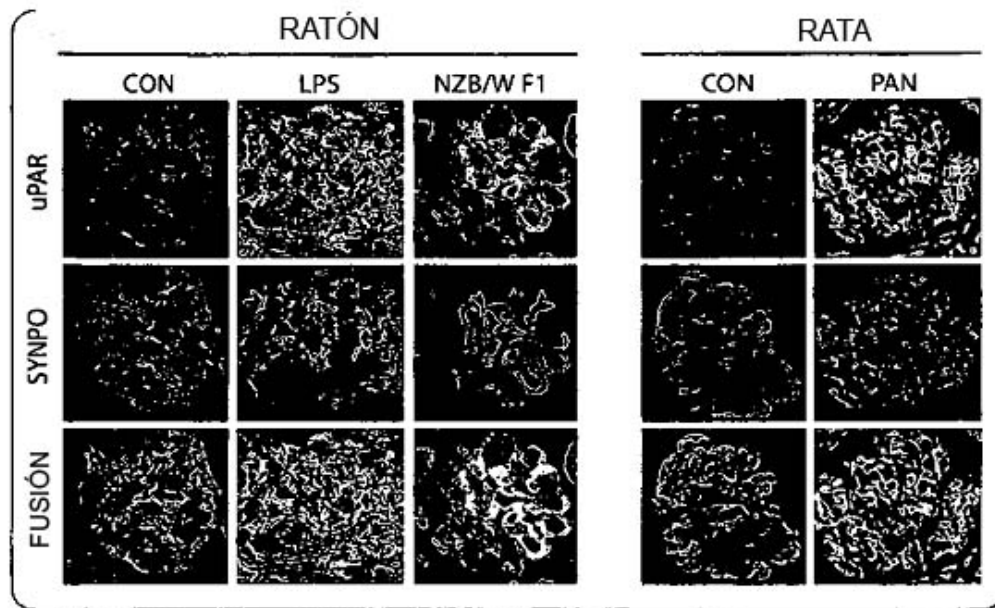


Fig. 1C



Fig. 1D

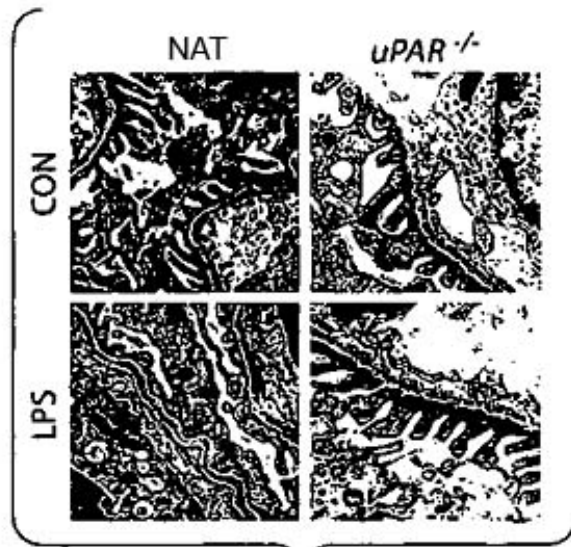


Fig. 2A

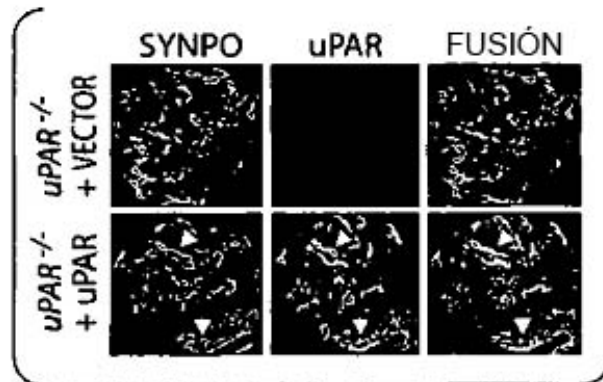


Fig. 2B

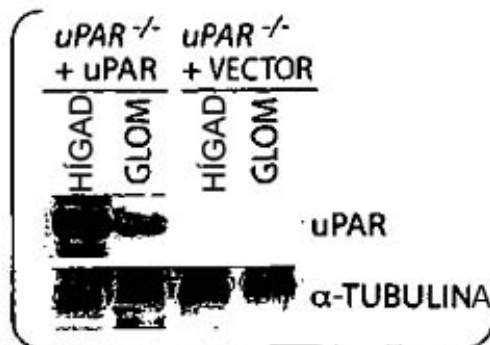


Fig. 2C

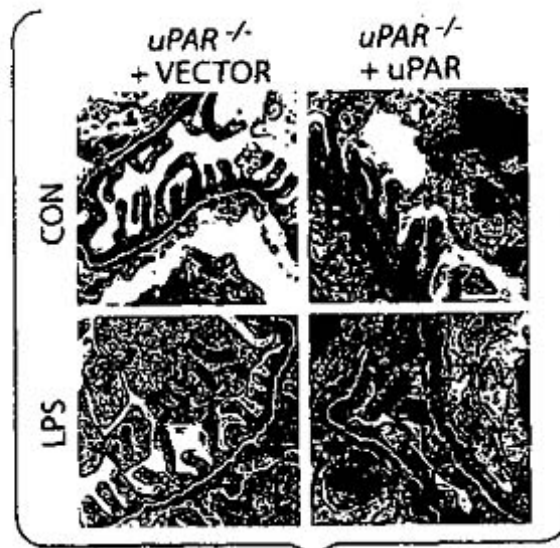


