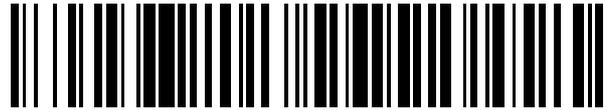


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 575 160**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2011 E 11714874 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2547359**

54 Título: **Inhibidores de las interacciones que unen la subunidad alfa de la beta integrina-proteína G**

30 Prioridad:

15.03.2010 US 314027 P
14.01.2011 US 433037 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
24.06.2016

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE UNIVERSITY
OF ILLINOIS (100.0%)
352 Henry Administration Building, 506 South
Wright Street
Urbana, IL 61801, US**

72 Inventor/es:

DU, XIAOPING

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 575 160 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

Inhibidores de las interacciones que unen la subunidad alfa de la beta integrina-proteína G

5 **Referencia cruzada a solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica prioridad sobre la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/314.027; presentada el 15 de marzo de 2010 y la solicitud de patente provisional de Estados Unidos n.º 61/433.037 presentada el 14 de enero de 2011.

10

Financiación

La presente invención se realizó con financiación del gobierno con las subvenciones n.º HL080264, HL062350, HL068819, concedidas por el National Heart, Lung, and Blood Institute, y las subvenciones n.º GM061454 y GM074001 del National Institute of General Medical Sciences. El gobierno tiene ciertos derechos sobre la presente invención.

15

Incorporación por referencia de material presentado por vía electrónica

20 En el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos legible en ordenador presentado a la vez con el presente documento e identificado del siguiente modo: Archivo de 89 kilobytes ACII (Texto) denominado "30303_45326A_seq_listing.txt," creado el 15 de marzo de 2011.

25 **Antecedentes**

Las integrinas son receptores heterodiméricos transmembrana de la matriz extracelular y se componen de una subunidad alfa y una beta. Los ligandos de integrinas de origen natural incluyen laminina, fibronectina y vitronectina, pero también incluyen fibrinógeno y fibrina, trombospondina, MMP-2, y el factor 2 de crecimiento de fibroblastos. Las integrinas se unen a los ligandos a través del reconocimiento de tramos cortos de aminoácidos sobre bucles expuestos, en particular la secuencia arginina-glicina-ácido aspártico (RGD). Tras la unión, las integrinas participan en los acontecimientos de señalización del complejo, solas o en combinación con los receptores del factor de crecimiento, y regulan la diseminación, retracción, adhesión, proliferación, supervivencia y migración celular. Las integrinas activan las vías canónicas, incluyendo, por ejemplo, la cinasa ligada a integrina (ILK), la proteína cinasa B (PKB/Akt), la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK), el factor Rac o nuclear kappa B (NF-κB). Véase, por ejemplo, Stupp, J Clin Oncol 25(13): 1637–1638 (2007).

30

35

En los vasos sanguíneos en reposo, las integrinas interaccionan con la membrana basal, manteniendo de este modo la quiescencia vascular. Durante la angiogénesis, las integrinas son esenciales para la migración, la proliferación y la supervivencia de las células endoteliales, (Alghisi y Ruegg, Endothelium 13: 113–135 (2006)). La inhibición farmacológica de la función de la integrina se ha demostrado que suprime con eficiencia la angiogénesis e inhibe la progresión tumoral. Véase, por ejemplo, Stupp (2007), citada anteriormente.

40

Actualmente hay tres clases de inhibidores de la integrina en desarrollo preclínico y clínico: Anticuerpos monoclonales dirigidos al dominio extracelular del heterodímero (por ejemplo, Vitaxin; MedImmune, Gaithersburg, MD), péptidos sintéticos que contienen una secuencia RGD (por ejemplo, cilengitida; Merck KGaA, Darmstadt, Alemania) y peptidomiméticos (por ejemplo, S247; Pfizer, St Louis, MO), que son moléculas no peptídicas biodisponibles por vía oral que simulan la secuencia RGD.

45

Los primeros fármacos específicos de la integrina dirigidos a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que es crucial para la hemostasia y desempeña un papel en la adhesión plaquetaria y el crecimiento del trombo. $\alpha_{IIb}\beta_3$ también funciona en la respuesta inflamatoria. Los primeros antagonistas de $\alpha_{IIb}\beta_3$ aprobados por la FDA han demostrado ser beneficiosos para indicaciones como los síndromes coronarios agudos y la prevención del infarto de miocardio. No obstante, el uso de algunos de estos fármacos está limitado debido a sus perfiles farmacocinéticos, algunos fármacos demuestran un rápido aclaramiento en plasma, un metabolismo rápido, poca biodisponibilidad oral y/o gran variación de los niveles plasmáticos. Asimismo, algunos antagonistas de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ indujeron trombocitopenia. Véase, por ejemplo, Advances in Immunology, Volumen 91, Elsevier Academic Press (San Diego, CA), 2006.

50

Gong et al., Science, vol. 237, pp.340–343 815,01,2010) divulga que la subunidad $G_{\alpha 13}$ de la proteína G se une a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y participa en la señalización "de fuera a dentro" de la integrina. Dicho documento divulga un inhibidor que es un péptido sintético miristoilado correspondiente a la secuencia SRI de $G_{\alpha 13}$ (197–209).

60

Sumario

65 La invención se refiere a un péptido como se define en la reivindicación 1 y a una composición farmacéutica que comprende el péptido como se define en la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento o prevención de un

derrame cerebral o un ataque al corazón en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la trombosis en un sujeto que lo necesite; en la mejora de la retracción del coágulo de sangre en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que lo necesite; o en la inhibición de la metástasis de una célula tumoral. La invención también se refiere a un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos EEERA y un ácido graso como se define en la reivindicación 12.

La divulgación proporciona un compuesto que inhibe una interacción de unión entre una integrina β y una subunidad α de proteína G. Como se tratar adicionalmente en este documento, en realizaciones a modo de ejemplo, el compuesto toma la forma de un anticuerpo, o un análogo de anticuerpo, un péptido o análogo de péptido.

La invención también proporciona una composición farmacéutica, que comprende un proporciona un compuesto que inhibe una interacción de unión entre una integrina β y una subunidad α de proteína G. En el presente documento también se proporcionan kits que comprenden uno o más compuestos.

También se proporcionan métodos de uso de los compuestos y composiciones de la invención. Se proporciona un método de inhibición de una interacción de unión entre una integrina y una subunidad de la proteína G en una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la interacción de unión.

La divulgación proporciona además un método para inhibir la activación de Src dependiente de integrina en una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la activación de Src.

Se proporciona además un método de activación de una GTPasa. El método comprende la etapa de poner en contacto una subunidad de la proteína G con un compuesto o composición en una cantidad eficaz para activar una GTPasa.

La divulgación proporciona además un método para inhibir la propagación o migración de una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la propagación y la migración.

También se proporciona un método para inhibir la adhesión de las plaquetas. El método comprende la etapa de poner en contacto una plaqueta con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión de las plaquetas. La invención proporciona además un método de inhibición de la secreción de gránulos por las plaquetas y la agregación plaquetaria. El método comprende la etapa de poner en contacto una plaqueta con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la secreción de gránulos y la agregación.

Los compuestos y las composiciones de la invención se contemplan, además, con fines terapéuticos. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones de la invención se pueden usar para mejorar la retracción del coágulo de sangre o inhibir la trombosis en un sujeto que lo necesite. Por consiguiente, la divulgación proporciona un método para mejorar la retracción del coágulo de sangre en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para mejorar la retracción del coágulo de sangre. También se proporciona un método para inhibir la trombosis en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la trombosis.

Debido a que la trombosis desempeña un papel en el accidente cerebrovascular y el ataque al corazón, la invención proporciona además un método de tratamiento o prevención de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el accidente cerebrovascular o el ataque al corazón.

Debido a que los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento se refieren al proceso de difusión-retracción celular coordinada que, a su vez, es importante en la migración celular, la invención también proporciona un método para inhibir la metástasis de una célula tumoral. El método comprende la etapa de poner en contacto una célula tumoral con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis. También se contemplan los compuestos y composiciones para su uso en la inhibición de la angiogénesis. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis.

Dado que la metástasis y la angiogénesis son aspectos importantes del cáncer, la divulgación proporciona además un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer.

Los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento también se pueden utilizar para afectar a la función de los leucocitos. De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un método para inhibir la adhesión, la propagación, la migración, o la quimiotaxis de los leucocitos. El método comprende la etapa de poner en contacto un leucocito con un compuesto o composición en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión, la propagación, la migración, o la quimiotaxis de los leucocitos. Puesto que estas funciones de los leucocitos están relacionadas con la inflamación, la divulgación proporciona además un método para inhibir o tratar la inflamación en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición en una cantidad eficaz para inhibir o tratar la inflamación.

10 **Breve descripción de las figuras**

La figura 1 demuestra un papel de $G\alpha_{13}$ en la señalización de fuera a adentro de la integrina. (A) Imágenes de microscopía confocal de propagación de las plaquetas de control de ARNip revuelto o plaquetas sin $G\alpha_{13}$ ($G\alpha_{13}$ -ARNip) sobre el fibrinógeno, sin o con Y27632. Fluorescencia fusionada de EGFP (verde) y fluorescencia (rojo) de faloidina conjugada con Alex Fluor 546. (B) Comparación de transferencia de tipo Western de abundancia de $G\alpha_{13}$ en las plaquetas de ratones a los que se ha inoculado células madre de la médula ósea transfectadas con ARNip control o $G\alpha_{13}$ -ARNip. Las plaquetas de ratón (C, D E) de células madre transfectadas con ARNip revuelto o ARNip de $G\alpha_{13}$ se dejaron adherir al fibrinógeno inmovilizado, se solubilizaron y analizó la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶ y la activación de RhoA.

La Figura 2 demuestra la unión de $G\alpha_{13}$ a β_3 y el efecto inhibitor del péptido Msr1. (A) Las proteínas de lisados plaquetarios se inmunoprecipitaron con IgG control o anticuerpo frente a $G\alpha_{13}$ con o sin GDP 1 μ M, GTP 1 μ M o AlF_4^- 30 μ M. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 (Mab15). Véase la cuantificación en la Fig. S4. (B) Las proteínas de lisados plaquetarios se inmunoprecipitaron con IgG control de ratón, anti- $\alpha_{IIb}\beta_3$ (D57 (24)) o un anticuerpo frente a la glicoproteína Iba (GPIb). Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 , o anti-GPIb. (C, D) GST- β_3 CD purificadas (C) o GST- β_1 CD (D) unidas a esferas de glutatión se mezclaron $G\alpha_{13}$ purificada con o sin GDP 1 μ M, GTP γ S 1 μ M o AlF_4^- 30 μ M. Las proteínas unidas se sometieron a inmunotransferencia con anti- $G\alpha_{13}$. Los datos cuantitativos se muestran como la media \pm SD y el valor p (prueba t). (E) Los lisados de las plaquetas control o las plaquetas adheridas al fibrinógeno en ausencia o presencia de 0,025 U/ml de trombina se inmunoprecipitaron con anti- $G\alpha_{13}$, y después se sometieron a inmunotransferencia con Mab15. Los datos cuantitativos se muestran como la media \pm SD y el valor p (prueba t). (F) Los lisados de las células 293FT transfectadas con $G\alpha_{13}$ silvestre marcada con Flag o mutantes de truncamiento indicadas (véase la Fig. S5) se precipitaron con esferas de glutatión unidas a GST- β_3 CD- o a GST. Las proteínas unidas a esferas se sometieron a inmunotransferencia con anti-Flag (unidas). Las cantidades de proteínas marcadas con Flag en los lisados se muestran mediante inmunotransferencia anti-Flag (entrada). (G) La proteína de los lisados de plaquetas tratados con 0,1 % de DMSO, péptido control revuelto 250 μ M (Ctrl) o mSR1 se inmunoprecipitó con anti- $G\alpha_{13}$. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 . Véase la cuantificación en la Fig. S4.

La figura 3 demuestra los efectos de mSR1 o la fosforilación de c-Src inducida por integrina, la actividad de RhoA y la propagación de las plaquetas. (A) Las plaquetas humanas lavadas pretratadas con DMSO, mSR1 o péptido control revuelto se dejaron adherir al fibrinógeno y después se solubilizaron a los puntos de tiempo indicados. Las proteínas de los lisados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos frente a c-Src fosforilado en Tyr⁴¹⁶, c-Src, o RhoA. RhoA unido a GTP se midió mediante la asociación con esferas de GST-RBD (25). Véanse los datos cuantitativos en la Fig. S4. (B) Propagación de las plaquetas tratadas con 0,1 % de DMSO, péptido control revuelto o mSR1, en ausencia o presencia de la toxina C3, Y27632, o 0,01 U/ml de trombina. Las plaquetas se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 546.

La figura 4 demuestra un papel de $G\alpha_{13}$ en la retracción de coágulos y la regulación dinámica de RhoA. (A) Efecto del péptido mSR1 250 μ M sobre la retracción del coágulo de plasma rico en plaquetas humanas comparado con DMSO y péptido revuelto. Los tamaños del coágulo se cuantificaron usando Image J (media \pm SD, n = 3, prueba t). (B) Comparación de la retracción del coágulo (media \pm SD, n = 3, prueba t) mediada por las plaquetas de control de ARNip y plaquetas sin $G\alpha_{13}$. (C, D, E, F) Las plaquetas se estimularon con trombina con o sin RGDS 2 mM, y se controlaron los cambios de turbidez de la suspensión de plaquetas causados por el cambio de la forma y la agregación (C). Después, las plaquetas se solubilizaron en los puntos de tiempo indicados y se analizó la cantidad de β_3 coinmunoprecipitada con $G\alpha_{13}$ (D) y la cantidad de GTP-RhoA unido a esferas de GST-RBD (E) mediante inmunotransferencia. (F) Datos cuantitativos (media \pm SD) de 3 experimentos. (G) Un diagrama esquemático que ilustra la regulación dependiente de $G\alpha_{13}$ de RhoA y contaminación cruzada entre GPCR y la señalización de la integrina.

La Figura 5 demuestra la eficacia de la sustitución de plaquetas por irradiación y trasplante de células madre de médula ósea infectadas por lentivirus. Cinco semanas después de la irradiación de dosis alta y el trasplante de células madre de médula ósea infectadas con lentivirus codificados en ARNip o ARNip n.^o1 específico de $G\alpha_{13}$ revueltos, las plaquetas se aislaron de los ratones receptores, y se dejó que se adherían a fibrinógeno inmovilizado. Se obtuvieron imágenes de las plaquetas utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META.

Verde: Fluorescencia de EGFP que indica que las plaquetas derivan de las células madre trasplantadas. Rojo: Tinción con faloidina conjugada con Alexa Fluor 546 que indica las plaquetas totales.

5 La Figura 6 demuestra los efectos similares de dos ARNip de $G\alpha_{13}$ diferentes sobre la propagación de las plaquetas, la activación de c-Src y la actividad de RhoA, y el efecto de la aspirina sobre la propagación de las plaquetas. (A) Imágenes de microscopia confocal de la propagación de plaquetas de ratón transfectadas con ARNip revuelto, ARNip n.º1 de $G\alpha_{13}$ y ARNip n.º2 de $G\alpha_{13}$ sobre fibrinógeno inmovilizado. Fluorescencia verde fusionada de EGFP y fluorescencia roja de faloidina conjugada con Alexa Fluor 546. (B) Se dejó que las plaquetas transfectadas con ARNip revuelto, ARNip #1 de $G\alpha_{13}$ y ARNip #2 de $G\alpha_{13}$ se adhirieran al fibrinógeno inmovilizado durante el tiempo indicado y se analizó la activación de c-Src y la actividad de RhoA. Obsérvese que dos ARNip diferentes inhibían de forma similar la propagación y la activación de c-Src y la activación acelerada de RhoA. (C) Las plaquetas de ratón se preincubaron con o sin aspirina 1 mM durante 30 minutos a temperatura ambiente y después se dejó que se extendieran sobre el fibrinógeno inmovilizado.

15 La Figura 7 demuestra los efectos inhibidores del ARNip de $G\alpha_{13}$ sobre la propagación de las células y la fosforilación de c-Src en células CHO que expresan integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y su rescate por un mutante resistente a ARNip de $G\alpha_{13}$. La línea celular de CHO estable que expresa la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ (células 123) se transfectó con construcciones de ADNc que codifican EGFP y ARNip control revuelto o ARNip de $G\alpha_{13}$ con o sin cotransfección de mutantes resistentes al ARNip marcado con Flag de las construcciones de ADNc de $G\alpha_{13}$ (Flag-G13-Mut1). (A) Las células se solubilizaron y sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$, anti-Flag (para la detección de $G\alpha_{13}$ marcada con Flag) y un anticuerpo frente a la tubulina (control de carga). (B) Las células se sembraron en superficies revestidas de fibrinógeno para distintos períodos de tiempo, se solubilizaron y los lisados se sometieron a inmunotransferencia para la fosforilación de c-Src en Y416 para indicar activación de c-Src o la cantidad total de c-Src. (C) Las células adherentes al fibrinógeno se tiñeron con faloidina marcada con Alexa Fluor 633 (color azul artificial) y anticuerpo anti-Flag conjugado con Alexa Fluor 546 (rojo) y se obtuvieron imágenes utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM 510 META. Las células transfectadas con éxito con las construcciones de ARNip expresan EGFP y, por lo tanto, muestran fluorescencia verde. Obsérvese que el ARNip de $G\alpha_{13}$ inhibía la activación de c-Src dependiente de integrina y la propagación celular sobre el fibrinógeno, que se rescató mediante la expresión Flag-G13-Mut1.

20 La Figura 8 proporciona datos cuantitativos de los experimentos mostrados en las Figuras 2 y 3. (A) Datos cuantitativos para la Fig. 2A, que muestran que la coimmunoprecipitación de β_3 con $G\alpha_{13}$ mejoró con GTP y AIF4⁻. (B) Datos cuantitativos para la Fig. 2G, que muestran que mSR1 inhibía la coimmunoprecipitación de β_3 con $G\alpha_{13}$. (C y D) Datos cuantitativos de la Fig. 3A que muestran que mSR1 inhibía la activación de c-Src (C) y la activación de RhoA acelerada (D). Todos los datos se expresan como media \pm SD de 3 experimentos. La significación estadística se determinó usando la prueba t de Student.

25 La Figura 9 representa un esquema de $G\alpha_{13}$ con regiones de cambio indicadas. Se desarrollaron dos mutantes de truncamiento de $G\alpha_{13}$ para mapear el sitio de unión de β_3 (véase la figura 2F): (1) el mutante que codifica un fragmento de $G\alpha_{13}$ que contiene los residuos 1-196 que carecen de la región de cambio 1 y (2) el mutante que codifica un fragmento de $G\alpha_{13}$ (residuos 1-212) que contienen la región de cambio 1.

30 La Figura 10 proporciona imágenes típicas de la retracción del coágulo que muestran los efectos sobre la retracción del coágulo mediada por las plaquetas defectuosas en mSR1 y $G\alpha_{13}$ sobre la retracción del coágulo. (A) Efecto del péptido mSR1 250 μ M sobre la retracción del coágulo de plasma rico en plaquetas humanas comparado con DMSO y péptido revuelto. Los datos cuantitativos se muestran en la Fig. 4A. (B) Comparación de la retracción del coágulo mediada por las plaquetas de control de Siria y plaquetas defectuosas en $G\alpha_{13}$. Los datos cuantitativos se muestran en la Fig. 4B.

35 La Figura 11 demuestra el sitio de unión de $G\alpha_{13}$ en el dominio citoplásmico de la integrina β_3 . (A) Alineación de la secuencia de aminoácidos de los dominios citoplásmicos de varias subunidades de las integrinas β humanas. Las secuencias clave cruciales en la unión de $G\alpha_{13}$ están marcadas en rojo. Se sintetizaron los péptidos sintéticos correspondientes a la región de unión a Gal 3 de β_3 (B) Los lisados de las células CHO que expresan un nivel similar de integrina β_3 silvestre y truncada se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o la misma cantidad de IgG de conejo control. Los lisados y los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o anti-pj(MAb15). (C) Los lisados de las células CHO que expresan β_3 silvestre o mutante se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o la misma cantidad de IgG de conejo control. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos monoclonales anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 (MAb 15). (D) Imágenes de microscopia confocal de la propagación de plaquetas $\beta_3^{-/-}$ y plaquetas $\beta_3^{-/-}$ que expresan integrina β_3 silvestre o AA-mutante sobre el fibrinógeno. Fluorescencia anti-integrina β_3 (MAb15) fusionada (verde) y fluorescencia de faloidina conjugada con Alexa Fluor 546 (rojo). (E) Análisis por citometría de flujo de los niveles de expresión de β_3 en plaquetas $\beta_3^{-/-}$ de ratón transfectadas con integrina β_3 silvestre y mutante de AAA (E⁷³¹⁻⁷³³ a alanina) en complejo con plaquetas $\beta_{IIb}\beta_3^{-/-}$ silvestres sirven como control negativo. (b)

65

En la figura 12, (A) se dejó que las células CHO que expresan $\alpha_{IIb}\beta_3$ silvestre o mutante de AAA se extendieran sobre superficies de fibrinógeno. (B) se dejó que las células CHO-1b9 que expresan $\alpha_{IIb}\beta_3$ silvestre o mutante de AAA se adhirieran a fibrinógeno inmovilizado, se solubilizaron y se analizó la activación de RhoA y la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶. (C) Cuantificación de la actividad de RhoA y fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶ como se muestra en (d) (media \pm SD, 3 experimentos). (D) Análisis por citometría de flujo de fibrinógeno marcado con verde oregón inducido con PAR4AP a plaquetas que expresan $\alpha_{IIb}\beta_3$ silvestre o mutante de AAA de ratones $\beta_3^{-/-}$ a los que se ha transplantado médula ósea. Las plaquetas $\beta_3^{-/-}$ sirvieron como control negativo.

La Figura 13 demuestra la identificación de un motivo de unión a $G\alpha_{13}$ en las integrinas. (A) Se trató a las plaquetas con el péptido control 500 μ M, los péptidos mP₁₃, mP₇, o mP₅, a continuación, se inmunoprecipitaron con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o la misma cantidad de IgG de conejo control. Los lisados y los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 (MAB15). (B) Se dejó que las plaquetas humanas tratadas con el DMSO, el péptido revuelto-Myr o el péptido mP₅ se adhirieran al fibrinógeno inmovilizado, se solubilizaron y se analizó la activación de RhoA y la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶. (C) Imágenes de de microscopia confocal de plaquetas tratadas con DMSO, péptidos revueltos miristoilados y plaquetas tratadas con el péptido mP₅ adherentes sobre el fibrinógeno durante 30 minutos, sin o con inhibidor de la Rho cinasa Y27632. Fluorescencia fusionada de integrina β_3 (verde) y fluorescencia de faloidina conjugada con Alex Fluor 546 (rojo). (D) Análisis por citometría de flujo de la unión de fibrinógeno marcado con verde oregón inducida por PAR4AP (50 μ M) a las plaquetas humanas pretratadas con DMSO, péptido revuelto-Myr 250 μ M o péptido mP₅ 250 μ M. (E) Las plaquetas se incubaron previamente con mP₅ o péptidos de control revueltos y después se estimularon con trombina en un agregómetro de plaquetas a 37 °C. Se registraron los rastros de la agregación plaquetaria.

La figura 14 demuestra la inhibición de la señalización de fuera a dentro de la integrina por el péptido mP₁₃. (A) Imágenes de microscopia de fluorescencia de las plaquetas humanas adherentes sobre el fibrinógeno que se trataron previamente con el péptido control revuelto miristoilado 250 μ M, péptido mP₁₃ 250 μ M. (B) Análisis por citometría de flujo de la unión de fibrinógeno marcado con verde oregón inducida por PAR4AP (50 μ M) a las plaquetas humanas pretratadas con DMSO, péptido revuelto-Myr 150 μ M o péptido mP₁₃ 150 μ M.

La Figura 15 demuestra que el motivo EEE de la integrina β_3 -CD es importante para la unión de $G\alpha_{13}$ y la propagación de células. (A) Las secuencias del dominio citoplásmico de la integrina humana se alinearon manualmente. Los motivos ExE conservados se destacan en rojo. Los motivos NxxY y HDR[R/K] conservados se destacan en negrita. Los residuos se numeran según la secuencia del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Las secuencias de los inhibidores peptídicos desarrollados en este estudio se muestran debajo de las correspondientes secuencias de los dominios citoplásmicos de β_3 . (B) Los lisados de 123 células de expresión estable de integrina β_3 truncada se precipitaron con el anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o la misma cantidad de IgG de conejo normal como control. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 (M15). (C) Los lisados de 123 células de expresión estable de integrina β_3 mutante de E a A se precipitaron con el anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o la misma cantidad de IgG de conejo normal como control. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o anti- β_3 (M15). (D) Imágenes de microscopia confocal de la propagación de plaquetas $\beta_3^{-/-}$ control o plaquetas que expresan integrina β_3 silvestre o mutante de AAA sobre el fibrinógeno. Fluorescencia fusionada de integrina β_3 (verde) y fluorescencia de faloidina conjugada con Alex Fluor 546 (rojo). (E) Análisis por citometría de flujo del nivel de expresión de integrina β_3 silvestre y mutante de AAA. Las plaquetas humanas y las plaquetas $\beta_3^{-/-}$ sirven como control positivo y negativo.

La Figura 16 demuestra que la mutación AAA es responsable del aumento de actividad de RhoA y la disminución de la actividad de c-Src sin afectar a la señalización de dentro a fuera de la integrina. (A) Se dejó que las células 123 silvestres o mutante de AAA se adhirieran a fibrinógeno inmovilizado, se solubilizaron y se analizó la activación de RhoA y la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶. (B) Cuantificación de la actividad de RhoA para A. (C) Cuantificación de la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶ para A. (D) Los lisados de células 123 de expresión estable de integrina β_3 silvestre o mutante de AAA se precipitaron con anticuerpo anti-c-Src o la misma cantidad de IgG de conejo normal como control. Los inmunoprecipitados se inmunotransfirieron con anticuerpo anti-v-Src o anti-p190RhoGAP. (E) Cuantificación de c-Src unido a p190RhoGAP para D. (F) Los lisados de células 123 de expresión estable de integrina β_3 silvestre o mutante de AAA se precipitaron con anticuerpo anti-p115RhoGEF o la misma cantidad de IgG de ratón normal como control. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$ o anti-p115RhoGEF. (G) Cuantificación de p115RhoGEF unido a $G\alpha_{13}$ para F. (H) Análisis por citometría de flujo de la capacidad de unión al fibrinógeno inducida por Par4- de las plaquetas de expresión de integrina β_3 silvestre o mutante de AAA. Las plaquetas humanas y las plaquetas $\beta_3^{-/-}$ sirven como control positivo y negativo.

La Figura 17 demuestra que el péptido Myr-P₅ inhibía la agregación y la propagación de de plaquetas debido al aumento de la actividad de RhoA y la disminución de la actividad de c-Src sin afectar a la señalización de dentro a fuera de la integrina. (A) Se dejó que las plaquetas humanas tratadas con el DMSO, el péptido revuelto-Myr o el péptido Myr-P₅ se adhirieran al fibrinógeno inmovilizado, se solubilizaron y se analizó la activación de RhoA y la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶. (B) Cuantificación de la actividad de RhoA para A. (C) Cuantificación de la

fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶ para A. D) Los lisados de las plaquetas tratadas con DMSO, péptido revuelto con Myr o péptido Myr-P₅ se precipitaron con anticuerpo anti-G α ₁₃ o la misma cantidad de IgG de conejo normal como control. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-G α ₁₃ o anti- β ₃ (M15). (E) Cuantificación de la integrina β ₃ unida a G α ₁₃ para D. (F) Imágenes de microscopia confocal de plaquetas tratadas con DMSO, péptido revuelto Myr o péptido Myr-P₅ sobre el fibrinógeno durante 30 minutos, con o sin Y27632. Fluorescencia fusionada de integrina β ₃ (verde) y fluorescencia de faloidina conjugada con Alex Fluor 546 (rojo). (G, H) Análisis por citometría de flujo de la capacidad de unión de las plaquetas tratadas con DMSO, péptido revuelto Myr o péptido Myr-P₅ al fibrinógeno inducida por Par4. La concentración de péptido fue 150 μ M para G, de 250 μ M para H. (I) El péptido Myr-P₅ 200 μ M inhibió la agregación de las plaquetas inducida por trombina.

La Figura 18 demuestra que la cabeza de talina no podía rescatar la deficiencia de la propagación de las células 123 mutantes AAA –sobre el fibrinógeno. (A, C) GST- β ₃-CD purificado unido a esferas de glutatión se mezcló con G α ₁₃ purificada con o sin talina purificada. Las proteínas unidas se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-G α ₁₃ o anti-talina. Los datos cuantitativos se muestran como la media \pm SD y el valor p (prueba t). (B, D) Cuantificación de GST- β ₃-CD unido a G α ₁₃ o talina para A y C. (E) Los lisados de células 123 o AAA transfectadas con cabeza de talina se precipitaron con suero anti- β ₃ de conejo (8053) o la cantidad igual de suero preinmune. Los inmunoprecipitados se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpo anti-G α ₁₃ o anti- β ₃. (F) Cuantificación de talina unido a integrina β ₃ para E.

La Figura 19 demuestra que el motivo EEE de la integrina β ₃ es importante para la mediación de la propagación celular sobre el fibrinógeno inmovilizado. A) Propagación de plaquetas humanas lavadas previamente tratadas con vehículo (PBS), péptido revuelto o péptido P13 sobre el fibrinógeno inmovilizado durante 1 hora. Las plaquetas se tiñeron con faloidina conjugada con Alexa Fluor 546. (B) Imágenes de microscopia de la propagación de células 123 o E o células mutantes de E a A sobre el fibrinógeno durante 1 hora. Fluorescencia fusionada de integrina β ₃ (verde) y fluorescencia de cabeza talina (rojo).

La Figura 20 demuestra que el efecto del péptido P₅ sobre la propagación y agregación de las plaquetas. (A) Imágenes de microscopia confocal de la propagación de las plaquetas tratadas con DMSO, péptido revuelto con Myr o péptido Myr-P₅ sobre el fibrinógeno durante 60 minutos, sin o con Y27632. Fluorescencia fusionada de integrina β ₃ (verde) y fluorescencia de faloidina conjugada con Alex Fluor 546 (rojo). (B, C) El péptido Myr-P₅ 30 μ M inhibió la agregación de plaquetas humanas (B) y de ratón (C) inducida por trombina.

Descripción detallada

Inhibidores de las interacciones de unión entre una integrina β y la subunidad α de la proteína G α

En la presente invención se proporcionan compuestos que inhiben una interacción de unión proteína-proteína entre una integrina β y una subunidad α de proteína G. Los compuestos pueden considerarse inhibidores de la unión de la integrina β a una subunidad α de proteína G y / o inhibidores de la unión de una subunidad α de la proteína G a una integrina P. En algunas realizaciones, los compuestos son inhibidores de la unión competitivos. En ciertos aspectos, los compuestos se unen al sitio de una integrina β integrina a la que se une una subunidad α de la proteína G. En ciertos aspectos, los compuestos se unen al sitio de una subunidad α de la proteína G a la que se une la integrina P. En realizaciones alternativas, los compuestos son inhibidores de la unión no competitivos. En determinados aspectos, los compuestos inhiben la interacción de la unión entre una β integrina y la subunidad α de la proteína G, sin embargo, los compuestos se unen a un sitio de la β integrina que no sea el sitio al que se une la subunidad α de la proteína G o los compuestos se unen a un sitio de la subunidad α de la proteína G sitio distinto del sitio al que se une la β integrina.

La inhibición proporcionada por los compuestos no puede ser un 100 % o inhibición completa o supresión de la interacción de unión entre la integrina β y la subunidad α de la proteína G. Más bien, hay diferentes grados de inhibición cada uno de los cuales el experto en la técnica reconoce que tienen un potencial beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los compuestos pueden inhibir la interacción de unión entre una β integrina y la subunidad α de la proteína G a cualquier cantidad o nivel. En realizaciones de ejemplo, el compuesto proporciona al menos o aproximadamente una inhibición del 10 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente una inhibición del 20 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 30 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 40 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 50 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 60 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 70 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 80 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 90 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 95 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 98 %) de la unión entre una β integrina y la subunidad α de la proteína G. En algunas realizaciones, el compuesto anula completamente la interacción de unión entre la integrina β y la subunidad α de la proteína G, de modo que no se pueden detectar complejos de unión de β integrina—subunidad α de la proteína G en una muestra obtenida de un sujeto, tal como se mide mediante, por ejemplo, inmunoprecipitación, inmunotransferencia de tipo Western, inmunohistoquímica, y similares.

En algunas realizaciones, los compuestos inhiben la interacción de unión entre una β humano integrina silvestre humana y una subunidad α de la proteína G silvestre humana. En aspectos de ejemplo, subunidad α de la proteína G silvestre humana es una $G\alpha_{12}$ silvestre humana o una $G\alpha_{13}$ silvestre humana. En aspectos de ejemplo, la β integrina silvestre humana es una β_{1A} integrina silvestre humana, β_{1D} integrina silvestre humana, β_2 integrina silvestre humana, β_3 integrina silvestre humana, β_5 integrina silvestre humana, β_6 integrina silvestre humana o β_7 integrina silvestre humana. Las secuencias de aminoácidos de estas proteínas humanas silvestres se conocen en la técnica y están disponibles en la base de datos de proteínas del sitio web del National Center for Biotechnology Information (NCBI) con los números de secuencia de referencia en el NCB1 NP_006563,2 ($G\alpha_{13}$), NP_031379,2 ($G\alpha_{12}$), NP_002202 (β_{1A} integrina), NP_391988 (β_{1D} integrina), NP_000202 (β_2 integrina), NP_000203 (β_3 integrina), NP_002204,2 (β_5 integrina), NP_000879,2 (β_6 integrina) y NP_000770,1 (β_7 integrina). Las secuencias de aminoácidos también se proporcionan en el presente documento como SEQ ID NOs: 1–4 y 10–18.

En otras realizaciones de ejemplo, los compuestos inhiben la interacción de unión entre una β integrina y la proteína subunidad α de una proteína G, en el que uno o los dos de la β integrina y la subunidad α de la proteína G no es / son silvestres, por ejemplo mutantes. Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la β integrina mutante difiere en uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o más) posiciones de la secuencia de aminoácidos de una β integrina humana silvestre reconocida en la técnica (por ejemplo, β_{1A} integrina, β_{1D} integrina, β_2 integrina, β_3 integrina, β_5 integrina, β_6 integrina, β_7 integrina). La secuencia de aminoácidos de la β integrina mutante en aspectos de ejemplo es aproximadamente un 98 % o menos (por ejemplo, aproximadamente 95 % o menos, aproximadamente 90 % o menos, aproximadamente 85 % o menos, aproximadamente 80 % o menos, aproximadamente 75 % o menos, aproximadamente 70 % o menos, aproximadamente 65 % o menos, aproximadamente 60 % o menos, aproximadamente 55 % o menos, aproximadamente 50 % o menos) idéntica a la de una β integrina silvestre. Asimismo, por ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la proteína G mutante difiere en uno o más (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, o más) posiciones de la secuencia de aminoácidos de una subunidad α de la proteína G humana silvestre reconocida en la técnica (por ejemplo, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$). La secuencia de aminoácidos de la subunidad α de la proteína G mutante en aspectos de ejemplo es aproximadamente un 98 % o menos (por ejemplo, aproximadamente 95 % o menos, aproximadamente 90 % o menos, aproximadamente 85 % o menos, aproximadamente 80 % o menos, aproximadamente 75 % o menos, aproximadamente 70 % o menos, aproximadamente 65 % o menos, aproximadamente 60 % o menos, aproximadamente 55 % o menos, aproximadamente 50 % o menos) idéntica a la de una subunidad α de la proteína G silvestre.

En aspectos de ejemplo, el compuesto es un anticuerpo, un análogo de anticuerpo, un péptido, un análogo de péptido (por ejemplo, peptido, peptidomimético), una molécula de ácido nucleico que codifica cualquiera de los anticuerpos o péptidos, o análogos de los mismos, o un compuesto de molécula pequeña (por ejemplo, el compuesto de molécula pequeña diseñado racionalmente basado en cualquiera de los anticuerpos o péptidos descritos en el presente documento).

Anticuerpos y análogos de los mismos

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. En algunas realizaciones de la invención, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo puede ser cualquier tipo de inmunoglobulina conocida en la técnica. En realizaciones de ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo de isotipo IgG, IgD, IgE, IgG, o IgM. Además, el anticuerpo en algunas realizaciones es un anticuerpo monoclonal. En otras realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal.

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo de origen natural, por ejemplo, un anticuerpo aislado y / o purificado de un mamífero, por ejemplo, ratón, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, se humano, y similares. A este respecto, el anticuerpo puede considerarse como un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, un anticuerpo de conejo, un anticuerpo de cabra, un anticuerpo de caballo, un anticuerpo de pollo, un anticuerpo de hámster, un anticuerpo humano, y similares. Los métodos de producción de anticuerpos de origen natural son conocidos en la técnica, algunos de los cuales se describen más adelante en el presente documento en la sección titulada "Métodos de Producción de anticuerpos".

En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo manipulado genéticamente, por ejemplo, un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo en el que se ha injertado CDR, un anticuerpo que incluye partes de secuencias CDR específicas para una β integrina o una subunidad α de proteína G, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo biespecífico, un anticuerpo trispecífico, y similares. Las técnicas de ingeniería genética también proporcionan la capacidad para producir anticuerpos totalmente humanos en una fuente no humana.

En algunos aspectos, el anticuerpo modificado por ingeniería genética es un anticuerpo de cadena sencilla (SCA) específico para una β integrina o una subunidad α de proteína G. En aspectos particulares, el SCA se une al sitio de una integrina P a la que se une la subunidad α de la proteína G o el SCA se une al sitio de subunidad α de la

proteína G a la que se une una β integrina. En aspectos de ejemplo, el SCA se une a un epítipo como se describe más adelante en el presente documento en la sección titulada "Epítipos". En la técnica se conocen métodos de fabricación de SCA. Véase, por ejemplo, Davis et al., *Nature Biotechnology* 9: 165–169 (1991).

5 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo quimérico. La expresión "anticuerpo quimérico" se usa en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo que contiene dominios constantes de una especie y los dominios variables de un segundo, o más generalmente, que contiene tramos de secuencia de aminoácidos de al menos dos especies. En aspectos particulares, el anticuerpo quimérico se une al sitio de una β integrina a la que se une la subunidad α de la proteína G o el anticuerpo quimérico se une al sitio de subunidad α de la proteína G a la que se une una β integrina. En aspectos de ejemplo, el anticuerpo quimérico se une a un epítipo como se describe más adelante en el presente documento en la sección titulada "Epítipos".

15 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado. El término "humanizado" cuando se usa en relación a los anticuerpos se refiere a anticuerpos que tienen al menos regiones CDR de una fuente no humana que se han diseñado para tener una estructura y la función inmunológica más similar a los anticuerpos humanos verdaderos que los anticuerpos de la fuente original. Por ejemplo, la humanización puede implicar el injerto de CDR de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en un anticuerpo humano. La humanización también puede implicar seleccionar sustituciones de aminoácidos para hacer que una secuencia no humana se parezca más a una secuencia humana. En aspectos particulares, el anticuerpo humanizado se une al sitio de una β integrina a la que se une la subunidad α de la proteína G o el anticuerpo humanizado se une al sitio de subunidad α de la proteína G a la que se une una β integrina. En aspectos de ejemplo, el anticuerpo humanizado se une a un epítipo como se describe más adelante en el presente documento en la sección titulada "Epítipos".

25 El uso de los términos "quimérico o humanizado" en el presente documento no está destinado a ser mutuamente excluyente, y más bien, está destinado a abarcar anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, y anticuerpos quiméricos que se han humanizado después. Excepto cuando el contexto indique lo contrario, las afirmaciones sobre (propiedades de, usos de, pruebas de, y así sucesivamente) los anticuerpos quiméricos de la invención se aplican a los anticuerpos humanizados de la invención, y las afirmaciones acerca de los de anticuerpos humanizados de la invención se refieren también a los anticuerpos quiméricos. Asimismo, excepto cuando el contexto lo indique, también debe entenderse que dichas afirmaciones son aplicables a anticuerpos y fragmentos de unión a antígeno de dichos anticuerpos de la invención.

35 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo en el que se ha injertado CDR para una β integrina o una subunidad α de proteína G. En aspectos particulares, el anticuerpo en el que se ha injertado CDR se une al sitio de una β integrina a la que se une la subunidad α de la proteína G o el anticuerpo en el que se ha injertado CDR se une al sitio de subunidad α de la proteína G a la que se une una β integrina. En aspectos de ejemplo, el anticuerpo en el que se ha injertado CDR se une a un epítipo como se describe más adelante en el presente documento en la sección titulada "Epítipos". En la técnica se conocen métodos de fabricación de anticuerpos en los que se ha injertado CDR. Véase, por ejemplo, Lo, Benny, *Antibody Engineering: Methods and Protocols*, Volume 248 (2004), que se incorpora en su totalidad por referencia.

45 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo biespecífico o triespecífico para una β integrina o una subunidad α de proteína G. En aspectos particulares, el anticuerpo biespecífico o triespecífico se une al sitio de una β integrina a la que se une la subunidad α de la proteína G o el anticuerpo biespecífico o triespecífico se une al sitio de subunidad α de la proteína G a la que se une una β integrina. En aspectos de ejemplo, el anticuerpo biespecífico o triespecífico se une a un epítipo como se describe más adelante en el presente documento en la sección titulada "Epítipos". En la técnica se conocen métodos de fabricación de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos. Véase, por ejemplo, Marvin y Zhu, *Acta Pharmacologica Sinica* 26: 649–658 (2005) y la patente de EE.UU. 6.551.592.

50 En algunos aspectos, el anticuerpo es un anticuerpo humaneered™. La tecnología para humanizar es un método patentado de KaloBios Pharmaceuticals, Inc. (San Francisco, California) para la conversión de los anticuerpos no humanos en anticuerpos humanos modificados por ingeniería. Los anticuerpos Humaneered™ son secuencias de anticuerpos de alta afinidad y altamente similares a las secuencias de anticuerpos de la línea germinal humana.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene un nivel de afinidad o aidez por la β integrina que es suficiente para evitar que la subunidad α de la proteína G se una a la β integrina. En algunas realizaciones, el anticuerpo tiene un nivel de afinidad o aidez por la subunidad α de la proteína G que es suficiente para evitar que la β integrina se una a la subunidad α de la proteína G. Por lo tanto, en algunas realizaciones, la constante de afinidad, K_a , (que es la constante de disociación, K_d) del anticuerpo de la invención para la β integrina es mayor que la K_a de la subunidad α de la proteína G para la β integrina. Como alternativa, en algunas realizaciones, la K_a del anticuerpo de la invención para la subunidad α de la proteína G es mayor que la de la β integrina para la subunidad α de la proteína G. Las constantes de unión, incluidas las constantes de disociación, se pueden determinar mediante métodos conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos que utilizan los principios de la resonancia de plasmón superficial, por ejemplo, los métodos que utilizan un sistema Biacore™.

65

En algunas realizaciones, el anticuerpo está en forma monomérica, mientras que en otras realizaciones, el anticuerpo está conjugado con uno o más anticuerpos (por ejemplo, cada uno de los cuales reconocen el mismo epítipo del primer anticuerpo). De acuerdo con lo anterior, en algunos aspectos, el anticuerpo está en forma polimérica, oligomérica o multimérica. En ciertas realizaciones en las que el anticuerpo comprende dos o más fragmentos de regiones de unión a antígeno distintos, el anticuerpo se considera biespecífico, trispecífico, o multi-específicos, o bivalente, trivalente, o multivalente, dependiendo del número de epítopos diferentes que el anticuerpo reconoce y a los que se une.

Fragmentos de unión a antígeno

En algunos aspectos, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G es un fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo. El fragmento de unión a antígeno (también denominado en el presente documento "porción de unión a antígeno") puede ser un fragmento de unión a antígeno de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento. El fragmento de unión a antígeno puede ser cualquier parte de un anticuerpo que tiene al menos un sitio de unión a antígeno, incluyendo, pero no limitado a, Fab, $F(ab')_2$, dsFv, sFv, diacuerpos, triacuerpos, bis-scFv, fragmentos expresados por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos de dominio, los dominios V_H, los dominios V-NAR, dominios V_H, dominios V_L, y similares. Sin embargo, los fragmentos de anticuerpo de la invención no están limitados a estos tipos de ejemplo de fragmentos de anticuerpo.

Un anticuerpo de dominio comprende una unidad de unión funcional de un anticuerpo y puede corresponder a las regiones variables de cualquiera de las cadenas pesada (V_H) o ligera (V_L) de anticuerpos. Un anticuerpo de dominio puede tener un peso molecular de aproximadamente 13 kDa o aproximadamente una décima parte de un anticuerpo completo. Los anticuerpos de dominio se pueden derivar de anticuerpos completos tales como los descritos en el presente documento. Los fragmentos de unión a antígeno en algunas realizaciones son monoméricos o poliméricos, biespecíficos o trispecíficos, bivalentes o trivalentes.

Los fragmentos de anticuerpo que contienen la unión al antígeno, o idiotipo, de la molécula de anticuerpo pueden generarse mediante técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, tales fragmentos incluyen, pero no se limitan a, el fragmento $F(ab')_2$ que puede producirse mediante digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo; los fragmentos Fab' que pueden generarse reduciendo los puentes disulfuro del fragmento $F(ab')_2$ y los dos fragmentos Fab' que pueden generarse tratando la molécula de anticuerpo con papaina y un agente reductor.

Se puede generar un fragmento de anticuerpo de fragmento de la región variable de cadena única (sFv) fragmento de anticuerpo, que consiste en un fragmento Fab truncado que comprende el dominio variable (V) de una cadena pesada del anticuerpo unido a un dominio V de una cadena ligera del anticuerpo mediante un péptido sintético utilizando técnicas de rutina de la tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Janeway et al., mencionado anteriormente). Del mismo modo, los fragmentos de la región variable estabilizados con disulfuro (dsFv) se pueden preparar mediante tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo Reiter et al., Protein Engineering, 7, 697–704 (1994)).

Los fragmentos de anticuerpos recombinantes, *por ejemplo*, scFv, también pueden diseñarse para montarlos en oligómeros multiméricos estables de alta avidéz y especificidad de unión para diferentes antígenos diana. Tales diacuerpos (dímeros), triacuerpos (trímeros) o tetracuerpos (tetrámeros) son bien conocidos en la técnica, véase, por ejemplo, Kortt et al., Biomol Eng. 2001 18:95–108, (2001) y Todorovska et al., J Immunol Methods. 248:47–66, (2001).

Los anticuerpos biespecíficos (bscAb) son moléculas que comprenden dos fragmentos Fv de una sola cadena unidos a través de un enlazador de glicina-serina usando métodos recombinantes. Los dominios V de la cadena ligera (V_L) y V de la cadena pesada (V_H) de dos anticuerpos de interés en las realizaciones de ejemplo se aíslan usando métodos de PCR estándar. El ADNc de V_L y V_H obtenido de cada hibridoma se unen para formar un fragmento de una sola cadena en una PCR de fusión de dos etapas. Las proteínas de fusión biespecíficas se preparan de un modo similar. Los anticuerpos monocatenarios biespecíficos y las proteínas de fusión biespecíficas son sustancias de anticuerpo incluidas dentro del alcance de la presente invención. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos se muestran en la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2005-0282233A1 y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos WO 2005/087812, ambas solicitudes incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad.

Métodos de producción de anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno

Los métodos adecuados para preparar anticuerpos se conocen en la técnica. Por ejemplo, se describen métodos de hibridoma estándar en, por ejemplo, Harlow y Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), y CA. Janeway et al. Immunobiology, 5ª Ed., Garland Publishing, Nueva York, NY (2001)).

En resumen, un anticuerpo policlonal se prepara inmunizando un animal con un inmunógeno que comprende un polipéptido de la presente invención y recogiendo el antisuero de dicho animal inmunizado. Para la producción de

antisuero se puede usar un amplio abanico de especies animales. En algunos aspectos, un animal usado para la producción de anti-antisuero es un animal no humano, incluidos conejos, ratones, ratas, hámsteres, cabras, ovejas, cerdos o caballos. Dado el volumen relativamente grande de sangre de los conejos, un conejo es una elección preferida para la producción de anticuerpos policlonales. En un método de ejemplo para generar un antisuero policlonal inmunorreactivo con el epítipo elegido de la β integrina, se emulsionan 50 μg de antígeno de β integrina en adyuvante completo de Freund para la inmunización de los conejos. A intervalos de, por ejemplo, 21 días, se emulsionan 50 μg del epítipo se emulsionan en adyuvante incompleto de Freund para refuerzos. Se puede obtener antisuero policlonal después de dejar tiempo para la generación de anticuerpos, simplemente extrayendo sangre del animal y preparando muestras de suero de sangre entera.

Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar usando cualquier técnica que proporcione la producción de moléculas de anticuerpos mediante líneas celulares continuas en cultivo. Estas incluyen, pero no se limitan a, la técnica del hibridoma descrita originalmente por Kohler y Milstein (Nature 256: 495–497, 1975), la técnica del hibridoma de células B humanas (Kosbor et al., Immunol Today 4:72, 1983; Cote et al., Proc Natl Acad Sci 80: 2026–2030, 1983) y la técnica del hibridoma de EBV (Cole et al, 1985, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan Liss Inc, Nueva York N.Y., pp 77–96, (1985).

En pocas palabras, en realizaciones de ejemplo, para generar anticuerpos monoclonales, se inyecta un ratón periódicamente β integrina recombinante contra la cual se deben producir los anticuerpos (por ejemplo, 10 a 20 μg emulsionados en adyuvante completo de Freund). Se administra al ratón un refuerzo final previo a la fusión de un polipéptido de la β integrina en PBS y cuatro días más tarde se sacrifica al ratón y se extirpa el bazo. El bazo se introduce en 10 ml de medio RPM1 1640 sin suero y se forma una única suspensión de células mediante molturación del bazo entre los extremos helados de dos portaobjetos de microscopio de vidrio sumergidos en medio RPM1 1640 sin suero suplementado con L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, 100 unidades / ml de penicilina, y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de estreptomycin (RPM1) (Gibco, Canadá). La suspensión celular se filtra a través de un filtro estéril de células Nitex de malla 70 (Becton Dickinson, Parsippany, N.J.), y se lava dos veces mediante centrifugación a 200 g durante 5 minutos y resuspendiendo el sedimento en 20 ml de medio RPM1 sin suero. Los esplenocitos extraídos de tres ratones Balb/c no tratados previamente se preparan de una manera similar y se utilizan como control. Las células de mieloma NS-1, mantenidas en fase log en RPM1 con 11 % de suero bovino fetal (FBS) (Hyclone Laboratories, Inc., Logan, Utah) durante tres días antes de la fusión se centrifugan a 200 g durante 5 minutos y el sedimento se lava dos veces.

Las células de bazo (1×10^8) se combinan con $2,0 \times 10^7$ células NS-1 y se centrifugan, y se aspira el sobrenadante. El sedimento celular se suelta golpeando suavemente el tubo y se añade 1 ml de PEG 1500 a 37 °C (50 % en Heces 75 mM, pH 8,0) (Boehringer Mannheim) con agitación durante 1 minuto, seguido de la adición de 7 ml de medio RPM1 sin suero durante 7 minutos. Se añaden 8 ml adicionales de RPM1 y las células se centrifugan a 200 g durante 10 minutos. Después de desechar el sobrenadante, el sedimento se resuspende en 200 ml de RPM1 que contiene 15 % de FBS, hipoxantina sódica 100 μM , aminopterina 0,4 mM, timidina 16 μM (HAT) (Gibco), 25 unidades / ml de IL-6 (Boehringer Mannheim) y $1,5 \times 10^6$ esplenocitos / ml y se siembran en 10 placas de cultivo tisular de 96 pocillos de fondo plano de Corning (Corning, Corning N.Y.).

Los días 2, 4 y 6, después de la fusión se extraen 100 μl de medio de los pocillos de las placas de fusión y se reemplazan con medio recién preparado. El día 8, la fusión se criba mediante ELISA y se analiza para determinar la presencia de unión de IgG de ratón a la β integrina del siguiente modo. Las placas Immulon 4 (Dynatech, Cambridge, Mass.) se revisten durante 2 horas a 37 °C con 100 ng / pocillo de β integrina diluida en Tris 25 mM a pH 7,5. La solución de revestimiento se aspira y se añaden 200 μl / pocillo de solución de bloqueo (0,5 % de gelatina de piel de pescado (Sigma) diluida en CMF-PBS) y se incuban durante 30 minutos a 37 °C. Las placas se lavan tres veces con PBS con 0,05 % de Tween 20 (PBST) y se añaden 50 μl del sobrenadante del cultivo. Después de incubar a 37 °C durante 30 minutos y lavar como se ha indicado anteriormente se añaden 50 μl de IgG anti-ratón de cabra (fc) conjugada con peroxidasa de rábano (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA) diluida a 1:3500 en PBST. Las placas se incuban como se ha citado anteriormente, se lavan cuatro veces con PBST y se añaden 100 μl de sustrato, que consiste en 1 mg / ml de o-fenilendiamina (Sigma) y 0,1 l $\mu\text{l}/\text{ml}$ de H_2O_2 al 30% en citrato 100 mM a pH 4,5. La reacción de color se detuvo después de 5 minutos con la adición de 50 μl de 15 % de H_2SO_4 . La A_{490} se lee en un lector de placas (Dynatech).

Los pocillos de fusión seleccionados se clonan dos veces mediante dilución en placas de 96 pocillos y puntuación visual del número de colonias / pocillo tras 5 días. Los anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas se isotipan mediante el sistema Isostrip (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.).

Cuando se emplea la técnica del hibridoma, pueden utilizarse líneas celulares de mieloma. Dichas líneas celulares adecuadas para usar en procedimientos de fusión productores de hibridoma son, preferentemente, no productores de anticuerpos, tienen una elevada eficiencia de fusión y deficiencias enzimáticas que las hacen incapaces de crecer en ciertos medios selectivos que soportan el crecimiento de únicamente las células fusionadas deseadas (hibridomas). Por ejemplo, cuando el animal inmunizado es un ratón, se puede usar P3–X63/Ag8, P3–X63–Ag8,653, NS1/1.Ag 4 1, Sp210–Ag14, FO, NSO/U, MPC–11, MPC11–X45–GTG 1,7 y S194/15XX0 Bul; para ratas se puede usar R210.RCY3, Y3–Ag 1,2,3, IR983F y 4B210; y U–266, GM1500–GRG2, LICR–LON–HMy2 y UC729–6 son

todos ellos útiles en relación con fusiones celulares. Cabe señalar que se contempla que los hibridomas y las líneas celulares producidos mediante tales técnicas para producir los anticuerpos monoclonales son nuevas composiciones de la invención.

5 Dependiendo de la especie huésped se puede usar varios adyuvantes para incrementar la respuesta inmunológica. Entre dichos adyuvantes se incluyen adyuvantes de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, y sustancias de superficie activa tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana y dinitrofenol. El BCG (bacilo de Calmette- Guerin) y *Corynebacterium parvum* también son adyuvantes humanos potencialmente útiles.

10 Como alternativa, en la materia se conocen otros métodos, tales como los métodos del hibridoma de EBV (Haskard y Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361–67 (1984) y Roder et al.5 Methods Enzymol., 121, 140–67 (1986)), y sistemas de expresión de vector bacteriófago (véase, por ejemplo, Huse et al., Science, 246, 1275–81 (1989)). Adicionalmente, se describen métodos de producción de anticuerpos en animales no humanos en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.545.806, 5.569.825 y 5.714.352, y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0197266 A1).

15 También se pueden producir anticuerpos mediante inducción de la producción *in vivo* de la población de linfocitos o mediante la detección selectiva de bibliotecas de inmunoglobulinas o paneles de reactivos de unión altamente específicos como se divulga en Orlandi et al., Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837 (1989), y Winter G. y Milstein C; Nature 349: 293–299, 1991).

20 La presentación en fagos también se puede utilizar para generar el anticuerpo. En este sentido, las bibliotecas de fagos que codifican dominios variables (V) de unión a antígeno de los anticuerpos se pueden generar utilizando técnicas de biología molecular estándar y de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Sambrook et al. (eds.), Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 3ª Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001)), Los fagos que codifican una región variable con la especificidad deseada se seleccionan según la unión específica al antígeno deseado y se reconstituye un anticuerpo completo o parcial que comprende el dominio variable seleccionado. Las secuencias de ácido nucleico que codifica el anticuerpo reconstituido se introducen en una línea celular adecuada, tal como una célula de mieloma usada para la producción del hibridoma, de forma que la célula secreta los anticuerpos que tienen las características de los anticuerpos monoclonales (véase, por ejemplo, Janeway et al., citado anteriormente, Huse et al., citado anteriormente y la patente de Estados Unidos 6.265.150). Métodos relacionados también se describen en la patente de Estados Unidos n.º 5.403.484; la patente de Estados Unidos n.º 5.571.698; la patente de Estados Unidos n.º 5.837.500; la patente de Estados Unidos n.º 5.702.892. Las técnicas descritas en la patente de Estados Unidos n.º 5.780.279; la patente de Estados Unidos n.º 5.821.047; la patente de Estados Unidos n.º 5.824.520; la patente de Estados Unidos n.º 5.855.885; la patente de Estados Unidos n.º 5.858.657; la patente de Estados Unidos n.º 5.871.907; la patente de Estados Unidos n.º 5.969.108; la patente de Estados Unidos n.º 6.057.098; la patente de Estados Unidos n.º 6.225.447.

30 Los anticuerpos pueden producirse en ratones transgénicos que son transgénicos para los genes específicos de inmunoglobulina de las cadenas pesada y ligera. Tales métodos se conocen en la técnica y se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 5.545.806 y 5.569.825, y Janeway et al., citado anteriormente.

35 Los métodos para generar anticuerpos humanizados son bien conocidos en la materia y se describen con detalle en, por ejemplo, Janeway et al., citado anteriormente, las patentes de Estados Unidos 5.225.539, 5.585.089 y 5.693.761, la patente europea n.º 0239400 B1 y la patente del Reino Unido n.º 2188638. Los anticuerpos humanizados también pueden generarse utilizando la tecnología de acondicionamiento anticuerpos descrita en la patente de Estados Unidos 5.639.641 y Pedersen et al., J. Mol. Biol, 235, 959–973 (1994).

40 Se pueden usar técnicas desarrolladas para la producción de “anticuerpos quiméricos”, el corte y empalme de genes de anticuerpos de ratón a genes de anticuerpos humanos para obtener una molécula con la especificidad antigénica y la actividad biológica adecuadas (Morrison et al., Proc Natl Acad Sci 81: 6851–6855, 1984; Neuberger et al., Nature 312: 604–608, 1984; Takeda et al., Nature 314: 452–454; 1985). Como alternativa, las técnicas descritas para la producción de anticuerpos de cadena sencilla (patente de EE.UU. 4.946.778) se pueden adaptar para producir anticuerpos de cadena sencilla específicos de la β integrina o de la subunidad α de la proteína G.

45 Un anticuerpo quimérico o humanizado preferido tiene una región constante humana, mientras que la región variable, o al menos una CDR, del anticuerpo deriva de una especie no humana. En la técnica se conocen métodos para humanizar anticuerpos no humanos (véanse las patentes de EE.UU. n.º 5.585.089 y 5.693.762). En general, un anticuerpo humanizado tiene uno o más restos de aminoácidos introducidos en su región marco procedentes de una fuente que no es humana. La humanización puede realizarse, por ejemplo, utilizando métodos descritos en Jones et al. (Nature 321: 522–525, 1986), Riechmann et al., (Nature, 332: 323–327, 1988) y Verhoeyen et al. (Science 239:1534–1536, 1988), sustituyendo al menos una porción de una región determinante de la complementariedad (CDR) de roedor para las regiones correspondientes de un anticuerpo humano. Se describen numerosas técnicas para la preparación de anticuerpos modificados por ingeniería en, *por ejemplo*, En Owens y Young, J. Immunol. Meth., 168:149–165 (1994). Después, se pueden introducir otros cambios en la estructura del anticuerpo para

modular la afinidad o la inmunogenicidad.

Asimismo, utilizando técnicas conocidas en la materia para aislar CDR se generan composiciones que comprenden CDR. Las regiones determinantes de complementariedad se caracterizan por seis bucles de polipéptidos, tres bucles de cada una de las regiones variables de las cadenas pesada o ligera. La posición del aminoácido en una CDR se define según Kabat et al., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," U.S. Department of Health and Human Services, (1983), que se incorpora en el presente documento por referencia. Por ejemplo, se ha definido que las regiones hipervariables de los anticuerpos humanos se encuentran aproximadamente en los restos 28 a 35, de 49–59 y de los restos 92–103 de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera (Janeway y Travers, Immunobiology, 2ª Edición, Garland Publishing, Nueva York, (1996)). La CDR murina también se encuentra aproximadamente en estos restos de aminoácidos. Se entiende en la materia que las regiones CDR se pueden encontrar dentro de varios aminoácidos de estos restos aproximados indicados anteriormente. Una región variable de inmunoglobulina también consiste en cuatro regiones "marco" que rodean a las CDR (FR1-4). Las secuencias de las regiones marco de diferentes cadenas ligeras o pesadas están muy conservadas dentro de una especie y también están conservadas entre las secuencias humanas y murinas.

Se generan composiciones que comprenden una, dos y/o tres CDR de una región variable de la cadena pesada o una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo monoclonal. Las técnicas para la clonación y expresión de secuencias de nucleótidos y de polipéptidos están bien establecidas en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989). Las secuencias de CDR amplificadas se ligan en un plásmido apropiado. El plásmido que comprende una, dos, tres, cuatro, cinco y / o seis CDR clonadas contiene opcionalmente regiones codificantes de polipéptidos adicionales unidas a la CDR.

Las regiones marco (FR) de un anticuerpo murino se humanizan mediante la sustitución de las regiones marco humanas compatibles elegidas de una gran base de datos de secuencias variables de anticuerpos humanos, incluyendo más de doscientas secuencias de V_H humana y más de mil secuencias de V_L . La base de datos de secuencias de anticuerpos utilizadas para la comparación se descarga desde la página web de Andrew C. R. Martin's KabatMan (<http://www.rubic.rdg.ac.uk/abs/>). El método de Kabat para identificar CDR proporciona un medio para delinear las CDR y las regiones marco aproximadas de cualquier anticuerpo humano y comparar la secuencia de un anticuerpo murino para determinar similitud con las CDR y las FR. Las secuencias V_H y V_L humanas mejor coincidentes se eligen sobre la base de un apareamiento general del marco, una longitud similar de la CDR y un apareamiento erróneo mínimo de los restos de contacto de V_H / V_L y canónicos. Las regiones marco humanas más similares a la secuencia murina se insertan entre la CDR murina. Como alternativa, la región de marco murina puede modificarse mediante sustituciones de aminoácidos de toda o parte de la región marco nativa que se parece más a una región marco de un anticuerpo humano.

Además, otra técnica útil para la generación de anticuerpos puede ser una que utilice un enfoque de tipo de diseño racional. El objetivo del diseño racional es producir análogos estructurales de polipéptidos biológicamente activos o compuestos con los que interactúan (agonistas, antagonistas, inhibidores, peptidomiméticos, parejas de unión, etc.). En un enfoque, se podría generar una estructura tridimensional para los anticuerpos o un fragmento de unión al epítipo de los mismos. Esto podría lograrse mediante cristalografía de rayos x, modelización por ordenador o a través de una combinación de ambos enfoques. Un enfoque alternativo, "exploración de alanina", implica la sustitución aleatoria de los restos a lo largo de la molécula por alanina, y el resultante efecto sobre la función determinada.

También es posible resolver la estructura cristalina de los anticuerpos específicos. En principio, este enfoque da un núcleo de fármaco en el que se basa el posterior diseño del fármaco. Es posible eludir la cristalografía de proteínas totalmente generando anticuerpos antiidiotípicos frente a un anticuerpo funcional farmacológicamente activo. Como imagen especular de una imagen especular, cabe esperar que el sitio de unión del anti-idiotipo sea un análogo del antígeno original. A continuación, el antiidiotipo podría usarse para identificar y aislar anticuerpos adicionales de bancos de péptidos producidos química o biológicamente.

Los anticuerpos biespecíficos construidos químicamente se pueden preparar mediante reticulación química de fragmentos Fab o $F(ab')_2$ heterólogos por medio de sustancias químicas tal como el reactivo heterobifuncional succinimidil-3-(2-piridilditiol-propionato) (SPDP, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.). Los fragmentos Fab y $F(ab')_2$ pueden obtenerse a partir de anticuerpos intactos mediante digestión con papaina o pepsina, respectivamente (Karpovsky et al., J. Exp. Med. 160:1686–701, 1984; Titus et al., J. Immunol., 138:4018–22, 1987).

Los métodos de análisis de anticuerpos para determinar la capacidad de unirse al epítipo de la β integrina independientemente de cómo se producen los anticuerpos se conocen en la técnica e incluyen cualquier ensayo de unión antígeno-anticuerpo, tales como, por ejemplo, radioinmunoensayo (RIA), ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación y ensayos de inhibición competitiva (véase, por ejemplo, Janeway et al., más adelante y la publicación de solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2002/0197266 A1).

Aptámeros

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G es un análogo de un anticuerpo. En algunos aspectos, el compuesto es un aptámero. Los recientes avances en el campo de las ciencias combinatorias han identificado secuencias poliméricas cortas (por ejemplo, moléculas de ácido oligonucleico o de péptidos) con alta afinidad y especificidad para un objetivo dado. Por ejemplo, se ha usado la tecnología SELEX para identificar aptámeros de ADN y ARN con propiedades de unión que rivalizan con las de los anticuerpos de mamíferos, el campo de la inmunología ha generado y aislado anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se unen a un gran número de compuestos y la expresión en fagos se ha utilizado para descubrir nuevas secuencias de péptidos con propiedades de unión muy favorables. Basado en el éxito de estas técnicas de evolución molecular, lo cierto es que pueden crearse moléculas que se unen a cualquier molécula diana. A menudo una estructura de bucle está implicada en la provisión de las características de unión deseadas como en el caso de: aptámeros que a menudo utilizan los bucles en horquilla creados a partir de regiones cortas y sin apareamiento de bases complementarias, anticuerpos de origen natural que utilizan la disposición combinatoria de las regiones hipervariables en bucle y nuevas bibliotecas de expresión en fagos que utilizan péptidos cíclicos que han mostrado mejores resultados en comparación con los resultados de la expresión en fagos de péptidos lineales. Por lo tanto, se ha generado suficiente para sugerir que se pueden crear ligandos de alta afinidad e identificarlos mediante técnicas de evolución molecular combinatoria. Las técnicas de evolución molecular se pueden utilizar para aislar compuestos específicos para las β integrinas o las subunidades α de proteína G descritas en el presente documento que inhiben la interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G. Para más información sobre los aptámeros, véase, en general, Gold, L., Singer, B., He, Y. Y., Brody, E., "Aptamers As Therapeutic And Diagnostic Agents," J. Biotechnol. 74:5-13 (2000). Las técnicas relevantes para la generación de aptámeros se pueden encontrar en la patente de Estados Unidos n.º 6.699.843, que se incorpora por referencia en su totalidad.

Epítomos

Por "epítomo", como se usa en el presente documento, se quiere decir la región de o dentro de la integrina P o la subunidad α de la proteína G que se une a través del compuesto, por ejemplo, el anticuerpo, el fragmento de unión al antígeno, el aptámero. En algunas realizaciones, el epítomo es un epítomo lineal. Por "epítomo lineal" como se usa en el presente documento se refiere a la región de o dentro de la β integrina o la subunidad α de la proteína G que se une a través del compuesto, cuya región está compuesta por aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de la β integrina o la subunidad α de la proteína G. Los aminoácidos de un epítomo lineal se encuentran próximos unos a otros en la estructura primaria del antígeno y la o las estructuras secundarias y / o terciarias del antígeno. Por ejemplo, cuando el antígeno, por ejemplo, la β integrina o la subunidad α de la proteína G, está en su estado plegado apropiadamente (por ejemplo, su conformación nativa), los aminoácidos contiguos del epítomo lineal están situados en estrecha proximidad entre sí.

En otros aspectos, el epítomo de la construcción de unión es un epítomo conformacional. Por "epítomo conformacional" se entiende un epítomo que está compuesto por aminoácidos que se encuentran en estrecha proximidad entre sí solo cuando la β integrina o la subunidad α de la proteína G está en su estado correctamente plegado, pero no son aminoácidos contiguos de la amino secuencia de aminoácidos de la β integrina o la subunidad α de la proteína G.

El compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de la proteína G se une a un epítomo de una β integrina. En algunos aspectos, el epítomo al que se une el compuesto está dentro del dominio citoplásmico de una β integrina. En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro del dominio citoplásmico de una P_{1A} integrina, β_{1D} integrina, β_2 integrina, β_3 integrina, β_5 integrina, β_6 integrina o β_7 integrina. En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 738-777 de una β_{1A} integrina (SEQ ID NO: 12) o los aminoácidos 732-778 de una β_{1A} integrina (SEQ ID NO: 12). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 738-776 de una β_{1D} integrina (SEQ ID NO: 13) o los aminoácidos 732-781 de una β_{1D} integrina (SEQ ID NO: 13). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 702-746 de una β_2 integrina (SEQ ID NO: 14) o los aminoácidos 702-747 de una β_2 integrina (SEQ ID NO: 14). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 722-761 de una β_3 integrina (SEQ ID NO: 15) o los aminoácidos 716-762 de una β_3 integrina (SEQ ID NO: 15). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 720-765 de una β_5 integrina (SEQ ID NO: 16) o los aminoácidos 720-776 de una β_5 integrina (SEQ ID NO: 16). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 710-755 de una β_6 integrina (SEQ ID NO: 17) o los aminoácidos 710-767 de una β_6 integrina (SEQ ID NO: 17). En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de los aminoácidos 728-773 de una β_7 integrina (SEQ ID NO: 18) o los aminoácidos 728-779 de una β_7 integrina (SEQ ID NO: 18).

En realizaciones de ejemplo la divulgación, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G se une a un epítomo de la subunidad α de proteína G. En algunos aspectos, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de la región interruptor 1 de una subunidad α de proteína G. En aspectos de ejemplo, el epítomo al que se une el compuesto está dentro de la región interruptor 1 de una subunidad

α de proteína G $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$. En aspectos de ejemplo, el compuesto se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 201–216 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11) o los aminoácidos 197-212 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 197-209 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10) o los aminoácidos 198-206 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto se une a un epítipo dentro de los aminoácidos 203-211 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11).

En aún otras realizaciones, el compuesto que inhibe la interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G se une a un epítipo que comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los péptidos o análogos de péptidos descritos en el presente documento. Véase, por ejemplo, la sección titulada "*Fragmentos de β Integrina o subunidad α de proteína G y derivados de los mismos.*" En aspectos de ejemplo, el compuesto que inhibe la interacción de unión entre una β integrina y subunidad α de la proteína G se une a un epítipo que comprende una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NOs: 19–40.

Péptidos

En algunas realizaciones, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de la proteína G es un péptido que comprende al menos cuatro aminoácidos conectados a través de enlaces peptídicos. En algunas realizaciones, el péptido tiene una longitud de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos. En algunos aspectos, el compuesto tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos. En algunos aspectos, el compuesto tiene una longitud de aproximadamente de 5 a 20 aminoácidos. En algunas realizaciones, el péptido es un 5-mer, 6-mer, 7-mer, 8-mer, 9-mer-10-mer, 11-mer, 12-mer, 13-mer, 14-mer, 15-mer, 16-mer, 17-mer, 18-mer, 19-mer, o 20-mer.

Fragmentos de β Integrina o subunidad α de proteína G y derivados de los mismos

En algunas formas de realización, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende un fragmento o es un fragmento de una β integrina humana silvestre, por ejemplo, cualquiera de los divulgados en el presente documento. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "fragmento" no abarca una β integrina de longitud completa o una subunidad α de proteína G de longitud completa. En algunos aspectos, el compuesto comprende o es un fragmento de una β_{1A} integrina, β_{1D} integrina, β_2 integrina, β_3 integrina, β_5 integrina, β_6 integrina o β_7 integrina. En aspectos específicos, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de un dominio citoplásmico de una β integrina.

En realizaciones de ejemplo de la divulgación, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos del dominio citoplásmico de una β_{1A} integrina, β_{1D} integrina, β_2 integrina, β_3 integrina, β_5 integrina, β_6 integrina o β_7 integrina. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 738 a 777 de una β_{1A} integrina (SEQ ID NO: 12) o los aminoácidos 732–778 de una β_{1A} integrina (SEQ ID NO: 12). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 738 a 776 de una β_{1D} integrina (SEQ ID NO: 13) o los aminoácidos 732-781 de una β_{1D} integrina (SEQ ID NO: 13). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 702–746 de una β_2 integrina (SEQ ID NO: 14) o los aminoácidos 702-747 de una β_2 integrina (SEQ ID NO: 14). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 722-761 de una β_3 integrina (SEQ ID NO: 15) o los aminoácidos 716-762 de una β_3 integrina (SEQ ID NO: 15). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 720–765 de una β_5 integrina (SEQ ID NO: 16) o los aminoácidos 720-776 de una β_5 integrina (SEQ ID NO: 16). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 710–755 de una β_6 integrina (SEQ ID NO: 17) o los aminoácidos 710-767 de una β_6 integrina (SEQ ID NO: 17). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 728–773 de una β_7 integrina (SEQ ID NO: 18) o los aminoácidos 728-779 de una β_7 integrina (SEQ ID NO: 18).

En realizaciones de ejemplo de la divulgación, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de la subunidad α de proteína G. En algunos aspectos, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de la región interruptor 1 de la subunidad α de la proteína G. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de la región interruptor 1 de la subunidad α de la proteína G $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 201–216 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11) o los aminoácidos 197-212 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 197-209 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10) o los aminoácidos 198-206 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 203-211 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11).

En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo de tres aminoácidos que es una porción o fragmento de un dominio citoplasmático de la β integrina. Por ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo idéntica a los aminoácidos 731-733 de la secuencia de aminoácidos de la β_3 integrina (SEQ ID NO: 15), que es EEE. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo idéntica a los aminoácidos 747-749 de la secuencia de aminoácidos de la P_{1A} integrina (SEQ ID NO: 12) o β_{1D} integrina (SEQ ID NO: 13), los aminoácidos 717-719 de la secuencia de aminoácidos de la β_2 integrina (SEQ ID NO: 14) o los aminoácidos 743-745 de la secuencia de aminoácidos de la β_2 integrina (SEQ ID NO: 18), cada uno de los cuales es EKE. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo idéntica a los aminoácidos 725-727 de la secuencia de aminoácidos de la β_6 integrina (SEQ ID NO: 17), que es EAE. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo idéntica a los aminoácidos 735-737 de la secuencia de aminoácidos de la β_5 integrina (SEQ ID NO: 16), que es QSE.

En realizaciones de ejemplo, el compuesto comprende los aminoácidos adicionales en N-terminal y / o en C-terminal a la secuencia del núcleo. Los aminoácidos adicionales, por ejemplo, las secuencias que no son del núcleo pueden representar aminoácidos que están en N-terminal y / o C-terminal de la secuencia del núcleo de la secuencia de aminoácidos de la β integrina. Por ejemplo, el compuesto puede comprender una secuencia del núcleo de EEE (aminoácidos 731 A 733 de la secuencia de aminoácidos de la β_3 integrina (SEQ ID NO: 15) y puede comprender adicionalmente una secuencia que no es del núcleo en N-terminal que comprende KF (Lys-Phe) y / o una secuencia que no es del núcleo en C-terminal que comprende RA (Arg-Ala). De acuerdo con lo anterior, el compuesto en aspectos de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos de KFEED (SEQ ID NO: 19), KFEEDRA (SEQ ID NO: 20), EEERA (SEQ ID NO: 21). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos de KFEEDARAKWDT (SEQ ID NO: 22).

En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo de EKE y comprende una secuencia que no es del núcleo en N-terminal que comprende KF (Lys-Phe) o RF (Arg-Phe) y/o una secuencia que no es del núcleo en C-terminal que comprende KM (Lys-Met), KL (Lys-Leu), o QQ (Gln-Gln). De acuerdo con lo anterior, el compuesto en aspectos de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos de KFEKE (SEQ ID NO: 23), RFEKE (SEQ ID NO: 24), KFEKEKM (SEQ ID NO: 25), KFEKEKL (SEQ ID NO: 26), KFEKEQQ (SEQ ID NO: 27), RFEKEKM (SEQ ID NO: 28), RKFEKEKL (SEQ ID NO: 29), RFEKEQQ (SEQ ID NO: 30), EKEKM (SEQ ID NO: 31), EKEKL (SEQ ID NO: 32), o EKEQQ (SEQ ID NO: 33).

En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo de EAE y comprende una secuencia que no es del núcleo en N-terminal que comprende KF (Lys-Phe) y/o una secuencia que no es del núcleo en C-terminal que comprende RS (Arg-Ser). De acuerdo con lo anterior, el compuesto en aspectos de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos de KFEAE (SEQ ID NO: 34), KFEAERS (SEQ ID NO: 35), o EAERS (SEQ ID NO: 36).

En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia del núcleo de QSE y comprende una secuencia que no es del núcleo en N-terminal que comprende KF (Lys-Phe) y/o una secuencia que no es del núcleo en C-terminal que comprende RS (Arg-Ser). De acuerdo con lo anterior, el compuesto en aspectos de ejemplo comprende la secuencia de aminoácidos de KFQSE (SEQ ID NO: 37), KFQSERS (SEQ ID NO: 38), or QSERS (SEQ ID NO: 39).

En realizaciones alternativas o adicionales, el compuesto comprende una secuencia que no es del núcleo que no se basa en la secuencia de silvestre de la β integrina. En aspectos de ejemplo, el compuesto puede comprender una secuencia del núcleo de EEE (aminoácidos 731 A 733 de la secuencia de aminoácidos de la β_3 integrina (SEQ ID NO: 15) y puede comprender adicionalmente una secuencia que no es del núcleo en N-terminal distinta de KF (Lys-Phe) y / o una secuencia que no es del núcleo en C-terminal distinta de RA (Arg-Ala).

En realizaciones de ejemplo, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende un fragmento o es un fragmento de una subunidad α de proteína G humana silvestre, por ejemplo, $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$. En algunos aspectos, el compuesto comprende o es un fragmento de $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$. En aspectos específicos, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de la región interruptor 1 de la subunidad α de la proteína G.

En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de la región interruptor 1 de la subunidad α de la proteína G $G\alpha_{12}$ o $G\alpha_{13}$. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 201-216 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11) o los aminoácidos 197-212 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 197-209 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10) o los aminoácidos 198-206 de $G\alpha_{13}$ (SEQ ID NO: 10). En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende de 4 a 50 (por ejemplo, de 5 a 25) aminoácidos consecutivos de los aminoácidos 203-211 de $G\alpha_{12}$ (SEQ ID NO: 11). En algunos aspectos, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos de LLARRPTKGIHEY (SEQ ID NO: 40).

En algunas realizaciones, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos de una β

integrina humana silvestre, o un fragmento de la misma, pero difiere en una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más) posiciones de aminoácidos, cuando se alinea con la secuencia de la β integrina humana silvestre o fragmento de la misma.

- 5 En algunas formas de realización, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de la proteína G comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 25 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una β integrina humana silvestre, por ejemplo, la SEQ ID NO: 15, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 4 a aproximadamente 50 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con la SEQ ID NO: 15, o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 4 a aproximadamente 25 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 15). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con cualquiera de las SEQ ID NO: 12–18, o un fragmento de las mismas (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 4 a aproximadamente 25 aminoácidos contiguos de las SEQ ID NOs:12–18). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con una cualquiera de las SEQ ID NO: 19–39.

En algunas realizaciones, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G comprende una secuencia de aminoácidos que se basa en la secuencia de aminoácidos de una subunidad α de proteína G humana silvestre, o un fragmento de la misma, pero difiere en una o más (por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, o más) posiciones de aminoácidos, cuando se alinea con la secuencia de subunidad α de proteína G humana silvestre o fragmento de la misma. En algunas formas de realización, el péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de la proteína G comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 25 % de identidad de secuencia con la secuencia de aminoácidos de una subunidad α de proteína G humana silvestre, por ejemplo, la SEQ ID NO: 10 u 11 o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 4 a aproximadamente 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 10 u 11). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con la SEQ ID NO: 10 u 11 o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento de aproximadamente 4 a aproximadamente 10 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 10 u 11). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con los aminoácidos 201–216 de G α ₁₂ (SEQ ID NO: 11) o los aminoácidos 197-212 de G α ₁₃ (SEQ ID NO: 10), los aminoácidos 197-209 de G α ₁₃ (SEQ ID NO: 10) o los aminoácidos 198-206 de G α ₁₃ (SEQ ID NO: 10), los aminoácidos 203-211 de G α ₁₂ (SEQ ID NO: 11). En algunas realizaciones, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos que es de al menos 30 al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, o tiene una identidad de secuencia superior al 95 % con la SEQ ID NO: 40.