Fig. 2D

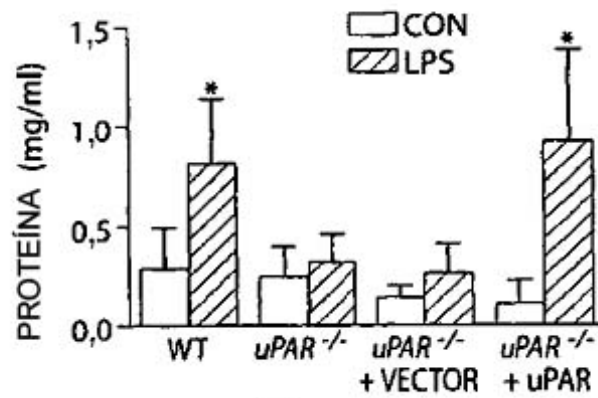


Fig. 2E

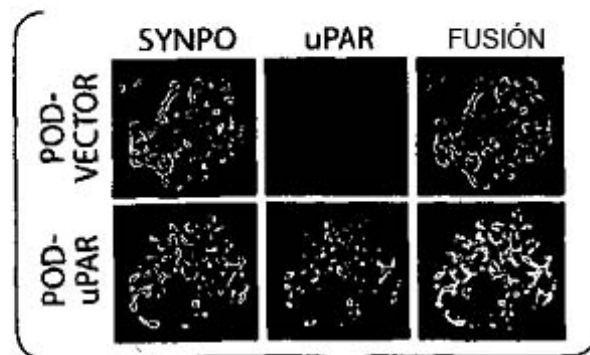


Fig. 2F

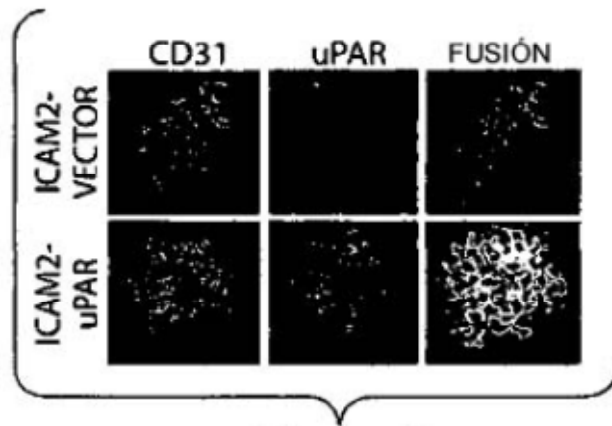


Fig. 2G

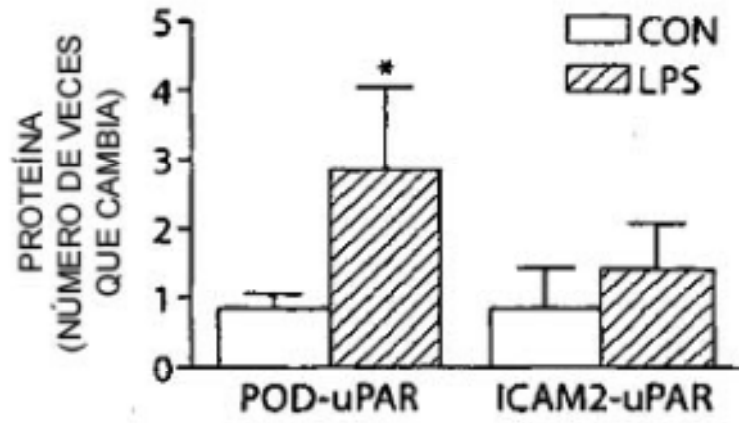


Fig. 2H

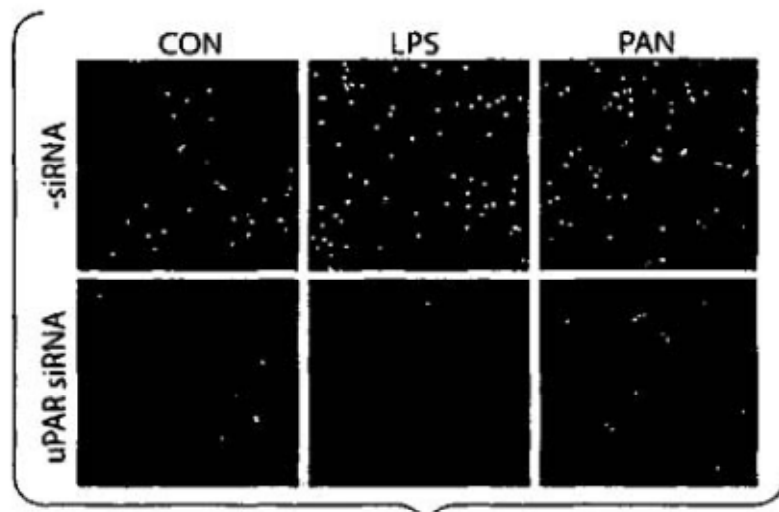


Fig. 3A