- 45 En realizaciones de ejemplo, el compuesto comprende una secuencia de aminoácidos:

Xaa₁ Xaa₂ Glu,

en la que Xaa₁ es Glu o Gln y Xaa₂ es Glu, Lys, Ser, o Ala. En aspectos de ejemplo, (i) Xaa₁ es Glu y Xaa₂ es Glu, Lys, o Ala or (ii) Xaa₁ es Gln y Xaa₂ es Ser. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una extensión de dos aminoácidos Xaa₋₁ Xaa₀ en N-terminal a Xaa₁ Xaa₂ Glu. En aspectos de ejemplo, Xaa₋₁ de la extensión en N-terminal es Lys o Arg. En aspectos de ejemplo, Xaa₀ de la extensión en N-terminal es Phe. En aspectos de ejemplo, el compuesto comprende una extensión de dos aminoácidos Xaa₃ Xaa₄ en C-terminal a Xaa₁ Xaa₂ Glu. En aspectos de ejemplo, Xaa₃ de la extensión en C-terminal es Lys, Arg o Gln. En aspectos de ejemplo, Xaa₄ de la extensión en C-terminal es Met, Leu, Ala, Ser o Gln. De acuerdo con lo anterior, en aspectos de ejemplo de la invención, el compuesto comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: HDRKEFAKFEEERARAKWDT (SEQ ID NO: 83) KFEERARAKWDT (SEQ ID NO: 22); KFEERA (SEQ ID NO: 20); y EEERA (SEQ ID NO: 21).

En realizaciones de ejemplo, el compuesto comprende la secuencia de aminoácidos de X₁X₂X₃X₄X₅X₆X₇KX₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂ (SEQ ID NO: 44). En aspectos de ejemplo, cada uno de X₁, X₂, X₃, X₈, y X₉ es independientemente un aminoácido alifático. En aspectos de ejemplo, cada uno de X₄, X₅ y X₁₀ es independientemente un aminoácido básico. En aspectos de ejemplo, X₆ es Pro. En aspectos de ejemplo, X₇ y X₁₂ son independientemente un aminoácido que contiene hidroxilo. En aspectos de ejemplo, X₁₁ es un aminoácido ácido. En aspectos de ejemplo, cada uno de X₁, X₂, X₃, X₈, y X₉ se selecciona independientemente del grupo que consiste en L, A, G, y I. En aspectos de ejemplo, cada uno de X₄, X₅, y X₁₀ se selecciona independientemente del grupo que consiste en R y H. En aspectos de ejemplo, X₇ y X₁₂ es independientemente T o Y. aspectos de ejemplo,

X₁₁ es E o D. En consecuencia, en aspectos de ejemplo, el compuesto comprende la secuencia de aminoácidos de LLARRPTKGIHEY (SEQ ID NO: 45).

Modificaciones peptídicas adicionales

5 En realizaciones adicionales de la invención, el péptido se lipida (por ejemplo, miristoila, palmitoila), glicosila, amida, carboxila, fosforila, esterifica, acila, acetila, cicla, o convierte en una sal de adición de ácido y / u opcionalmente dimeriza o polimeriza, o conjuga, como se describe adicionalmente en el presente documento.

10 En algunos aspectos, el primer aminoácido del péptido se miristoila en el que el grupo -NH₂ alfa en el extremo N de un péptido no modificado se une a un miristato.

Análogos peptídicos

15 En algunas realizaciones de la divulgación, el compuesto es un análogo peptídico que tiene una estructura basada en uno de los péptidos divulgados en el presente documento (el "péptido parental"), pero difiere de la del péptido parental en uno o más aspectos. De acuerdo con lo anterior, como aprecia un experto en la materia, las enseñanzas de los péptidos parentales proporcionados en el presente documento también pueden ser aplicables a los análogos peptídicos.

20 En algunos aspectos, el análogo peptídico comprende la estructura de un péptido parental, excepto que el análogo peptídico comprende uno o más enlaces no peptídicos en lugar de enlaces peptídicos. En aspectos de ejemplo, el análogo peptídico comprende en lugar de un enlace peptídico, un enlace éster, un enlace éter, un enlace tioéter, un enlace amida, y similares. En algunos aspectos, el análogo peptídico es un depsipéptido que comprende un enlace éster en lugar de un enlace peptídico.

30 En algunos aspectos, el análogo peptídico comprende la estructura de un péptido parental descrito en el presente documento, excepto en que el análogo peptídico comprende una o más sustituciones de aminoácidos, por ejemplo, una o más sustituciones de aminoácidos conservadoras. En la materia se conocen sustituciones conservadoras de aminoácidos e incluyen sustituciones de aminoácidos en las que se intercambia un aminoácido que tiene ciertas propiedades físicas y / o químicas por otro aminoácido que tiene las mismas propiedades químicas o físicas. Por ejemplo, la sustitución conservadora de un aminoácido puede ser un aminoácido ácido sustituido por otro aminoácido ácido (por ejemplo, Asp o Glu), un aminoácido con una cadena lateral no polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral no polar (por ejemplo, Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, etc.), un aminoácido básico sustituido por otro aminoácido básico (Lys, Arg, etc.), un aminoácido con una cadena lateral polar sustituido por otro aminoácido con una cadena lateral polar (Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, etc.), etc.

40 En algunos aspectos, el análogo peptídico comprende uno o más aminoácidos sintéticos, por ejemplo, un aminoácido no nativo a un mamífero. Los aminoácidos sintéticos incluyen β-alanina (β-Ala), N-α-metil-alanina (Me-Ala), ácido aminobutírico (Abu), ácido γ-aminobutírico (γ-Abu), ácido aminohexanoico (E-Ahx), ácido aminoisobutírico (Aib), ácido carboxílico aminometilpirrol, ácido aminopiperidincarboxílico, aminoserina (Ams), ácido aminotetrahidropiran-4-carboxílico, arginina N-metoxi-N-metil amida, ácido β-aspártico (β-Asp), ácido azetidincarboxílico, 3-(2-benzotiazolil)alanina, α-*tert*-butilglicina, ácido 2-amino-5-ureido-n-valérico (citrulina, Cit), β-ciclohexilalanina (Cha), acetamidometil-cisteína, ácido diaminobutanoico (Dab), ácido diaminopropiónico (Dpr), dihidroxifenilalanina (DOPA), dimetiltiazolidina (DMTA), ácido γ-glutámico (γ-Glu), homoserina (Hse), hidroxiprolina (Hyp), isoleucina N-metoxi-N-metilamida, metil-isoleucina (Melle), ácido isonipecótico (Isn), metil-leucina (MeLeu), metil-lisina, dimetil-lisina, trimetil-lisina, metanoprolina, metionina-sulfóxido (Met(O)), metionina-sulfona (Met(O₂)), norleucina (Nle), metil-norleucina (Me-Nle), norvalina (Nva), ornitina (Orn), ácido para-aminobenzoico (PABA), penicilamina (Pen), metilfenilalanina (MePhe), 4-clorofenilalanina (Phe(4-Cl)), 4-fluorofenilalanina (Phe(4-F)), 4-nitrofenilalanina (Phe(4-NO₂)), 4-cianofenilalanina ((Phe(4-CN)), fenilglicina (Phg), piperidinilalanina, piperidinilglicina, 3,4-dehidroprolina, pirrolidinilalanina, sarcosina (Sar), selenocisteína (Sec), O-bencil-fosfoserina, ácido 4-amino-3-hidroxi-6-metiheptanoico (Sta), ácido 4-amino-5-ciclohexil-3-hidroxipentanoico (ACHPA), ácido 4-amino-3-hidroxi-5-fenilpentanoico (AHPPA), ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolin-3-carboxílico (Tic), tetrahidropiranglicina, tienilalanina (Thi), O-bencil-fosfotirosina, O-fosfotirosina, metoxitirosina, etoxitirosina, O-(bis-dimetilamino-fosfono)-tirosina, tirosina sulfato tetrabutilamina, metil-valina (MeVal) y ácido 3-mercaptopropiónico alquilado.

60 En algunas realizaciones, el análogo peptídico comprende una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras y el análogo peptídico todavía funciona en un grado similar, en la misma medida, o un grado mejorado al del péptido parental. En ciertos aspectos, el análogo peptídico que comprende una o más sustituciones de aminoácidos no conservadoras inhibe la interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G en un grado mejor que el péptido parental.

65 En algunas realizaciones, y / o una o más inserciones o deleciones de aminoácidos, en referencia al péptido parental descrito en el presente documento. En algunas formas de realización, el análogo peptídico comprende una inserción de uno o más aminoácidos en el extremo N-o C en referencia al péptido parental. En algunas realizaciones, el

análogo peptídico comprende una deleción de uno o más aminoácidos en el extremo N-o C en referencia al péptido parental. En estos aspectos, el análogo peptídico todavía funciona en un grado similar, en la misma medida, o en mejor medida que el péptido parental para inhibir la interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G.

5 En algunos aspectos, el análogo peptídico es un peptidomimético. Los peptidomiméticos, así como los métodos de fabricación de los mismos, se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, *Advances in Amino Acid Mimetics and Peptidomimetics*, Volumes 1 and 2, ed., Abell, A., JAI Press Inc., Greenwich, CT, 2006. En algunos aspectos, el peptidomimético es un peptidomimético de D-péptido que comprende el D-isómero de los aminoácidos. En algunos
10 aspectos, el peptidomimético es un peptoide en el que la cadena lateral de un aminoácido está conectada al átomo de nitrógeno alfa de la cadena principal peptídica. Los métodos para fabricar peptoides se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, Zuckermann et al., *JACS* 114(26): 10646–10647 (1992) and *Design, Synthesis, and Evaluation of Novel Peptoids*, Fowler, Sarah, University of Wisconsin–Madison, 2008. En algunos aspectos, el peptidomimético es un β -péptido que comprende aminoácidos β que tienen su grupo amino unido al carbono β en lugar de al carbono
15 alfa. En la técnica se conocen métodos de fabricación de β -péptidos. Véase, por ejemplo, Seebach et al., *Helvetica Chimica Acta* 79(4): 913–941 (1996).

Sales farmacéuticamente aceptables

20 Los compuestos que inhiben una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G (compuestos que se denominan colectivamente en lo sucesivo "agentes activos") en algunos aspectos están en forma de una sal, por ejemplo, una sal farmacéuticamente aceptable. Dichas sales se pueden preparar *in situ* durante el aislamiento y purificación finales del agente activo o por separado haciendo reaccionar una función de base libre con un ácido adecuado. Ejemplos de ácidos que se pueden emplear para formar sales de adición de ácido
25 farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, un ácido inorgánico, por ejemplo, ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico y ácido fosfórico, y un ácido orgánico, por ejemplo ácido oxálico, ácido maleico, ácido succínico y ácido cítrico.

30 Las sales de adición de ácido representativas incluyen, entre otras, acetato, adipato, alginato, citrato, aspartato, benzoato, bencenosulfonato, bisulfato, butirato, canforato, canforsulfonato, digluconato, glicerofosfato, hemisulfato, heptanoato, hexanoato, fumarato, clorhidrato, bromhidrato, yodhidrato, 2-hidroxietanosulfonato (isotionato), lactato, maleato, metanosulfonato, nicotinato, 2-naftalenosulfonato, oxalato, palmitoato, pectinato, persulfato, 3-fenilpropionato, picrato, pivalato, propionato, succinato, tartrato, tiocianato, fosfato, glutamato, bicarbonato, p-tosilato y undecanoato.

35 También se pueden preparar *in situ* sales de adición básicas durante el aislamiento y la purificación finales del agente activo haciendo reaccionar un resto que contiene ácido carboxílico con una base adecuada tal como el hidróxido, carbonato o bicarbonato de un catión metálico farmacéuticamente aceptable o con amoníaco, o una amina orgánica primaria, secundaria o terciaria. Entre las sales de adición de base farmacéuticamente aceptables se
40 incluyen cationes basados en metales alcalinos y metales alcalino-térreos, tales como sales de litio, sodio, potasio, calcio, magnesio y aluminio y similares, y cationes de amonio cuaternario no tóxico y de amina, incluidos amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamonio, dimetilamonio, trimetilamonio, trietilamonio, dietilamonio y etilamonio entre otros. Otras aminas orgánicas representativas útiles para la formación de sales de adición de bases incluyen, por ejemplo, etilendiamina, etanolamina, dietanolamina, piperidina, piperazina y similares.

45 Adicionalmente, los grupos básicos que contienen nitrógeno pueden cuaternizarse con dichos agentes activos tales como haluros de alquilo inferior, tales como cloruros, bromuros y yoduros de metilo, etilo, propilo y butilo; haluros de cadena larga, tales como cloruros, bromuros y yoduros de decilo, laurilo, miristilo y estearilo, haluros de arilalquilo como bromuros de bencilo y fenetilo, y otros. De este modo se obtienen productos dispersables solubles en agua o
50 en aceite.

Aislados y purificados

55 Los compuestos que inhiben una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G pueden aislarse y/o purificarse. El término "aislado", como se usa en el presente documento significa que se ha extraído de su entorno natural. El término "purificado" tal como se usa en el presente documento significa que se ha incrementado su pureza, en el que la "pureza" es un término relativo y no debe interpretarse necesariamente como pureza absoluta. En aspectos de ejemplo, la pureza del compuesto (por ejemplo, en la composición) es al menos o
60 aproximadamente 50 %, al menos o aproximadamente 60 %, al menos o aproximadamente 70 %, al menos o aproximadamente 80 %, al menos o aproximadamente 90 %, o al menos o aproximadamente 95 %, o al menos o aproximadamente 98 % o es aproximadamente 100 %.

Métodos de fabricación de péptidos

65 Los péptidos de la presente divulgación pueden obtenerse mediante métodos conocidos en la materia. Los métodos adecuados de los péptidos de síntesis de novo se describen en, por ejemplo, Chan et al., *Fmoc Solid Phase Peptide*

Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005; Peptide and Protein Drug Analysis, ed. Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000; Epitope Mapping, ed. Westwood et al., Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000; y la patente de Estados Unidos n.º 5.449.752. Los métodos de ejemplo adicionales de fabricar los péptidos de la invención se exponen en el presente documento.

5 En algunas realizaciones, los péptidos descritos en el presente documento se sintetizan comercialmente por empresas, tales como Synpep (Dublín, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), Multiple Peptide Systems (San Diego, CA), Peptide 2.0 Inc. (Chantilly, VA), y American Peptide Co. (Sunnyvale, CA). A este respecto, los péptidos pueden ser sintéticos, recombinantes, aislados y / o purificados.

10 Además, en algunos aspectos, los péptidos se producen de manera recombinante utilizando un ácido nucleico que codifica la secuencia de aminoácidos del péptido utilizando métodos recombinantes estándar. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001; y Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994.

Ácidos nucleicos

20 En realizaciones de ejemplo, el compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de la proteína G comprende o es un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos o péptidos descritos en el presente documento (incluyendo análogos de los mismos). El ácido nucleico puede comprender cualquier secuencia de nucleótidos que codifica cualquiera de los anticuerpos, péptidos, o análogos de los mismos.

25 En realizaciones de ejemplo, el compuesto es un ácido nucleico que inhibe la expresión de la β integrina o la subunidad α de la proteína G. En aspectos de ejemplo, el compuesto es una molécula antisentido, un microARN (ARNmi), horquilla pequeña (ARNhp), y similares. En realizaciones de ejemplo de la invención, el compuesto es un ácido nucleico que inhibe la expresión de cualquiera de las β integrinas o subunidades α de proteína G descritas en el presente documento. En aspectos de ejemplo, el compuesto es una molécula de ARN de interferencia pequeño (ARNip). En algunos aspectos, el ARNip inhibe la expresión de $G\alpha_{13}$. Por ejemplo, el ARNip comprende la secuencia de SEQ ID NO: 7 o 8.

30 Por "ácido nucleico" tal como se utiliza en el presente documento incluye "polinucleótido", "oligonucleótido" y "molécula de ácido nucleico" y generalmente significa un polímero de ADN o ARN, que puede ser de cadena sencilla o de doble cadena, se sintetiza u obtiene (por ejemplo, se aísla y/o purifica) de fuentes naturales, que puede contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados, y que puede contener un enlace internucleótido natural, no naturales o alterado, tal como un enlace fosfoamidato o un enlace fosforotioato, en lugar del fosfodiéster encontrado entre los nucleótidos de un oligonucleótido no modificado. En algunas realizaciones, el ácido nucleico no comprende ninguna inserción, delección, inversión y/o sustitución. En otras realizaciones, el ácido nucleico comprende una o más inserciones, delecciones, inversiones, y / o sustituciones.

45 En algunos aspectos, los ácidos nucleicos de la invención son recombinantes. Tal como se usa en el presente documento, el término "recombinante" se refiere a (i) moléculas que se construyen fuera de las células vivas uniendo segmentos de ácidos nucleicos naturales o sintéticos a moléculas de ácido nucleico que pueden replicarse en una célula viva, o (ii) moléculas que son el resultado de la replicación de los descritos en (i) anteriormente. Para los fines del presente documento, la replicación puede ser replicación *in vitro* o replicación *in vivo*.

50 Los ácidos nucleicos en algunos aspectos se construyen sobre la base de la síntesis química y / o reacciones de ligación enzimática utilizando procedimientos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., citado anteriormente y Ausubel et al., citado anteriormente. Por ejemplo, un ácido nucleico puede sintetizarse químicamente usando nucleótidos de origen natural o nucleótidos modificados diversamente diseñados para aumentar la estabilidad biológica de las moléculas o para aumentar la estabilidad física del dúplex formado tras la hibridación (por ejemplo, derivados de fosforotioato y nucleótidos sustituidos con acridina). Los ejemplos de nucleótidos modificados que se pueden utilizar para generar los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a, 5-fluorouracilo, 5-bromouracilo, 5-clorouracilo, 5-yodouracilo, hipoxantina, xantina, 4-acetilcitosina, 5-(carboxihidroximetil)uracilo, 5-carboximetilaminometil-2-tiouridina, 5-carboximetilaminometiluracilo, dihidrouracilo, beta-D-galactosilqueosina, inosina, N⁶-isopenteniladenina, 1-metilguanina, 1-metilinosina, 2,2-dimetilguanina, 2-metiladenina, 2-metilguanina, 3-metilcitosina, 5-metilcitosina, adenina N-sustituida, 7-metilguanina, 5-metilammometiluracilo, 5-metoxiaminometil-2-tiouracilo, beta-D-manosilqueosina, 5'-metoxicarboximetiluracilo, 5-metoxiuracilo, 2-metiltio-N⁶-isopenteniladenina, ácido uracil-5-oxiacético (v), wibutoxosina, pseudouratilo, queosina, 2-tiocitosina, 5-metil-2-tiouracilo, 2-tiouracil, 4-tiouracilo, 5-metiluracilo, éster metílico de ácido uracil-5-oxiacético, 3-(3-amino-3-N-2-carboxipropil)uracilo y 2,6-diaminopurina. Como alternativa, uno o más de los ácidos nucleicos de la invención se pueden adquirir en empresas, tales como los Macromolecular Resources (Fort Collins, CO) y Synthegen (Houston, TX).

65

Vector de expresión recombinante

Los ácidos nucleicos en algunos aspectos se incorporan en un vector de expresión recombinante. A este respecto, la divulgación proporciona vectores de expresión recombinantes que comprenden cualquiera de los ácidos nucleicos divulgados en el presente documento. Para los propósitos del presente documento, el término "vector de expresión recombinante" significa una construcción de oligonucleótido o polinucleótido modificado genéticamente que permite la expresión de un ARNm, proteína, polipéptido o péptido por una célula huésped, cuando la construcción comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido, y el vector se pone en contacto con la célula en condiciones suficientes para expresar el ARNm, la proteína, el polipéptido o el péptido expresado dentro de la célula. Los vectores no son de origen natural como un todo. Sin embargo, las partes de los vectores pueden ser de origen natural. Los vectores de expresión recombinantes divulgados en el presente documento pueden comprender cualquier tipo de nucleótidos, incluyendo, pero sin limitaciones, ADN y ARN, que pueden ser de una cadena o de doble cadena, sintetizado u obtenido en parte a partir de fuentes naturales, y que pueden contener nucleótidos naturales, no naturales o alterados. Los vectores de expresión recombinantes pueden comprender enlaces internucleotídicos de origen natural, de origen no natural o ambos tipos de enlaces. En algunos aspectos, los nucleótidos alterados o los enlaces internucleotídicos no naturales no dificultan la transcripción o la replicación del vector.

El vector de expresión recombinante puede ser cualquier vector de expresión recombinante adecuado y se puede utilizar para transformar o transfectar cualquier huésped adecuado. Los vectores adecuados incluyen los diseñados para la propagación y la expansión o para la expresión o ambos, tales como plásmidos y virus. El vector se puede seleccionar del grupo que consiste en la serie de pUC (Fermentas Life Sciences), la serie de pBluescript (Stratagene, La Jolla, CA), la serie de pET (Novagen, Madison, WI), la serie de pGEX (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia) y la serie de pEX (Clontech, Palo Alto, CA). También se pueden usar vectores de bacteriófagos, tales como λ GT10, λ GTI 1, λ ZapII (Stratagene), λ EMBL4, y λ NMI 149. Ejemplos de vectores de expresión de plantas incluyen pBIO1, pBI101,2, pBIO1,3, pBI121 y pBIN19 (Clontech). Ejemplos de vectores de expresión de animales incluyen pEUK-CI, pMAM y pMAMneo (Clontech). En algunos aspectos, el vector de expresión recombinante es un vector viral, por ejemplo, un vector retroviral.

Los vectores de expresión recombinantes se pueden preparar utilizando técnicas de ADN recombinante estándar descritas en, por ejemplo, Sambrook et al., citado anteriormente y Ausubel et al., citado anteriormente. Las construcciones de los vectores de expresión, que son circulares o lineales, pueden prepararse para contener un sistema de replicación funcional en una célula huésped procarionta o eucariota. Los sistemas de replicación pueden derivar de, por ejemplo, ColE1, 2 μ plásmido, λ , SV40, virus del papiloma bovino, y similares.

En algunos aspectos, el vector de expresión recombinante comprende secuencias reguladoras, tales como codones de iniciación y terminación de la transcripción y de la traducción, que son específicos del tipo de huésped (por ejemplo, bacteria, hongo, planta, o animal) en el que el vector se va a introducir, según sea adecuado, y teniendo en cuenta si el vector está basado en ADN o ARN.

El vector de expresión recombinante puede incluir uno o más genes marcadores, que permiten la selección de los huéspedes transformados o transfectados. Los genes marcadores incluyen resistencia a biocidas, por ejemplo, resistencia a antibióticos, metales pesados, etc., la complementación en un huésped auxotrófico para proporcionar prototofía, y similares. Los genes marcadores adecuados para los vectores de expresión divulgados en el presente documento incluyen, por ejemplo, genes de resistencia a neomicina / G418, genes de resistencia a higromicina, genes de resistencia a histidinol, genes de resistencia a tetraciclina, y genes de resistencia a ampicilina.

El vector de expresión recombinante puede comprender un promotor nativo o normativo unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido (incluyendo porciones funcionales y variantes funcionales de los mismos), o a la secuencia de nucleótidos que es complementaria a o que se hibrida con la secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido. La selección de promotores, por ejemplo, fuerte, débil, inducible, específico de tejido y específico de desarrollo, está dentro de la experiencia ordinaria del artesano. Del mismo modo, la combinación de una secuencia de nucleótidos con un promotor está también dentro de la habilidad del artesano. El promotor puede ser un promotor no viral o un promotor viral, por ejemplo, un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor de SV40, un promotor de RSV, y un promotor que se encuentra en la repetición terminal larga del virus de células madre murino.

Los vectores de expresión recombinantes divulgados en el presente documento pueden diseñarse para la expresión transitoria, para la expresión estable, o para ambos. Además, los vectores de expresión recombinantes se pueden hacer para la expresión constitutiva o la expresión inducible. Adicionalmente, los vectores de expresión recombinantes se pueden hacer para incluir un gen suicida.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "gen suicida" se refiere a un gen que hace que la célula que expresa el gen suicida muera. El gen suicida, en algunos aspectos, es un gen que confiere sensibilidad a un agente, por ejemplo, un medicamento, en la célula en la que se expresa el gen, y hace que la célula muera cuando la célula entra en contacto o esté expuesta al agente. Los genes suicidas se conocen en la materia (véase, por

ejemplo, Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews. Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, Reino Unido), Humana Press, 2004) e incluyen, por ejemplo, el gen de la timidina cinasa (TK) del virus del herpes simple (VHS), citosina daminasa, nucleósido purina fosforilasa y nitroreductasa.

5

Células Huésped

En realizaciones de ejemplo, el compuesto es una célula que expresa el ácido nucleico de la invención, opcionalmente, en el que el ácido nucleico es parte de un vector de expresión recombinante. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "célula huésped" se refiere a cualquier tipo de célula que puede contener el vector de expresión recombinante divulgado en el presente documento. Célula huésped en algunos aspectos es una célula eucariota, por ejemplo, vegetal, animal, hongos, o algas, o puede ser una célula procariota, por ejemplo, bacterias o protozoos. La célula huésped en algunos aspectos es una célula cultivada o una célula primaria, es decir, aislada directamente de un organismo, por ejemplo, un ser humano. La célula huésped en algunos aspectos es una célula adherente o una célula en suspensión, es decir, una célula que crece en suspensión. Las células huésped adecuadas se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, células DH5α E. coli, células de ovario de hámster chino, células VERO de mono, células COS, células HEK293, y similares. Para los fines de la amplificación o replicar el vector de expresión recombinante, la célula huésped es en algunos aspectos es una célula procariota, por ejemplo, una célula DH5α. Para los fines de producir un polipéptido recombinante, la célula huésped es, en algunos aspectos, una célula de mamífero, por ejemplo, una célula humana. La célula huésped puede ser de cualquier tipo de célula, puede proceder de cualquier tipo de tejido y puede estar en cualquier etapa de desarrollo.

También se proporciona una población de células que comprende al menos una célula huésped descrita en el presente documento. La población de células en algunos aspectos es una población heterogénea que comprende la célula huésped que comprende cualquiera de los vectores de expresión recombinante descritos, además de al menos otra célula, que no comprende ninguno de los vectores de expresión recombinante. Como alternativa, en algunos aspectos, la población de células es una población sustancialmente homogénea, en la que la población comprende principalmente células huésped (por ejemplo, que consisten esencialmente en) que comprenden el vector de expresión recombinante. La población en algunos aspectos es una población clonal de células, en las que todas las células de la población son clones de una sola célula huésped que comprende un vector de expresión recombinante, de tal manera que todas las células de la población comprenden el vector de expresión recombinante. En una realización, la población de células es una población clonal que comprende células huésped que comprenden un vector de expresión recombinante como se describe en el presente documento.

Conjugados

En algunas realizaciones, los compuestos están unidos o ligados o conjugados a un segundo resto (por ejemplo, un resto heterólogo, un resto conjugado). Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "resto heterólogo" es sinónimo de "resto conjugado" y se refiere a cualquier molécula (química o bioquímica, de origen natural o no codificado) que es diferente de los compuestos de la invención. Los ejemplos de restos heterólogos incluyen, pero no se limitan a, un polímero, un carbohidrato, un lípido, un ácido nucleico, un oligonucleótido, un ADN o ARN, un aminoácido, un péptido, un polipéptido, una proteína, un agente terapéutico, (por ejemplo, un agente citotóxico, citocina), o un agente de diagnóstico.

En algunas realizaciones, los compuestos están modificados químicamente con diversos sustituyentes. En algunas realizaciones, las modificaciones químicas imparten características deseables adicionales como se discute en el presente documento. Las modificaciones químicas en algunos aspectos toman un número de formas diferentes, tales como péptidos heterólogos, polisacáridos, lípidos, radioisótopos, restos de aminoácidos no estándar y ácidos nucleicos, quelatos metálicos y diversos agentes citotóxicos.

En algunas realizaciones, los compuestos se fusionan a péptidos heterólogos para conferir diversas propiedades, por ejemplo, aumento de la solubilidad y / o la estabilidad y / o la semivida, la resistencia a la escisión proteolítica, la modulación del aclaramiento, dirigidos a determinados tipos de células o tejidos. En algunas realizaciones, el compuesto está unido a un dominio Fc de IgG o u otra inmunoglobulina. En algunas realizaciones, el compuesto se fusiona a la fosfatasa alcalina (AP). Los métodos para hacer construcciones de fusión Fc o AP se encuentran en el documento WO 02/060950. Mediante la fusión del compuesto con los dominios de proteínas que tienen propiedades específicas (por ejemplo, la semivida, la biodisponibilidad) es posible conferir estas propiedades al compuesto de la invención.

Cuando los compuestos son péptidos, se pueden modificar, por ejemplo, mediante glicosilación, amidación, carboxilación, o fosforilación, o mediante la creación de sales de adición de ácido, amidas, ésteres, en particular ésteres C-terminal, y derivados N-acilo como se ha tratado anteriormente. Los péptidos también se pueden modificar para crear derivados de péptidos mediante la formación de complejos covalentes o no covalentes con otros restos. Los complejos unidos de manera covalente se pueden preparar mediante la unión de los restos químicos a grupos funcionales sobre las cadenas laterales de aminoácidos que comprenden los péptidos o en el extremo N- o el extremo C-.

Los péptidos se pueden conjugar a un grupo indicador incluyendo, pero sin limitación un radiomarcador, un marcador fluorescente, una enzima (por ejemplo, que cataliza una reacción colorimétrica o fluorométrica), un sustrato, una matriz sólida, o un vehículo (por ejemplo, biotina o avidina). Los ejemplos de análogos se describen en el documento WO 98/28621 y en Olofsson, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:11709–11714 (1998), las patentes de Estados Unidos n.º 5.512.545 y 5.474.982; las solicitudes de patente de Estados Unidos n.º 20020164687 y 20020164710.

Los restos de cisteinilo con mayor frecuencia se hacen reaccionar con haloacetatos (y las aminas correspondientes), tales como ácido cloroacético o cloroacetamida, para dar derivados de carboximetilo o carboxiamidometilo. Los restos de cisteinilo también se obtienen mediante reacción con bromotri-fluoroacetona, ácido α -bromo-beta-(5-imidozoi)propiónico, fosfato de cloroacetilo, N-alquilmaleimidas, disulfuro de 3-nitro-2-piridilo, disulfuro de metil-2-piridilo, p-cloromercuribenzoato, 2-cloromercuri-4-nitrofenol o cloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazol.

Los restos de histidilo se obtienen mediante reacción con dietilprocarbonato a pH 5,5-7,0 debido a que este agente es relativamente específico de la cadena lateral de histidilo. El bromuro de para-bromofenacilo también es útil; la reacción se realiza preferiblemente en cacodilato sódico 0,1 M a pH 6,0.

Los restos de lisinilo y amino terminales se hacen reaccionar con anhídridos de ácido succínico o carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar los restos que contienen α -amino incluyen imidoésteres, tales como picolinimidato de metilo; fosfato de piridoxal; piridoxal; cloroborohidruo; ácido trinitrobenenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

Los residuos de arginilo se modifican mediante la reacción con uno cualquiera o combinación de varios reactivos convencionales, incluyendo fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido a la alta pK del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como el grupo guanidino de epsilon-amino.

Se ha estudiado extensamente la modificación específica de residuos de tirosilo, con particular interés en la introducción de etiquetas espectrales en residuos de tirosilo mediante la reacción con compuestos aromáticos de diazonio o tetranitrometano. Más habitualmente se usan N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetil-tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente. Los restos de tirosilo se yodan utilizando ^{125}I o ^{131}I para preparar proteínas marcadas para su uso en radioinmunoensayo.

Los grupos carboxilo de cadena lateral (aspartilo o glutamilo) se modifican de forma selectiva mediante la reacción con carbodiimidias (R1) tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, los residuos de aspartilo y glutamilo se convierten en restos de asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para la reticulación de la construcción de unión a matrices de soporte insolubles en agua. Dicha derivatización puede también proporcionar el enlazador que puede conectar los elementos de unión adyacentes en una construcción de unión o un elemento de unión a un péptido heterólogo, por ejemplo un fragmento Fc. Los agentes de reticulación de uso habitual incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidas bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan compuestos intermedios fotoactivables que pueden formar reticulaciones en presencia de luz. Como alternativa, se usan matrices insolubles en agua reactivas, tales como hidratos de carbono activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes de EE.UU. n.º 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

Los residuos de glutaminilo y asparaginilo con frecuencia se desmidan para dar los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se desamidán en condiciones ácidas suaves. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de la presente invención.

Otras modificaciones incluyen hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o tetronilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos α -amino de las cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (T. E. Creighton, Proteins: Structure and Molecule Properties, W. H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79–86.1983), acetilación de la amina del extremo N, y, en algunos casos, amidación de los grupos carboxilo C-terminal. Tales derivados son composiciones de polipéptidos modificadas químicamente en las que el polipéptido de construcción de unión está unido a un polímero.

En general, la derivatización química se puede realizar en cualquier condición adecuada utilizada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los métodos para preparar derivados químicos de

polipéptidos comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con la molécula de polímero activado (tal como un éster reactivo o derivado aldehído de la molécula de polímero) en condiciones en las que la construcción de unión se une a una o más moléculas de polímero, y (b) obtener el o los productos de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la relación entre las moléculas de polímero y la proteína, mayor será la cantidad de molécula de polímero unida. En algunas realizaciones, el compuesto puede tener un único resto de molécula de polímero sola en el extremo amino. (Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n.º 5.234.784.)

Las construcciones de unión derivadas divulgadas en el presente documento pueden tener actividades adicionales, una actividad biológica mejorada o reducida, u otras características, tales como semivida aumentada o disminuida, en comparación con las moléculas no derivatizadas.

En algunas realizaciones, el compuesto se une directamente a un resto conjugado en ausencia de un enlazador. En aspectos alternativos, el compuesto está conectado indirectamente al resto de conjugado a través de uno o más enlazadores. Ya sea unidos directamente entre sí o unidos indirectamente entre sí a través de un enlazador, el compuesto puede estar conectado a través de enlaces covalentes (por ejemplo, un enlace peptídico, éster, amida, o sulfhidrilo) o enlaces no covalentes (por ejemplo, mediante interacción hidrofóbica, enlace de hidrógeno, fuerzas de van der Waals, interacción electrostática o iónico), o una combinación de los mismos. El compuesto de la invención y el resto conjugado pueden estar conectados a través de cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitaciones, mediante un enlazador de cualquiera de la invención. Véase, por ejemplo, la sección del presente documento titulada "Enlazadores".

Conjugados_Fusiones de Fc

Para los sustituyentes tales como una región Fc de IgG humana, la fusión se puede fusionar directamente a un compuesto o fusionarse a través de una secuencia intermedia. Por ejemplo, una región bisagra, CH2 y CH3 de IgG humana puede fusionarse en el N-terminal o el C-terminal de una construcción de unión para unirse a la región Fc. La construcción de fusión de Fc resultante permite la purificación a través de una columna de afinidad de proteína A (Pierce, Rockford, Ill.). Los péptidos y proteínas fusionados a una región Fc pueden exhibir una semivida *in vivo* sustancialmente mayor que el homólogo fusionado. Una fusión a una región Fc permite la dimerización/multimerización del polipéptido de fusión. La región Fc puede ser una región Fc de origen natural o puede estar modificada para características superiores, por ejemplo, cualidades terapéuticas, tiempo de circulación, reducción de la agregación. Como se ha indicado anteriormente, en algunas realizaciones, los compuestos se conjugan, por ejemplo, fusionan a una inmunoglobulina o porción de la misma (por ejemplo, región variable, CDR o región Fc). Los tipos conocidos de inmunoglobulinas (Ig) incluyen IgG, IgA, IgE, IgD o IgM. La región Fc es una región C-terminal de una cadena pesada de Ig, que es responsable de la unión a los receptores Fc que llevan a cabo actividades como reciclado (que se traduce en una semivida prolongada), citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA) y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Por ejemplo, de acuerdo con algunas definiciones, la región Fc de la cadena pesada de IgG humana se extiende desde Cys226 al C terminal de la cadena pesada. La "región bisagra" generalmente se extiende desde Glu216 a Pro230 de la IgG humana (las regiones de bisagra de otros isotipos de IgG pueden alinearse con la secuencia IgG1 mediante la alineación de las cisteínas implicadas en la unión de cisteína). La región Fc de una IgG incluye dos dominios constantes, CH2 y CH3. El dominio CH2 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 231 a 341 del aminoácido. El dominio CH3 de una región Fc de IgG humana normalmente se extiende desde los aminoácidos 342 a 447. Las referencias a la numeración de los aminoácidos de las inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulina, o regiones, se basan todas ellas en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md. En realizaciones relacionadas, la región Fc puede comprender una o más regiones constantes nativas o modificadas de una cadena pesada de inmunoglobulina, distinta de CH1, por ejemplo, las regiones CH2 y CH3 de IgG e IgA, o las regiones CH3 y CH4 de IgE.

Los restos de conjugado adecuados incluyen porciones de la secuencia de inmunoglobulina que incluyen el sitio de unión a FcRn. FcRn, receptor de rescate, es responsable del reciclado de las inmunoglobulinas y su devolución a la circulación en la sangre. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en la cristalografía de rayos x (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). El área de contacto principal de la Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están dentro de una única cadena pesada de Ig. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288,290, -291308, -311-311 y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387,428, 428 y 433-436 del dominio CH3.

Algunos restos de conjugados pueden o no incluir el o los sitios de unión a FcγR. Los FcγR son responsables de la CCDA y la CDC. Los ejemplos de posiciones dentro de la región Fc que hacen un contacto directo con FcγR son los aminoácidos 234-239 (región bisagra inferior), los aminoácidos 265-269 (bucle B/C), los aminoácidos 297-299 (bucle C'/E) y los aminoácidos 327-332 (bucle F/G) (Sondermann et al., Nature 406: 267-273, 2000). La región bisagra inferior de IgE también se ha implicado en la unión a FcRI (Henry, et al., Biochemistry 36, 15568-15578,

1997). Los restos implicados en la unión al receptor de IgA se describen en Lewis et al., (J Immunol. 175:6694–701, 2005). Los restos de aminoácidos implicados en la unión al receptor de IgE se describen en Sayers et al. (J Biol Chem. 279(34):35320–5, 2004).

- 5 Las modificaciones de aminoácidos pueden hacerse en la región Fc de una inmunoglobulina. Tales regiones Fc variantes comprenden al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH3 de la región Fc (restos 342-447) y / o al menos una modificación de aminoácidos en el dominio CH2 de la región Fc (restos 231-341). Las mutaciones que se cree que imparten una mayor afinidad para FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591). Otras mutaciones pueden reducir la unión de la región Fc a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y/o FcγRIIIA sin reducir significativamente la afinidad por FcRn. Por ejemplo, la sustitución de la Asn en la posición 297 de la región Fc con Ala u otro aminoácido elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado y puede dar lugar a una inmunogenicidad reducida con una semivida concomitante prolongada de la región Fc, así como una unión reducida a los FcγR (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Se han realizado las modificaciones de aminoácidos en las posiciones 233-236 de IgG1 que reducen la unión a FcγR (Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77 y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Algunas sustituciones de aminoácidos de ejemplo se describen en las patentes de Estados Unidos 7.355.008 y 7.381.408.

Restos heterólogos: Polímeros, hidratos de carbono y lípidos

- 20 En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un polímero. El polímero puede ser ramificado o no ramificado. El polímero puede ser de cualquier peso molecular. El polímero en algunas realizaciones tiene un peso molecular promedio de entre aproximadamente 2 kDa a aproximadamente 100 kDa (el término "aproximadamente" indica que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular indicado). El peso molecular promedio del polímero está, en algún aspecto, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 12 kDa a aproximadamente 40 kDa o entre aproximadamente 20 kDa a aproximadamente 35 kDa.

- 30 En algunas realizaciones, el polímero se modifica para que tenga un único grupo reactivo, tal como un éster activo para acilación o un aldehído para alquilación, de modo que el grado de polimerización puede controlarse. El polímero en algunas realizaciones es soluble en agua, de modo que la proteína a la que está unido no precipita en un entorno acuoso, tal como un entorno fisiológico. En algunas realizaciones, cuando, por ejemplo, la composición se utiliza para uso terapéutico, el polímero es farmacéuticamente aceptable. Adicionalmente, en algunos aspectos, el polímero es una mezcla de polímeros, por ejemplo, un copolímero, un copolímero de bloque.

- 35 En algunas realizaciones, el polímero se selecciona del grupo que consiste en: poliamidas, policarbonatos, polialquilenos y derivados de los mismos, incluyendo, polialquilenglicoles, óxidos de polialquileno, tereftalatos de polialquileno, polímeros de ésteres acrílicos y metacrílicos, incluyendo poli(metacrilato de metilo), poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo), y poli(acrilato de octadecilo), polímeros de polivinilo, incluyendo alcoholes de polivinilo, éteres de polivinilo, ésteres de polivinilo, haluros de polivinilo, poli(acetato de vinilo) y polivinilpirrolidona, poliglicólidos, polisiloxanos, poliuretanos y co-polímeros de los mismos, celulosas incluyendo celulosa de alquilo, celulosas de hidroxialquilo, éteres de celulosa, ésteres de celulosa, nitrocelulosas, metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, hidroxibutilmetilcelulosa, acetato de celulosa, propionato de celulosa, butirato acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, carboxietilcelulosa, triacetato de celulosa y sal de sodio de sulfato de celulosa, polipropileno, polietilenos, incluyendo poli(etilenglicol), poli(óxido de etileno) y poli(tereftalato de etileno) y poliestireno.

- 50 En algunos aspectos, el polímero es un polímero biodegradable, que incluye un polímero biodegradable sintético (por ejemplo, polímeros de ácido láctico y ácido glicólico, polianhídridos, poli(orto)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico), poli(ácido valérico) y poli(lactida-cocaprolactona)), y un polímero biodegradable natural (por ejemplo, alginato y otros polisacáridos, incluyendo dextrano y celulosa, colágeno, derivados químicos de los mismos (sustituciones, adiciones de grupos químicos, por ejemplo, alquilo, alquileno, hidroxilaciones, oxidaciones, y otras modificaciones de rutina hechas por los expertos en la técnica), albúmina y otras proteínas hidrófilas (por ejemplo, zeína y otras prolaminas y proteínas hidrofóbicas)), así como cualquier copolímero o mezcla de los mismos. En general, estos materiales se degradan ya sea mediante hidrólisis enzimática o exposición al agua *en vivo*, por erosión en superficie o en volumen.

- 60 En algunos aspectos, el polímero es un polímero bioadhesivo, tal como un hidrogel biodegradable descrito por H. S. Sawhney, C. P. Pathak y J. A. Hubbell in *Macromolecules*, 1993, 26, 581–587, cuyas enseñanzas se incorporan en el presente documento, ácidos polihialurónico, caseína, gelatina, glutina, polianhídridos, ácido poliacrílico, alginato, quitosano, poli(metacrilatos de metilo), poli(metacrilatos de etilo), poli(metacrilato de butilo), poli(metacrilato de isobutilo), poli(metacrilato de hexilo), poli(metacrilato de isodecilo), poli(metacrilato de laurilo), poli(metacrilato de fenilo), poli(acrilato de metilo), poli(acrilato de isopropilo), poli(acrilato de isobutilo) y poli(acrilato de octadecilo).

- 65

En algunas realizaciones, el polímero es un polímero soluble en agua o un polímero hidrófilo. Los polímeros solubles en agua adecuados se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, polivinilpirrolidona, hidroxipropilcelulosa (HPC; Klucel), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC; Methocel), nitrocelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilbutilcelulosa, hidroxipropilpentilcelulosa, metilcelulosa, etilcelulosa (Ethocel), hidroxietilcelulosa, diversas alquilcelulosas e hidroxialquilcelulosas, diversos éteres de celulosa, acetato de celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, carboximetilcelulosa calcio, copolímeros de acetato de vinilo / ácido crotonico, metacrilato de polihidroxialquilo, metacrilato de hidroximetilo, copolímeros de ácido metacrílico, ácido polimetacrílico, polimetilmetacrilato, copolímeros de anhídrido maleico/éter de metilvinilo, alcohol polivinílico, ácido poliacrílico de sodio y de calcio, ácido, polímeros de carboxiácidos, carboxipolimetileno, polímeros de carboxivinilo, copolímero de polioxietileno polioxipropileno, anhídrido comaleico de polimetilviniléter, carboximetilamida, copolímero de metacrilato de potasio divinilbenceno, polioxietilenglicoles, óxido de polietileno, y derivados, sales, y combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, los polímeros hidrosolubles o mezclas de los mismos incluyen, pero no se limitan a, carbohidratos unidos a N o unidos a O, azúcares, fosfatos, hidratos de carbono; azúcares; fosfatos; polietilenglicol (PEG) (incluyendo las formas de PEG que se han usado para derivatizar proteínas, incluyendo monoalcoxi (C1-C 10) o ariloxi-polietilenglicol); monometoxi-polietilenglicol; dextrano (tal como dextrano de bajo peso molecular, de, por ejemplo, aproximadamente 6 kDa), celulosa; celulosa; otros polímeros basados en carbohidratos, poli(N-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de óxido de polipropileno / óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol) y alcohol de polivinilo. También se abarcan en la presente invención moléculas reticulantes bifuncionales que pueden usarse para preparar multímeros unidos covalentemente.

Un polímero soluble en agua particularmente preferido para su uso en el presente documento es polietilenglicol (PEG). Como se usa en el presente documento, se entiende que polietilenglicol abarca cualquiera de las formas de PEG que se pueden usar para derivar otras proteínas, tales como mono (C1-C10) alcoxi o ariloxi-polietilenglicol. El PEG es un poliéter neutro lineal o ramificado disponible en una amplia serie de pesos moleculares, y es soluble en agua y en la mayoría de los disolventes orgánicos. El PEG es eficaz en la exclusión de otros polímeros o péptidos cuando está presente en el agua, principalmente a través de su alta movilidad dinámica de la cadena y su naturaleza hidrofóbica, de modo que crea una cubierta de agua o esfera de hidratación cuando se une a otras proteínas o superficies poliméricas. El PEG no es tóxico ni inmunogénico, y está aprobado por la Food and Drug Administration para consumo interno.

Las proteínas o enzimas cuando están conjugadas con PEG han demostrado bioactividad, propiedades no antigénicas y disminución de las tasas de aclaramiento cuando se administran a animales. F. M. Veronese et al., *Preparation and Properties of Monomethoxypoly(ethylene glycol)-modified Enzymes for Therapeutic Applications*, in J. M. Harris ed., *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Biotechnical and Biomedical Applications*, 127–36, 1992, incorporado en el presente documento por referencia. Estos fenómenos se deben a las propiedades de exclusión de PEG en la prevención del reconocimiento por el sistema inmunológico. Además, el PEG se ha usado ampliamente en los procedimientos de modificación de superficie para disminuir la adsorción de proteínas y mejorar la compatibilidad con la sangre. S. W. Kim et al., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 516: 116–30 1987; Jacobs et al., *Artif. Organs* 12: 500–501, 1988; Park et al., *J. Poly. Sci, Part A* 29:1725–31, 1991. Las superficies de polímero hidrófobo, tal como poliuretanos y poliestireno, pueden modificarse mediante el injerto de PEG (PM 3.400) y se emplean como superficies no trombogénicas. Las propiedades de la superficie (ángulo de contacto) pueden ser más consistentes con las superficies hidrófilas, debido al efecto hidratante de PEG. Más importante aún, la adsorción de proteínas (albúmina y otras proteínas plasmáticas) se puede reducir en gran medida y dar como resultado propiedades elevadas de motilidad de la cadena, esfera de hidratación y de exclusión de PEG.

En estudios de inmovilización en superficie se ha determinado que el PEG (PM 3.400) tenía un tamaño óptimo, Park et al., *J. Biomed. Mat. Res.* 26:739–45, 1992, mientras que el PEG (PM 5.000) era más beneficioso en la disminución de la antigenicidad de las proteínas. (F. M. Veronese et al., In J. M. Harris, et al., *Poly(Ethylene Glycol) Chemistry—Biotechnical and Biomedical Applications*, 127–36.)

Los métodos para preparar compuestos pegilados pueden comprender las etapas de (a) hacer reaccionar el compuesto con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado aldehído de PEG) en condiciones en las que el compuesto se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinarán en función de los parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la proporción de PEG: compuesto, mayor es el porcentaje de producto poli-pegilado. En algunas realizaciones, el compuesto tendrá un único resto de PEG en el extremo N. Véase la patente de Estados Unidos n.º 8.234.784.

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un hidrato de carbono. En algunas realizaciones, el hidrato de carbono es un monosacárido (por ejemplo, glucosa, galactosa, fructosa), un disacárido (por ejemplo, sacarosa, lactosa, maltosa), un oligosacárido (por ejemplo, rafinosa, estaquiosa), un polisacárido (un almidón, amilasa, amilopectina, celulosa, quitina, calosa, laminarina, xilano, manano, fucoidan, galactomanano).

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un lípido. El lípido, en algunas realizaciones, es un ácido graso, eicosanoide, prostaglandina, leucotrieno, tromboxano, N-acil-etanolamina, glicerolípido (por ejemplo, mono-, di-, tri-

gliceroles sustituidos), glicerofosfolípido (por ejemplo, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina), esfingolípido (por ejemplo, esfingosina, ceramida), lípido esterol (por ejemplo, esteroide, colesterol), lípido prenol, sacarolípido o un policétido, aceite, cera, colesterol, esterol, vitamina liposoluble, monoglicérido, diglicérido, triglicérido, un fosfolípido.

5 *Restos heterólogos: Agentes terapéuticos*

En algunas realizaciones, el resto heterólogo es un agente terapéutico. El agente terapéutico puede ser cualquiera de los conocidos en la técnica: los ejemplos de agentes terapéuticos que se contemplan en el presente documento
 10 incluyen, pero no se limitan a, enzimas naturales, proteínas derivadas de fuentes naturales, proteínas recombinantes, péptidos naturales, péptidos sintéticos, péptidos cíclicos, anticuerpos, agonistas de receptores, agentes citotóxicos, inmunoglobulinas, agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, bloqueantes de los canales de calcio, vasodilatadores coronarios, glucósidos cardíacos, antiarrítmicos, simpaticomiméticos cardíacos, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA), diuréticos, fármacos inotrópicos, reductores de colesterol y
 15 triglicéridos, secuestrantes de ácidos biliares, fibratos, inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG) CoA reductasa, derivados de niacina, agentes antiadrenérgicos, agentes bloqueadores alfa-adrenérgicos, agentes antiadrenérgicos de acción central, vasodilatadores, agentes ahorradores de potasio, tiazidas y agentes relacionados, antagonistas de los receptores de la angiotensina D, vasodilatadores periféricos, antiandrógenos, estrógenos, antibióticos, retinoides, insulinas y análogos, inhibidores de la alfa-glucosidasa, biguanidas, meglitinidas,
 20 sulfonilureas, tizaolidindionas, andrógenos, progestágenos, reguladores del metabolismo óseo, hormonas de la adenohipófisis, hormonas hipotalámicas, hormonas de la neurohipófisis, gonadotropinas, antagonistas de la hormona liberadora de gonadotropina, estimulantes de la ovulación, moduladores selectivos del receptor de estrógenos, agentes antitiroideos, hormonas tiroideas, agentes formadores de masa, laxantes, antiperistálticos, modificadores de la flora, adsorbentes intestinales, antiinfecciosos intestinales, antianorécticos, anticaquéticos,
 25 antibulímicos, supresores del apetito, agentes antiobesidad, antiácidos, agentes del tracto gastrointestinal superior, agentes anticolinérgicos, derivados del ácido aminosalicílico, modificadores de la respuesta biológica, corticosteroides, antiespasmódicos, agonistas parciales de 5-HT₄, antihistamínicos, cannabinoides, antagonistas de la dopamina, antagonistas de la serotonina, citoprotectores, antagonistas de los receptores H₂ de la histamina, agentes protectores de la mucosa, inhibidores de la bomba de protones, terapia de erradicación del *H. pylori*,
 30 estimulantes de la eritropoyesis, agentes hematopoyéticos, agentes para la anemia, heparinas, antifibrinolíticos, hemostáticos, factores de coagulación de la sangre, inhibidores de difosfato de adenosina, inhibidores de los receptores de glicoproteínas, inhibidores de la unión fibrinógeno - plaquetas, inhibidores del tromboxano-A₂, activadores del plasminógeno, agentes antitrombóticos, glucocorticoides, mineralocorticoides, corticosteroides, agentes inmunosupresores selectivos, antifúngicos, fármacos implicados en la terapia profiláctica, infecciones asociadas con el SIDA, citomegalovirus, inhibidores no nucleosídicos de la transcriptasa inversa, análogos nucleosídicos inhibidores de la transcriptasa inversa, inhibidores de la proteasa, anemia, sarcoma de Kaposi, aminoglucósidos, carbapenems, cefalosporinas, glicopéptidos, lincosamidas, macrólidos, oxazolidinonas, penicilinas, estreptograminas, sulfonamidas, trimetoprim y derivados, tetraciclinas, antihelmínticos, amebicidas, biguanidas, alcaloides de la quina, antagonistas del ácido fólico, derivados de quinolina, terapia para *Pneumocystis carinii*,
 40 hidrazidas, imidazoles, triazoles, nitroimidazoles, aminas cíclicas, inhibidores de la neuraminidasa, nucleósidos, quelantes de fosfato, inhibidores de la colinesterasa, terapia adyuvante, barbitúricos y derivados, benzodiacepinas, derivados del ácido gamma aminobutírico, derivados de hidantoína, derivados de iminoestilbeno, derivados de succinimida, anticonvulsivos, alcaloides del cornezuelo del centeno, preparaciones antimigrañas, modificadores de la respuesta biológica, comedores de ácido carbámico, derivados tricíclicos, agentes despolarizantes, agentes no despolarizantes, agentes paralizantes neuromusculares, estimulantes del SNC, reactivos dopaminérgicos, inhibidores de la monoamino oxidasa, inhibidores de la COMT, sulfonatos de alquilo, etileniminas, imidazotetrazinas, análogos de mostaza de nitrógeno, nitrosoureas, compuestos, que contienen platino, antimetabolitos, análogos púricos, análogos pirimidínicos, derivados de la urea, antraciclina, actinomicina, derivados de camptotecina, epipodofilotoxinas, taxanos, alcaloides de la vinca y análogos, antiandrógenos, antiestrógenos, inhibidores no esteroideos de la aromatasa, antineoplásicos inhibidores de la proteína cinasa, derivados azaspirodecanediona, ansiolíticos, estimulantes, inhibidores selectivos de la recaptación de monoamina, inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, antidepresivos, derivados de bencisooxazol, derivados de butirofenona, derivados de dibenzodiacepina, derivados dibenzotiacepina, derivados de difenilbutilpiperidina, fenotiazinas, derivados de tienobenzodiacepina, derivados de tioxanteno, extractos alergénicos, agentes no esteroideos, antagonistas del receptor de leucotrienos, xantinas, antagonistas de los receptores de la endotelina, prostaglandinas, tensioactivos pulmonares, mucolíticos, antimitóticos, uricosúricos, inhibidores de la xantina oxidasa, inhibidores de la fosfodiesterasa, sales de meteamina, derivados de nitrofuranos, quinolonas, relajantes del músculo liso, agentes parasimpaticomiméticos, hidrocarburos halogenados, ésteres de ácido aminobenzoico, amidas (por ejemplo, lidocaína, clorhidrato de articaína, clorhidrato de bupivacaína), antipiréticos, hipnóticos y sedantes, ciclopirrolonas, pirazolopirimidinas, fármacos antiinflamatorios no esteroideos, opioides, derivados de para-aminofenol, inhibidor de la alcohol deshidrogenasa, antagonistas de heparina, adsorbentes, eméticos, antagonistas de opioides, reactivadores de la colinesterasa, terapia de reemplazo de nicotina, análogos y antagonistas de la vitamina A, análogos y antagonistas de la vitamina B, análogos y antagonistas de la vitamina C, análogos y antagonistas de la vitamina D, análogos y antagonistas de la vitamina E, análogos y antagonistas de la vitamina K.

65

Los compuestos se pueden conjugar con una o más citocinas y factores de crecimiento que son eficaces en la inhibición de las metástasis tumorales y en los que se ha demostrado que el factor de crecimiento de citocinas tiene un efecto antiproliferativo sobre al menos una población celular. Tales citocinas, linfocinas, factores de crecimiento u otros factores hematopoyéticos incluyen, pero no se limitan a: M-CSF, GM-CSF, TNF, IL-1, IL-2, 1L-3, 1L-4, 1L-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, I-15, IL-16, 1L-17, IL-18, IFN, TNF α , TNF1, TNF2, G-CSF, Meg-CSF, GM-CSF, trombopoyetina, factor de células y eritropoyetina. Los factores de crecimiento adicionales para su uso en el presente documento incluyen angiogenina, proteína morfogénica ósea 1, proteína morfogénica ósea 2, proteína morfogénica ósea 3, proteína morfogénica ósea 4, proteína morfogénica ósea 5, proteína morfogénica ósea 6, proteína morfogénica ósea 7, proteína morfogénica ósea 8, proteína morfogénica ósea 9, proteína morfogénica ósea 10, proteína morfogénica ósea 11, proteína morfogénica ósea 12, proteína morfogénica ósea 13, proteína morfogénica ósea 14, proteína morfogénica ósea 15, receptor 1A de la proteína morfogénica ósea, receptor 1B de la proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar, receptor α del factor neurotrófico ciliar, factor quimiotáctico de neutrófilos 1 inducido por citocinas, factor quimiotáctico de neutrófilos 2 α inducido por citocinas, factor quimiotáctico de neutrófilos 2 β inducido por citocinas, factor de crecimiento celular endotelial β , endotelina 1, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio, receptor α 1 del factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, receptor α 2 del factor neurotrófico derivado de la línea de células gliales, proteína relacionada con el crecimiento, proteína α relacionada con el crecimiento, proteína β relacionada con el crecimiento, proteína γ relacionada con el crecimiento, factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina, factor de crecimiento de hepatocitos, receptor del factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento 1 similar a la insulina, receptor factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento II similar a la insulina, proteína de unión al factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor α del factor inhibidor de la leucemia, receptor del factor de crecimiento neural, receptor del factor de crecimiento neural, neurotrofina-3, neurotrofina-4, factor estimulante del crecimiento de células pre-B, factor de células madre, receptor del factor de células madre, factor α transformante de crecimiento, factor β transformante del crecimiento, factor β 1 transformante de crecimiento, factor β 1,2 transformante del crecimiento, factor β 2 transformante del crecimiento, factor β 3 transformante del crecimiento, factor β 5 transformante del crecimiento, factor β 1 transformante del crecimiento latente, proteína 1 de unión al factor P transformante del crecimiento, proteína II de unión al factor β transformante del crecimiento, proteína III de unión al factor β transformante del crecimiento, receptor de tipo 1 del factor de necrosis tumoral, receptor de tipo ii del factor de necrosis tumoral, receptor del activador de plasminógeno de tipo uroquinasa y proteínas quiméricas y fragmentos de los mismos biológicamente o inmunológicamente activos.

En algunas realizaciones, el conjugado comprende un compuesto como se describe en el presente documento y un agente citotóxico. El agente citotóxico es cualquier molécula (química o bioquímica) que es tóxica para una célula. En algunos aspectos, cuando un agente citotóxico se conjuga a un compuesto de la invención, los resultados obtenidos son sinérgicos. Es decir, la eficacia de la terapia de combinación de un compuesto y el agente citotóxico es sinérgica, es decir, la eficacia es mayor que la eficacia esperada de los efectos individuales aditivos de cada uno. Por lo tanto, la dosis del agente citotóxico se puede reducir y, por tanto, el riesgo de los problemas de toxicidad y otros efectos secundarios se reduce de forma concomitante. En algunas realizaciones, el agente citotóxico es un agente quimioterapéutico. Los agentes quimioterapéuticos son conocidos en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, compuestos de coordinación de platino, inhibidores de la topoisomerasa, antibióticos, alcaloides antimitóticos y difluoronucleósidos, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.630.124.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un agente de coordinación de platino. La expresión "compuesto de coordinación de platino" se refiere a cualquier compuesto de coordinación de platino inhibidor del crecimiento de las células tumorales que proporciona el platino en la forma de un ion. En algunas realizaciones, el compuesto de coordinación de platino es ion de cis-diaminodialquilplatino (II); cloruro de cloro(dietilentriamina)-platino(II); dicloro(etilendiamina)-platino (II), diamina(1,1-ciclobutandicarboxilato) platino (II) (carboplatino); espiroplatino; iuproplatino; diamina(2-etilmalonato)-platino (D); etilendiaminomalonatoplatino (II); agua(1,2-diaminodihexano)-sulfatoplatino(II); (1,2-diaminociclohexano)malonatoplatino(II); (4-carboxifalato)(1,2-diaminociclohexano)platino(II); (1,2-diaminociclohexano)-(isocitrato)platino(II); (1,2-diaminociclohexano)cis(piruvato)platino(II); (1,2-diaminociclohexano)oxalatoplatino(II); ormaplatino; y tetraplatino.

En algunas realizaciones, el cisplatino es el compuesto de coordinación de platino empleado en las composiciones y métodos de el presente documento invención. El cisplatino está disponible comercialmente bajo el nombre PLATINOLTM de Bristol Myers-Squibb Corporation y está disponible como un polvo para su constitución con agua, solución salina estéril u otro vehículo adecuado. Otros compuestos de coordinación de platino adecuados para su uso en el presente documento invención son conocidos y están disponibles comercialmente y / o se pueden preparar mediante técnicas convencionales. El cisplatino, o cis-diclorodiaminoplatino II, se ha utilizado con éxito durante muchos años como agente quimioterapéutico en el tratamiento de diversos tumores malignos sólidos humanos. Más recientemente, otros complejos de diamino-platino también han mostrado eficacia como agentes quimioterapéuticos en el tratamiento de diversos tumores malignos sólidos humanos. Tales complejos de diamino-platino incluyen, pero no se limitan a, espiroplatino y carboplatino. Aunque el cisplatino y otros complejos de diamino-platino se han usado ampliamente como agentes quimioterapéuticos en seres humanos, han tenido que administrarse a niveles de dosificación altos que pueden producir problemas de toxicidad tal como daño renal.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un inhibidor de la topoisomerasa. Las topoisomerasas son enzimas que son capaces de alterar la topología del ADN en células eucariotas. Son críticos para las funciones celulares y la proliferación celular. En general en las células eucarióticas, hay dos clases de topoisomerasas, de tipo I y de tipo II. La topoisomerasa I es una enzima monomérica de peso molecular de aproximadamente 100.000. La enzima se une al ADN e introduce una rotura transitoria en una sola hebra, desenrolla la doble hélice (o permite que se desenrolle), y posteriormente vuelve a sellar la rotura antes de disociarse de la cadena de ADN. Recientemente se ha demostrado la eficacia clínica de varios inhibidores de la topoisomerasa en el tratamiento de seres humanos afectados por cáncer de ovarios, cáncer de esófago o carcinoma de pulmón amicrocítico.

En algunos aspectos, el inhibidor de la topoisomerasa es la camptotecina o un análogo de la camptotecina. La camptotecina es un alcaloide citotóxico insoluble en agua producido por los árboles de *Camptotheca acuminata* indígenas de China y los árboles de *Nothapodytes foetida* indígenas de la India. La camptotecina presenta actividad inhibidora del crecimiento de células tumorales contra una serie de células tumorales. Los compuestos de la clase de análogos de la camptotecina son normalmente inhibidores específicos de la ADN topoisomerasa 1. Con la expresión "inhibidor de la topoisomerasa" se entiende cualquier compuesto inhibidor del crecimiento de células tumorales que está estructuralmente relacionado con la camptotecina. Los compuestos de la clase de análogos de la camptotecina incluyen, pero no se limitan a; topotecán, irinotecán y 9-amino-camptotecina.

En realizaciones adicionales, el agente citotóxico es cualquier análogo de la camptotecina inhibidor del crecimiento de células tumorales reivindicado o descrito en: la patente de Estados Unidos n.º 5.004.758, expedida el 2 de abril de 1991 y el número de solicitud de patente europea 88311366,4, publicado el 21 de junio de 1989 como publicación 20' número EP 0 321 122; la patente de Estados Unidos n.º 4.604.463, expedida el 5 de agosto de 1986 y la publicación de solicitud de patente europea número EP 0137 145, publicada el 17 de abril de 1985; la patente de Estados Unidos n.º 4.473.692, expedida el 25 de septiembre de 1984 y la publicación de solicitud de patente europea número EP 0074 256, publicada el 16 de marzo de 1983; la patente de Estados Unidos n.º 4.545.880, expedida el 8 de octubre de 1985 y la publicación de solicitud de patente europea número EP0074256, publicada el 16 de marzo de 1983; la publicación de solicitud de patente europea número EP 0088642, publicada el 14 de septiembre de 1983; Wani et al., *J. Med. Chem.*, 29, 2358–2363 (1986); Nitta et al., *Proc. 14th International Congr. Chemotherapy*, Kyoto, 1985, Tokyo Press, Anticancer Section 1, p. 28–30, especialmente un compuesto llamado CPT–11. CPT–11 es un análogo de camptotecina con una cadena lateral de 4–(piperidino)–piperidina unida a través de un enlace de carbamato en el C–10 de 10–hidroxi–7–etil camptotecina. Actualmente, la CPT–11 está en ensayos clínicos con seres humanos y también se denomina irinotecán; Wani et al, *J. Med. Chem.*, 23, 554 (1980); Wani et al., *J. Med. Chem.*, 30, 1774 (1987); la patente de Estados Unidos n.º 4.342.776, expedida el 3 de agosto de 1982; la solicitud de patente de Estados Unidos número de serie 581.916, presentada el 13 de septiembre de 1990 y la publicación de solicitud de patente europea número EP 418 099, publicada el 20 de marzo de 1991; la patente de Estados Unidos n.º 4.513.138, expedida el 23 de abril de 1985 y la publicación de solicitud de patente europea número EP 0 074 770, publicada el 23 de marzo de 1983; la patente de Estados Unidos n.º 4.399.276, expedida el 16 de agosto de 1983 y la publicación de solicitud de patente europea número 0 056 692, publicada el 28 de julio de 1982. Todos los compuestos mencionados anteriormente de la clase de análogos de la camptotecina están disponibles comercialmente y / o se pueden preparar mediante técnicas convencionales que incluyen las descritas en las referencias enumeradas anteriormente. El inhibidor de la topoisomerasa se puede seleccionar del grupo que consiste en topotecán, irinotecán y 9-aminocamptotecina.

La preparación de numerosos compuestos de la clase de análogos de la camptotecina (incluyendo sales, hidratos y solvatos farmacéuticamente aceptables de los mismos), así como la preparación de composiciones farmacéuticas orales y parenterales que comprenden compuestos de este tipo de la clase de análogos de la camptotecina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, está ampliamente descrito en la patente de Estados Unidos n.º 5,004,758, expedida el 2 de abril de 1991 y la solicitud de patente europea número 88311366.4, publicada el 21 de junio de 1989, como el número de publicación EP 0 321 122.

En todavía otras realizaciones, el agente quimioterapéutico es un compuesto antibiótico. Los antibióticos adecuados incluyen, pero no se limitan a, doxorubicina, mitomicina, bleomicina, daunorrubicina y estreptozocina.

En algunas realizaciones, el agente quimioterapéutico es un alcaloide antimitótico. En general, los alcaloides antimitóticos se pueden extraer de *Cantharanthus roseus* y se han demostrado que son eficaces como agentes de quimioterapia contra el cáncer. Se ha estudiado un gran número de derivados semisintéticos tanto química como farmacológicamente (véase, O. Van Tellingen et al. *Anticancer Research*, 12, 1699–1716 (1992)). Los alcaloides antimitóticos de el presente documento invención incluyen, pero no están limitados a, vinblastina, vincristina, vindesina, Taxol y vinorelbina. Los últimos dos alcaloides antimitóticos están disponibles comercialmente en Eli Lilly and Company, y Pierre Fabre Laboratories, respectivamente (véase la patente de Estados Unidos n.º 5.620.985). En un aspecto preferido de el presente documento invención, el alcaloide antimitótico es vinorelbina.

En otras realizaciones de la invención, el agente quimioterapéutico es un difluoronucleósido. En la materia se sabe que los 2'-desoxi-2',2'-difluoronucleósidos tienen actividad antiviral. Tales compuestos se divulgan y enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 4.526.988 y 4.808614. La publicación de solicitud de patente europea 184.365 divulga que estos mismos difluoronucleósidos tienen actividad oncolítica. En ciertos aspectos específicos, el 2'-

desoxi-2',2'-difluoronucleósido utilizado en las composiciones y métodos de la presente invención es clorhidrato de 2'-desoxi-2',2'-difluorocitidina, también conocido como clorhidrato de gemcitabina. La gemcitabina está disponible comercialmente o se puede sintetizar en un proceso de varias etapas como se divulga y se enseña en las patentes de Estados Unidos n.º 4.526.988, 4.808.614 y 5.223.608.

5

Conjugados formas dirigidas

Un experto ordinario en la técnica apreciará fácilmente que los compuestos de la presente divulgación pueden modificarse de cualquier número de formas, de manera que la eficacia terapéutica o profiláctica del compuesto se incrementa a través de la modificación. Por ejemplo, el compuesto de la presente divulgación se puede conjugar a un resto dirigido directa o indirectamente a través de un enlazador. La práctica de conjugar compuestos con restos dirigidos se conoce en la técnica. Véase, por ejemplo, Wadhwa et al., J Drug Targeting, 3, 111–127 (1995) y la patente de Estados Unidos n.º 5.087.616. La expresión "resto dirigido", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier molécula o agente que reconoce específicamente y se une a un receptor de superficie celular, de manera que el resto dirigido dirige la liberación del compuesto de la invención a una población de células en cuya superficie se expresa el receptor. Los restos dirigidos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos, o fragmentos de los mismos, péptidos, hormonas, factores de crecimiento, citocinas, y cualquier otro ligando natural o no natural, que se unen a receptores de la superficie celular (por ejemplo, receptor del factor de crecimiento epitelial (EGFR), receptor de las células T (TCR), receptor de las células B (BCR), CD28, receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), receptor de la acetilcolina nicotínico (nAChR), etc.). Tal como se usa en el presente documento un "enlazador" es un enlace, molécula o grupo de moléculas que une dos entidades separadas entre sí. Los enlazadores pueden proporcionar un espaciamiento óptimo de las dos entidades o pueden suministrar adicionalmente un enlace lábil que permite a las dos entidades separarse una de la otra. Los enlaces lábiles incluyen grupos fotoescindibles, restos lábiles en ácido, restos lábiles en bases y grupos de escindibles con enzimas. El término "enlazador" en algunas realizaciones se refiere a cualquier agente o molécula que une el compuesto de la invención al resto dirigido. El enlazador puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento en la sección titulada "Enlazadores". Un experto en la materia reconoce que los sitios en el compuesto de la invención, que no son necesarios para la función del compuesto, son lugares ideales para la fijación de un enlazador y / o un resto dirigido, siempre que el enlazador y / o el resto dirigido, una vez unido al compuesto, no interfiere con la función del compuesto, es decir, la capacidad para inhibir la interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G, como se describe en el presente documento.

10

15

20

25

30

Enlazadores

En algunas realizaciones, el conjugado comprende un enlazador que une el compuesto al resto heterólogo. En algunos aspectos, el enlazador comprende una cadena de átomos de 1 a aproximadamente 60, o de 1 a 30 átomos o más, de 2 a 5 átomos, de 2 a 10 átomos, de 5 a 10 átomos, o de 10 a 20 átomos de longitud. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena son átomos de carbono. En algunas realizaciones, los átomos de la cadena en la cadena principal del enlazador se seleccionan del grupo que consiste en C, O, N, y S. Los átomos de la cadena y los enlazadores pueden seleccionarse de acuerdo con su solubilidad prevista (hidrofilicidad) a fin de proporcionar un conjugado más soluble. En algunas realizaciones, el enlazador proporciona un grupo funcional que está sujeto a escisión por una enzima u otro catalizador o condiciones hidrolíticas que se encuentran en el tejido u órgano o célula diana. En algunas realizaciones, la longitud del enlazador es lo suficientemente larga como para reducir el potencial de hidrancia estérica. En algunas realizaciones, el ligador es un aminoácido o un enlazador de peptidilo. Tales enlazadores de peptidilo pueden tener cualquier longitud. Enlazadores de ejemplo tienen una longitud de aproximadamente 1 a 50 aminoácidos, de 5 a 50, de 3 a 5, de 5 a 10, 5 a 15, o 10 a 30 aminoácidos.

35

40

45

Dímeros y multímeros

En algunas realizaciones, el compuesto se proporciona como un dímero o un multímero en el que más de un compuesto de la invención están unidos entre sí. El dímero en algunos aspectos es un homodímero que comprende dos compuestos del mismo tipo (por ejemplo, misma estructura) unidos entre sí. En aspectos alternativos, el dímero es un heterodímero que comprende dos compuestos de la invención, en el que los dos compuestos son estructuralmente distintos uno de otro. El multímero en algunos aspectos es un homomultímero que comprende más de un compuesto de la invención y cada compuesto son del mismo tipo (por ejemplo, la misma estructura). En aspectos alternativos, el multímero es un heteromultímero que comprende más de un compuesto de la invención y en el que al menos dos compuestos de la heteromultímero son estructuralmente distintos uno de otro. Dos o más de los compuestos se pueden unir entre sí utilizando agentes de unión estándar y procedimientos conocidos por los expertos en la técnica. En ciertas realizaciones, el enlazador que conecta los dos (o más) compuestos es un enlazador como se describe en la sección titulada "Enlazadores." En algunas realizaciones, el enlazador es un enlace disulfuro. Por ejemplo, cada monómero del dímero puede comprender un sulfhidrilo y el átomo de azufre de cada uno participa en la formación del enlace disulfuro.

50

55

60

Composiciones

La divulgación proporciona además composiciones que comprenden un compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G, por ejemplo, un anticuerpo, fragmento de unión a antígeno, aptámero, péptido, análogo peptídico, sal farmacéuticamente aceptable, conjugado, multímero, dímero, como se describe en el presente documento. Las composiciones en algunos aspectos comprenden los compuestos en forma aislada y / o purificada. En algunos aspectos, la composición comprende un único tipo (por ejemplo, la estructura) de un compuesto de la invención o comprende una combinación de dos o más compuestos de la invención, en la que la combinación comprende dos o más compuestos de diferentes tipos (por ejemplo, estructuras).

En algunos aspectos, la composición comprende agentes que potencian las características químico-físicas del compuesto, por ejemplo, mediante la estabilización del compuesto a ciertas temperaturas, por ejemplo, a temperatura ambiente, el aumento de la vida útil, la reducción de la degradación, por ejemplo, la degradación mediada por oxidación con proteasa, el aumento de la semivida del compuesto, etc. En algunos aspectos, la composición comprende cualquiera de los agentes divulgados en el presente documento como un resto heterólogo o resto conjugado, opcionalmente en mezcla con los compuestos o conjugados con los compuestos.

En ciertos aspectos, la composición comprende un agente de liberación que ayuda en la localización del compuesto al lugar apropiado. En realizaciones de ejemplo, la composición comprende un vehículo que ayuda para introducir el compuesto dentro de una célula. En aspectos de ejemplo, el vehículo está unido covalentemente al compuesto. En aspectos alternativos, la composición comprende un vehículo mezclado con el compuesto. En aspectos de ejemplo, el vehículo comprende o es cualquiera de los restos heterólogos descritos en el presente documento en relación con los conjugados. Por ejemplo, el vehículo puede ser un polímero, por ejemplo, un polímero soluble en agua, que puede ser lineal o ramificado. En aspectos de ejemplo el polímero soluble en agua se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol (PEG), PEG ramificado, ácido polisialílico (PSA), hidratos de carbono, polisacáridos, pululano, quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina, dermatánsulfato, almidón o un derivado de almidón, dextrano, carboximetil-dextrano, óxido de polialquileño (PAO), polialquilenglicol (PAG), polipropileno glicol (PPG), polioxazolina, poliacriloilmorfolina, alcohol polivinílico (PVA), policarboxilato, polivinilpirrolidona, polifosfaceno, polioxazolina, polietileno-co-anhídrido de ácido maleico, poliestireno-co-anhídrido de ácido maleico, poli(1-hidroximetil-etileno hidroximetilformal) (PHF), y 2-metacriloloxi-2'-etiltrimetilamoniofosfato (MPC).

En realizaciones de ejemplo, el vehículo comprende un hidrato de carbono, tal como cualquiera de los descritos en el presente documento. En aspectos de ejemplo, el vehículo comprende un polisacárido.

En aspectos de ejemplo, el vehículo comprende un resto lipófilo. En aspectos de ejemplo, el vehículo comprende un ácido graso. El ácido graso puede ser un ácido graso de C4 a C30, por ejemplo, un ácido graso de C4, ácido graso de C6, ácido graso de C8, ácido graso de C10, ácido graso de C12, ácido graso de C14, ácido graso de C16, ácido graso de C18, ácido graso de C20, ácido graso de C22, ácido graso de C24, ácido graso de C26, ácido graso de C28, o un ácido graso de C30. En aspectos de ejemplo, el ácido graso es un ácido graso de C12 a C30. En aspectos de ejemplo, el ácido graso es un grupo miristoilo o un grupo palmitoilo. En aspectos de ejemplo, el compuesto es un péptido o análogo peptídico y el ácido graso está unido covalentemente al péptido o análogo peptídico. Por ejemplo, el ácido graso está unido covalentemente al péptido o análogo peptídico en el extremo N o el extremo C a través de una cadena lateral de un aminoácido no terminal del péptido o análogo peptídico.

En aspectos de ejemplo, el vehículo comprende un polipéptido, que cuando está en la composición mejora la capacidad de la composición para entrar en una célula en comparación con la capacidad de la composición en ausencia del polipéptido. En ciertos aspectos, la composición comprende un compuesto de la invención (por ejemplo, un péptido que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G) y un agente de liberación de péptidos. En algunos aspectos, el agente de liberación de péptidos es un péptido que penetra en las células (CPP). En aspectos particulares, la composición comprende un CPP fusionado con el compuesto, por ejemplo, la composición comprende un producto de péptido de fusión que comprende un péptido de la invención que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G fusionada a un CPP.

Composiciones farmacéuticas y formulaciones

En todavía otros aspectos de la invención, la composición comprende un compuesto que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G y comprende adicionalmente un vehículo diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, el compuesto de la invención, la sal farmacéuticamente aceptable, el conjugado, el dímero o multímero de la invención (denominados en lo sucesivo "agentes activos") se formula en una composición farmacéutica que comprende el agente activo, junto con un vehículo, diluyente o excipiente farmacéuticamente aceptable. En este sentido, la invención proporciona además composiciones farmacéuticas que comprenden un agente activo que inhibe una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α de proteína G que están destinadas a administrar a un sujeto, por ejemplo, un mamífero.

En algunas realizaciones, el agente activo está presente en la composición farmacéutica a un nivel de pureza adecuada para la administración a un paciente. En algunas realizaciones, el agente activo tiene un nivel de pureza de al menos aproximadamente 90 %, aproximadamente 91 %, aproximadamente 92 %, aproximadamente 93 %, aproximadamente 94 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % or aproximadamente 99 % y un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica en algunos aspectos comprende el agente activo de la presente divulgación a una concentración de al menos A, en la que A es aproximadamente 0,001 mg/ml, aproximadamente 0,01 mg/ml, 0 aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 0,5 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 23 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml o mayor. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende el agente activo a una concentración de como máximo B, en la que B es aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 25 mg/ml, aproximadamente 24 mg/ml, aproximadamente 23, mg/ml, aproximadamente 22 mg/ml, aproximadamente 21 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 19 mg/ml, aproximadamente 18 mg/ml, aproximadamente 17 mg/ml, aproximadamente 16 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml, aproximadamente 14 mg/ml, aproximadamente 13 mg/ml, aproximadamente 12 mg/ml, aproximadamente 11 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 9 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml, aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 6 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 4 mg/ml, aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente mg/ml, o aproximadamente 0,1 mg/ml. En algunas realizaciones, las composiciones pueden contener un agente activo a un intervalo de concentración de A to B mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,001 a aproximadamente 30,0 mg/ml.

Dependiendo de la vía de administración, el agente activo particular que se pretende usar, así como otros factores, la composición farmacéutica puede comprender ingredientes farmacéuticamente aceptables adicionales, incluyendo, por ejemplo, agentes acidificantes, aditivos, adsorbentes, propelentes de aerosoles, agentes de desplazamiento de aire, agentes alcalinizantes, agentes antiaglutinantes, anticoagulantes, conservantes antimicrobianos, antioxidantes, antisépticos, bases, aglutinantes, agentes tampón, agentes quelantes, agentes de recubrimiento, agentes colorantes, desecantes, detergentes, diluyentes, desinfectantes, disgregantes, agentes dispersantes, agentes de mejora de la disolución, colorantes, emolientes, agentes emulsionantes, estabilizadores de emulsión, agentes de carga, agentes formadores de película, potenciadores del sabor, agentes aromatizantes, potenciadores del flujo, agentes gelificantes, agentes de granulación, humectantes, lubricantes, mucoadhesivos, bases de pomadas, pomadas, vehículos oleaginosos, bases orgánicas, bases de pastillas, pigmentos, plastificantes, agentes de pulido, conservantes, agentes secuestrantes, agentes de penetración de la piel, agentes solubilizantes, disolventes, agentes estabilizantes, bases para supositorios, agentes de superficie activa, tensioactivos, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, agentes terapéuticos, agentes espesantes, agentes de tonicidad, agentes de toxicidad, agentes de incremento de la viscosidad, agentes absorbentes de agua, codisolventes miscibles en agua, ablandadores de agua, o agentes humectantes.