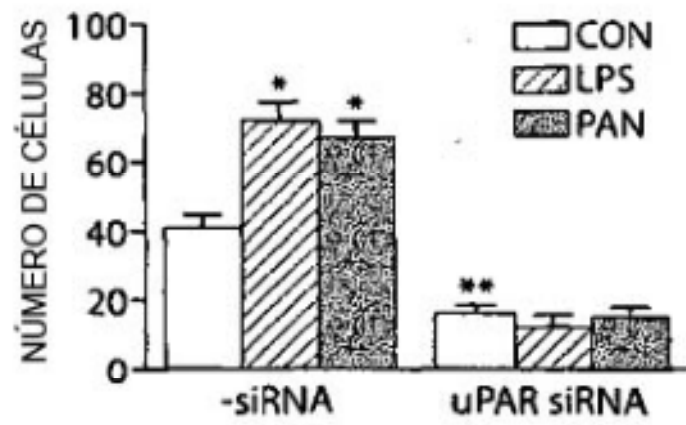


Fig. 3B

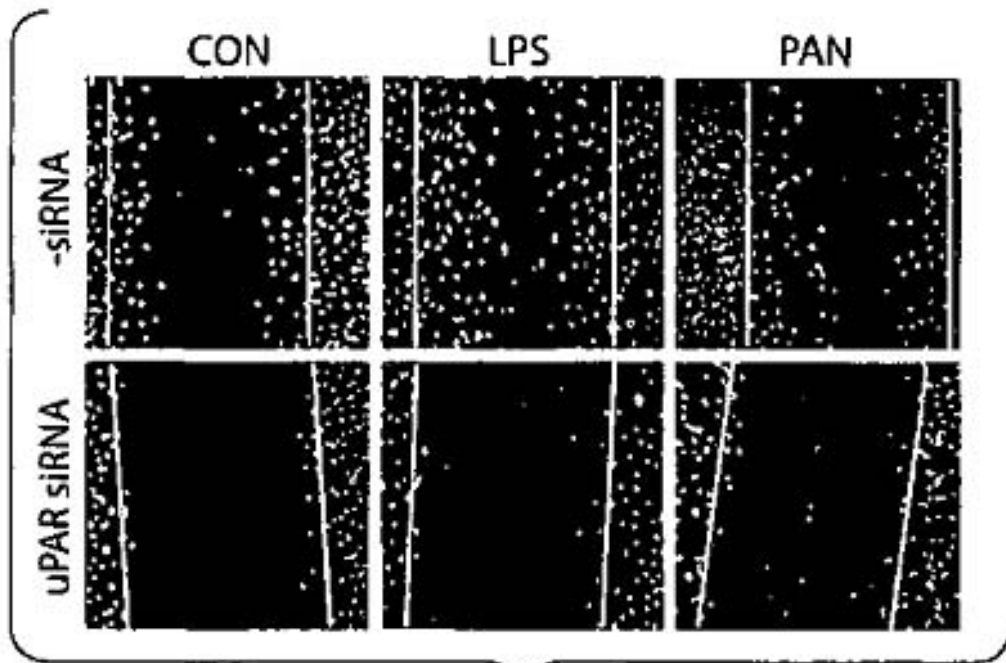


Fig. 3C

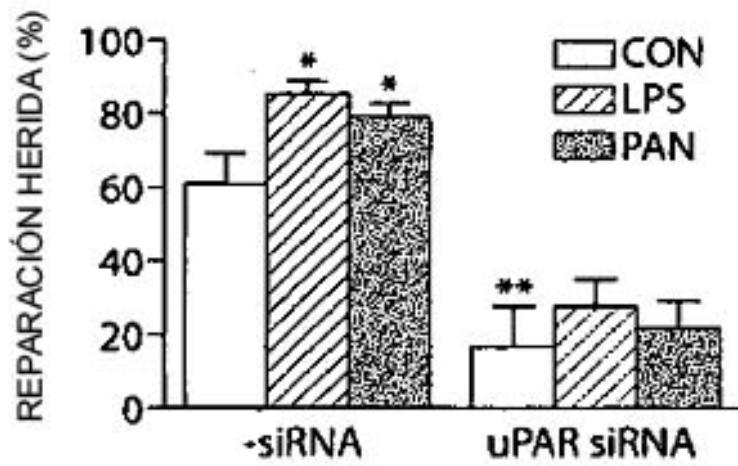


Fig. 3D

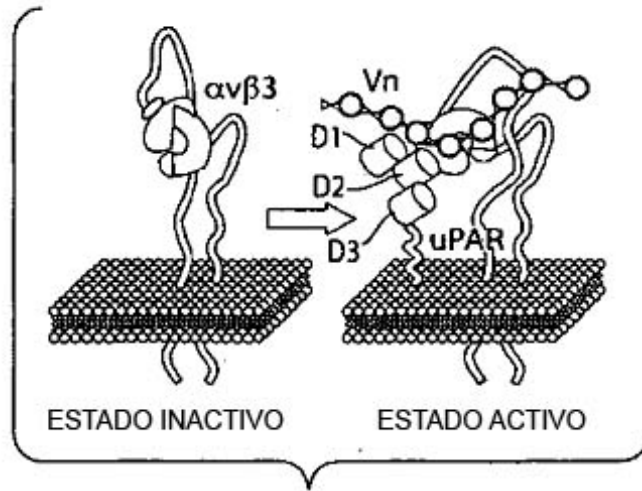


Fig. 4A

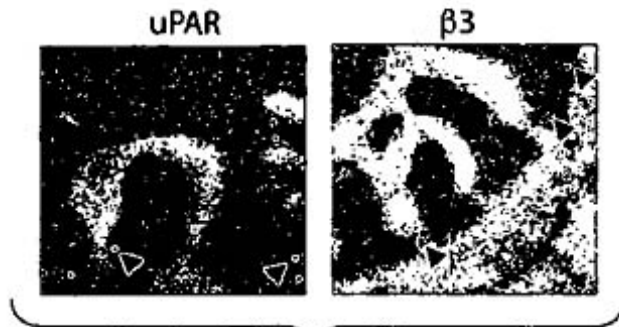


Fig. 4B