De acuerdo con lo anterior, en algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una cualquiera o una combinación de los siguientes componentes: goma arábiga, acesulfamo de potasio, citrato de acetiltributilo, citrato de acetiltriethyl, agar, albúmina, alcohol, alcohol deshidratado, alcohol desnaturalizado, alcohol de dilución, ácido aleurítico, ácido alginico, poliésteres alifáticos, alúmina, hidróxido de aluminio, estearato de aluminio, amilopectina, a- amilosa, ácido ascórbico, palmitato de ascorbilo, aspartamo, agua bacteriostática para inyección, bentonita, magma de bentonita, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, ácido benzoico, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, bronopol, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, butilparabeno, butilparabeno sódico, alginato de calcio, ascorbato de calcio, carbonato de calcio, ciclamato de calcio, fosfato de calcio anhidro dibásico, fosfato de calcio dibásico dihidrato, fosfato de calcio tribásico, propionato de calcio, silicato de calcio, sorbato de calcio, estearato de calcio, sulfato de calcio, sulfato de calcio hemihidrato, aceite de canola, carbómero, dióxido de carbono, carboximetilcelulosa cálcica, carboximetilcelulosa sódica, β -caroteno, carragenano, aceite de ricino, aceite de ricino hidrogenado, cera emulsionante catiónica, acetato de celulosa, acetato ftalato de celulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, celulosa en polvo, celulosa microcristalina silicificada, carboximetilcelulosa de sodio, alcohol cetoestearílico, cetrimida, alcohol cetílico, clorhexidina, clorobutanol, clorocresol, colesterol, acetato de clorhexidina, gluconato de clorhexidina, hidrocloreto de clorhexidina, clorodifluoroetano (HCFC), clorodifluorometano, clorofluorocarbonos (CFC) clorofenoxietanol, cloroxilenol, sólidos de jarabe de maíz, ácido cítrico anhidro, ácido cítrico monohidrato, manteca de cacao, agentes colorantes, aceite de maíz, aceite de algodón, cresol, m-cresol, o-cresol, p-cresol, croscarmelosa sódica, crospovidona, ácido ciclámico, ciclodextrinas, dextratos, dextrina, dextrosa, dextrosa anhidra, diazolidinilurea, ftalato de dibutilo, sebacato de dibutilo, dietanolamina, ftalato de dietilo, difluoroetano (HFC), dimetil- β -ciclodextrina, compuestos de de tipo ciclodextrina tales como Captisol®, éter de dimetilo, ftalato de dimetilo, edentato de dipotasio, edentato de disodio, hidrógeno fosfato disódico, docusato de calcio, docusato potasio, docusato de sodio, galato de dodecilo, bromuro de dodeciltrimetilamonio, edentato de calcio disódico, ácido edítico, eglumina, alcohol etílico, etilcelulosa, galato de etilo, laurato de etilo, etilmaltol, oleato de etilo, etilparabeno de potasio, etilparabeno de sodio, etil vainillina, fructosa, fructosa líquida, fructosa molida, fructosa libre de pirógenos, fructosa en polvo, ácido fumárico, gelatina, glucosa, glucosa líquida, mezclas de

glicéridos de ácidos grasos saturados, glicerina, behenato de glicerilo, monooleato de glicerilo, monoestearato de glicerilo, monoestearato de glicerilo autoemulsionante, palmitoestearato de glicerilo, glicina, glicoles, glicofurol, goma guar, heptafluoropropano (HFC), bromuro de hexadeciltrimetilamonio, jarabe de fructosa, seroalbúmina humana, hidrocarburos (HC), ácido clorhídrico diluido, aceite vegetal hidrogenado, tipo 11, hidroxietilcelulosa, 2-hidroxietil-β-ciclodextrina, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilcelulosa de baja sustitución, 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina, hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, imidurea, indigo carmin, intercambiadores de iones, óxidos de hierro, alcohol de isopropilo, miristato de isopropilo, palmitato de isopropilo, solución salina isotónica, caolín, ácido láctico, lactitol, lactosa, lanolina, alcoholes de lanolina, lanolina anhidra, lecitina, silicato de aluminio magnesio, carbonato de magnesio, carbonato de magnesio normal, carbonato de magnesio anhidro, hidróxido de magnesio, hidróxido de magnesio, laurilsulfato de magnesio, óxido de magnesio, silicato de magnesio, estearato de magnesio, trisilicato de magnesio, trisilicato de magnesio anhidro, ácido málico, malta, maltitol, solución de maltitol, maltodextrina, maltol, maltosa, manitol, triglicéridos de cadena media, meglumina, mentol, metilcelulosa, metacrilato de metilo, oleato de metilo, metilparabeno, metilparabeno de potasio, metilparabeno de sodio, celulosa microcristalina y carboximetilcelulosa de sodio, aceite mineral, aceite mineral ligero, aceite mineral y alcoholes de lanolina, aceite, aceite de oliva, monoetanolamina, montmorillonita, galato de octilo, ácido oleico, ácido palmítico, parafina, aceite de cacahuete, vaselina, alcoholes de vaselina y lanolina, esmalte farmacéutico, fenol, fenol licuado, fenoxietanol, fenoxipropanol, alcohol feniletílico, acetato de fenilmercurio, borato fenilmercúrico, nitrato fenilmercúrico, polacrilina, potasio polacrilina, poloxámero, polidextrosa, polietilenglicol, óxido de polietileno, poliácridatos, polímeros de bloque de polietileno-polióxipropileno, polimetacrilatos, éteres de alquilpolioxietileno, derivados de aceite de ricino de polioxietileno, ésteres de ácido graso de sorbitol de polioxietileno, estearatos de polioxietileno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, alginato de potasio, benzoato de potasio, bicarbonato de potasio, bisulfito de potasio, cloruro de potasio, citrato de potasio, citrato de potasio anhidro, hidrógeno fosfato de potasio, metabisulfito de potasio, fosfato de potasio monobásico, propionato de potasio, sorbato de potasio, povidona, propanol, ácido propiónico, carbonato de propileno, propilenglicol, alginato de propilenglicol, galato de propilo, propilparabeno, propilparabeno de potasio, propilparabeno de sodio, sulfato de protamina, aceite de colza, solución de Ringer, sacarina, sacarina de amonio, sacarina de calcio, sacarina de sodio, aceite de cártamo, saponita, proteínas de suero, aceite de sésamo, sílice coloidal, dióxido de silicio coloidal, alginato de sodio, ascorbato de sodio, benzoato de sodio, bicarbonato de sodio, bisulfito de sodio, cloruro de sodio, citrato de sodio anhidro, citrato de sodio deshidratado, cloruro de sodio, ciclamato de sodio, edentato de sodio, dodecilsulfato sódico, laurilsulfato de sodio, metabisulfito de sodio, fosfato de sodio dibásico, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio tribásico, propionato de sodio anhidro, propionato de sodio, sorbato de sodio, almidón glicolato de sodio, estearil fumarato de sodio, sulfito de sodio, ácido sórbico, ésteres de sorbitán (ésteres grasos de sorbitán), sorbitol, solución de sorbitol al 70 %, aceite de soja, cera de esperma de ballena, almidón, almidón de maíz, almidón de patata, almidón pregelatinizado, almidón de maíz esterilizable, ácido esteárico, ácido esteárico purificado, alcohol estearílico, sacarosa, azúcares, azúcar compresible, azúcar para confitería, esferas de azúcar, azúcar invertido, *Sugartab*, Sunset Yellow FCF, parafina sintética, talco, ácido tartárico, tartrazina, tetrafluoroetano (HFC), aceite de teobroma, timerosal, dióxido de titanio, alfa tocoferol, acetato de tocoferilo, succinato ácido alfa-tocoferílico, beta-tocoferol, delta-tocoferol, gamma-tocoferol, tragacanto, triacetina, citrato de tributilo, trietanolamina, citrato de trietilo, trimetil-β-ciclodextrina, bromuro de trimetiltetradecilamonio, tampón tris, edentato trisódico, vainillina, aceite vegetal hidrogenado de tipo 1, agua, agua blanda, agua dura, agua libre de dióxido de carbono, agua libre de pirógenos, agua para inyección, agua estéril para inhalación, agua estéril para inyección, agua estéril para irrigación, ceras, cera emulsionante aniónica, cera de carnauba, cera emulsionante catiónica, cera de éster cetílico, cera microcristalina, cera emulsionante no iónica, cera de supositorio, cera blanca, cera amarilla, vaselina blanca, grasa de lana, goma xantana, xilitol, zeína, propionato de cinc, sales de cinc, estearato de cinc, o cualquier excipiente en Handbook of Pharmaceutical Excipients, Tercera Edición, A. H. Kibbe (Pharmaceutical Press, Londres, Reino Unido, 2000), que se incorpora en su totalidad en el presente documento por referencia. En Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición, E. W. Martin (Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1980), que se incorpora en su totalidad por referencia, se divulgan varios componentes usados en la formulación de composiciones farmacéuticamente aceptables y técnicas conocidas para la preparación de las mismas. Excepto en tanto que cualquier agente convencional es incompatible con las composiciones farmacéuticas, se contempla su uso en composiciones farmacéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios.

En algunas realizaciones, el o los componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica a cualquier concentración, tal como, por ejemplo, al menos A, en la que A es 0,0001 % p/v, 0,001 % p/v, 0,01 % p/v, 0,1 % p/v, 1 % p/v, 2 % p/v, 5 % p/v, 10 % p/v, 20 % p/v, 30 % p/v, 40 % p/v, 50 % p/v, 60 % p/v, 70 % p/v, 80 % p/v, o 90 % p/v. En algunas realizaciones, el o los componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica a cualquier concentración, tal como, por ejemplo, como máximo B, en la que B es 90 % p/v, 80 % p/v, 70 % p/v, 60 % p/v, 50 % p/v, 40 % p/v, 30 % p/v, 20 % p/v, 10 % p/v, 5 % p/v, 2 % p/v, 1 % p/v, 0,1 % p/v, 0,001 % p/v, o 0,0001 %. En otras realizaciones, el o los componentes anteriores pueden estar presentes en la composición farmacéutica a cualquier intervalo de concentración, tal como, por ejemplo, de aproximadamente A a aproximadamente B. En algunas realizaciones, A es 0,0001 % y B es 90 %.

Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para lograr un pH fisiológicamente compatible. En algunas realizaciones, el pH de la composición farmacéutica puede ser de al menos 5, al menos 5,5, al menos 6, al menos 6,5, al menos 7, al menos 7,5, al menos 8, al menos 8,5, al menos 9, al menos 9,5, al menos 10, o al menos 10,5 hasta e incluyendo pH 11, dependiendo de la formulación y vía de administración. En ciertas realizaciones, las

composiciones farmacéuticas pueden comprender agentes tampón para alcanzar un pH fisiológico compatible. Los agentes tampón pueden incluir cualquier compuesto capaz de tamponar al pH deseado, tal como, por ejemplo, tampones de fosfato (por ejemplo, PBS), trietanolamina, Tris, bicina, TAPS, tricina, HEPES, TES, MOPS, PIPES, cacodilato, MES, y otros. En ciertas realizaciones, la fuerza del tampón es de al menos 0,5 mM, al menos 1 mM, al menos 5 mM, al menos 10 mM, al menos 20 mM, al menos 30 mM, al menos 40 mM, al menos 50 mM, al menos 60 mM, al menos 70 mM, al menos 80 mM, al menos 90 mM, al menos 100 mM, al menos 120 mM, al menos 150 mM, o al menos 200 mM. En algunas realizaciones, la fuerza del tampón es no superior a 300 mM (por ejemplo, como máximo 200 mM, como máximo 100 mM, como máximo 90 mM, como máximo 80 mM, como máximo 70 mM, como máximo 60 mM, como máximo 50 mM, como máximo 40 mM, como máximo 30 mM, como máximo 20 mM, como máximo 10 mM, como máximo 5 mM, como máximo 1 mM).

Vías de administración

Con respecto a la invención, el agente activo, la composición farmacéutica que comprende el mismo, se puede administrar al sujeto por cualquier vía de administración adecuada. La siguiente discusión sobre las vías de administración se proporciona simplemente para ilustrar realizaciones de ejemplo y no debe interpretarse como limitante del alcance de ninguna manera.

Las formulaciones adecuadas para administración oral pueden consistir en (a) soluciones líquidas, tal como una cantidad eficaz del agente activo de la presente divulgación disuelta en diluyentes, tales como agua, solución salina, o zumo de naranja; (b) cápsulas, sobres, comprimidos, pastillas, y trociscos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo, como sólidos o gránulos; (c) polvos; (d) suspensiones en un líquido apropiado; y (e) emulsiones adecuadas. Las formulaciones líquidas pueden incluir diluyentes, tales como agua y alcoholes, por ejemplo, etanol, alcohol bencílico, y los alcoholes de polietileno, con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable. Las formas de cápsula pueden ser del tipo de gelatina con recubrimiento duro o blando habitual que contiene, por ejemplo, tensioactivos, lubricantes y cargas inertes, tales como lactosa, sacarosa, fosfato de calcio, y almidón de maíz. Las formas de comprimidos pueden incluir uno o más de lactosa, sacarosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, ácido alginico, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, goma guar, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa sódica, talco, estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de cinc, ácido esteárico, y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes tampón, agentes disgregantes, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes, y otros excipientes farmacológicamente compatibles. Las formas de pastilla pueden comprender el agente activo de la presente divulgación en un sabor, habitualmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto, así como pastillas que comprenden el agente activo de la presente divulgación en una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga, emulsiones, geles y similares que contienen, además de, excipientes tal como se conocen en la materia.

Los agentes activos de la presente divulgación, solos o en combinación con otros componentes adecuados, se pueden liberar mediante administración pulmonar y se pueden hacer en formulaciones en aerosol para su administración mediante inhalación. Estas formulaciones en aerosol se pueden colocar en propelentes presurizados aceptables, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno, y similares. También se pueden formular como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas, tal como en un nebulizador o un atomizador. Tales formulaciones de aerosol se pueden usar también para pulverizar la mucosa. En algunas realizaciones, el agente activo se formula en una mezcla en polvo o en micropartículas o nanopartículas. Las formulaciones pulmonares adecuadas se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, Qian et al., *Int J Pharm* 366: 218–220 (2009); Adjei y Garren, *Pharmaceutical Research*, 7(6): 565–569 (1990); Kawashima et al., *J Controlled Release* 62(1–2): 279–287 (1999); Liu et al., *Pharm Res* 10(2): 228–232 (1993); publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 2007/133747 y WO 2007/141411.

Las formulaciones adecuadas para la administración parenteral incluyen soluciones inyectables estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacterioestáticos y solutos, que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor que se pretenda; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. El término "parenteral" significa no a través del canal alimentario, sino por alguna otra vía tal como subcutánea, intramuscular, intraespinal, o intravenosa. El agente activo de el presente divulgación se puede administrar con un diluyente fisiológicamente aceptable en un vehículo farmacéutico, tal como un líquido o mezcla de líquidos estériles, incluyendo agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionados, un alcohol, tal como etanol o alcohol hexadecílico, un glicol, tal como propilenglicol o polietilenglicol, dimetilsulfóxido, glicerol, cetales tales como 2,2-dimetil-153-dioxolano-4-metanol, éteres, poli(etilenglicol) 400, aceites, ácidos grasos, ésteres o glicéridos de ácidos grasos, o glicéridos de ácidos grasos acetilados con o sin la adición de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable, tal como un jabón o un detergente, agente de suspensión, tales como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, o carboximetilcelulosa, o agentes emulsionantes y otros adyuvantes farmacéuticos.

Los aceites que se pueden utilizar en formulaciones parenterales incluyen petróleo, aceites animales, vegetales o sintéticos. Los ejemplos específicos de aceites incluyen de cacahuete, de soja, de sésamo, de semilla de algodón, de maíz, de oliva, vaselina, y mineral. Los ácidos grasos adecuados para su uso en formulaciones parenterales

incluyen ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico. El oleato de etilo y el miristato de isopropilo son ejemplos de ésteres de ácidos grasos adecuados.

5 Los jabones adecuados para su uso en formulaciones parenterales incluyen sales grasas de metales alcalinos, de amonio, y de trietanolamina, y los detergentes adecuados incluyen (a) detergentes catiónicos tales como, por ejemplo, haluros de dimetilalquilamonio y haluros de alquilpiridinio, (b) detergentes aniónicos tales como, por ejemplo, sulfonatos de alquilo, arilo, y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos, y sulfosuccinatos, (c) detergentes no iónicos tales como, por ejemplo, óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos, y copolímeros de polioxietileno-polipropileno, (d) detergentes anfóteros tales como, por ejemplo, alquil-beta-aminopropionatos y sales de amonio cuaternario 2-alquil-imidazolina, y e) mezclas de los mismos.

15 Las formulaciones parenterales en algunas realizaciones contienen de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 25 % en peso del agente activo de la presente divulgación en solución. Se pueden usar conservantes y tampones. Con el fin de minimizar o eliminar la irritación en el sitio de inyección, tales composiciones pueden contener uno o más tensioactivos no iónicos que tienen un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) de aproximadamente 12 a aproximadamente 17. La cantidad de tensioactivo en tales formulaciones variará normalmente desde aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % en peso. Los tensioactivos adecuados incluyen ésteres de ácidos grasos de sorbitano de polietilenglicol, tales como monooleato de sorbitano y aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrofóbica, formados mediante la condensación de óxido de propileno con propilenglicol. Las formulaciones parenterales en algunos aspectos se presentan en recipientes de dosis unitaria o de multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado de desecación por congelación (liofilizado) que requiere solo la adición del excipiente líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones inyectables extemporáneas en algunos aspectos se preparan a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles del tipo descrito previamente.

25 Las formulaciones inyectables son conforme a la invención. Los requisitos para los vehículos farmacéuticos eficaces para las composiciones inyectables son bien conocidos para los expertos en la materia (véase, *Pharmaceutics and Pharmacy Practise*, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker y Chalmers, eds., páginas 238–250 (1982), y *ASHP Handbook on Injectable Drugs*, Toissel, 4ª ed., páginas 622–630 (1986)).

30 Adicionalmente, el agente activo de la invención se puede formar en supositorios para administración rectal mezclando con diversas bases, tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas de pulverización que contienen además del ingrediente activo, transportadores como los conocidos en la técnica que son adecuados.

35 El experto en la técnica apreciará que, además de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente, el agente activo de la divulgación se puede formular como complejos de inclusión, tales como complejos de inclusión de ciclodextrina, o liposomas.

40 *Dosificaciones*

45 Se cree que los agentes activos de la divulgación son útiles en métodos de inhibición de una interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G, así como otros métodos, como se describe adicionalmente en el presente documento, incluidos los métodos de tratamiento o prevención de accidente cerebrovascular, ataque del corazón, cáncer o inflamación. Para los fines de la divulgación, la cantidad o la dosis del agente activo administrado debe ser suficiente para efectuar, por ejemplo, una respuesta terapéutica o profiláctica, en el sujeto o animal durante un marco de tiempo razonable. Por ejemplo, la dosis del agente activo de la presente divulgación debe ser suficiente para tratar el cáncer, como se describe en el presente documento en un período de aproximadamente 1 a 4 minutos, 50 de 1 a 4 horas o de 1 a 4 semanas o más, por ejemplo, de 5 a 20 o más semanas, desde el momento de la administración. En ciertas realizaciones, el período de tiempo podría ser incluso más largo. La dosis se determinará mediante la eficacia del agente activo particular y la afección del animal (por ejemplo, ser humano), así como el peso del cuerpo del animal (por ejemplo, ser humano) que se va a tratar.

55 En la materia se conocen muchos ensayos para la determinación de una dosis administrada. Para los propósitos del presente documento, un ensayo, que comprende la comparación de la medida en que se trata el cáncer tras la administración de una dosis dada del agente activo de la presente divulgación a un mamífero entre un conjunto de mamíferos, cada conjunto de los cuales se administra a una dosis diferente del agente activo, podría usarse para determinar una dosis de partida para administrar a un mamífero. La medida en que se trata el cáncer tras la 60 administración de una dosis determinada puede estar representada por, por ejemplo, por la citotoxicidad del agente activo o la extensión de la regresión del tumor lograda con el agente activo en un modelo de xenoinjerto de ratón. Los métodos para medir la citotoxicidad de los compuestos y métodos de ensayo de la regresión del tumor son conocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, los métodos descritos en los EJEMPLOS que se exponen a continuación.

La dosis del agente activo de la presente divulgación también se determinará mediante la existencia, la naturaleza y la extensión de cualquier efecto secundario adverso que podría acompañar a la administración de un agente activo particular de la presente divulgación. Normalmente, el médico encargado de la atención decidirá la dosis del agente activo de la presente divulgación con la que tratar a cada paciente individual, teniendo en cuenta diversos factores, tales como la edad, el peso corporal, la salud general, la dieta, el sexo, agente activo de la presente divulgación que se va a administrar, la vía de administración, y la gravedad de la afección que se va a tratar. A modo de ejemplo y sin pretender limitar la invención, la dosis del agente activo de la presente divulgación puede ser de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 1 g / kg de peso corporal del sujeto que se está tratando / día, de aproximadamente 0,0001 a aproximadamente 0,001 g / kg de peso corporal / día, o de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 1 g / kg de peso corporal / día.

Formulaciones de liberación controlada

En algunas realizaciones, los agentes activos descritos en el presente documento pueden modificarse en una forma depot, de manera que la forma en que el agente activo de la invención se libera en el organismo al que se administra está controlada con respecto al tiempo y la ubicación dentro del cuerpo (véase, por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.450.150). Las formas depot de agentes activos de la invención pueden ser, por ejemplo, una composición implantable que comprenden los agentes activos y un material poroso o no poroso, tal como, por ejemplo, un polímero, en el que el agente activo está encapsulado o se difunde por todo el material y / o la degradación del material no poroso. A continuación, el depósito se implanta en la localización deseada dentro del cuerpo del sujeto y el agente activo se libera desde el implante a una velocidad predeterminada.

La composición farmacéutica que comprende el agente activo en ciertos aspectos se modifica para que tenga cualquier tipo de perfil de liberación *in vivo*. En algunos aspectos, la composición farmacéutica es una formulación de liberación inmediata, de liberación controlada, de liberación sostenida, de liberación prolongada, de liberación retardada o de liberación bifásica. Los métodos de formulación de péptidos para la liberación controlada se conocen en la materia. Véase, por ejemplo, Qian et al., J Pharm 374: 46-52 (2009) y las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 2008/130158, WO2004/033036; WO2000/032218; y WO 1999/040942.

Las presentes composiciones pueden comprender adicionalmente, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación prolongada para proporcionar un almacenamiento prolongado y / o efecto de liberación.

Momento de la administración

Las composiciones y formulaciones farmacéuticas divulgadas se pueden administrar de acuerdo con cualquier régimen que incluye, por ejemplo, todos los días (1 vez al día, 2 veces al día, 3 veces al día, 4 veces al día, 5 veces al día, 6 veces al día), cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, cada cinco días, cada seis días, todas las semanas, quincenalmente, cada tres semanas, mensualmente o cada dos meses. El momento, al igual que la dosificación, se puede ajustar basándose en los estudios de dosis-respuesta, la eficacia y los datos de toxicidad y, en un principio, calibrarse en función de los tiempos usados para otras terapéuticas con anticuerpos.

Combinaciones

En algunas realizaciones, los agentes activos descritos en el presente documento se administran solos, y en realizaciones alternativas, los agentes activos descritos en el presente documento se administran en combinación con otro agente terapéutico, por ejemplo, otro agente activo de la invención de tipo diferente (por ejemplo, estructura), u otra terapéutica que no inhibe una interacción de unión entre la β integrina y la subunidad α de la proteína G. En algunos aspectos, la otra terapéutica tiene como objetivo tratar o prevenir el cáncer. En aspectos específicos, la otra terapéutica es una de las enumeradas en la sección titulada "*Restos heterólogos: Agentes terapéuticos*". En algunas realizaciones, la otra terapéutica es un agente quimioterapéutico. En algunas realizaciones, la otra terapéutica es un agente usado en radioterapia para el tratamiento de cáncer.

En aspectos de ejemplo, los agentes activos descritos en el presente documento se administran o empaquetan en combinación con un agente antitrombótico. En realizaciones de ejemplo, el agente antitrombótico es un anticoagulante, por ejemplo, fondaparinux y bivalirudina. En realizaciones de ejemplo, el agente antitrombótico es un agente antiagregante plaquetario, por ejemplo, aspirina, clopidogrel, dipiridamol, y abciximab.

En realizaciones de ejemplo, el agente activo se administra al mismo tiempo como la otra terapéutica. En realizaciones alternativas, el agente activo se administra antes o después de la otra terapéutica.

Métodos de uso

Dada la importancia de las funciones biológicas de una β integrina y una subunidad α de proteína G, de forma individual, y, como se muestra en el presente documento, en combinación uno con el otro, los agentes activos de la invención son útiles para una serie de aplicaciones en diversos entornos. Por ejemplo y de forma más simplista, los

agentes activos de la invención son útiles para inhibir una interacción de unión entre una integrina P y una subunidad α de proteína G. A este respecto, la divulgación proporciona un método para inhibir una interacción de unión entre una β integrina y una subunidad α subunidad de proteína G. El método comprende poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la interacción de unión.

5 En algunos aspectos, la célula es parte de un cultivo celular *in vitro* o *ex vivo* o muestra de tejido *in vitro* o *ex vivo*. En algunos aspectos, la célula es una célula *in vivo*. En ciertas realizaciones, el método está destinado a fines de investigación, y, en otras realizaciones, el método está destinado a fines terapéuticos.

La divulgación también proporciona un método para inhibir la activación de Src dependiente de integrina en una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la activación de Src. Los métodos para medir la activación de Src dependiente de integrina se conocen en la materia e incluyen, por ejemplo, los expuestos en el presente documento en los EJEMPLOS y el uso del ensayo ProFluor[®] de la familia Src quinasa (Promega, Madison, WI) o uno de los kits de ensayo de la actividad de Src disponibles en Millipore (Billerica, MA).

La divulgación proporciona además un método de activación de una GTPasa pequeña. El método comprende la etapa de poner en contacto una subunidad de la proteína G con un compuesto o composición en una cantidad eficaz para activar una GTPasa pequeña. En aspectos de ejemplo, la GTPasa pequeña del método de la invención es RhoA. Los métodos de medición de la actividad GTPasa se conocen en la materia e incluyen, por ejemplo, los expuestos en el presente documento en los EJEMPLOS. Adicionalmente, los niveles de actividad GTPasa pueden medirse utilizando kits disponibles comercialmente (Thermo Fisher Scientific, Inc. (Rockford, IL), Innova Biosciences (Cambridge, UK), Cell Biolabs, Inc. (San Diego, CA).

La divulgación proporciona además un método para inhibir la propagación o migración de una célula. El método comprende la etapa de poner en contacto la célula con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la propagación y la migración. La célula puede ser cualquier célula que experimente adhesión dependiente de integrina, diseminación, retracción o migración, o cualquier célula que experimente supervivencia y proliferación dependiente de anclaje. En aspectos de ejemplo, la célula es una plaqueta, leucocito, célula endotelial, fibroblasto, célula epitelial. Los métodos para medir la propagación celular o la migración celular se conocen en la materia. Véanse, por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento en los EJEMPLOS.

También se proporciona un método para inhibir la adhesión de las plaquetas. El método comprende la etapa de poner en contacto una plaqueta con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión de las plaquetas. La divulgación proporciona además un método de inhibición de la secreción de gránulos por las plaquetas y la agregación plaquetaria. El método comprende la etapa de poner en contacto una plaqueta con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la secreción de gránulos y la agregación. Los métodos para medir la secreción de gránulos de las plaquetas o la agregación plaquetaria se conocen en la materia. Por ejemplo, la agregación plaquetaria puede medirse en plasma rico en plaquetas (PRP) utilizando un agregómetro de plaquetas turbidomátrico para analizar las plaquetas lavadas. La agregación puede estar indicada por un aumento en la transmisión de luz a través del PRP o la suspensión de plaquetas. La agregación de plaquetas también se puede medir en la sangre entera utilizando un agregómetro de plaquetas en sangre entera, en el que la agregación de las plaquetas viene indicado por un aumento en la resistencia eléctrica de los electrodos. Véanse, por ejemplo, los métodos descritos en el presente documento en EJEMPLOS.

Los compuestos y las composiciones se contemplan, además, con fines terapéuticos. Por ejemplo, los compuestos y las composiciones de la invención se usan para mejorar la retracción del coágulo de sangre o inhibir la trombosis en un sujeto que lo necesite. Por consiguiente, la invención proporciona un método para mejorar la retracción del coágulo de sangre en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para mejorar la retracción del coágulo de sangre. También se proporciona un método para inhibir la trombosis en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la trombosis.

Debido a que la coagulación de la sangre y la trombosis desempeñan un papel en el accidente cerebrovascular y el ataque al corazón, la invención proporciona además un método de tratamiento o prevención de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el accidente cerebrovascular o el ataque al corazón. Debido a que los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento se refieren al proceso de difusión-retracción celular coordinada que, a su vez, es importante en la migración celular, la invención también proporciona un método para inhibir la metástasis de una célula tumoral. El método comprende la etapa de poner en contacto una célula tumoral con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la metástasis. También se contemplan los compuestos y composiciones para su uso en la inhibición de la angiogénesis. De acuerdo con lo anterior, la invención proporciona un método para inhibir la angiogénesis en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la angiogénesis.

La estimulación del coágulo y la retracción celular por los compuestos de la invención también puede facilitar la cicatrización de heridas. De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un método para facilitar la cicatrización de heridas en un sujeto que la necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para facilitar la cicatrización de heridas. En

5 aspectos de ejemplo, el compuesto o composición se administra al sujeto por vía tópica cerca o en el sitio de la herida. En realizaciones de ejemplo, la tasa de curación de la herida se incrementa en al menos 10 %, 25 %, 50 %, 75 %, 90 % o más, en comparación con el momento en que la herida se curaría sin la administración del compuesto o composición de la invención.

10 Dado que la metástasis y la angiogénesis son aspectos importantes del cáncer, la divulgación proporciona además un método para tratar o prevenir el cáncer en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para tratar o prevenir el cáncer. En aspectos de ejemplo, el sujeto tiene un tumor sólido y el compuesto o composición de la invención se

15 administra cerca o en el sitio del tumor. En aspectos de ejemplo, se administra el compuesto o la composición mediante inyección en el sitio del tumor.

Los compuestos y composiciones proporcionados en el presente documento también se pueden utilizar para afectar a la función de los leucocitos. De acuerdo con lo anterior, la divulgación proporciona un método para inhibir la adhesión, la propagación, la migración, o la quimiotaxis de los leucocitos. El método comprende la etapa de poner

20 en contacto un leucocito con un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir la adhesión, la propagación, la migración, o la quimiotaxis de los leucocitos. Puesto que estas funciones de los leucocitos están relacionadas con la inflamación, la divulgación proporciona además un método para inhibir o tratar la inflamación en un sujeto que lo necesite. El método comprende la etapa de administrar al sujeto un compuesto o composición de la invención en una cantidad eficaz para inhibir o tratar la inflamación. En realizaciones de ejemplo,

25 el compuesto o composición se administra al sujeto por vía sistémica, por ejemplo, por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa).

Tratamiento, prevención e inhibición

30 Tal como se utiliza en el presente documento el término "tratar", así como las palabras relacionadas con el mismo, no implica necesariamente el 100 % o el tratamiento completo. Más bien, hay diferentes grados de tratamiento cada uno de los cuales el experto en la técnica reconoce que tienen un potencial beneficio o efecto. A este respecto, los métodos de tratamiento de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón o cáncer o inflamación de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento terapéutico. A este respecto, los

35 métodos de tratamiento de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón o cáncer o inflamación de la invención pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de tratamiento. Adicionalmente, el tratamiento proporcionado por el método de la invención puede incluir el tratamiento de una o más afecciones o síntomas o signos del accidente cerebrovascular, ataque al corazón, cáncer o la inflamación, que se esté tratando. Además, el tratamiento proporcionado por los métodos de la invención puede abarcar la ralentización de la progresión del

40 accidente cerebrovascular, el ataque al corazón, el cáncer o la inflamación. Por ejemplo, los métodos pueden tratar el cáncer en virtud de la reducción del tumor o el crecimiento del cáncer, la reducción de la metástasis de las células tumorales, el aumento de la muerte celular del tumor y las células cancerosas, y similares.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" y las palabras derivadas engloban retrasar el inicio de la afección médica que se quiere prevenir. En aspectos de ejemplo, el método retrasa la aparición de la afección médica en 1 día, 2 días, 4 días, 6 días, 8 días, 10 días, 15 días, 30 días, dos meses, 4 meses, 6 meses, 1

45 año, 2 años, 4 años, o más. Tal como se utiliza en el presente documento, el término "prevenir" y las palabras derivadas engloban retrasar el inicio de la afección médica que se quiere prevenir. En aspectos de ejemplo, el método reduce el riesgo de SCD 2 veces, 5 veces, 10 veces, 20 veces, 50 veces, 100 veces, o más.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "inhibir" y las palabras derivadas puede no ser un 100 % o inhibición o anulación completa. Más bien, hay diferentes grados de inhibición cada uno de los cuales el experto en la técnica reconoce que tienen un potencial beneficio o efecto terapéutico. A este respecto, los compuestos de la invención pueden inhibir la interacción de unión entre una β integrina y la subunidad α de la proteína G a cualquier

55 cantidad o nivel. En realizaciones de ejemplo, la inhibición proporcionada por los métodos de la invención es al menos o aproximadamente una inhibición del 10 % (por ejemplo, al menos o aproximadamente una inhibición del 20 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 30 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 40 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 50 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 60 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 70 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 80 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 90 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 95 %, al menos o aproximadamente una inhibición del 98 %).

Cáncer

65 El cáncer que se puede tratar mediante los métodos divulgados en el presente documento puede ser cualquier cáncer, por ejemplo, cualquier crecimiento maligno o tumor causado por la división anormal e incontrolada de células

que pueden diseminarse a otras partes del cuerpo a través del sistema linfático o del torrente sanguíneo. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer en el que una integrina y una subunidad α de proteína G se expresan en la superficie de las células.

- 5 El cáncer en algunos aspectos es uno seleccionado del grupo que consiste en cáncer linfocítico agudo, leucemia mieloide aguda, rhabdomyosarcoma alveolar, cáncer de huesos, cáncer de cerebro, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal, o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer del cuello, de la vesícula biliar, o la pleura, cáncer de la nariz, la cavidad nasal, o el oído medio, cáncer de la cavidad oral, cáncer de la vulva, leucemia linfocítica crónica, cáncer mieloide crónico, cáncer de colon, cáncer de esófago, 10 cáncer de cuello uterino, tumor carcinoide gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, cáncer de hipofaringe, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, mesotelioma maligno, melanoma, mieloma múltiple, cáncer de nasofaringe, linfoma no Hodgkin, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, peritoneo, omento, y el cáncer de mesenterio, cáncer de faringe, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales (CCR)), cáncer de intestino delgado, cáncer de tejidos blandos, cáncer de estómago, cáncer testicular, 15 cáncer de tiroides, cáncer de uréter y cáncer de vejiga urinaria. En aspectos particulares, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en: cánceres de cabeza y cuello, de ovarios, cervical, de vejiga y de esófago, cáncer de páncreas, cáncer gastrointestinal, gástrico, de mama, de endometrio y colorrectal, carcinoma hepatocelular, glioblastoma, de vejiga, cáncer de pulmón, por ejemplo, cáncer de pulmón no microcítico (CPNM), carcinoma bronquioloalveolar.

20 *Sujetos*

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto es un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, mamíferos del orden Rodentia, tales como ratones y hámsteres, y mamíferos del orden Logomorpha, tales como conejos, 25 mamíferos del orden Carnivora, incluyendo felinos (gatos) y caninos (perros), mamíferos del orden Artiodactyla, incluyendo bovinos (vacas) y cerdos (cerdos) o del orden Perssodactyla, incluyendo equinos (caballos). En algunos aspectos, los mamíferos son del orden de los Primates, Ceboids, o Simoids (monos) o de la Anthropoids (seres humanos y simios). En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano. En algunos aspectos, el ser humano es un adulto de 18 años o más. En algunos aspectos, el ser humano es un niño de 17 años o menos.

30 *Kits*

En algunas realizaciones, la composición que comprende un compuesto, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un conjugado que comprende el compuesto, o un multímero o dímero que comprende el compuesto, se 35 proporciona como un kit o paquete o dosis unitaria. La "dosis unitaria" es una cantidad discreta de una composición terapéutica dispersa en un vehículo adecuado. De acuerdo con lo anterior, en el presente documento se proporcionan kits que comprenden un compuesto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un conjugado que comprende el compuesto, o un multímero o dímero que comprende el compuesto.

40 En algunas realizaciones, los componentes del kit / dosis unitaria están empaquetados con instrucciones para la administración a un paciente. En algunas realizaciones, el kit comprende uno o más dispositivos para la administración a un paciente, por ejemplo, una aguja y una jeringa, una cuentagotas, una cuchara o taza dosificadora o un dispositivo similar, un inhalador, y similares. En algunos aspectos, el compuesto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un conjugado que comprende el compuesto, o un multímero o dímero que 45 comprende el compuesto, se preempaqueta en una forma lista para usar, por ejemplo, una jeringa, una bolsa intravenosa, un inhalador, un comprimido, cápsula, etc. En algunos aspectos, el kit comprende además otros agentes terapéuticos o de diagnóstico o vehículos farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, disolventes, tampones, diluyentes, etc.), incluyendo cualquiera de los descritos en el presente documento. En aspectos particulares, el kit comprende un compuesto de la invención, una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, un 50 conjugado que comprende el compuesto, o un multímero o dímero que comprende el compuesto, junto con un agente, por ejemplo, un agente terapéutico, usado en quimioterapia o radioterapia.

Los siguientes ejemplos se proporcionan meramente para ilustrar la presente invención y de ningún modo para 55 limitar su alcance.

Ejemplos

Ejemplo 1

60 Los siguientes materiales y métodos se usaron en los estudios descritos en el Ejemplo 2.

Reactivos

65 Péptido $G\alpha_{13}$ SRI miristoilado, Myr-LLARRPTKGIHEY (mSRI-, SEQ ID NO: 46) y péptido revuelto miristoilado (Myr-LIRYALHRPTKEG; SEQ ID NO: 47) se sintetizaron y se purificaron en el Research Resource Center at University of Illinois, Chicago (S1). La expresión y purificación de $G\alpha_{13}$ recombinante se describieron previamente (S2). El

anticuerpo anti-RhoA y la C3 transferasa permeable a la célula (toxina C3) se adquirieron en Cytoskeleton, Inc.; los anticuerpos anti- α_{13} (SC410), anti-c-Src (sc-18) y anti-integrina β_3 (sc-6627) de ratón procedieron de Santa Cruz Biotechnology, Inc; el anticuerpo anti-fosfo-Src Y⁴¹⁶ se obtuvo de Cell Signaling; anticuerpo frente a la integrina β_3 humana, los anticuerpos MAb 15 y anti- α_{11b} β_3 , D57, fueron proporcionados amablemente por el Dr. Mark Ginsberg (University of California, San Diego, La Jolla, CA); el anticuerpo monoclonal anti-GPIb LJP3 fue proporcionado amablemente por el Dr. Zaverio Ruggeri, the Scripps Research Institute, La, Jolla, CA); los anticuerpos anti-tubulina y anti-flag se adquirieron en Sigma-Aldrich; lipofectamina 2000, el sistema de expresión en lentivirus viraPower, faloidina conjugado con Alexa Fluor 546, faloidina conjugado con Alexa Fluor 633 y el anticuerpo IgG anti-ratón conjugado con Alexa Fluor 546 procedían de Invitrogen; Y27632 se adquirió en Calbiochem.

Preparación de plaquetas, diseminación de plaquetas y retracción del coágulo.

Los estudios que utilizan plaquetas humanas fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Illinois en Chicago. Las plaquetas lavadas humanas se prepararon a partir de sangre extraída recientemente de voluntarios sanos y se resuspendieron en tampón de Tyrode modificado (NaHCO₃ 12 mM, NaCl 138 mM, glucosa 5,5 mM, KCl 2,9 mM, MgCl₂ 2 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, HEPES 10 mM, (pH 7,4) (S3, S4). Los estudios con animales fueron aprobados por el Comité de Cuidados de Animales institucionales de la Universidad de Illinois en Chicago. La sangre se extrajo recientemente de la vena cava inferior en ratones anestesiados con isoflurano. Las plaquetas de ratón se aislaron y se lavaron usando los métodos descritos anteriormente (S4, S5). Para el análisis de la propagación de plaquetas sobre fibrinógeno ligando de integrina se dejó que las plaquetas lavadas se diseminaran en cubreobjetos recubiertos con fibrinógeno 100 μ g/ml a 37 °C durante 90 minutos, se tiñeron y vieron con un microscopio Leica RM1 RB o un microscopio confocal Zeiss LSM510 META como se ha descrito previamente (S5). La retracción del coágulo se analizó con el método descrito previamente (S6, S7). En pocas palabras, las plaquetas de ratón (6 x 10⁹/ ml) se resuspendieron en plasma humano con depleción de plaquetas y se añadieron 0,4 U / ml de α -trombina para iniciar la coagulación. Los coágulos se fotografiaron en diversos puntos de tiempo. Los tamaños de los coágulos retraídos en las fotografías se cuantificaron utilizando el software NIH Image J. La significación estadística se determinó usando la prueba t de Student.

30 Coimmunoprecipitación y ensayos de unión

Las plaquetas humanas o células CHO que expresan la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ recombinante se solubilizaron en tampón RIPA modificado (Tris 50 mM, pH 7,4, MgCl₂, 10 mM, NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, ortovanadato de sodio 1 mM, NaF 1 mM), o tampón RIPA (Tris 25 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, 1 % de desoxicolato de sodio, 0,1 % de SDS) y comprimidos de cóctel inhibidor completo de la proteasa (1 comprimido / 5 ml de tampón, Roche). Como se ha descrito previamente (S7), los lisados celulares se incubaron con 2 μ g/ml de D57 (anticuerpo frente a la integrina $\alpha_{11b}\beta_3$), LJP3 (anticuerpo contra GPIb) o IgG de ratón y se incubaron adicionalmente con perlas de Sepharose conjugadas con la proteína G. Los lisados celulares se incubaron también con anticuerpo IgG anti- α_{13} de conejo (1,5 μ g/ml) o una cantidad igual de IgG de conejo y se incubaron adicionalmente con perlas de Sepharose conjugadas con proteína A. Después de 3-6 lavados con tampón de lisis, los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis en SDS-gel de poli(acrilamida) y transferencias Western con anticuerpos contra β_3 (MAb15), GPIb (anti-IbaC (S8)) o α_{13} . En algunos experimentos se añadieron GDP 1 μ M, GTP γ S 1 μ M o 30 [tM AIF₄⁻ a la reacción para evaluar el efecto de la activación de α_{13} sobre la unión a la integrina. En otros experimentos, mSR1 250 μ M o péptido control revuelto se incubó con lisados de plaquetas antes de la inmunoprecipitación. El análisis con esferas de GST se describió previamente (S7). La α_{13} purificada se incubó con perlas de glutatión unidas a GST, GST- β_1 CD o GST- β_3 CD a 4 °C durante la noche. Las proteínas unidas a las esferas se analizaron mediante inmunotransferencia. Para la construcción de ADNc de GST- β_3 CD, se generó el ADNc del dominio citoplasmático de integrina- β_3 (716-762) mediante PCR y se clonó en el vector pGEX-4T2 usando los sitios de restricción Bam HI y Xho I. El cebador directo es 5'-CGTGGATCCAACTCCTCATCACCATCCACGACC-3' (SEQ ID NO: 48); el cebador inverso es 5'-GCGCTCGAGTTAAGTGCCCCGGTACGTGATATTG-3' (SEQ ID NO: 49). Para la construcción de ADNc GST-131CD, el ADNc del dominio citoplasmático β_1 (752-798) se amplificó mediante PCR y se clonó en el vector pGEX-4T1 usando los sitios de restricción EcoRI y XhoI. Las secuencias de los cebadores son: (1) directo: 5'-GCGAATTC AAGCTTTTAATGATAATTCATGAC-3' (SEQ ID NO: 50); (2) inverso: 5'-GCGCTCGAGTCATTTCCCTCATACTTCGGATT-3' (SEQ ID NO: 51). GST, GST- β_1 CD y GST- β_3 CD se purificaron de BL21 (DE3) *E. coli* usando perlas conjugadas con glutatión.

Expresión de α_{13} silvestre y mutantes de truncamiento para la unión a β_3

El ADNc de α_{13} humano (S9) se marcó con el epitopo Flag en el extremo N usando PCR con la secuencia del ADNc de Flag incorporado en el cebador directo y después se subclonó en el vector pCDEF3 usando los sitios de restricción KpnI y NotI. La secuencia del cebador directo es 5'-GCGGGTACCGCCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCGGACTTCC-TGCCGTGCGGGTCCCGT-3' (SEQ ID NO: 52). La secuencia del cebador inverso es 5'-GGCCGGCGCGCCGCTCACTGTAGCATAAGCTGCTTGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 53). Los mutantes de truncamiento de α_{13} se generaron usando PCR con las secuencias del cebador inverso 5'-

GGCCGGCGGCCGCTCAAATATCTTGTGTGATGGAAT-ATAATCTGGTTCTCCAAGTTTATCCAAG-3' (SEQ ID NO: 54). Para el mutante 1-196; y 5'-GGCCGGCGGCCGCTCATTCAAAGTCGTATTCATGGATGCC-3' (SEQ ID NO: 55) para el mutante 1-212.

- 5 El ADNc que codifica los mutantes de $G\alpha_{13}$ o $G\alpha_{13}$ silvestres marcados con Flag se transfectaron en células 293FT usando lipofectamina 2000. Los lisados celulares se prepararon 48 horas después de la transfección. La $G\alpha_{13}$ mutante o silvestre marcada con Flag en los lisados celulares 293FT se incubaron con GST unidos a perlas de glutatión o GST- β_3 CD a 4 °C durante la noche. Después de la centrifugación y el lavado, las proteínas unidas a las esferas se sometieron a inmunotransferencia con anticuerpos anti-Flag.

10

Ensayo de la actividad RhoA

- 15 Las plaquetas en tampón de Tyrode modificado o adherente sobre el fibrinógeno inmovilizado se lisaron rápidamente en 0,8 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, $MgCl_2$ 10 mM, NaCl 500 mM, 1 % de Triton X-100, 0,1 % de SDS, 0,5 % de desoxicolato, 10 μ g/ml cada uno de aprotinina y leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonio 1 mM y vanadato sódico 200 μ M). Los lisados se aclararon mediante centrifugación a 18.000 g durante 2 minutos a 4 °C y el sobrenadante se incubó durante 1 hora con 30 μ g de la proteína de fusión del dominio de unión a RhoA GST-Rhotekin (GST-RBD) unido a perlas de Sepharose-glutatión (S10). Las muestras se lavaron tres veces usando tampón de lavado (Tris 50 mM, pH 7,4, $MgCl_2$, 10 mM, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100) y después
20 inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal anti-RhoA. Los lisados celulares también se sometieron a inmunotransferencia con anti-RhoA como control de carga.

Interferencia de la expresión de $G\alpha_{13}$ con ARNip, rescate con $G\alpha_{13}$ resistente a ARNip y trasplante de médula ósea

25

- Se usaron dos secuencias diana de ARNip de $G\alpha_{13}$ diferentes: ARNip n.º 1, 5'-GTCCACCTTCTGAAGCAG (SEQ ID NO: 56); ARNip n.º 2, 5'-GGAGATCGACAAATGCCTG (SEQ ID NO: 57). La secuencia del ARNip revuelto es: 5'-GAGGAGCCGACGCTTAATA.3' (SEQ ID NO: 58). Estas secuencias están conservadas en hámsteres y ratones. El lentivirus se preparó mediante cotransfección de ARNip revuelto-pLL3.7 o ARNip de pLL3.7- $G\alpha_{13}$ (n.º 1 y n.º 2) con los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP/VSFG (Invitrogen) en células 293FT con una confluencia ~90 % utilizando Lipofectamina 2000. 48 horas después de la transfección se filtró el medio de cultivo celular que contiene virus, se tituló y se almacenó a -80 °C. Las células de la médula ósea de ratones C57/BL sanos de 6-8 semanas de edad se aislaron asépticamente de los fémures y las tibias. Las células madre se seleccionaron negativamente con el kit de depleción celular de linaje MACS (Miltenyi Biotec) y se cultivaron en medio completo RPMI 1640 con 10 ng/ml de interleucina-3, 10 ng / ml de interleucina-6, 10 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y 100 ng / ml de factor de células madre (SCF). Se usaron lentivirus con una multiplicidad de infección (MOI) de 50 para infectar las células madre de la médula ósea de los ratones dos veces con 6 μ g/ml de polibreno. 48 horas después de la infección, 5×10^6 células madre resuspendidas en PBS se trasplantaron mediante inyección retrobulbar en ratones C57 / BL irradiados letalmente (10,5 Gy) un día después de la irradiación (S11). Los mutantes
30 resistentes al ARNip de $G\alpha_{13}$ se generaron mediante PCR.

35

- Estos mutantes cambiaron la secuencia diana del ARNip n.º 1 a 5'-GTCCACCTTtTaAAGCAG-3' (SEQ ID NO: 59) o la secuencia diana del ARNip n.º 2 a 5'-GGAGATCGATAAgtGCCTG-3' (SEQ ID NO: 60) sin cambiar la secuencia de aminoácidos de $G\alpha_{13}$. Los mutantes se subclonaron en el vector pLenti6N5-Dest usando los sitios de restricción EcoR I y Sal I en los fragmentos de PCR y los sitios de restricción EcoRI y Xho I en el vector. Las secuencias de los cebadores son las siguientes: (1) cebador directo marcado con Flag: 5'-CGGAATTCG-CCATGGACTACAAGGACGACGATGACAAGGCGGACTTCTGCCGTCGCGGTCCGT-3' (SEQ ID NO: 61); (2) cebador inverso: 5'-GCCGTCGACTCACTGTAGCATAAGCTGCTTGAGGTT-3' (SEQ ID NO: 62); (3) cebador directo en el sitio de mutación para la resistencia al ARNip n.º 1: 5'-GTCCAAGGAGATCGATAAGTGCCTGTCTCGGGAA-3' (SEQ ID NO: 63); (4) cebador inverso en el sitio de mutación para la resistencia al ARNip n.º 1: 5'-TTCCCGAGACAGGCACCTTATCGATCTCCTTGGAC-3' (SEQ ID NO: 64); (5) cebador directo en el sitio de mutación para la resistencia al ARNip n.º 2: 5'-CGGCAAGTCCACCTTTTTAAAGCAGATGCGGATC-3' (SEQ ID NO: 65); (6): cebador inverso en el sitio de mutación para la resistencia al ARNip n.º 2: 5'-GATCCGCATCTGCTTTAAAAAGGTGGACTTGCCG-3' (SEQ ID NO: 66).
45
50
55

- Las células CHO que expresan células $\alpha_{IIb}\beta_3$ humanas (123 células) se transfectaron con la construcción del ARNip de $G\alpha_{13}$ con o sin cotransfección del plásmido con el ARNip marcado con Flag de resistencia a $G\alpha_{13}$ utilizando lipofectamina 2000. Después de 30 horas, las células se desprendieron mediante EDTA 0,53 mM en solución salina tamponada con fosfato y se dejó que se propagaron sobre 100 μ g/m de fibrinógeno. Para la fosforilación de c-Src, las células se solubilizaron en tampón de muestra-SDS se someten a inmunotransferencia con anticuerpo anti c-Src pY416. Para los experimentos de inmunotinción, se dejó que 123 células cotransfectadas con el plásmido con ARNip de $G\alpha_{13}$ y el plásmido con ARNip de resistencia a $G\alpha_{13}$ se adhirieran a 100 μ g/ml de fibrinógeno durante 1 hora, se fijaron mediante paraformaldehído al 4 %, y se tiñeron mediante el anticuerpo anti-flag y el anticuerpo secundario conjugado con Alexa Fluor 546 y faloidina conjugada con Alexa Fluor 633. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio confocal Zeiss LSM510META.
60
65

Cuantificación y estadística

Las bandas de la transferencia Western se escanearon y se analizaron para la densidad óptica sin calibrar utilizando el software NIH Image J. Se utilizó la prueba t de Student para determinar la significación estadística.

5

Ejemplo 2

Las integrinas participan en la adhesión celular y transmiten señales dentro de la célula que conducen a la propagación, retracción, migración, y proliferación celular (1). Por lo tanto, las integrinas tienen papeles fundamentales en procesos biológicos tales como el desarrollo, la inmunidad, el cáncer, la curación de heridas, la hemostasia y la trombosis. La integrina plaquetaria, $\alpha_{IIb}\beta_3$, normalmente muestra función de señalización bidireccional (2, 3). Las señales procedentes de dentro de la célula activan la unión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ a ligandos extracelulares, que a su vez desencadena de señalización dentro de la célula iniciada por el receptor ocupado (la denominada señalización "de fuera a dentro"). Una importante consecuencia temprana de la señalización "de fuera a dentro" de la integrina es la propagación celular, que requiere la activación de la proteína cinasa c-Src y la inhibición mediada por c-Src de la guanosina trifosfatasa pequeña (GTPasa) RhoA (4-7). La escisión posterior del sitio de unión a c-Src en β_3 por calpaína permite la activación de RhoA, que estimula la retracción celular (7, 8). El mecanismo molecular de acoplamiento de $\alpha_{IIb}\beta_3$ unido a ligando a estos eventos de señalización ha sido poco claro.

Las proteínas heterotriméricas de unión al nucleótido guanina (proteínas G) consisten en las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ (9). Las proteínas G se unen al lado intracelular de los receptores acoplados a la proteína G (GPCR) y transmiten señales que son importantes en muchos acontecimientos intracelulares (9-11). La $G\alpha_{13}$, cuando es activada por los GPCR, interacciona con los factores de intercambio de nucleótidos de guanina Rho (RhoGEF) y, por tanto, activa RhoA (11-14), lo que facilita la contractilidad y el redondeo de las plaquetas discoidales (cambio de forma). Para determinar si $G\alpha_{13}$ funciona en la señalización de la integrina ocupada por ligando, los inventores investigaron si la inhibición de la expresión de $G\alpha_{13}$ con ARN de interferencia pequeño (ARNip) afectaba a la propagación de las plaquetas dependiente de $\alpha_{IIb}\beta_3$ sobre el fibrinógeno, que es un ligando de la integrina. Se aislaron las células madre de médula ósea de ratones y se transfectaron con lentivirus que codifica ARNip de $G\alpha_{13}$. Las células madre transfectadas se transplantaron en ratones C57 / BL6 irradiadas (15). De cuatro a seis semanas después del trasplante, casi todas las plaquetas aisladas de ratones receptores se obtuvieron a partir de células madre trasplantadas como se indica por la proteína verde fluorescente potenciada (EGFP) codificada en el vector lentivirus (Figura 5, Figura 1A). Las plaquetas de ratones receptores de células madre transfectadas con ARNip de $G\alpha_{13}$ mostraron una disminución > 80 % de la expresión de $G\alpha_{13}$ (Figura 1B). Cuando se permitió que las plaquetas se adhirieran a fibrinógeno inmovilizado, [unión de $\alpha_{IIb}\beta_3$ a fibrinógeno inmovilizado no requiere activación previa de la señalización "de dentro a fuera" (16)], las plaquetas con depleción de $G\alpha_{13}$ se propagan mal en comparación con las plaquetas de control (Figura 1A, Figura 6). Es improbable que el efecto inhibitorio de la deficiencia de $G\alpha_{13}$ se deba a su efecto sobre la señalización de $G\alpha_{13}$ estimulada con GPCR porque (i) se usaron plaquetas en reposo lavadas y no se añadieron agonistas de GPCR y (ii) tratamiento previo con aspirina 1 mM [que anula la generación de tromboxano A_2 (TXA₂) (17)] no afectó a la propagación de las plaquetas sobre el fibrinógeno (Figura 6), lo que convierte en improbable la estimulación de $G\alpha_{13}$ mediada por TXA₂ endógeno. Además, el ARNip de $G\alpha_{13}$ inhibió la propagación de las células de ovario de hámster chino (CHO) QUE EXPRESAN $\alpha_{IIb}\beta_3$ humana (123 Células) (18), que se rescató mediante una $G\alpha_{13}$ resistente al ARNip (Figura 7). Por tanto, la $G\alpha_{13}$ parece ser importante en la señalización de "fuera a dentro" de la integrina que conduce a la propagación de células.

Para determinar si la $G\alpha_{13}$ sirve como un mecanismo de señalización temprano que media en la activación inducida por integrina de c-Src, se midió la fosforilación de c-Src en Tyr⁴¹⁶ (Que indica la activación de c-Src) en las células control y las células unidas al fibrinógeno. La depleción de $G\alpha_{13}$ en las plaquetas de ratón o 123 células anuló la fosforilación de c-Src Tyr⁴¹⁶ (Figura 1C, Figura 7), lo que indica que $G\alpha_{13}$ puede unir la α integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ y la activación de c-Src. Debido a que c-Src inhibe la RhoA (7, 19), también se analizó el papel de $G\alpha_{13}$ en la regulación de la activación de RhoA. La actividad de RhoA se suprimió a los valores basales 15 minutos después de la adhesión de plaquetas y se activó a los 30 minutos (Figura 1C), lo que es consistente con la inhibición transitoria de RhoA por c-Src (7). La activación retardada dependiente de integrina de RhoA no se inhibió por la depleción de $G\alpha_{13}$, lo que indica su independencia de la vía GPCR- $G\alpha_{13}$ -RhoGEF (Figura 1C). Por el contrario, la depleción de $G\alpha_{13}$ aceleró la activación de RhoA (Figura 1C). Por lo tanto, la $G\alpha_{13}$ parece mediar en la inhibición de RhoA. El efecto inhibitorio de la depleción de $G\alpha_{13}$ sobre la propagación de las plaquetas fue invertido por el inhibidor de la Rho cinasa Y27632 (Figura 1A), lo que sugiere que la inhibición mediada por $G\alpha_{13}$ de RhoA es importante en la estimulación de la propagación de las plaquetas. Estos datos son consistentes con la participación de $G\alpha_{13}$ en la "señalización de fuera a dentro" de la integrina que induce la activación de c-Src, la inhibición de RhoA, y la propagación celular.

La integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ se coimmunoprecipitó mediante el anticuerpo anti- $G\alpha_{13}$, pero no la IgG control, de lisados de plaquetas (Figura 2A). Por el contrario, un anticuerpo frente a β_3 inmunoprecipitó la $G\alpha_{13}$ con β_3 (Figura 2B). La coimmunoprecipitación de β_3 con $G\alpha_{13}$ se mejoró mediante GTP- γ S o AIF₄⁻ (Figura 2A, Figura 8). Por tanto, el β_3 está presente en un complejo con $G\alpha_{13}$, preferentemente la $G\alpha_{13}$ unida a GTP activo. Para determinar si $G\alpha_{13}$ se une directamente al dominio citoplásmico de la integrina, se incubaron $G\alpha_{13}$ recombinante purificada (20) con perlas de agarosa conjugadas con glutatión S-transferasa (GST), o una proteína de fusión del dominio citoplásmico de GST-

65

β_3 . La $G\alpha_{13}$ purificada se unió a GST- β_3 CD, pero no a GST (Figura 2C). La $G\alpha_{13}$ purificada también se unió al dominio citoplásmico de la β_1 integrina fusionado con GST (GST- β_1 CD) (Figura 2D). La unión de $G\alpha_{13}$ a GST- β_3 CD y GST- β_1 CD se detectó con $G\alpha_{13}$ cargada con GDP, pero se potenció con GTP- γ S y AlF_4^- (Figuras 2C, 2D), lo que indica que los dominios citoplásmicos de β_3 y β_1 pueden interactuar directamente con $G\alpha_{13}$, y GTP aumenta la interacción. La interacción $G\alpha_{13}$ - β_3 se mejoró en las plaquetas adherentes al fibrinógeno, y mediante trombina, que estimula la unión de GTP a $G\alpha_{13}$ a través de GPCR (Figura 2E). Por lo tanto, la interacción está regulada tanto por la ocupación de la integrina como por la señalización de GPCR.

Para mapear el sitio de unión a β_3 en $G\alpha_{13}$, se incubaron los lisados celulares que contienen $G\alpha_{13}$ silvestre o mutantes de truncamiento marcados con Flag (Figura 9) con perlas GST- β_3 CD. GST- β_3 CD asociado con $G\alpha_{13}$ silvestre y el fragmento 1-212 de $G\alpha_{13}$ que contiene la región de α hélice y la región interruptora I (mSRI), pero no con el fragmento de $G\alpha_{13}$ que contiene los residuos 1-196 que carecen de SRI (Figura 2F). Por lo tanto, SR1 parece ser crítica para la unión a β_3 . A fin de determinar la importancia de SRI, la unión $G\alpha_{13}$ - β_3 se evaluó en la presencia de un péptido sintético miristoilado, Myr-LLARRPTKGIHEY (mSRI; SEQ ID NO: 45), correspondiente a la secuencia de SRI de $G\alpha_{13}$ (197-209) (21). El péptido mSRI pero no es un péptido revuelto miristoilado, inhibió la unión de $G\alpha_{13}$ a β_3 (Figura 2G), lo que indica que mSRI es un inhibidor eficaz de la Interacción β_3 - $G\alpha_{13}$. Por lo tanto, los inventores analizaron adicionalmente si mSRI podría inhibir la señalización de la integrina. El tratamiento de las plaquetas con mSRI inhibió la fosforilación dependiente de integrina de c-Src Tyr⁴¹⁶ y la activación de RhoA acelerada (Figura 3A). El efecto de mSRI es poco probable que sea el producto de su efecto inhibidor sobre la unión de RhoGEFs a $G\alpha_{13}$ SRI porque la unión de $G\alpha_{13}$ a RhoGEFs estimula la activación de RhoA, que debería inhibirse en lugar de estimularse por acción de mSRI (21). Por lo tanto, estos datos sugieren que la interacción β_3 - $G\alpha_{13}$ media la activación de c-Src y la inhibición de RhoA. Además, mSRI inhibió la propagación de las plaquetas mediada por la integrina (Figura 3B), y este efecto inhibidor fue invertido por la toxina C3 (que cataliza la ribosilación por ADP de RhoA) o Y27632, lo que confirma la importancia de la inhibición dependiente $G\alpha_{13}$ de RhoA en la propagación de las plaquetas. La trombina estimula la propagación de las plaquetas, lo que requiere las vías cdc42/Rac (22). Sin embargo, la propagación de las plaquetas estimulada por trombina también fue anulada por mSRI (Figura 3B, 3B), lo que indica la importancia de la Interacción $G\alpha_{13}$ - β_3 . Por lo tanto, la interacción $G\alpha_{13}$ -integrina parece ser un mecanismo que participa en la señalización de la integrina a c-Src y RhoA, de modo que se regula la propagación de celular.

A fin de determinar si $G\alpha_{13}$ participa en la inhibición de la señalización contráctil dependiente de RhoA inducida por integrina, se investigaron los efectos de mSRI y la depleción de $G\alpha_{13}$ sobre la retracción del coágulo dependiente de las plaquetas (la disminución de tamaño y la consolidación de un coágulo de sangre requiere la retracción dependiente de integrina de las plaquetas desde dentro) (7, 8). La retracción del coágulo fue acelerada por mSRI y la depleción de $G\alpha_{13}$ (Figura 4, A y B, Figura 10), lo que indica que $G\alpha_{13}$ regula negativamente la retracción de plaquetas dependiente de RhoA y coordina la propagación de células y la retracción. El proceso de propagación-retracción celular coordinado es también importante en la cicatrización de heridas, la migración y la proliferación celular (23).

La función de $G\alpha_{13}$ en la mediación de la inhibición dependiente de la integrina de RhoA contrasta con el papel tradicional de $G\alpha_{13}$, que es para mediar la activación inducida por GPCR de RhoA. Sin embargo, la activación mediada por GPCR de RhoA es transitoria, alcanzando un máximo 1 minuto después de la exposición de las plaquetas a la trombina, lo que indica la presencia de una señal de regulación negativa (Figura 4, D y F). Además, la activación estimulada por trombina de RhoA se produce durante el cambio de forma de las plaquetas antes de la unión sustancial del ligando a las integrinas (Figura 4, C, D y F). Por el contrario, después de la estimulación de la trombina, la unión de β_3 a $G\alpha_{13}$ se redujo a 1 minuto cuando se produce la activación dependiente de $G\alpha_{13}$ de RhoA, pero aumentó después de la agregación plaquetaria dependiente de integrina (Figura 4, E y F). La unión estimulada por trombina de $G\alpha_{13}$ a $\alpha_{IIb}\beta_3$ y la inhibición simultánea de RhoA requieren ambos la ocupación por el ligando de $\alpha_{IIb}\beta_3$ y son inhibidas por el inhibidor de la integrina RGDS (Figura 4, D-F). Por lo tanto, el estudio de los inventores no solo demuestra una función de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$ como receptor acoplado a $G\alpha_{13}$ sino también un nuevo concepto de regulación dinámica de RhoA, dependiente de $G\alpha_{13}$ en la que $G\alpha_{13}$ participa en la activación inicial de RhoA inducida por GPCR y la posterior inhibición de RhoA dependiente de la integrina posterior (Figura 4G). Estos hallazgos son importantes para la comprensión de cómo se propagan, retraen, migran y proliferan las células, que es fundamental para el desarrollo, el cáncer, la inmunidad, la cicatrización de heridas, la hemostasia y la trombosis.

Ejemplo 3

Se llevaron a cabo los siguientes materiales y métodos y los resultados de algunos se describen en el Ejemplo 4.

Animales y reactivos

Los ratones integrina se obtuvieron del Jackson Laboratory. Los péptidos miristoilados se sintetizaron y se purificaron en el Research Resource Center at University of Illinois. Estos péptidos incluyen: mP₁₃ (Myr-KFEEERARAKWDT; SEQ ID NO: 67), mP₇ (Myr-KFEEERA) y mPs (Myr-EEERA; SEQ ID NO: 68) y péptido revuelto miristoilado de mP₁₃ (Myr-EEARERKDWAKFT; SEQ NO: 69); péptido revuelto miristoilado de mP₇ (Myr-EAREKFE; SEQ ID NO: 70) y el péptido revuelto miristoilado para mP₅ (Myr-EEARE; SEQ ID NO: 71). El ADNc de

la integrina β_3 humana se clonó en el vector pcDNA3.1 después de la digestión con Hind III y Xho I, o el vector pLenti6-V5 / Dest después de la digestión con EcoR I, Mfe I y Xho I. Los mutantes por truncamiento y los mutantes de integrina E a A se notificaron previamente²³ o se generaron mediante PCR y se clonaron en el vector pCDNA3.1 mediante Bam HI y Xho I. Las secuencias de los cebadores utilizados son: (1): ITGB₃-UP: 5'-GCGAAGCTTGCCCGCCATGGACCGAGCGCGGCCGCGGCCCGCCGCTCT-3' (SEQ ID NO: 72); (2):ITGB₃-728DN:5'-GCGCTCGAGTCAAGCGAATTCCTTTTCGGTCTGGATGGTATGAG-3' (SEQ NO: 73); (3): ITGB₃-715DN: 5'-GCGCTCGAGTCACCAGATGAGCAGGCGGCCAATGAGCAG-3' (SEQ ID NO: 74); (4): Itgb₃-E731A-up: 5'-AAGAATTCGCTAAATTTGCAGAAGAACGCGCCAGAGCAA-3' (SEQ ID NO: 75); (5): Itgb₃-E732A-up: 5'- AAGAATTCGCTAAATTTGAGGCAGAACGCGCCAGAGCAA-3' (SEQ ID NO: 76); (6): Itgb₃-E733A-up: 5'-AAGAATTCGCTAAATTTGAGGAAGCACGCGCCAGAGCAA-3' (SEQ ID NO: 77); (7): Itgb₃-E731-733A-up: 5'-AAGAATTCGCTAAATTTGCAGCAGCACGCGCCAGAGCAA-3' (SEQ ID NO: 78); (8): Mfe-ITGB₃-Up: 5'-CCGCAATTGGCCCGCCATGGACCGAGCGCGGCCGCGGCCCGCCGCTCT-3' (SEQ ID NO: 79); (9): Xho I-TTGB₃-DN: 5'- GCGCTCGAGTTAAGTGCCCGGTACGTGATATTG-3' (SEQ ID NO: 80). El ADNc de integrina β_8 -CD humana se clonó en el vector pGEX4T-1 tras la digestión con Bam HI y Xho I. Las secuencias de los cebadores usados son: (1): ITGB₈-UP: 5'-CGTGGATCC ATTAGACAGGTGATACTACAATGG -3' (SEQ ID NO: 81); (2): ITGB₈-Dn: 5'- GCGCTCGAGTTAGA AGTTGCACCTGAAAGTTTC -3'(SEQ NO: 82). GST- β_3 CD y la purificación de α_{13} recombinante se describió previamente⁸. El ADNc del dominio de cabeza de talina humana corresponde a los residuos de aminoácidos talina en N-terminal 1-433, que se clonó en el vector pCDNA3.1 y el vector pMal-C2 entre los sitios EcoR I y Xho I. El anticuerpo Anti-RhoA se adquirió en Cytoskeleton, Inc.; los anticuerpos anti- α_{13} (sc410), anti-c-Src total (sc18), anti-talina (sc7534), y anti-integrina β_3 (sc6627) eran de Santa Cruz Biotechnology, Inc; el anticuerpo anti- α_{13} (26004) procedía de NewEast; el anticuerpo anti-fosfo-Src Y⁴¹⁶ se obtuvo en Cell Signaling; anti-talina (TA205) procedía de Millipore; el anticuerpo frente a la integrina β_3 humana, MAb 15 y suero de conejo 8053 fueron proporcionados amablemente por el Dr. Mark Ginsberg (University of California, San Diego, La Jolla, CA); lipofectamina 2000, el sistema de expresión en lentivirus viraPower, faloidina conjugada con Alexa Fluor 546 y en anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con Fluor 546 procedían de Invitrogen; Y-27632 es de Calbiochem.

Preparación de plaquetas y propagación sobre fibrinógeno inmovilizado

Los estudios que utilizan plaquetas humanas fueron aprobados por la Junta de Revisión Institucional de la Universidad de Illinois en Chicago. Las plaquetas lavadas humanas se prepararon a partir de sangre recién extraída de voluntarios sanos como se ha descrito previamente y se resuspendieron en tampón de Tyrode modificado (NaHCO₃, 12 mM, NaCl mM, glucosa 5,5 mM, KCl 2,6 mM, MgCl₂ 1 mM, NaH₂PO₄ 0,42 mM, HEPES 2,5 mM, CaCl₂ 1 mM a pH 7,4, 0,1 % de BSA)²⁴. Se anestesió a los ratones con isoflurano (Pharmaceutical, Inc) y las plaquetas se prepararon a partir de sangre recién extraída de la vena cava inferior y se lavaron usando el método descrito previamente²⁵. Para el análisis de la propagación de plaquetas sobre fibrinógeno ligando de integrina se dejó que las plaquetas lavadas se diseminaran en cubreobjetos recubiertos con fibrinógeno 100 μ g/ml a 37 °C durante diferentes puntos de tiempo, se fijaron, se permeabilizaron, se tiñeron y se vieron con un microscopio Leica RM1 RB o un microscopio confocal Zeiss LSM510 META como se ha descrito previamente⁸.

Ensayo de unión a fibrinógeno

Las plaquetas lavadas humanas o de ratón resuspendidas en tampón de Tyrode modificado (3 x 10⁸/ ml, 50 μ l) se incubaron con 10 μ g/ml de fibrinógeno conjugado con verde oregón⁴⁸⁸ (Molecular Probes) y PAR4AP 50 μ M durante 30 minutos a 22 °C como se ha descrito previamente²⁶. La reacción se diluyó con 0,5 ml de PBS y se analizó mediante citometría de flujo utilizando FACS Caliber (BD Biosciences, San Jose, CA).

Coinmunoprecipitación y ensayos de unión *in vitro*

Las plaquetas o células CHO-Ib9 que expresan integrina $\alpha_{11b}\beta_3$ ^{14,23} recombinantes se solubilizaron en tampón RIPA modificado (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 1 % de NP-40, ortovanadato sódico 1 mM, NaF 1 mM) con comprimidos de cóctel completo de inhibidores de la proteasa. Los lisados celulares se incubaron con IgG anti- α_{13} de conejo (1,5 μ g/ml), suero de conejo anti-integrina β_3 (5 μ l/ml) o una cantidad igual de IgG de conejo o suero pre-inmune a 4 °C durante la noche, y, posteriormente, con perlas de Sepharose conjugadas con proteína A durante 1 hora. Para el experimento de agrupamiento de integrina β_3 , las plaquetas humanas (3 x 10⁸) se estimularon con 0,025 U / ml de α -trombina durante 2 minutos a temperatura ambiente (para evitar la agregación de las plaquetas) con o sin RGDS 2 mM, después se incubaron con 5 μ l de anti-integrina β_3 8053 de suero de conejo a temperatura ambiente durante 1 hora y 5 μ g de anticuerpo secundario anti-conejo de cabra durante 1 hora más. Las plaquetas se solubilizaron después en tampón RIPA modificado. Para el control del desagrupamiento y el control de suero pre-inmune, las células se solubilizaron en tampón RIPA modificado primero, después se incubaron 5 μ l de suero 8053 o suero pre-inmune. Después de 3-6 lavados con tampón de lisis, los inmunoprecipitados se analizaron mediante electroforesis en SDS-gel de poliacrilamida y transferencias Western con anticuerpos contra β_3 , talina, o α_{13} . En algunos experimentos, el control 500 μ M o los péptidos inhibidores, mP₅, mP₇ y mP₁₃ se incubaron con lisados de plaquetas antes de la inmunoprecipitación, o RGDS 2 mM se añadió a plaquetas humanas lavadas antes de la estimulación mediante 0,025 U / ml de α -trombina. El análisis con esferas de GST se describió previamente⁸. La α_{13} o cabeza de MBP-Talina purificadas se incubaron con perlas de glutatión unidas a GST o GST- β_3 CD a 4 °C

durante la noche. Las proteínas unidas a las esferas se analizaron mediante inmunotransferencia.

Ensayo de la actividad RhoA

5 Las plaquetas o células CHO que expresan $\alpha_{IIb}\beta_3$ en tampón de Tyrode modificado o adherente sobre el fibrinógeno inmovilizado se solubilizaron en 0,8 ml de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 7,4, $MgCl_2$ 10 mM, NaCl 500 mM, 1 % de Triton X-100, 0,1 % de SDS, 0,5 % de desoxicolato, 10 $\mu g/ml$ cada uno de aprotinina y leupeptina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM y vanadato sódico 200 μM). Los lisados se aclararon a 14.000 rpm durante 2 minutos a 4 °C y el sobrenadante se incubó durante 1 hora con 30 μg de la proteína de fusión del dominio de unión a RhoA GST-Rhotekin (GST-RBD) unido a perlas de Sepharose-glutatin²⁷. Las muestras se lavaron tres veces con Tris 50 mM, pH 7,4, $MgCl_2$, 10 mM, NaCl 150 mM, 1% de Triton X-100) y después inmunotransferencia con un anticuerpo monoclonal anti-RhoA. Los lisados celulares también se sometieron a inmunotransferencia con anti-RhoA como control de carga.

15 Trasplante de médula ósea

El lentivirus se preparó mediante cotransfección del vector pLenti6/V5-Dest insertado con el ADNc de la integrina β_3 o mutante AAA de β_3 con los plásmidos pLP1, pLP2 y pLP/VSFV (Invitrogen) en células 293FT con una confluencia ~90 % utilizando Lipofectamine 2000. 48-72 horas después de la transfección se concentró el medio de cultivo celular que contiene virus, se tituló y se almacenó a -80 °C. Las células de la médula ósea de ratones integrina $\beta_3^{-/-}$ de 6-8 semanas de edad (Jackson Laboratories) se aislaron asépticamente de los fémur y las tibias. Las células madre se seleccionaron negativamente con el kit de depleción celular de linaje MACS (Miltenyi Biotec) y se cultivaron en medio completo RPMI 1640 con 10 ng/ml de interleucina-3, 10 ng / ml de interleucina-6, 10 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), y 100 ng / ml de factor de células madre (SCF). Se usaron lentivirus con una multiplicidad de infección (MOI) de 50 para infectar las células madre de la médula ósea de los ratones dos veces con 6 $\mu g/ml$ de polibreno. 48 horas después de la infección, 5×10^6 células madre resuspendidas en PBS se trasplantaron mediante inyección retrobulbar en ratones integrina $\beta_3^{-/-}$ irradiados (5Gy) un día después de la irradiación⁸.

30 Inmunofluorescencia y microscopia confocal

Los cubreobjetos se recubrieron previamente con 100 $\mu g/ml$ de fibrinógeno y se bloquearon con 5 % de BSA en PBS. 300 μl de células CHO que expresan $\alpha_{IIb}\beta_3$ (que expresan integrinas SV o mutantes; $1 \times 10^5/ml$) o plaquetas ($1 \times 10^7/ml$) suspendidas en tampón de Tyrode se añadieron a cubreobjetos y se incubaron a 37 °C durante varias duraciones de tiempo. Las células se fijaron con 4 % de paraformaldehído (PFA) durante 10 minutos y se permeabilizaron con 0,1 % de Triton X-100 en PBS durante 2 minutos. Después de bloquear con BSA al 5 % durante 10 minutos, los cubreobjetos se incubaron con 0,2 $\mu g/ml$ de mAb 15, o faloidina conjugada con Alexa Fluor-546. Para las plaquetas de ratón que vuelven a expresar β_3 silvestre o la mutante AAA de β_3 , la β_3 se sometió a inmunotinción con el anticuerpo monoclonal anti- β_3 MAb 15 y faloidina conjugada con Alexa Fluor-546. Los portaobjetos se barrieron con un microscopio confocal Zeiss LSM510 META como se ha descrito anteriormente¹¹.

Cuantificación y estadística

El software Image J se utilizó para la cuantificación de la densidad óptica no calibrada de las bandas de transferencia Western. La prueba t pareada se utilizó para el análisis estadístico (media \pm SD).

Ejemplo 4

Como se muestra en los ejemplos anteriores, una subunidad de la proteína G, $G\alpha_{13}$, se une directamente al dominio citoplásmico de β_3 , y es necesario para la señalización de la integrina fuera - dentro que conduce a la activación de c-Src, la inhibición de RhoA, y la propagación celular⁸. Para mapear los sitios de unión a $G\alpha_{13}$, se caracterizaron la unión de $G\alpha_{13}$ a un panel de mutantes por truncamiento en C-terminal de β_3 que se coexpresan de forma estable con α_{IIb} silvestre en células de ovario de hámster chino (CHO)¹⁴ (Figura 11A). La $G\alpha_{13}$ se une a los mutantes por delección de β_3 $\Delta 759$ y $\Delta 741$ y a $\alpha_{IIb}\beta_3$ silvestre. Sin embargo, la $G\alpha_{13}$ no se pudo unir a las mutaciones de delección $\Delta 728$ y $\Delta 715$ (Figura 11B), lo que indica que la secuencia de β_3 entre los restos de aminoácidos K^{729} y T^{741} se requiere para la unión de $G\alpha_{13}$.

Para determinar los restos de aminoácidos en esta región en la unión a $G\alpha_{13}$, se realizaron mutantes de β_3 que cambian los restos de ácido glutámico E731, E732 o E733 a alanina (E731 A, E732A y E733A) (Figura 11A y C). También se fabricó un mutante en el que todos estos tres restos de ácido glutámico se cambiaron a restos de alanina (AAA). Estos mutantes se co-expresaron con α_{IIb} en células CHO, y se coimmunoprecipitaron con $G\alpha_{13}$ (Figuras 11C). La integrina β_3 silvestre, pero no E731A, E733A, o los mutantes de AAA, se unen a $G\alpha_{13}$ (Figura 11C), lo que indica que los restos E731 y E733 dentro de la región son importantes para la unión de $G\alpha_{13}$. La alineación de las secuencias de diferentes subunidades de la integrina β revela un motivo de ExE conservado entre la mayoría de las subunidades β (β_1 - β_7 , en β_5 , el primer ácido glutámico se sustituye por una glutamina) (Figura 11A). En los experimentos de los inventores, las subunidades β que contienen el motivo ExE (β_1 , β_2 , y β_3)

interaccionaron todas ellas con $G\alpha_{13}$, lo que indica un motivo ExE conservado en los dominios citoplasmáticos de la mayoría de las subunidades de la integrina β que es fundamental para la unión de $G\alpha_{13}$. Curiosamente, el mutante de β_3 deficiente en la unión a $G\alpha_{13}$, AAA, no afectó negativamente a la unión del dominio de cabeza de talina. Por lo tanto, no se requiere el motivo ExE para la unión a talina. Por lo tanto, se investigó adicionalmente el efecto de la mutación AAA sobre la señalización de β_3 de fuera a dentro dependiente de $G\alpha_{13}$. La β_3 silvestre y la β_3 mutante de AAA en los vectores de lentivirus se transfectaron en las células madre de médula ósea aisladas de ratones $\beta_3^{-/-}$. Las células madre de médula ósea transfectadas se transplantaron en ratones $\beta_3^{-/-}$ después de la irradiación de alta dosis. El análisis de citometría de flujo mostró que las plaquetas de los ratones receptores expresan niveles similares de β_3 silvestre o mutante de AAA (Figura 11E). Cuando las plaquetas se sembraron sobre el fibrinógeno ligando de integrina, la mayoría de las plaquetas que expresan β_3 silvestre se propagaron, en comparación con las plaquetas $\beta_3^{-/-}$ que no se propagan. En contraste con las plaquetas que expresan la β_3 silvestre, la propagación de las plaquetas mutantes en AAA sobre el fibrinógeno se redujo (Figura 11D). Del mismo modo, las células CHO que expresan β_3 α_{11b} /mutante de AAA también eran defectuosas en la difusión sobre el fibrinógeno en comparación con las células que expresan $\alpha_{11b}\beta_3$ silvestre (Figura 12A). Las células CHO que expresan la β_3 mutante en AAA también mostraron un defecto en la activación dependiente de integrina de c-Src, como muestra la fosforilación en Tyr⁴¹⁶, y anuló la inhibición transitoria de fase temprana dependiente de integrina de RhoA durante la propagación celular (Figura 12B y C). Estos datos indican que la interrupción del motivo EXE de unión a $G\alpha_{13}$ en β_3 produjo defectos en la señalización de la integrina de fuera a dentro dependiente de c-Src.