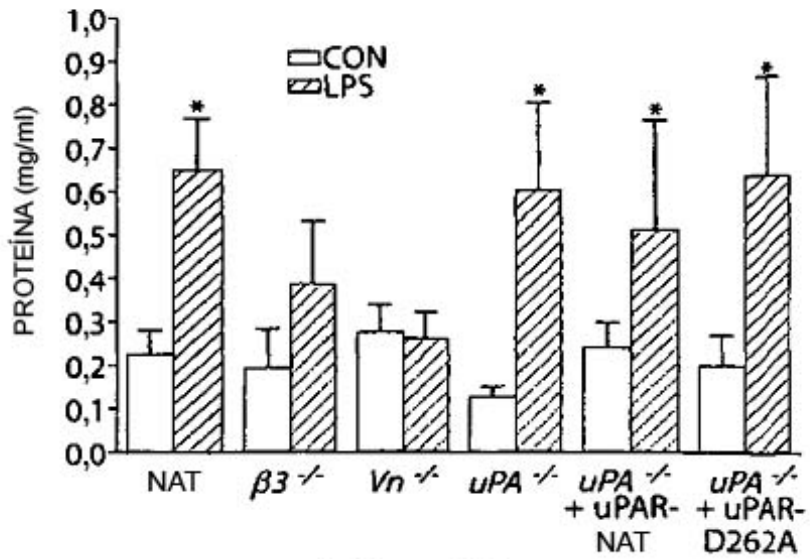


Fig. 4C

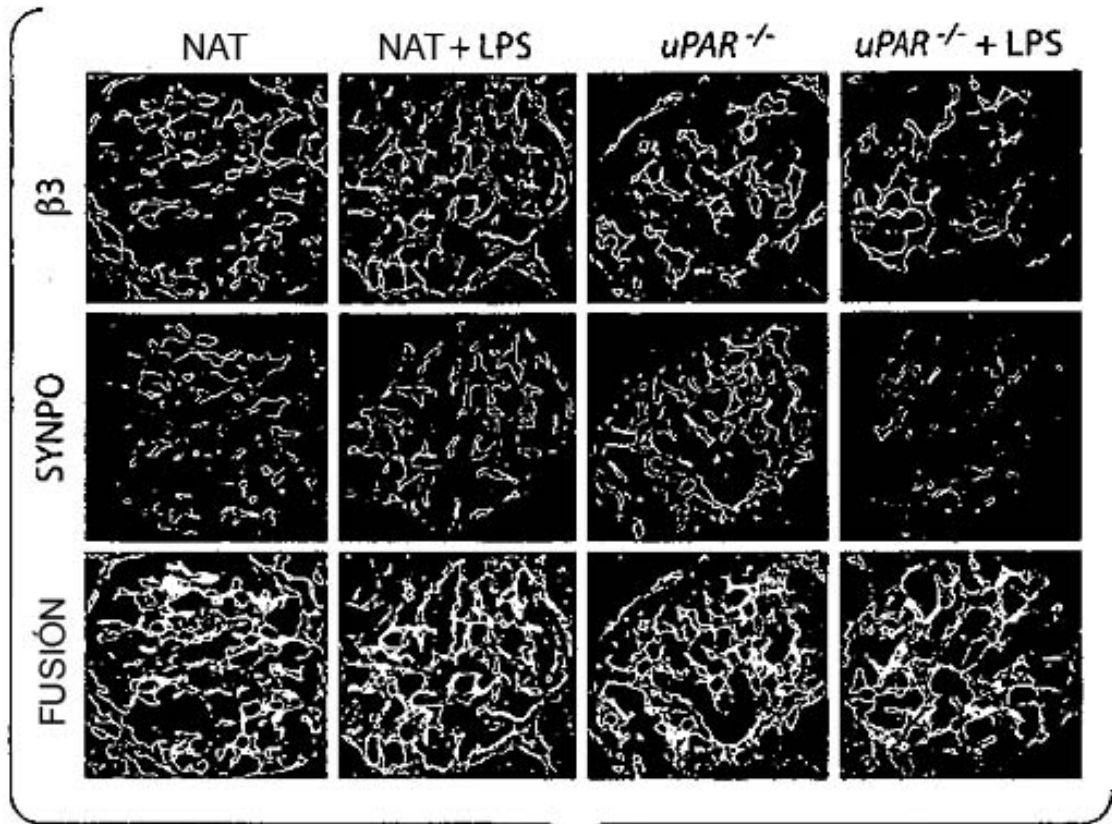


Fig. 5A

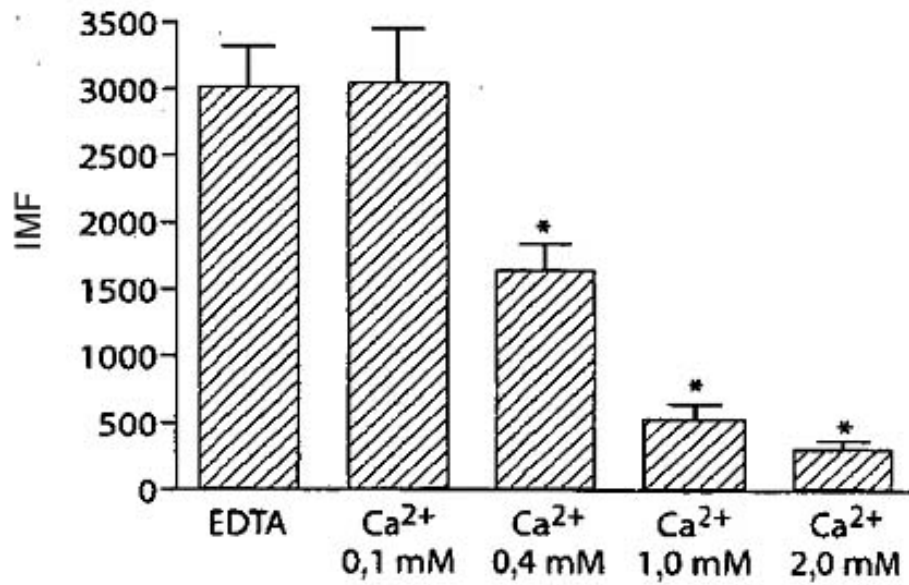


Fig. 5B

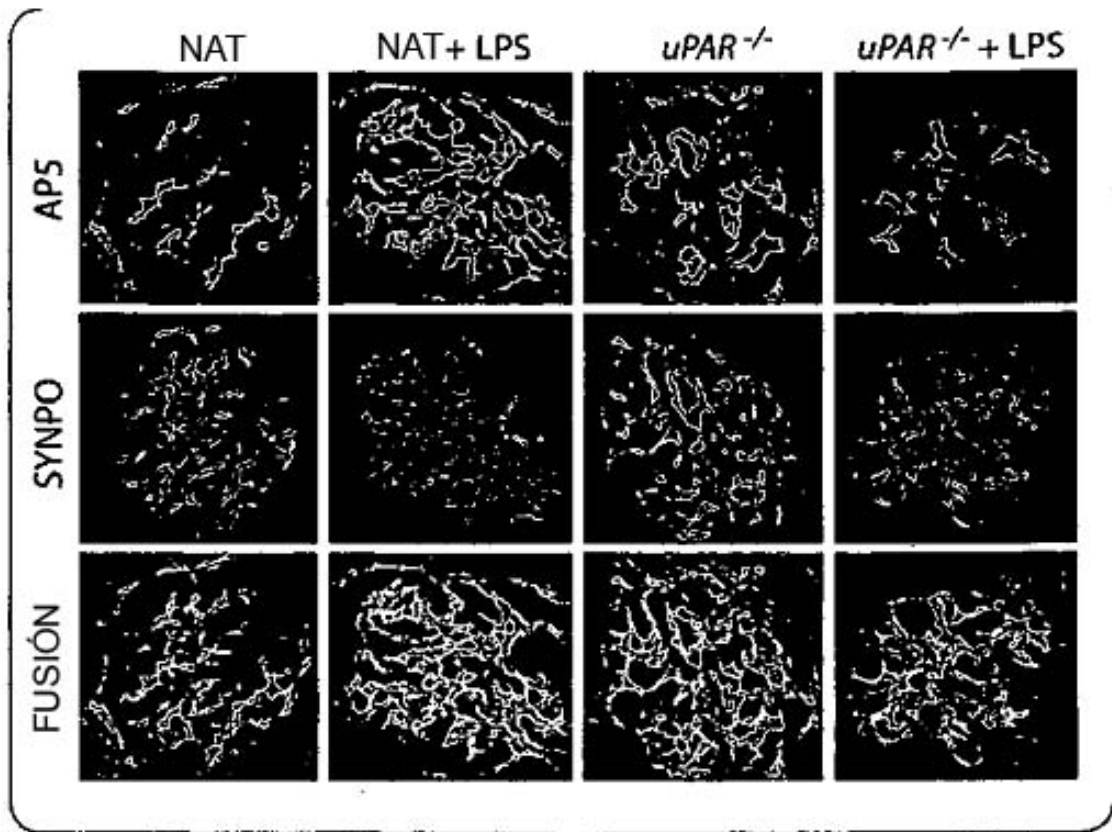


Fig. 5C

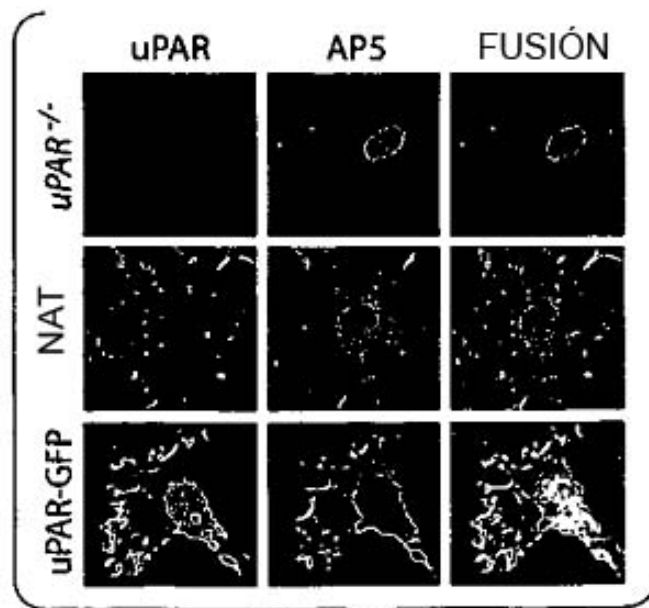


Fig. 5D

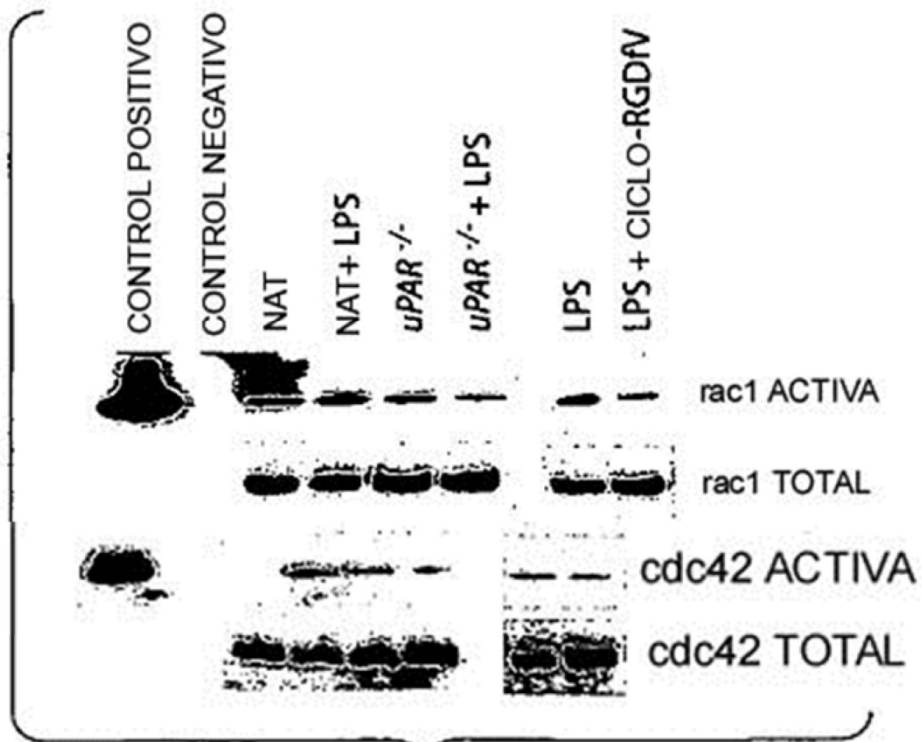


Fig. 5E

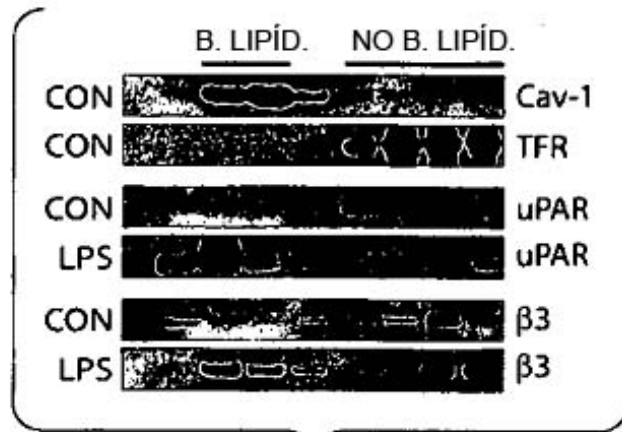


Fig. 6A

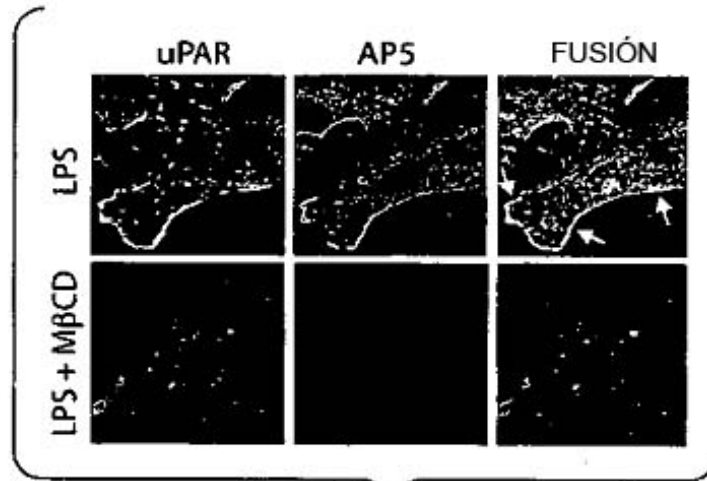


Fig. 6B

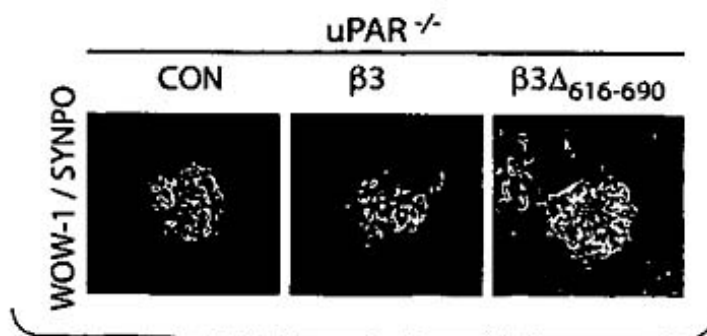


Fig. 6C

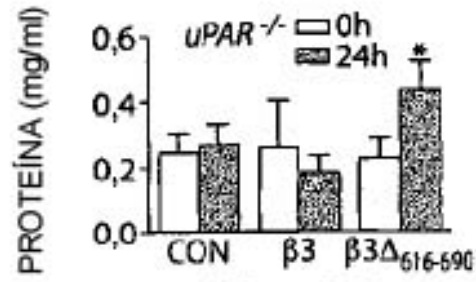


Fig. 6D