Para desarrollar aún más los potenciales inhibidores competitivos de la unión de $G\alpha_{13}$ a β_3 , se sintetizaron tres péptidos miristoilados reflejo de las secuencias dentro de la región K⁷²⁹-T⁷⁴¹ de β_3 : mP₁₃ (Myr-KFEEERARAKWDT), mP₇ (Myr-KFEEERA), y mP₅ (Myr-EEERA) (Fig. 11A). Estos péptidos se incubaron con lisados de plaquetas antes de la coinmunoprecipitación de $G\alpha_{13}$ con β_3 . Los 3 péptidos inhibieron la coinmunoprecipitación entre $G\alpha_{13}$ y β_3 (Figura 13A), que muestra mP₅, lo que indica que la secuencia EEERA es un sitio de unión a $G\alpha_{13}$ crítico, y estos péptidos sintéticos son nuevos inhibidores de la interacción $G\alpha_{13}$ -integrina.

Con el fin de determinar si estos inhibidores peptídicos interfieren con la señalización de la integrina de fuera a dentro, los inventores analizaron los efectos de estos péptidos del dominio citoplásmico de β_3 miristoilados sobre la señalización de la integrina de fuera a dentro. El tratamiento de las plaquetas con mP₅ (y mP₇ y mP₁₃, datos similares no mostrados) también inhibió la activación de c-Src dependiente de integrina y la inhibición transitoria de RhoA dependiente de c-Src (Figura 13 B), y también anuló la propagación de las plaquetas sobre el fibrinógeno (Figura 13C). El efecto inhibitorio de mP₅ sobre la propagación de las plaquetas fue invertido por el inhibidor de la Rho cinasa, Y27632 (Figura 13C), lo que sugiere que mP₅ inhibió la propagación de las plaquetas principalmente mediante el bloqueo de la ruta de señalización inhibitoria de RhoA dependiente de dependiente de $G\alpha_{13}$ - y c-Src, como se caracteriza en un estudio reciente de los inventores⁸. Adicionalmente, mP₅ inhibió la agregación plaquetaria inducida por trombina (Fig 13E). Por el contrario, mP₅ no tuvo efecto sobre la unión de fibrinógeno inducida por agonista (agonista PAR4 del receptor de trombina) a las plaquetas (Fig 13D). Por lo tanto, el péptido inhibitorio mP₅ inhibió la señalización de la integrina 1 dependiente de $G\alpha_{13}$ de fuera a dentro sin afectar a la señalización de dentro a fuera. El péptido mP₁₃ también inhibió la señalización de la integrina de fuera a dentro (Figura 14A), pero también afectó significativamente de la señalización de dentro a fuera, como se indica por la reducción de la unión a fibrinógeno (Figura 14B), que es coherente con las observaciones anteriores de que algunos restos (particularmente F⁷³⁰, y W⁷³⁹) en este péptido son cruciales para la interacción de talina. Estos resultados demuestran la inhibición selectiva de la señalización de la integrina de fuera a dentro mediante los inhibidores peptídicos permeables a la membrana de la interacción de $G\alpha_{13}$ -integrina. Estos datos también demuestran que estos inhibidores también inhiben la propagación y la agregación de las plaquetas y, por lo tanto, útiles en el tratamiento de la trombosis. Tales inhibidores selectivos pueden permitir la adhesión de plaquetas sin un efecto de amplificación espectacular de la señalización de fuera a dentro, y, por lo tanto, son potencialmente útiles como antitrombóticos sin un profundo efecto secundario de hemorragia, en comparación con los inhibidores de la integrina que se utilizan actualmente.

50 Referencias

Lo siguiente representa una lista de las referencias citadas en los Ejemplos 1 y 2.

1. R. O. Hynes, Cell 110, 673 (2002).
2. M. H. Ginsberg, A. Partridge, S. J. Shattil, Curr Opin Cell. Biol 17, 509 (2005).
3. Y. Ma, J. Qin, E. Plow, J Thromb Haemost 5, 1345 (2007).
4. S. J. Shattil, Trends Cell Biol 15, 399 (2005).
5. A. Oberfell et al., J Cell Biol 157, 265 (2002).
6. E. G. Arias-Salgado et al., Proc Natl Acad Sci U S A 100, 13298 (2003).
7. P. Flevaris et al., J Cell Biol 179, 553 (2007).

8. P. Flevaris et al., *Blood* 113, 893 (2009).
9. N. A. Riobo, D. R. Manning, *Trends Pharmacol Sci* 26, 146 (2005).
- 5 10. L. F. Brass, D. R. Manning, S. J. Shattil, *Prog Hemost Thromb* 10, 127 (1991).
11. A. Moers et al., *Nat Med* 9, 1418 (2003).
12. T. Kozasa et al., *Science*, 280, 2109 (1998).
- 10 13. M. J. Hart et al., *Science*, 280, 2112 (1998).
14. B. Klages, U. Brandt, M.I. Simon, G. Schultz, S. Offermanns, *J Cell Biol* 144, 745(1999).
- 15 15. V. Senyuk et al., *Cancer Res* 69, 262 (2009).
16. B. S. Coller, *Blood* 55, 169 (1980).
17. Z. Li, G. Zhang, R. Feil, J. Han, X. Du, *Blood* 107, 965 (2006).
- 20 18. M. Gu, X. Xi, G. D. Englund, M. C. Berndt, X. Du, *J. Cell. Biol.* 147, 1085 (1999).
19. W. T. Arthur, L. A. Petch, K. Burridge, *Curr Biol* 10, 719 (2000).
- 25 20. S. Tanabe, B. Kreutz, N. Suzuki, T. Kozasa, *Methods Enzymol* 390, 285 (2004).
21. J. S. Huang, L. Dong, T. Kozasa, G. C. Le Breton, *J Biol Chem* 282, 10210 (2007).
22. C. Vidal, B. Geny, J. Melle, M. Jandrot–Perrus, M. Fontenay–Roupie, *Blood* 100, 4462 (2002).
- 30 23. K. Moissoglu, M. A. Schwartz, *Biol Cell* 98, 547 (2006).
24. X. P. Du et al., *Cell* 65, 409 (1991).
- 35 25. X. D. Ren, M. A. Schwartz, *Methods Enzymol* 325, 264 (2000).
- S1. J. S. Huang, L. Dong, T. Kozasa, G. C. Le Breton, *J Biol Chem* 282, 10210 (2007).
- S2. S. Tanabe, B. Kreutz, N. Suzuki, T. Kozasa, *Methods Enzymol* 390, 285 (2004).
- 40 S3. X. P. Du et al., *Cell* 65, 409 (1991).
- S4. H. Yin, A. Stojanovic, N. Hay, X. Du, *Blood* 111, 658 (2008).
- 45 S5. H. Yin et al., *Blood* 112, 1139 (2008).
- S6. P. Flevaris et al., *Blood* 113, 893 (2009).
- S7. P. Flevaris et al., *J Cell Biol* 179, 553 (2007).
- 50 S8. X. Du, J. E. Fox, S. Pei, *J Biol Chem* 271, 7362 (1996).
- S9. J. Niu, J. Profirovic, H. Pan, R. Vaiskunaite, T. Voyno–Yasenetskaya, *Circ Res* 93, 848 (2003).
- 55 S10. X. D. Ren, M. A. Schwartz, *Methods Enzymol* 325, 264 (2000).
- S11. V. Senyuk et al., *Cancer Res* 69, 262 (2009).
- 60 Lo siguiente representa una lista de las referencias citadas en los Ejemplos 3 y 4.
- 60 1. Hynes, R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 110, 673–687 (2002).
2. Moissoglu, K. & Schwartz, M.A. Integrin signalling in directed cell migration. *Biol Cell* 98, 547–555 (2006).
- 65 3. Tadokoro, S. et al. Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* 302, 103–106 (2003).

4. Ginsberg, M.H., Partridge, A. & Shattil, S.J. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 509–516 (2005).
- 5 Moser, M., Nieswandt, B., Ussar, S., Pozgajova, M. & Fassler, R. Kindlin-3 is essential for integrin activation and platelet aggregation. *Nat Med* 14, 325–330 (2008).
- 6 Montanez, E. et al. Kindlin-2 controls bidirectional signaling of integrins. *Genes Dev* 22, 1325–1330 (2008).
7. Ma, Y.Q., Qin, J., Wu, C. & Plow, E.F. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol* 181, 439–446 (2008).
- 10 8. Gong, H. et al. G protein subunit G α 13 binds to integrin α IIb β 3 and mediates integrin "outside-in" signaling. *Science* 327, 340–343 (2010).
- 15 9. Arias-Salgado, E.G. et al. Src kinase activation by direct interaction with the integrin beta cytoplasmic domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13298–13302 (2003).
- 10 Obergfell, A. et al. Coordinate interactions of Csk, Src, and Syk kinases with $[\alpha]II\beta$ 3 initiate integrin signaling to the cytoskeleton. *J Cell Biol* 157, 265–275 (2002).
- 20 11. Flevaris, P. et al. A molecular switch that controls cell spreading and retraction. *J Cell Biol* 179, 553–565 (2007).
12. Wegener, K.L. et al. Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* 128, 171–182 (2007).
- 25 13. Patil, S. et al. Identification of a talin-binding site in the integrin beta(3) subunit distinct from the NPLY regulatory motif of post-ligand binding functions. The talin n-terminal head domain interacts with the membrane-proximal region of the beta(3) cytoplasmic tail. *J Biol Chem* 274, 28575–28583 (1999).
- 30 14. Gu, M., Xi, X., Englund, G.D., Berndt, M.C. & Du, X. Analysis of the roles of 14-3-3 in the platelet glycoprotein Ib-IX-mediated activation of integrin α (IIb) β (3) using a reconstituted mammalian cell expression model. *J Cell Biol* 147, 1085–1096 (1999).
- 35 15. Arias-Salgado, E.G., Lizano, S., Shattil, S.J. & Ginsberg, M.H. Specification of the direction of adhesive signaling by the integrin beta cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 280, 29699–29707 (2005).
16. Zhang, X. et al. Talin depletion reveals independence of initial cell spreading from integrin activation and traction. *Nat Cell Biol* 10, 1062–1068 (2008).
- 40 17. Law, D.A. et al. Integrin cytoplasmic tyrosine motif is required for outside-in α IIb β 3 signalling and platelet function. *Nature* 401, 808–811. (1999).
18. Anthis, N.J. et al. Beta integrin tyrosine phosphorylation is a conserved mechanism for regulating talin-induced integrin activation. *J Biol Chem* 284, 36700–36710 (2009).
- 45 19. Nayal, A., Webb, D.J. & Horwitz, A.F. Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics. *Curr Opin Cell Biol* 16, 94–98 (2004).
20. Wang, R., Shattil, S.J., Ambruso, D.R. & Newman, P.J. Truncation of the cytoplasmic domain of beta3 in a variant form of Glanzmann thrombasthenia abrogates signaling through the integrin α (IIb) β 3 complex. *J Clin Invest* 100, 2393–2403 (1997).
- 50 21. Petrich, B.G. et al. Talin is required for integrin-mediated platelet function in hemostasis and thrombosis. *J Exp Med* 204, 3103–3111 (2007).
- 55 22. Goksoy, E. et al. Structural basis for the autoinhibition of talin in regulating integrin activation. *Mol Cell* 31, 124–133 (2008).
23. Xi, X., Bodnar, R.J., Li, Z., Lam, S.C. & Du, X. Critical roles for the COOH-terminal NITY and RGT sequences of the integrin beta3 cytoplasmic domain in inside-out and outside-in signaling. *J Cell Biol* 162, 329–339 (2003).
- 60 24. Flevaris, P. et al. Two distinct roles of mitogen-activated protein kinases in platelets and a novel Rac1-MAPK-dependent integrin outside-in retractile signaling pathway. *Blood* 113, 893–901 (2009).
- 65 25. Yin, H. et al. Src family tyrosine kinase Lyn mediates VWF/GPIb-IX-induced platelet activation via the cGMP signaling pathway. *Blood* 112, 1139–1146 (2008).

26. Su, X. et al. RGT, a synthetic peptide corresponding to the integrin beta 3 cytoplasmic C-terminal sequence, selectively inhibits outside-in signaling in human platelets by disrupting the interaction of integrin alpha IIb beta 3 with Src kinase. *Blood* 112, 592–602 (2008).

5 27. Ren, X.D. & Schwartz, M.A. Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol* 325, 264–272 (2000).

10 El uso de los términos “un” y “una/uno” y “el/la” y referencias similares en el contexto de la descripción de la invención (especialmente en el contexto de las reivindicaciones siguientes) se deberá interpretar que abarca tanto el singular como el plural, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o esté claramente
 10 contraindicado por el contexto. Los términos “que comprende”, “que tiene”, “incluyendo” y “que contiene” se deben interpretar como términos abiertos (es decir, que significan incluyendo, aunque sin limitaciones”, a menos que se indique lo contrario.

15 Todos los métodos descritos en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden adecuado, a menos que se indique lo contrario en el presente documento o que, de otro modo, claramente se contradiga en el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o términos ilustrativos (p. ej., “tal como”) proporcionados en el presente documento está destinado simplemente a iluminar mejor la invención y no impone una limitación del alcance de la invención a menos que se reivindique de otro modo. Ninguna expresión en la memoria descriptiva se debe interpretar
 20 como indicativa de ningún elemento no reivindicado esencial en la práctica de la invención.

25 Realizaciones preferidas de la presente invención se describen en el presente documento, incluido el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Variaciones de estas realizaciones preferidas pueden ser evidentes para los expertos en la técnica a la luz de la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos usen dichas variaciones según sea adecuado y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo distinto a lo descrito específicamente en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

30 <110> Du, Xiaoping

<120> INHIBIDORES DE LA UNIÓN A LA SUBUNIDAD ALFA DE LA BETA INTEGRINA-PROTEÍNA G

<130> 30303/45326A

35 <150> 61/314.027

<151> 15-03-2010

<150> 61/433.037

<151> 14-01-2011

40

<160> 83

<170> PatentIn versión 3.5

45 <210> 1

<211> 377

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50 <220>

<221> misc_feature

<223> Proteína G - Alfa 13

<300>

55 <308> Genbank / AAA36756

<309> 15-07-2006

<313> (1)..(377)

60 <400> 1

ES 2 575 160 T3

Met Ala Asp Phe Leu Pro Ser Arg Ser Val Leu Ser Val Cys Phe Pro
 1 5 10 15
 Gly Cys Leu Leu Thr Ser Gly Glu Ala Glu Gln Gln Arg Lys Ser Lys
 20 25 30
 Glu Ile Asp Lys Cys Leu Ser Arg Glu Lys Thr Tyr Val Lys Arg Leu
 35 40 45
 Val Lys Ile Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe
 50 55 60
 Leu Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Gln Asp Phe Asp Gln Arg Ala
 65 70 75 80
 Arg Glu Glu Phe Arg Pro Thr Ile Tyr Ser Asn Val Ile Lys Gly Met
 85 90 95
 Arg Val Leu Val Asp Ala Arg Glu Lys Leu His Ile Pro Trp Gly Asp
 100 105 110
 Asn Ser Asn Gln Gln His Gly Asp Lys Met Met Ser Phe Asp Thr Arg

ES 2 575 160 T3

115		120		125
Ala Pro Met	Ala Ala Gln	Gly Met Val	Glu Thr Arg	Val Phe Leu Gln
130		135		140
Tyr Leu Pro	Ala Ile Arg	Ala Leu Trp	Ala Asp Ser	Gly Ile Gln Asn
145		150		155
Ala Tyr Asp	Arg Arg Arg	Glu Phe Gln	Leu Gly Glu	Ser Val Lys Tyr
	165		170	175
Phe Leu Asp	Asn Leu Asp	Lys Leu Gly	Glu Pro Asp	Tyr Ile Pro Ser
	180		185	190
Gln Gln Asp	Ile Leu Leu	Ala Arg Arg	Pro Thr Lys	Gly Ile His Glu
	195		200	205
Tyr Asp Phe	Glu Ile Lys	Asn Val Pro	Phe Lys Met	Val Asp Val Gly
	210		215	220
Gly Gln Arg	Ser Glu Arg	Lys Arg Trp	Phe Glu Cys	Phe Asp Ser Val
225		230		235
Thr Ser Ile	Leu Phe Leu	Val Ser Ser	Ser Glu Phe	Asp Gln Val Leu
	245		250	255
Met Glu Asp	Arg Leu Thr	Asn Arg Leu	Thr Glu Ser	Leu Asn Ile Phe
	260		265	270
Glu Thr Ile	Val Asn Asn	Arg Val Phe	Ser Asn Val	Ser Ile Ile Leu
	275		280	285
Phe Leu Asn	Lys Thr Asp	Leu Leu Glu	Glu Lys Val	Gln Ile Val Ser
	290		295	300
Ile Lys Asp	Tyr Phe Leu	Glu Phe Glu	Gly Asp Pro	His Cys Leu Arg
305		310		315
Asp Val Gln	Lys Phe Leu	Val Glu Cys	Phe Arg Asn	Lys Arg Arg Asp
	325		330	335
Gln Gln Gln	Lys Pro Leu	Tyr His His	Phe Thr Thr	Ala Ile Asn Thr
	340		345	350
Glu Asn Ile	Arg Leu Val	Phe Arg Asp	Val Lys Asp	Thr Ile Leu His
	355		360	365
Asp Asn Leu	Lys Gln Leu	Met Leu Gln		
	370		375	

<210> 2
 <211> 7.98
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Beta-1 integrina

10 <300>
 <308> Swiss Prot / P05556
 <309> 11-01-2011
 <313> (1)..(798)

15 <400> 2

```

Met Asn Leu Gln Pro Ile Phe Trp Ile Gly Leu Ile Ser Ser Val Cys
 1                               5                               10                               15

Cys Val Phe Ala Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala
 20                               25                               30

Lys Ser Cys Gly Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys
 35                               40                               45

Thr Asn Ser Thr Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys
 50                               55                               60

Asp Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile
 65                               70                               75

Glu Asn Pro Arg Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr
 85                               90                               95

Asn Arg Ser Lys Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr
100                               105                               110

Gln Ile Gln Pro Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro
115                               120                               125

Gln Thr Phe Thr Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp
130                               135                               140

Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu
145                               150                               155                               160

Asn Val Lys Ser Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile
165                               170                               175

Thr Ser Asp Phe Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val
180                               185                               190
    
```

Met Pro Tyr Ile Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr
 195 200 205

Ser Glu Gln Asn Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser
 210 215 220

Leu Thr Asn Lys Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg
 225 230 235 240

Ile Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met
 245 250 255

Gln Val Ala Val Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg
 260 265 270

Leu Leu Val Phe Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly
 275 280 285

Lys Leu Gly Gly Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu
 290 295 300

Asn Asn Met Tyr Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala
 305 310 315 320

His Leu Val Gln Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala
 325 330 335

Val Thr Glu Glu Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile
 340 345 350

Pro Lys Ser Ala Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile
 355 360 365

Gln Leu Ile Ile Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu
 370 375 380

Glu Asn Gly Lys Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr
 385 390 395 400

Cys Lys Asn Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser
 405 410 415

Asn Ile Ser Ile Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser
 420 425 430

Asn Lys Cys Pro Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu
 435 440 445

Gly Phe Thr Glu Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys
 450 455 460

Glu Cys Gln Ser Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly
 465 470 475 480

Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val
 485 490 495

Gly Arg His Cys Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met
 500 505 510

Asp Ala Tyr Cys Arg Lys Glu Asn Ser Ser Glu Ile Cys Ser Asn Asn
 515 520 525

Gly Glu Cys Val Cys Gly Gln Cys Val Cys Arg Lys Arg Asp Asn Thr
 530 535 540

Asn Glu Ile Tyr Ser Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asn Phe Asn Cys
 545 550 555 560

Asp Arg Ser Asn Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys
 565 570 575

Arg Val Cys Glu Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys
 580 585 590

Ser Leu Asp Thr Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn
 595 600 605

Gly Arg Gly Ile Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys
 610 615 620

Phe Gln Gly Gln Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys
 625 630 635 640

Ala Glu His Lys Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu
 645 650 655

Lys Lys Asp Thr Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys
 660 665 670

Val Glu Ser Arg Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val
 675 680 685

Ser His Cys Lys Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr
 690 695 700

Tyr Ser Val Asn Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn
705 710 715 720

Pro Glu Cys Pro Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val
725 730 735

Val Ala Gly Ile Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys
740 745 750

Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys
755 760 765

Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys
770 775 780

Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
785 790 795

<210> 3

<211> 788

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

10 <223> Beta-3 integrina

<300>

<308> Swiss Prot / P05106

<309> 11-01-2011

15 <313> (1)..(788)

<400> 3

Met Arg Ala Arg Pro Arg Pro Arg Pro Leu Trp Ala Thr Val Leu Ala
1 5 10 15

Leu Gly Ala Leu Ala Gly Val Gly Val Gly Gly Pro Asn Ile Cys Thr
20 25 30

Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys Leu Ala Val Ser Pro Met
35 40 45

Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro Leu Gly Ser Pro Arg Cys
50 55 60

Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn Cys Ala Pro Glu Ser Ile
65 70 75 80

Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu Glu Asp Arg Pro Leu Ser
85 90 95

Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val Thr Gln Val Ser Pro Gln
 100 105 110
 Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp Ser Lys Asn Phe Ser Ile
 115 120 125
 Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val Asp Ile Tyr Tyr Leu Met
 130 135 140
 Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Trp Ser Ile Gln Asn Leu
 145 150 155 160
 Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys Leu Thr Ser Asn Leu Arg
 165 170 175
 Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro Val Ser Pro Tyr Met Tyr
 180 185 190
 Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro Cys Tyr Asp Met Lys Thr
 195 200 205
 Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His Val Leu Thr Leu Thr Asp
 210 215 220
 Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys Lys Gln Ser Val Ser Arg
 225 230 235 240
 Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Ala Thr
 245 250 255
 Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp Ala Ser His Leu Leu
 260 265 270
 Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile Ala Leu Asp Gly Arg Leu
 275 280 285
 Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Val Gly Ser Asp
 290 295 300
 Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp Tyr Pro Ser Leu Gly Leu
 305 310 315 320
 Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile Asn Leu Ile Phe Ala Val
 325 330 335
 Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn Tyr Ser Glu Leu Ile Pro
 340 345 350
 Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp Ser Ser Asn Val Leu Gln

Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys Thr Phe Lys Lys Glu Cys
625 630 635 640

Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala Leu His Asp Glu Asn Thr
645 650 655

Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu Ser Val Lys Glu Leu Lys
660 665 670

Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr Tyr Lys Asn Glu Asp Asp
675 680 685

Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp Ser Ser Gly Lys Ser Ile
690 695 700

Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro Lys Gly Pro Asp Ile Leu
705 710 715 720

Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu Leu Ile Gly Leu Ala
725 730 735

Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile His Asp Arg Lys Glu
740 745 750

Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr Ala
755 760 765

Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser Thr Phe Thr Asn Ile Thr
770 775 780

Tyr Arg Gly Thr
785

<210> 4

<211> 13

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

10 <223> aminoácidos 197-209 de proteína G - alfa 13

<300>

<308> Genbank / AAA36756

<309> 2006-07-15

15 <313> (197)..(209)

<400> 4

Leu Leu Ala Arg Arg Pro Thr Lys Gly Ile His Glu Tyr
1 5 10

20

<210> 5

ES 2 575 160 T3

<211> 47
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <300>
 <308> Swiss Prot / P05556
 <309> 11-01-2011
 <313> (752)..(798)

10 <400> 5

Lys Leu Leu Met Ile Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Lys Glu Lys Met Asn Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr
 20 25 30

Lys Ser Ala Val Thr Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
 35 40 45

15 <210> 6
 <211> 47
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <221> misc_feature
 <223> Aminoácidos 716-762 de beta-3 integrina

25 <300>
 <308> Swiss Prot / P05106
 <309> 11-01-2011
 <313> (716)..(762)

<400> 6

Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile Leu
 1 5 10 15

Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr Ile
 20 25 30

His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg
 35 40 45

30 <210> 7
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<400> 7
 gtccacctc ctgaagcag 19

40 <210> 8
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 8
 ggagatcgac aaatgcctg 19

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5
 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 10 <221> misc_feature
 <222> (1)..(12)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 9
 15

Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 10
 <211> 377
 20 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 25 <223> G alfa 13 (N.º de referencia de GenBank NP_006563.2)

<400> 10

Met Ala Asp Phe Leu Pro Ser Arg Ser Val Leu Ser Val Cys Phe Pro
1 5 10 15

Gly Cys Leu Leu Thr Ser Gly Glu Ala Glu Gln Gln Arg Lys Ser Lys
20 25 30

Glu Ile Asp Lys Cys Leu Ser Arg Glu Lys Thr Tyr Val Lys Arg Leu
35 40 45

Val Lys Ile Leu Leu Leu Gly Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe
50 55 60

Leu Lys Gln Met Arg Ile Ile His Gly Gln Asp Phe Asp Gln Arg Ala
65 70 75 80

Arg Glu Glu Phe Arg Pro Thr Ile Tyr Ser Asn Val Ile Lys Gly Met
85 90 95

Arg Val Leu Val Asp Ala Arg Glu Lys Leu His Ile Pro Trp Gly Asp

ES 2 575 160 T3

			100						105							110
Asn	Ser	Asn	Gln	Gln	His	Gly	Asp	Lys	Met	Met	Ser	Phe	Asp	Thr	Arg	
		115					120					125				
Ala	Pro	Met	Ala	Ala	Gln	Gly	Met	Val	Glu	Thr	Arg	Val	Phe	Leu	Gln	
	130					135					140					
Tyr	Leu	Pro	Ala	Ile	Arg	Ala	Leu	Trp	Ala	Asp	Ser	Gly	Ile	Gln	Asn	
145					150					155					160	
Ala	Tyr	Asp	Arg	Arg	Arg	Glu	Phe	Gln	Leu	Gly	Glu	Ser	Val	Lys	Tyr	
				165					170					175		
Phe	Leu	Asp	Asn	Leu	Asp	Lys	Leu	Gly	Glu	Pro	Asp	Tyr	Ile	Pro	Ser	
			180					185					190			
Gln	Gln	Asp	Ile	Leu	Leu	Ala	Arg	Arg	Pro	Thr	Lys	Gly	Ile	His	Glu	
		195					200					205				
Tyr	Asp	Phe	Glu	Ile	Lys	Asn	Val	Pro	Phe	Lys	Met	Val	Asp	Val	Gly	
	210					215					220					
Gly	Gln	Arg	Ser	Glu	Arg	Lys	Arg	Trp	Phe	Glu	Cys	Phe	Asp	Ser	Val	
225					230					235					240	
Thr	Ser	Ile	Leu	Phe	Leu	Val	Ser	Ser	Ser	Glu	Phe	Asp	Gln	Val	Leu	
				245						250				255		
Met	Glu	Asp	Arg	Leu	Thr	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Asn	Ile	Phe	
			260					265					270			
Glu	Thr	Ile	Val	Asn	Asn	Arg	Val	Phe	Ser	Asn	Val	Ser	Ile	Ile	Leu	
		275					280					285				
Phe	Leu	Asn	Lys	Thr	Asp	Leu	Leu	Glu	Glu	Lys	Val	Gln	Ile	Val	Ser	
	290					295					300					
Ile	Lys	Asp	Tyr	Phe	Leu	Glu	Phe	Glu	Gly	Asp	Pro	His	Cys	Leu	Arg	
305					310					315					320	
Asp	Val	Gln	Lys	Phe	Leu	Val	Glu	Cys	Phe	Arg	Asn	Lys	Arg	Arg	Asp	
				325					330					335		
Gln	Gln	Gln	Lys	Pro	Leu	Tyr	His	His	Phe	Thr	Thr	Ala	Ile	Asn	Thr	
			340					345					350			
Glu	Asn	Ile	Arg	Leu	Val	Phe	Arg	Asp	Val	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	His	
		355					360					365				

Asp Asn Leu Lys Gln Leu Met Leu Gln
 370 375

<210> 11
 <211> 381
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> G alfa 12 (N.º de referencia de GenBank NP_031379.2)

<400> 11

Met Ser Gly Val Val Arg Thr Leu Ser Arg Cys Leu Leu Pro Ala Glu
 1 5 10 15

Ala Gly Gly Ala Arg Glu Arg Arg Ala Gly Ser Gly Ala Arg Asp Ala
 20 25 30

Glu Arg Glu Ala Arg Arg Arg Ser Arg Asp Ile Asp Ala Leu Leu Ala
 35 40 45

Arg Glu Arg Arg Ala Val Arg Arg Leu Val Lys Ile Leu Leu Leu Gly
 50 55 60

Ala Gly Glu Ser Gly Lys Ser Thr Phe Leu Lys Gln Met Arg Ile Ile
 65 70 75 80

His Gly Arg Glu Phe Asp Gln Lys Ala Leu Leu Glu Phe Arg Asp Thr
 85 90 95

Ile Phe Asp Asn Ile Leu Lys Gly Ser Arg Val Leu Val Asp Ala Arg
 100 105 110

Asp Lys Leu Gly Ile Pro Trp Gln Tyr Ser Glu Asn Glu Lys His Gly
 115 120 125

Met Phe Leu Met Ala Phe Glu Asn Lys Ala Gly Leu Pro Val Glu Pro
 130 135 140

Ala Thr Phe Gln Leu Tyr Val Pro Ala Leu Ser Ala Leu Trp Arg Asp
 145 150 155 160

Ser Gly Ile Arg Glu Ala Phe Ser Arg Arg Ser Glu Phe Gln Leu Gly
 165 170 175

Glu Ser Val Lys Tyr Phe Leu Asp Asn Leu Asp Arg Ile Gly Gln Leu
 180 185 190

Asn Tyr Phe Pro Ser Lys Gln Asp Ile Leu Leu Ala Arg Lys Ala Thr
 195 200 205

Lys Gly Ile Val Glu His Asp Phe Val Ile Lys Lys Ile Pro Phe Lys
 210 215 220

Met Val Asp Val Gly Gly Gln Arg Ser Gln Arg Gln Lys Trp Phe Gln
 225 230 235 240

Cys Phe Asp Gly Ile Thr Ser Ile Leu Phe Met Val Ser Ser Ser Glu
 245 250 255

Tyr Asp Gln Val Leu Met Glu Asp Arg Arg Thr Asn Arg Leu Val Glu
 260 265 270

Ser Met Asn Ile Phe Glu Thr Ile Val Asn Asn Lys Leu Phe Phe Asn
 275 280 285

Val Ser Ile Ile Leu Phe Leu Asn Lys Met Asp Leu Leu Val Glu Lys
 290 295 300

Val Lys Thr Val Ser Ile Lys Lys His Phe Pro Asp Phe Arg Gly Asp
 305 310 315 320

Pro His Arg Leu Glu Asp Val Gln Arg Tyr Leu Val Gln Cys Phe Asp
 325 330 335

Arg Lys Arg Arg Asn Arg Ser Lys Pro Leu Phe His His Phe Thr Thr
 340 345 350

Ala Ile Asp Thr Glu Asn Val Arg Phe Val Phe His Ala Val Lys Asp
 355 360 365

Thr Ile Leu Gln Glu Asn Leu Lys Asp Ile Met Leu Gln
 370 375 380

<210> 12
 <211> 778
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <223> Beta 1A integrina (N.º de referencia de GenBank NP_002202)

<400> 12

Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala Lys Ser Cys Gly
 1 5 10 15

Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys Thr Asn Ser Thr
 20 25 30
 Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys Asp Asp Leu Glu
 35 40 45
 Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile Glu Asn Pro Arg
 50 55 60
 Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr Asn Arg Ser Lys
 65 70 75 80
 Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr Gln Ile Gln Pro
 85 90 95
 Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro Gln Thr Phe Thr
 100 105 110
 Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp Leu Tyr Tyr Leu
 115 120 125
 Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Asn Val Lys Ser
 130 135 140
 Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile Thr Ser Asp Phe
 145 150 155 160
 Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val Met Pro Tyr Ile
 165 170 175
 Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr Ser Glu Gln Asn
 180 185 190
 Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser Leu Thr Asn Lys
 195 200 205
 Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg Ile Ser Gly Asn
 210 215 220
 Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Val Ala Val
 225 230 235 240
 Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg Leu Leu Val Phe
 245 250 255
 Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly
 260 265 270
 Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu Asn Asn Met Tyr

Gly Leu Ile Cys Gly Gly Asn Gly Val Cys Lys Cys Arg Val Cys Glu
 545 550 555 560
 Cys Asn Pro Asn Tyr Thr Gly Ser Ala Cys Asp Cys Ser Leu Asp Thr
 565 570 575
 Ser Thr Cys Glu Ala Ser Asn Gly Gln Ile Cys Asn Gly Arg Gly Ile
 580 585 590
 Cys Glu Cys Gly Val Cys Lys Cys Thr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Gln
 595 600 605
 Thr Cys Glu Met Cys Gln Thr Cys Leu Gly Val Cys Ala Glu His Lys
 610 615 620
 Glu Cys Val Gln Cys Arg Ala Phe Asn Lys Gly Glu Lys Lys Asp Thr
 625 630 635 640
 Cys Thr Gln Glu Cys Ser Tyr Phe Asn Ile Thr Lys Val Glu Ser Arg
 645 650 655
 Asp Lys Leu Pro Gln Pro Val Gln Pro Asp Pro Val Ser His Cys Lys
 660 665 670
 Glu Lys Asp Val Asp Asp Cys Trp Phe Tyr Phe Thr Tyr Ser Val Asn
 675 680 685
 Gly Asn Asn Glu Val Met Val His Val Val Glu Asn Pro Glu Cys Pro
 690 695 700
 Thr Gly Pro Asp Ile Ile Pro Ile Val Ala Gly Val Val Ala Gly Ile
 705 710 715 720
 Val Leu Ile Gly Leu Ala Leu Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Met Ile
 725 730 735
 Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Glu Lys Glu Lys Met Asn
 740 745 750
 Ala Lys Trp Asp Thr Gly Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Ser Ala Val Thr
 755 760 765
 Thr Val Val Asn Pro Lys Tyr Glu Gly Lys
 770 775

<210> 13

<211> 781

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

ES 2 575 160 T3

<220>

<221> MISC_FEATURE

<223> Beta 1D integrina (N.º de referencia de GenBank NP_391988)

5 <400> 13

Gln Thr Asp Glu Asn Arg Cys Leu Lys Ala Asn Ala Lys Ser Cys Gly
 1 5 10 15

Glu Cys Ile Gln Ala Gly Pro Asn Cys Gly Trp Cys Thr Asn Ser Thr
 20 25 30

Phe Leu Gln Glu Gly Met Pro Thr Ser Ala Arg Cys Asp Asp Leu Glu
 35 40 45

Ala Leu Lys Lys Lys Gly Cys Pro Pro Asp Asp Ile Glu Asn Pro Arg
 50 55 60

Gly Ser Lys Asp Ile Lys Lys Asn Lys Asn Val Thr Asn Arg Ser Lys
 65 70 75 80

Gly Thr Ala Glu Lys Leu Lys Pro Glu Asp Ile Thr Gln Ile Gln Pro
 85 90 95

Gln Gln Leu Val Leu Arg Leu Arg Ser Gly Glu Pro Gln Thr Phe Thr
 100 105 110

Leu Lys Phe Lys Arg Ala Glu Asp Tyr Pro Ile Asp Leu Tyr Tyr Leu
 115 120 125

Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Asn Val Lys Ser
 130 135 140

Leu Gly Thr Asp Leu Met Asn Glu Met Arg Arg Ile Thr Ser Asp Phe
 145 150 155 160

Arg Ile Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Thr Val Met Pro Tyr Ile
 165 170 175

Ser Thr Thr Pro Ala Lys Leu Arg Asn Pro Cys Thr Ser Glu Gln Asn
 180 185 190

Cys Thr Ser Pro Phe Ser Tyr Lys Asn Val Leu Ser Leu Thr Asn Lys
 195 200 205

Gly Glu Val Phe Asn Glu Leu Val Gly Lys Gln Arg Ile Ser Gly Asn
 210 215 220

Leu Asp Ser Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala Ile Met Gln Val Ala Val
 225 230 235 240

Cys Gly Ser Leu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg Leu Leu Val Phe
 245 250 255

Ser Thr Asp Ala Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly
 260 265 270

Ile Val Leu Pro Asn Asp Gly Gln Cys His Leu Glu Asn Asn Met Tyr
 275 280 285

Thr Met Ser His Tyr Tyr Asp Tyr Pro Ser Ile Ala His Leu Val Gln
 290 295 300

Lys Leu Ser Glu Asn Asn Ile Gln Thr Ile Phe Ala Val Thr Glu Glu
 305 310 315 320

Phe Gln Pro Val Tyr Lys Glu Leu Lys Asn Leu Ile Pro Lys Ser Ala
 325 330 335

Val Gly Thr Leu Ser Ala Asn Ser Ser Asn Val Ile Gln Leu Ile Ile
 340 345 350

Asp Ala Tyr Asn Ser Leu Ser Ser Glu Val Ile Leu Glu Asn Gly Lys
 355 360 365

Leu Ser Glu Gly Val Thr Ile Ser Tyr Lys Ser Tyr Cys Lys Asn Gly
 370 375 380

Val Asn Gly Thr Gly Glu Asn Gly Arg Lys Cys Ser Asn Ile Ser Ile
 385 390 395 400

Gly Asp Glu Val Gln Phe Glu Ile Ser Ile Thr Ser Asn Lys Cys Pro
 405 410 415

Lys Lys Asp Ser Asp Ser Phe Lys Ile Arg Pro Leu Gly Phe Thr Glu
 420 425 430

Glu Val Glu Val Ile Leu Gln Tyr Ile Cys Glu Cys Glu Cys Gln Ser
 435 440 445

Glu Gly Ile Pro Glu Ser Pro Lys Cys His Glu Gly Asn Gly Thr Phe
 450 455 460

Glu Cys Gly Ala Cys Arg Cys Asn Glu Gly Arg Val Gly Arg His Cys
 465 470 475 480

Glu Cys Ser Thr Asp Glu Val Asn Ser Glu Asp Met Asp Ala Tyr Cys

Ala Lys Trp Asp Thr Gln Glu Asn Pro Ile Tyr Lys Ser Pro Ile Asn
 755 760 765

Asn Phe Lys Asn Pro Asn Tyr Gly Arg Lys Ala Gly Leu
 770 775 780

<210> 14

<211> 747

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Beta 2 integrina (Referencia GenBank NP_000202)

<400> 14

Gln Glu Cys Thr Lys Phe Lys Val Ser Ser Cys Arg Glu Cys Ile Glu
 1 5 10 15

Ser Gly Pro Gly Cys Thr Trp Cys Gln Lys Leu Asn Phe Thr Gly Pro
 20 25 30

Gly Asp Pro Asp Ser Ile Arg Cys Asp Thr Arg Pro Gln Leu Leu Met
 35 40 45

Arg Gly Cys Ala Ala Asp Asp Ile Met Asp Pro Thr Ser Leu Ala Glu
 50 55 60

Thr Gln Glu Asp His Asn Gly Gly Gln Lys Gln Leu Ser Pro Gln Lys
 65 70 75 80

Val Thr Leu Tyr Leu Arg Pro Gly Gln Ala Ala Ala Phe Asn Val Thr
 85 90 95

Phe Arg Arg Ala Lys Gly Tyr Pro Ile Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp
 100 105 110

Leu Ser Tyr Ser Met Leu Asp Asp Leu Arg Asn Val Lys Lys Leu Gly
 115 120 125

Gly Asp Leu Leu Arg Ala Leu Asn Glu Ile Thr Glu Ser Gly Arg Ile
 130 135 140

Gly Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Asn Thr
 145 150 155 160

His Pro Asp Lys Leu Arg Asn Pro Cys Pro Asn Lys Glu Lys Glu Cys
 165 170 175

Gln Pro Pro Phe Ala Phe Arg His Val Leu Lys Leu Thr Asn Asn Ser
 180 185 190

Asn Gln Phe Gln Thr Glu Val Gly Lys Gln Leu Ile Ser Gly Asn Leu
 195 200 205

Asp Ala Pro Glu Gly Gly Leu Asp Ala Met Met Gln Val Ala Ala Cys
 210 215 220

Pro Glu Glu Ile Gly Trp Arg Asn Val Thr Arg Leu Leu Val Phe Ala
 225 230 235 240

Thr Asp Asp Gly Phe His Phe Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Ala Ile
 245 250 255

Leu Thr Pro Asn Asp Gly Arg Cys His Leu Glu Asp Asn Leu Tyr Lys
 260 265 270

Arg Ser Asn Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Leu Ala His Lys
 275 280 285

Leu Ala Glu Asn Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Arg Met
 290 295 300

Val Lys Thr Tyr Glu Lys Leu Thr Glu Ile Ile Pro Lys Ser Ala Val
 305 310 315 320

Gly Glu Leu Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Lys Asn
 325 330 335