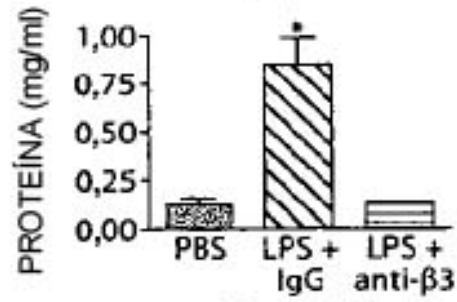


Fig. 6E

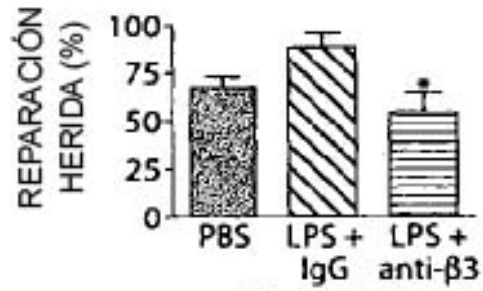


Fig. 6F

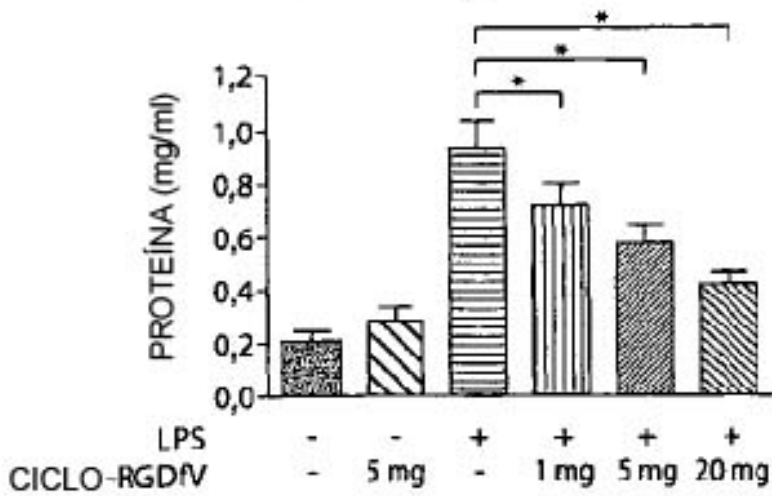


Fig. 6G

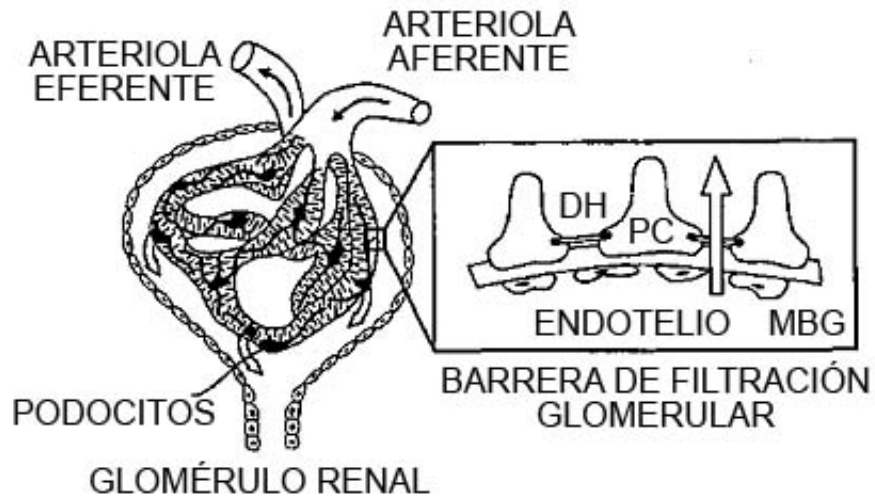


Fig. 7A

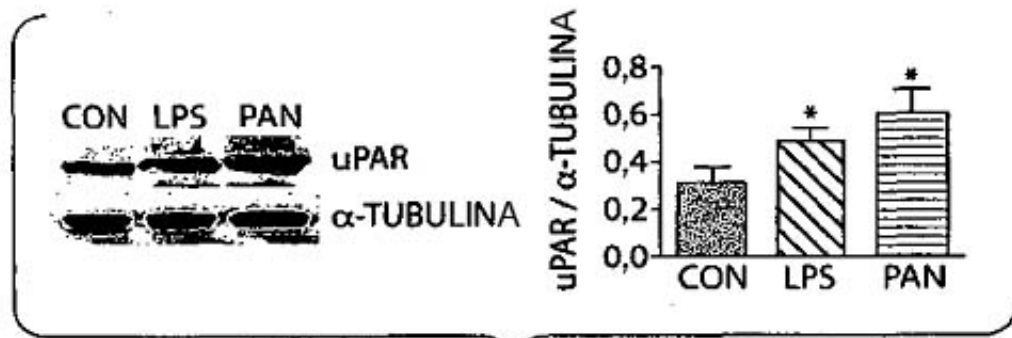


Fig. 7B

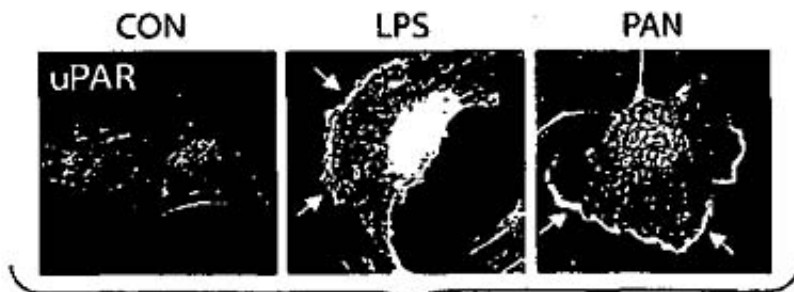
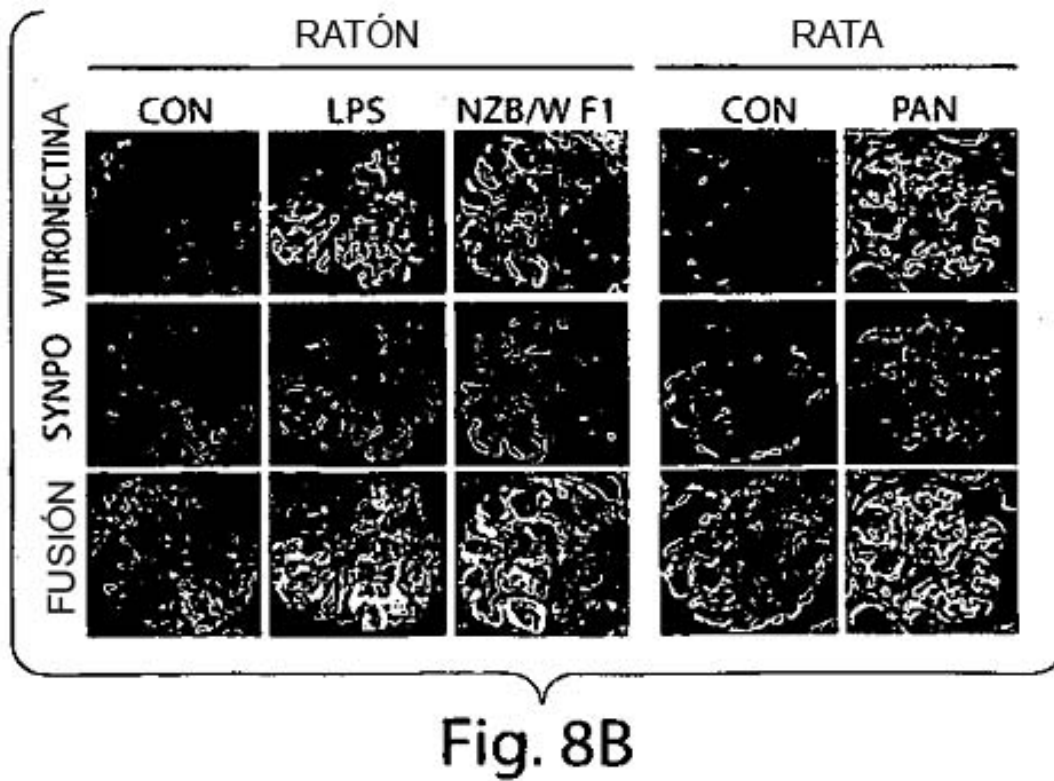
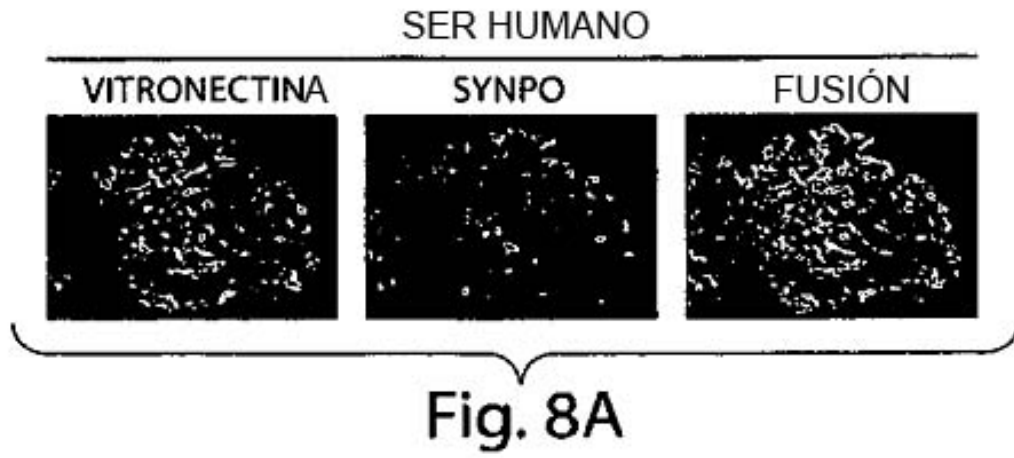
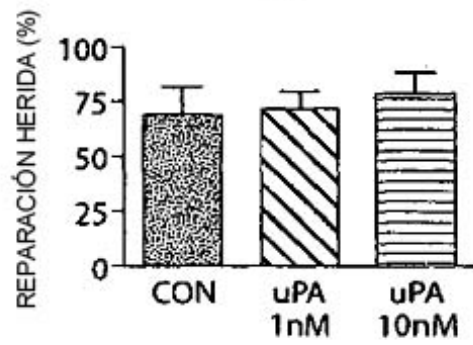
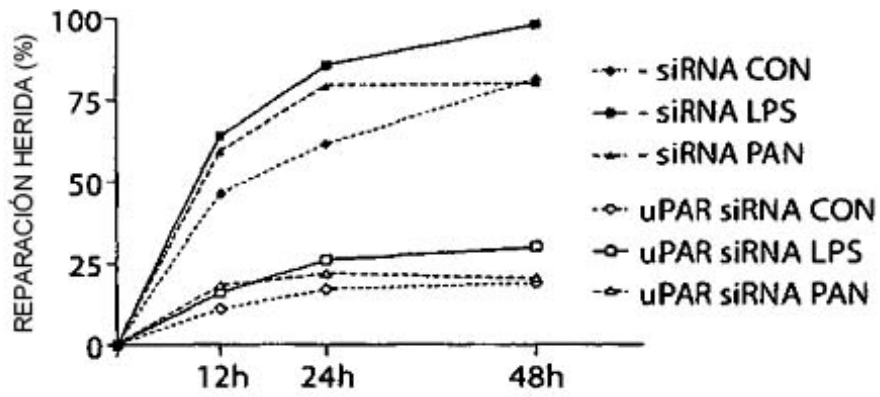
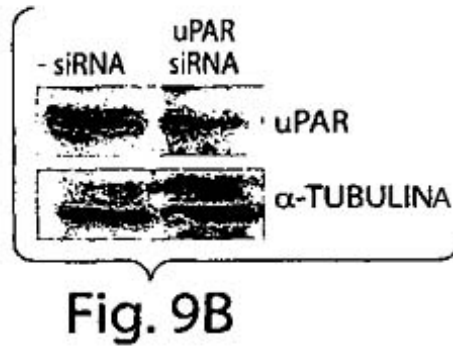
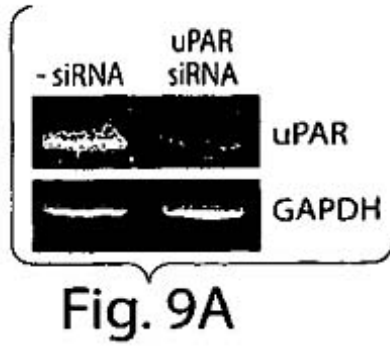


Fig. 7C





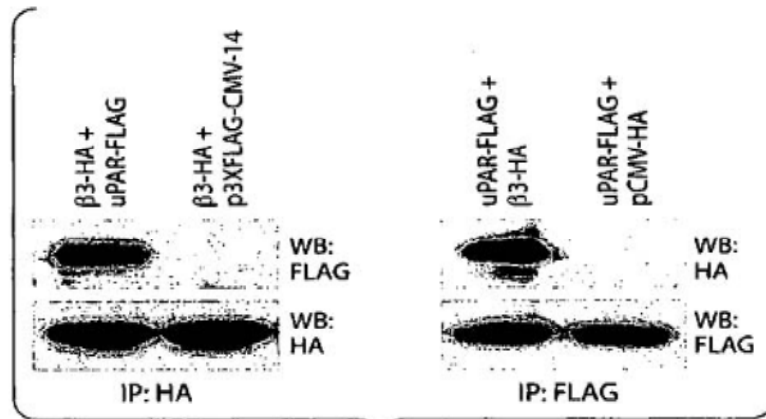


Fig. 10A

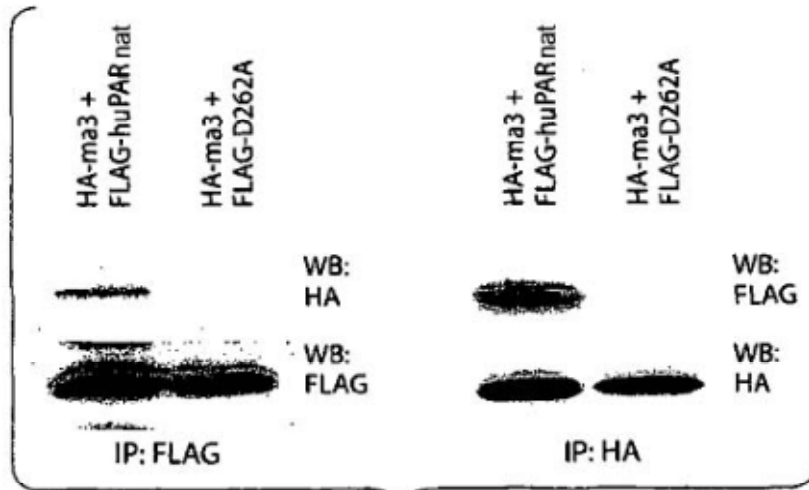


Fig. 10B

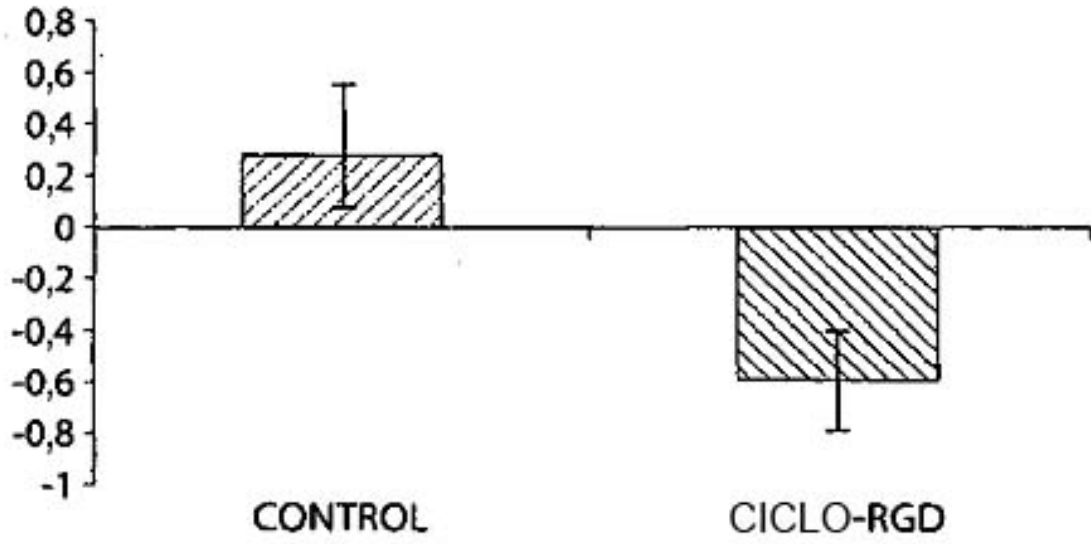


Fig. 11