Ala Tyr Asn Lys Leu Ser Ser Arg Val Phe Leu Asp His Asn Ala Leu
 340 345 350

Pro Asp Thr Leu Lys Val Thr Tyr Asp Ser Phe Cys Ser Asn Gly Val
 355 360 365

Thr His Arg Asn Gln Pro Arg Gly Asp Cys Asp Gly Val Gln Ile Asn
 370 375 380

Val Pro Ile Thr Phe Gln Val Lys Val Thr Ala Thr Glu Cys Ile Gln
 385 390 395 400

Glu Gln Ser Phe Val Ile Arg Ala Leu Gly Phe Thr Asp Ile Val Thr
 405 410 415

Val Gln Val Leu Pro Gln Cys Glu Cys Arg Cys Arg Asp Gln Ser Arg
 420 425 430

Asp Arg Ser Leu Cys His Gly Lys Gly Phe Leu Glu Cys Gly Ile Cys
 435 440 445
 Arg Cys Asp Thr Gly Tyr Ile Gly Lys Asn Cys Glu Cys Gln Thr Gln
 450 455 460
 Gly Arg Ser Ser Gln Glu Leu Glu Gly Ser Cys Arg Lys Asp Asn Asn
 465 470 475 480
 Ser Ile Ile Cys Ser Gly Leu Gly Asp Cys Val Cys Gly Gln Cys Leu
 485 490 495
 Cys His Thr Ser Asp Val Pro Gly Lys Leu Ile Tyr Gly Gln Tyr Cys
 500 505 510
 Glu Cys Asp Thr Ile Asn Cys Glu Arg Tyr Asn Gly Gln Val Cys Gly
 515 520 525
 Gly Pro Gly Arg Gly Leu Cys Phe Cys Gly Lys Cys Arg Cys His Pro
 530 535 540
 Gly Phe Glu Gly Ser Ala Cys Gln Cys Glu Arg Thr Thr Glu Gly Cys
 545 550 555 560
 Leu Asn Pro Arg Arg Val Glu Cys Ser Gly Arg Gly Arg Cys Arg Cys
 565 570 575
 Asn Val Cys Glu Cys His Ser Gly Tyr Gln Leu Pro Leu Cys Gln Glu
 580 585 590
 Cys Pro Gly Cys Pro Ser Pro Cys Gly Lys Tyr Ile Ser Cys Ala Glu
 595 600 605
 Cys Leu Lys Phe Glu Lys Gly Pro Phe Gly Lys Asn Cys Ser Ala Ala
 610 615 620
 Cys Pro Gly Leu Gln Leu Ser Asn Asn Pro Val Lys Gly Arg Thr Cys
 625 630 635 640
 Lys Glu Arg Asp Ser Glu Gly Cys Trp Val Ala Tyr Thr Leu Glu Gln
 645 650 655
 Gln Asp Gly Met Asp Arg Tyr Leu Ile Tyr Val Asp Glu Ser Arg Glu
 660 665 670
 Cys Val Ala Gly Pro Asn Ile Ala Ala Ile Val Gly Gly Thr Val Ala
 675 680 685
 Gly Ile Val Leu Ile Gly Ile Leu Leu Leu Val Ile Trp Lys Ala Leu

```

        690                695                700

Ile His Leu Ser Asp Leu Arg Glu Tyr Arg Arg Phe Glu Lys Glu Lys
705                710                715

Leu Lys Ser Gln Trp Asn Asn Asp Asn Pro Leu Phe Lys Ser Ala Thr
725                730                735

Thr Thr Val Met Asn Pro Lys Phe Ala Glu Ser
740                745
    
```

- <210> 15
- <211> 762
- 5 <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <220>
- <221> MISC_FEATURE
- 10 <223> Beta 3 integrina (N.º de referencia de GenBank NP_000203)
- <400> 15

```

Gly Pro Asn Ile Cys Thr Thr Arg Gly Val Ser Ser Cys Gln Gln Cys
1                5                10                15

Leu Ala Val Ser Pro Met Cys Ala Trp Cys Ser Asp Glu Ala Leu Pro
20                25                30

Leu Gly Ser Pro Arg Cys Asp Leu Lys Glu Asn Leu Leu Lys Asp Asn
35                40                45

Cys Ala Pro Glu Ser Ile Glu Phe Pro Val Ser Glu Ala Arg Val Leu
50                55                60

Glu Asp Arg Pro Leu Ser Asp Lys Gly Ser Gly Asp Ser Ser Gln Val
65                70                75                80

Thr Gln Val Ser Pro Gln Arg Ile Ala Leu Arg Leu Arg Pro Asp Asp
85                90                95

Ser Lys Asn Phe Ser Ile Gln Val Arg Gln Val Glu Asp Tyr Pro Val
100               105               110

Asp Ile Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu
115               120               125

Trp Ser Ile Gln Asn Leu Gly Thr Lys Leu Ala Thr Gln Met Arg Lys
130               135               140

Leu Thr Ser Asn Leu Arg Ile Gly Phe Gly Ala Phe Val Asp Lys Pro
145               150               155               160
    
```

Val Ser Pro Tyr Met Tyr Ile Ser Pro Pro Glu Ala Leu Glu Asn Pro
 165 170 175

Cys Tyr Asp Met Lys Thr Thr Cys Leu Pro Met Phe Gly Tyr Lys His
 180 185 190

Val Leu Thr Leu Thr Asp Gln Val Thr Arg Phe Asn Glu Glu Val Lys
 195 200 205

Lys Gln Ser Val Ser Arg Asn Arg Asp Ala Pro Glu Gly Gly Phe Asp
 210 215 220

Ala Ile Met Gln Ala Thr Val Cys Asp Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn
 225 230 235 240

Asp Ala Ser His Leu Leu Val Phe Thr Thr Asp Ala Lys Thr His Ile
 245 250 255

Ala Leu Asp Gly Arg Leu Ala Gly Ile Val Gln Pro Asn Asp Gly Gln
 260 265 270

Cys His Val Gly Ser Asp Asn His Tyr Ser Ala Ser Thr Thr Met Asp
 275 280 285

Tyr Pro Ser Leu Gly Leu Met Thr Glu Lys Leu Ser Gln Lys Asn Ile
 290 295 300

Asn Leu Ile Phe Ala Val Thr Glu Asn Val Val Asn Leu Tyr Gln Asn
 305 310 315 320

Tyr Ser Glu Leu Ile Pro Gly Thr Thr Val Gly Val Leu Ser Met Asp
 325 330 335

Ser Ser Asn Val Leu Gln Leu Ile Val Asp Ala Tyr Gly Lys Ile Arg
 340 345 350

Ser Lys Val Glu Leu Glu Val Arg Asp Leu Pro Glu Glu Leu Ser Leu
 355 360 365

Ser Phe Asn Ala Thr Cys Leu Asn Asn Glu Val Ile Pro Gly Leu Lys
 370 375 380

Ser Cys Met Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Val Ser Phe Ser Ile Glu
 385 390 395 400

Ala Lys Val Arg Gly Cys Pro Gln Glu Lys Glu Lys Ser Phe Thr Ile
 405 410 415

Lys Pro Val Gly Phe Lys Asp Ser Leu Ile Val Gln Val Thr Phe Asp
 420 425 430
 Cys Asp Cys Ala Cys Gln Ala Gln Ala Glu Pro Asn Ser His Arg Cys
 435 440 445
 Asn Asn Gly Asn Gly Thr Phe Glu Cys Gly Val Cys Arg Cys Gly Pro
 450 455 460
 Gly Trp Leu Gly Ser Gln Cys Glu Cys Ser Glu Glu Asp Tyr Arg Pro
 465 470 475 480
 Ser Gln Gln Asp Glu Cys Ser Pro Arg Glu Gly Gln Pro Val Cys Ser
 485 490 495
 Gln Arg Gly Glu Cys Leu Cys Gly Gln Cys Val Cys His Ser Ser Asp
 500 505 510
 Phe Gly Lys Ile Thr Gly Lys Tyr Cys Glu Cys Asp Asp Phe Ser Cys
 515 520 525
 Val Arg Tyr Lys Gly Glu Met Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Ser Cys
 530 535 540
 Gly Asp Cys Leu Cys Asp Ser Asp Trp Thr Gly Tyr Tyr Cys Asn Cys
 545 550 555 560
 Thr Thr Arg Thr Asp Thr Cys Met Ser Ser Asn Gly Leu Leu Cys Ser
 565 570 575
 Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Ser Cys Val Cys Ile Gln Pro Gly
 580 585 590
 Ser Tyr Gly Asp Thr Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys Pro Asp Ala Cys
 595 600 605
 Thr Phe Lys Lys Glu Cys Val Glu Cys Lys Lys Phe Asp Arg Gly Ala
 610 615 620
 Leu His Asp Glu Asn Thr Cys Asn Arg Tyr Cys Arg Asp Glu Ile Glu
 625 630 635 640
 Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Thr Gly Lys Asp Ala Val Asn Cys Thr
 645 650 655
 Tyr Lys Asn Glu Asp Asp Cys Val Val Arg Phe Gln Tyr Tyr Glu Asp
 660 665 670

ES 2 575 160 T3

Ser Ser Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Val Val Glu Glu Pro Glu Cys Pro
675 680 685

Lys Gly Pro Asp Ile Leu Val Val Leu Leu Ser Val Met Gly Ala Ile
690 695 700

Leu Leu Ile Gly Leu Ala Ala Leu Leu Ile Trp Lys Leu Leu Ile Thr
705 710 715 720

Ile His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg
725 730 735

Ala Lys Trp Asp Thr Ala Asn Asn Pro Leu Tyr Lys Glu Ala Thr Ser
740 745 750

Thr Phe Thr Asn Ile Thr Tyr Arg Gly Thr
755 760

<210> 16

<211> 776

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Beta 5 integrina (N.º de referencia de GenBank NP_002204.2)

<400> 16

Gly Leu Asn Ile Cys Thr Ser Gly Ser Ala Thr Ser Cys Glu Glu Cys
 1 5 10 15

Leu Leu Ile His Pro Lys Cys Ala Trp Cys Ser Lys Glu Asp Phe Gly
 20 25 30

Ser Pro Arg Ser Ile Thr Ser Arg Cys Asp Leu Arg Ala Asn Leu Val
 35 40 45

Lys Asn Gly Cys Gly Gly Glu Ile Glu Ser Pro Ala Ser Ser Phe His
 50 55 60

Val Leu Arg Ser Leu Pro Leu Ser Ser Lys Gly Ser Gly Ser Ala Gly
 65 70 75 80

Trp Asp Val Ile Gln Met Thr Pro Gln Glu Ile Ala Val Asn Leu Arg
 85 90 95

Pro Gly Asp Lys Thr Thr Phe Gln Leu Gln Val Arg Gln Val Glu Asp
 100 105 110

Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Leu Ser Met Lys

115	120	125																							
Asp	Asp	Leu	Asp	Asn	Ile	Arg	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Leu	Ala	Glu	Glu										
130						135					140														
Met	Arg	Lys	Leu	Thr	Ser	Asn	Phe	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	Ser	Phe	Val										
145					150					155					160										
Asp	Lys	Asp	Ile	Ser	Pro	Phe	Ser	Tyr	Thr	Ala	Pro	Arg	Tyr	Gln	Thr										
				165					170					175											
Asn	Pro	Cys	Ile	Gly	Tyr	Lys	Leu	Phe	Pro	Asn	Cys	Val	Pro	Ser	Phe										
			180					185					190												
Gly	Phe	Arg	His	Leu	Leu	Pro	Leu	Thr	Asp	Arg	Val	Asp	Ser	Phe	Asn										
		195					200					205													
Glu	Glu	Val	Arg	Lys	Gln	Arg	Val	Ser	Arg	Asn	Arg	Asp	Ala	Pro	Glu										
	210					215					220														
Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Val	Leu	Gln	Ala	Ala	Val	Cys	Lys	Glu	Lys	Ile										
225					230					235					240										
Gly	Trp	Arg	Lys	Asp	Ala	Leu	His	Leu	Leu	Val	Phe	Thr	Thr	Asp	Asp										
				245						250				255											
Val	Pro	His	Ile	Ala	Leu	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro										
			260					265					270												
His	Asp	Gly	Gln	Cys	His	Leu	Asn	Glu	Ala	Asn	Glu	Tyr	Thr	Ala	Ser										
		275					280					285													
Asn	Gln	Met	Asp	Tyr	Pro	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Gly	Glu	Lys	Leu	Ala										
	290					295					300														
Glu	Asn	Asn	Ile	Asn	Leu	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Lys	Asn	His	Tyr	Met										
305					310					315					320										
Leu	Tyr	Lys	Asn	Phe	Thr	Ala	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Thr	Val	Glu	Ile										
				325					330					335	.										
Leu	Asp	Gly	Asp	Ser	Lys	Asn	Ile	Ile	Gln	Leu	Ile	Ile	Asn	Ala	Tyr										
			340					345					350												
Asn	Ser	Ile	Arg	Ser	Lys	Val	Glu	Leu	Ser	Val	Trp	Asp	Gln	Pro	Glu										
		355					360					365													
Asp	Leu	Asn	Leu	Phe	Phe	Thr	Ala	Thr	Cys	Gln	Asp	Gly	Val	Ser	Tyr										
	370					375					380														

Pro Gly Gln Arg Lys Cys Glu Gly Leu Lys Ile Gly Asp Thr Ala Ser
 385 390 395 400
 Phe Glu Val Ser Leu Glu Ala Arg Ser Cys Pro Ser Arg His Thr Glu
 405 410 415
 His Val Phe Ala Leu Arg Pro Val Gly Phe Arg Asp Ser Leu Glu Val
 420 425 430
 Gly Val Thr Tyr Asn Cys Thr Cys Gly Cys Ser Val Gly Leu Glu Pro
 435 440 445
 Asn Ser Ala Arg Cys Asn Gly Ser Gly Thr Tyr Val Cys Gly Leu Cys
 450 455 460
 Glu Cys Ser Pro Gly Tyr Leu Gly Thr Arg Cys Glu Cys Gln Asp Gly
 465 470 475 480
 Glu Asn Gln Ser Val Tyr Gln Asn Leu Cys Arg Glu Ala Glu Gly Lys
 485 490 495
 Pro Leu Cys Ser Gly Arg Gly Asp Cys Ser Cys Asn Gln Cys Ser Cys
 500 505 510
 Phe Glu Ser Glu Phe Gly Lys Ile Tyr Gly Pro Phe Cys Glu Cys Asp
 515 520 525
 Asn Phe Ser Cys Ala Arg Asn Lys Gly Val Leu Cys Ser Gly His Gly
 530 535 540
 Glu Cys His Cys Gly Glu Cys Lys Cys His Ala Gly Tyr Ile Gly Asp
 545 550 555 560
 Asn Cys Asn Cys Ser Thr Asp Ile Ser Thr Cys Arg Gly Arg Asp Gly
 565 570 575
 Gln Ile Cys Ser Glu Arg Gly His Cys Leu Cys Gly Gln Cys Gln Cys
 580 585 590
 Thr Glu Pro Gly Ala Phe Gly Glu Met Cys Glu Lys Cys Pro Thr Cys
 595 600 605
 Pro Asp Ala Cys Ser Thr Lys Arg Asp Cys Val Glu Cys Leu Leu Leu
 610 615 620
 His Ser Gly Lys Pro Asp Asn Gln Thr Cys His Ser Leu Cys Arg Asp
 625 630 635 640

Glu Val Ile Thr Trp Val Asp Thr Ile Val Lys Asp Asp Gln Glu Ala
 645 650 655
 Val Leu Cys Phe Tyr Lys Thr Ala Lys Asp Cys Val Met Met Phe Thr
 660 665 670
 Tyr Val Glu Leu Pro Ser Gly Lys Ser Asn Leu Thr Val Leu Arg Glu
 675 680 685
 Pro Glu Cys Gly Asn Thr Pro Asn Ala Met Thr Ile Leu Leu Ala Val
 690 695 700
 Val Gly Ser Ile Leu Leu Val Gly Leu Ala Leu Leu Ala Ile Trp Lys
 705 710 715 720
 Leu Leu Val Thr Ile His Asp Arg Arg Glu Phe Ala Lys Phe Gln Ser
 725 730 735
 Glu Arg Ser Arg Ala Arg Tyr Glu Met Ala Ser Asn Pro Leu Tyr Arg
 740 745 750
 Lys Pro Ile Ser Thr His Thr Val Asp Phe Thr Phe Asn Lys Phe Asn
 755 760 765
 Lys Ser Tyr Asn Gly Thr Val Asp
 770 775

<210> 17

<211> 767

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Beta 6 integrina (N.º de referencia de GenBank NP_000879.2)

<400> 17

Gly Cys Ala Leu Gly Gly Ala Glu Thr Cys Glu Asp Cys Leu Leu Ile
 1 5 10 15
 Gly Pro Gln Cys Ala Trp Cys Ala Gln Glu Asn Phe Thr His Pro Ser
 20 25 30
 Gly Val Gly Glu Arg Cys Asp Thr Pro Ala Asn Leu Leu Ala Lys Gly
 35 40 45
 Cys Gln Leu Asn Phe Ile Glu Asn Pro Val Ser Gln Val Glu Ile Leu
 50 55 60

Lys Asn Lys Pro Leu Ser Val Gly Arg Gln Lys Asn Ser Ser Asp Ile
 65 70 75 80
 Val Gln Ile Ala Pro Gln Ser Leu Ile Leu Lys Leu Arg Pro Gly Gly
 85 90 95
 Ala Gln Thr Leu Gln Val His Val Arg Gln Thr Glu Asp Tyr Pro Val
 100 105 110
 Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Ala Ser Met Asp Asp Asp Leu
 115 120 125
 Asn Thr Ile Lys Glu Leu Gly Ser Arg Leu Ser Lys Glu Met Ser Lys
 130 135 140
 Leu Thr Ser Asn Phe Arg Leu Gly Phe Gly Ser Phe Val Glu Lys Pro
 145 150 155 160
 Val Ser Pro Phe Val Lys Thr Thr Pro Glu Glu Ile Ala Asn Pro Cys
 165 170 175
 Ser Ser Ile Pro Tyr Phe Cys Leu Pro Thr Phe Gly Phe Lys His Ile
 180 185 190
 Leu Pro Leu Thr Asn Asp Ala Glu Arg Phe Asn Glu Ile Val Lys Asn
 195 200 205
 Gln Lys Ile Ser Ala Asn Ile Asp Thr Pro Glu Gly Gly Phe Asp Ala
 210 215 220
 Ile Met Gln Ala Ala Val Cys Lys Glu Lys Ile Gly Trp Arg Asn Asp
 225 230 235 240
 Ser Leu His Leu Leu Val Phe Val Ser Asp Ala Asp Ser His Phe Gly
 245 250 255
 Met Asp Ser Lys Leu Ala Gly Ile Val Ile Pro Asn Asp Gly Leu Cys
 260 265 270
 His Leu Asp Ser Lys Asn Glu Tyr Ser Met Ser Thr Val Leu Glu Tyr
 275 280 285
 Pro Thr Ile Gly Gln Leu Ile Asp Lys Leu Val Gln Asn Asn Val Leu
 290 295 300
 Leu Ile Phe Ala Val Thr Gln Glu Gln Val His Leu Tyr Glu Asn Tyr
 305 310 315 320
 Ala Lys Leu Ile Pro Gly Ala Thr Val Gly Leu Leu Gln Lys Asp Ser

					325					330					335
Gly	Asn	Ile	Leu	Gln	Leu	Ile	Ile	Ser	Ala	Tyr	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser
			340					345						350	
Glu	Val	Glu	Leu	Glu	Val	Leu	Gly	Asp	Thr	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Ser
		355					360					365			
Phe	Thr	Ala	Ile	Cys	Asn	Asn	Gly	Thr	Leu	Phe	Gln	His	Gln	Lys	Lys
	370						375				380				
Cys	Ser	His	Met	Lys	Val	Gly	Asp	Thr	Ala	Ser	Phe	Ser	Val	Thr	Val
385					390					395					400
Asn	Ile	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Arg	Ser	Arg	His	Ile	Ile	Ile	Lys	Pro
				405					410					415	
Val	Gly	Leu	Gly	Asp	Ala	Leu	Glu	Leu	Leu	Val	Ser	Pro	Glu	Cys	Asn
			420					425					430		
Cys	Asp	Cys	Gln	Lys	Glu	Val	Glu	Val	Asn	Ser	Ser	Lys	Cys	His	His
		435					440					445			
Gly	Asn	Gly	Ser	Phe	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	Ala	Cys	His	Pro	Gly	His
	450					455					460				
Met	Gly	Pro	Arg	Cys	Glu	Cys	Gly	Glu	Asp	Met	Leu	Ser	Thr	Asp	Ser
465					470					475					480
Cys	Lys	Glu	Ala	Pro	Asp	His	Pro	Ser	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Cys
				485					490					495	
Tyr	Cys	Gly	Gln	Cys	Ile	Cys	His	Leu	Ser	Pro	Tyr	Gly	Asn	Ile	Tyr
			500					505					510		
Gly	Pro	Tyr	Cys	Gln	Cys	Asp	Asn	Phe	Ser	Cys	Val	Arg	His	Lys	Gly
		515					520					525			
Leu	Leu	Cys	Gly	Gly	Asn	Gly	Asp	Cys	Asp	Cys	Gly	Glu	Cys	Val	Cys
	530					535					540				
Arg	Ser	Gly	Trp	Thr	Gly	Glu	Tyr	Cys	Asn	Cys	Thr	Thr	Ser	Thr	Asp
545					550					555					560
Ser	Cys	Val	Ser	Glu	Asp	Gly	Val	Leu	Cys	Ser	Gly	Arg	Gly	Asp	Cys
				565					570					575	
Val	Cys	Gly	Lys	Cys	Val	Cys	Thr	Asn	Pro	Gly	Ala	Ser	Gly	Pro	Thr
			580					585					590		

Cys Glu Arg Cys Pro Thr Cys Gly Asp Pro Cys Asn Ser Lys Arg Ser
 595 600 605

Cys Ile Glu Cys His Leu Ser Ala Ala Gly Gln Ala Arg Glu Glu Cys
 610 615 620

Val Asp Lys Cys Lys Leu Ala Gly Ala Thr Ile Ser Glu Glu Glu Asp
 625 630 635 640

Phe Ser Lys Asp Gly Ser Val Ser Cys Ser Leu Gln Gly Glu Asn Glu
 645 650 655

Cys Leu Ile Thr Phe Leu Ile Thr Thr Asp Asn Glu Gly Lys Thr Ile
 660 665 670

Ile His Ser Ile Asn Glu Lys Asp Cys Pro Lys Pro Pro Asn Ile Pro
 675 680 685

Met Ile Met Leu Gly Val Ser Leu Ala Ile Leu Leu Ile Gly Val Val
 690 695 700

Leu Leu Cys Ile Trp Lys Leu Leu Val Ser Phe His Asp Arg Lys Glu
 705 710 715 720

Val Ala Lys Phe Glu Ala Glu Arg Ser Lys Ala Lys Trp Gln Thr Gly
 725 730 735

Thr Asn Pro Leu Tyr Arg Gly Ser Thr Ser Thr Phe Lys Asn Val Thr
 740 745 750

Tyr Lys His Arg Glu Lys Gln Lys Val Asp Leu Ser Thr Asp Cys
 755 760 765

<210> 18

<211> 779

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<221> MISC_FEATURE

10 <223> Beta 7 integrina (N.º de referencia de GenBank NP_000880.1)

<400> 18

Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr Glu Trp Arg
 1 5 10 15

Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala Pro Ser Cys
 20 25 30

Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys Lys Gln Leu
 35 40 45

Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys Ala Arg Arg
 50 55 60

Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu Glu Glu Pro
 65 70 75 80

Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser Gln Gly Ala
 85 90 95

Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val Arg Val Thr
 100 105 110

Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe Leu Arg Ala
 115 120 125

Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu Ser Tyr Ser
 130 135 140

Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His Ala Leu Leu
 145 150 155 160

Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly Phe Gly Ser
 165 170 175

Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val Pro Ser Lys
 180 185 190

Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln Ser Pro Phe
 195 200 205

Ser Phe His His Val Leu Ser Leu Thr Gly Asp Ala Gln Ala Phe Glu
 210 215 220

Arg Glu Val Gly Arg Gln Ser Val Ser Gly Asn Leu Asp Ser Pro Glu
 225 230 235 240

Gly Gly Phe Asp Ala Ile Leu Gln Ala Ala Leu Cys Gln Glu Gln Ile
 245 250 255

Gly Trp Arg Asn Val Ser Arg Leu Leu Val Phe Thr Ser Asp Asp Thr
 260 265 270

Phe His Thr Ala Gly Asp Gly Lys Leu Gly Gly Ile Phe Met Pro Ser
 275 280 285

Asp Gly His Cys His Leu Asp Ser Asn Gly Leu Tyr Ser Arg Ser Thr
 290 295 300
 Glu Phe Asp Tyr Pro Ser Val Gly Gln Val Ala Gln Ala Leu Ser Ala
 305 310 315 320
 Ala Asn Ile Gln Pro Ile Phe Ala Val Thr Ser Ala Ala Leu Pro Val
 325 330 335
 Tyr Gln Glu Leu Ser Lys Leu Ile Pro Lys Ser Ala Val Gly Glu Leu
 340 345 350
 Ser Glu Asp Ser Ser Asn Val Val Gln Leu Ile Met Asp Ala Tyr Asn
 355 360 365
 Ser Leu Ser Ser Thr Val Thr Leu Glu His Ser Ser Leu Pro Pro Gly
 370 375 380
 Val His Ile Ser Tyr Glu Ser Gln Cys Glu Gly Pro Glu Lys Arg Glu
 385 390 395 400
 Gly Lys Ala Glu Asp Arg Gly Gln Cys Asn His Val Arg Ile Asn Gln
 405 410 415
 Thr Val Thr Phe Trp Val Ser Leu Gln Ala Thr His Cys Leu Pro Glu
 420 425 430
 Pro His Leu Leu Arg Leu Arg Ala Leu Gly Phe Ser Glu Glu Leu Ile
 435 440 445
 Val Glu Leu His Thr Leu Cys Asp Cys Asn Cys Ser Asp Thr Gln Pro
 450 455 460
 Gln Ala Pro His Cys Ser Asp Gly Gln Gly His Leu Gln Cys Gly Val
 465 470 475 480
 Cys Ser Cys Ala Pro Gly Arg Leu Gly Arg Leu Cys Glu Cys Ser Val
 485 490 495
 Ala Glu Leu Ser Ser Pro Asp Leu Glu Ser Gly Cys Arg Ala Pro Asn
 500 505 510
 Gly Thr Gly Pro Leu Cys Ser Gly Lys Gly His Cys Gln Cys Gly Arg
 515 520 525
 Cys Ser Cys Ser Gly Gln Ser Ser Gly His Leu Cys Glu Cys Asp Asp
 530 535 540
 Ala Ser Cys Glu Arg His Glu Gly Ile Leu Cys Gly Gly Phe Gly Arg

<223> Péptido sintético

<400> 19

Lys Phe Glu Glu Glu
1 5

5

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 20

Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala
1 5

20 <210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<400> 21

Glu Glu Glu Arg Ala
1 5

30

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 22

40

Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys Trp Asp Thr
1 5 10

<210> 23

<211> 5

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

50

<400> 23

Lys Phe Glu Lys Glu
1 5

55 <210> 24

<211> 5

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

5

<400> 24

Arg Phe Glu Lys Glu
1 5

10 <210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 25

Lys Phe Glu Lys Glu Lys Met
1 5

20

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

30 <400> 26

Lys Phe Glu Lys Glu Lys Leu
1 5

35 <210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 27

Lys Phe Glu Lys Glu Gln Gln
1 5

45

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 28

55

Arg Phe Glu Lys Glu Lys Met
1 5

<210> 29
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Péptido sintético

10

<400> 29

Arg Lys Phe Glu Lys Glu Lys Leu
1 5

<210> 30
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Péptido sintético

20

<400> 30

Arg Phe Glu Lys Glu Gln Gln
1 5

<210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25

<220>
 <223> Péptido sintético

30

<400> 31

Glu Lys Glu Lys Met
1 5

35

<210> 32
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40

<220>
 <223> Péptido sintético

45

<400> 32

Glu Lys Glu Lys Leu
1 5

<210> 33
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50

<220>
 <223> Péptido sintético

55

<400> 33

Glu Lys Glu Gln Gln
1 5

5 <210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 34

Lys Phe Glu Ala Glu
1 5

15 <210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 35

Lys Phe Glu Ala Glu Arg Ser
1 5

25 <210> 36
<211> 5
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético
35 <400> 36

Glu Ala Glu Arg Ser
1 5

40 <210> 37
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Péptido sintético
<400> 37

Lys Phe Gln Ser Glu
1 5

50 <210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 38

Lys Phe Gln Ser Glu Arg Ser
1 5

5

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

15 <400> 39

Gln Ser Glu Arg Ser
1 5

<210> 40

20 <211> 13

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido sintético

<400> 40

Leu Leu Ala Arg Arg Pro Thr Lys Gly Ile His Glu Tyr
1 5 10

30

<210> 41

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35

<220>

<223> Péptido sintético

<220>

40 <221> misc_feature

<222> (1)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 41

45

Xaa Xaa Glu
1

<210> 42

<211> 5

50 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

55

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(4)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

60

ES 2 575 160 T3

<400> 42

Xaa Xaa Xaa Xaa Glu
1 5

5 <210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<220>
<221> misc_feature
15 <222> (1)..(2)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<220>
<221> misc_feature
20 <222> (4)..(5)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 43

Xaa Xaa Glu Xaa Xaa
1 5

25 <210> 44
<211> 12
<212> PRT
30 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

35 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(7)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

40 <220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(12)
<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

45 <400> 44

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Lys Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10

50 <210> 45
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
55 <223> Péptido sintético

<400> 45

Leu Leu Ala Arg Arg Pro Thr Lys Gly Ile His Glu Tyr
1 5 10

<223> Cebador sintético

<400> 50
gcgaattcaa gctttaatg ataattcatg ac 32

5 <210> 51
<211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 51
15 gcgctcgagt catttcct cataactcgg att 33

<210> 52
<211> 65
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético

25 <400> 52

gcggtaccg ccatggacta caaggacgac gatgacaagg cggacttct gccgtcggg 60

tcggt 65

<210> 53
30 <211> 40
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Cebador sintético

<400> 53
ggccggcggc cgctcactgt agcataagct gctgaggt 40

40 <210> 54
<211> 65
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Cebador sintético

<400> 54

ES 2 575 160 T3

Gly Gly Cys Cys Gly Gly Cys Gly Gly Cys Cys Gly Cys Thr Cys Ala
 1 5 10 15

Ala Ala Thr Ala Thr Cys Thr Thr Gly Thr Thr Gly Thr Gly Ala Thr
 20 25 30

Gly Gly Ala Ala Thr Ala Thr Ala Ala Thr Cys Thr Gly Gly Thr Thr
 35 40 45

Cys Thr Cys Cys Ala Ala Gly Thr Thr Thr Ala Thr Cys Cys Ala Ala
 50 55 60

Gly
 65

- <210> 55
- <211> 40
- 5 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Cebador sintético
- 10 <400> 55
- ggccggcggc cgctcattca aagtcgtatt catggatgcc 40
- <210> 56
- <211> 19
- 15 <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Cebador sintético
- <400> 56
- gtccaccttc ctgaagcag 19
- 25 <210> 57
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 30 <220>
- <223> Cebador sintético
- <400> 57
- ggagatcgac aaatgcctg 19
- 35 <210> 58
- <211> 19
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- 40 <220>
- <223> Cebador sintético
- <400> 58
- 45 gaggagcccga cgcttaata 19
- <210> 59
- <211> 19
- <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

5 <400> 59
gtccaccttt taaagcag 19

10 <210> 60
<211> 19
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 60
ggagatcgat aatgcctg 19

20 <210> 61
<211> 64
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>

<223> Cebador sintético

<400> 61

ccggaattcgc catggactac aaggacgacg atgacaaggc ggacttcctg ccgtcgcggt 60

30 **ccgt 64**

<210> 62
<211> 36
<212> ADN

35 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

40 <400> 62
gccgtcgact cactgtagca taagctgctt gaggtt 36

<210> 63
<211> 34
<212> PRT

45 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador sintético

50 <400> 63

Gly Thr Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Gly Ala Thr Cys Gly Ala Thr
1 5 10 15

Ala Ala Gly Thr Gly Cys Cys Thr Gly Thr Cys Thr Cys Gly Gly Gly
20 25 30

Ala Ala

Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala
1 5

5 <210> 69
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> el aminoácido en la posición 1 está miristoilado
 15 <400> 69

Glu Glu Ala Arg Glu Arg Lys Asp Trp Ala Lys Phe Thr
1 5 10

20 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> misc_feature
 30 <222> (1)..(1)
 <223> el aminoácido en la posición 1 está miristoilado
 <400> 70

Glu Ala Arg Glu Lys Phe Glu
1 5

35 <210> 71
 <211> 5
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(1)
 <223> el aminoácido en la posición 1 está miristoilado
 50 <400> 71

Glu Glu Ala Arg Glu
1 5

55 <210> 72
 <211> 49
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido sintético

<400> 72
 gcgaagcttg ccgcatgga ccgagcgcg cgcggcccc ggccgctct 49

5 <210> 73
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 73
 15 gcgctcgagt caagcgaatt ctttcggtc gtggatggg atgag 45

<210> 74
 <211> 45
 <212> ADN
 20 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

<400> 74
 25 gcgctcgagt caccagatga gcagggcggc aaggccaatg agcag 45

<210> 75
 <211> 39
 <212> ADN
 30 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador sintético

35 <400> 75
 aagaattcgc taaatttgca gaagaacgcg ccagagcaa 39

<210> 76
 <211> 39
 <212> ADN
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido sintético

45 <400> 76
 aagaattcgc taaatttgag gcagaacgcg ccagagcaa 39

<210> 77
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Péptido sintético

<400> 77
 60 aagaattcgc taaatttgag gaagcacgcg ccagagcaa 39

<210> 78
 <211> 39
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

65 <220>

<223> Péptido sintético

<400> 78
aagaattcgc taaatttgca gcagcacgcg ccagagcaa 39

5 <210> 79
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 79
15 ccgcaattgg ccgcatgga ccgagcgcgg ccgcgcccc ggccgctct 49

<210> 80
<211> 34
<212> ADN
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cebador sintético

<400> 80
25 gcgctcgagt taagtcccc ggtacgtgat attg 34

<210> 81
<211> 33
30 <212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido sintético

35 <400> 81
cgtggatcca ttagacaggt gatactaca tgg 33

<210> 82
40 <211> 33
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
45 <223> Péptido sintético

<400> 82
gcgctcgagt tagaagttgc acctgaaagt ttc 33

50 <210> 83
<211> 20
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

55 <220>
<223> Péptido sintético

<400> 83

His Asp Arg Lys Glu Phe Ala Lys Phe Glu Glu Glu Arg Ala Arg Ala
1 5 10 15

Lys Trp Asp Thr
20

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido para su uso en el tratamiento o la prevención de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la trombosis en un sujeto que lo necesite; en la mejora de la retracción del coágulo de sangre en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que la necesite; o en la inhibición de la metástasis de una célula tumoral; en donde el péptido comprende una secuencia de aminoácidos
- 10 Xaa₁ Xaa₂ Glu,
- en la que Xaa₁ es Glu y Xaa₂ es Glu, Lys, Ser o Ala,
 en la que el péptido es uno de 5-mer, 6-mer, 7-mer, 8-mer o 9-mer, y
 en la que el péptido inhibe una interacción de unión entre una β_3 integrina y una subunidad G α_{12} o G α_{13} de proteína G.
- 15 2. El péptido para el uso de la reivindicación 1, en el que Xaa₁ es Glu y Xaa₂ es Glu, Lys o Ala.
3. El péptido para el uso de la reivindicación 1, en donde el péptido comprende Xaa₁ Xaa₀ N-terminal a Xaa₁ Xaa₂ Glu, en donde Xaa₋₁ es Lys o Arg y Xaa₀ es Phe.
- 20 4. El péptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el péptido comprende Xaa₃ Xaa₄ C terminal a Xaa₁ Xaa₂ Glu, en donde Xaa₃ es Lys, Arg o Gln y Xaa₄ es Met, Leu, Ala, Ser o Gln.
5. El péptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el péptido comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:
- 25 a. KFEERA (SEQ ID NO: 20); y
 b. EEERA (SEQ ID NO: 21).
- 30 6. El péptido para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que está unido covalentemente a un vehículo.
7. El péptido para el uso de la reivindicación 6, en el que el vehículo comprende un resto lipófilo o un ácido graso.
- 35 8. El péptido para el uso de la reivindicación 7, en el que el ácido graso es un ácido graso de C12 a C30.
9. El péptido para el uso de la reivindicación 8, en el que el ácido graso es un grupo miristoilo o un grupo palmitoilo.
- 40 10. El péptido para el uso de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el ácido graso está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido.
11. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento o la prevención de un accidente cerebrovascular o un ataque al corazón en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la trombosis en un sujeto que lo necesite; en la mejora de la retracción del coágulo de sangre en un sujeto que lo necesite; en la inhibición de la angiogénesis en un sujeto que la necesite; o en la inhibición de la metástasis de una célula tumoral, que comprende el péptido de cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un vehículo, un diluyente o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 45 12. Un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos EEERA (SEQ ID NO: 21), en el que el péptido es uno de 6-mer, en donde un ácido graso de C12, C14, C16, C18 o C20 está unido covalentemente al extremo N-terminal del péptido.
- 50 13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de la reivindicación 12 y un vehículo, un diluyente, o un excipiente farmacéuticamente aceptables.
- 55

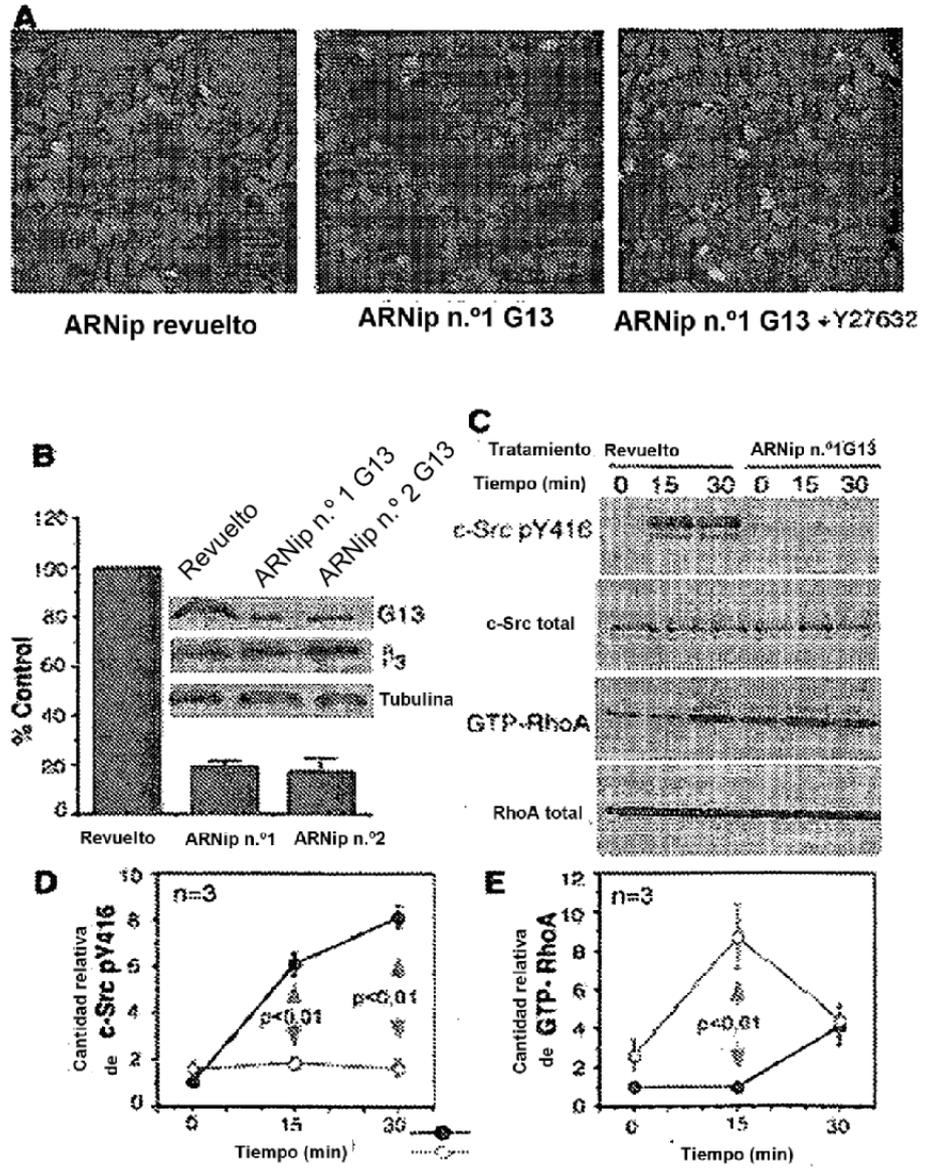


FIG. 1

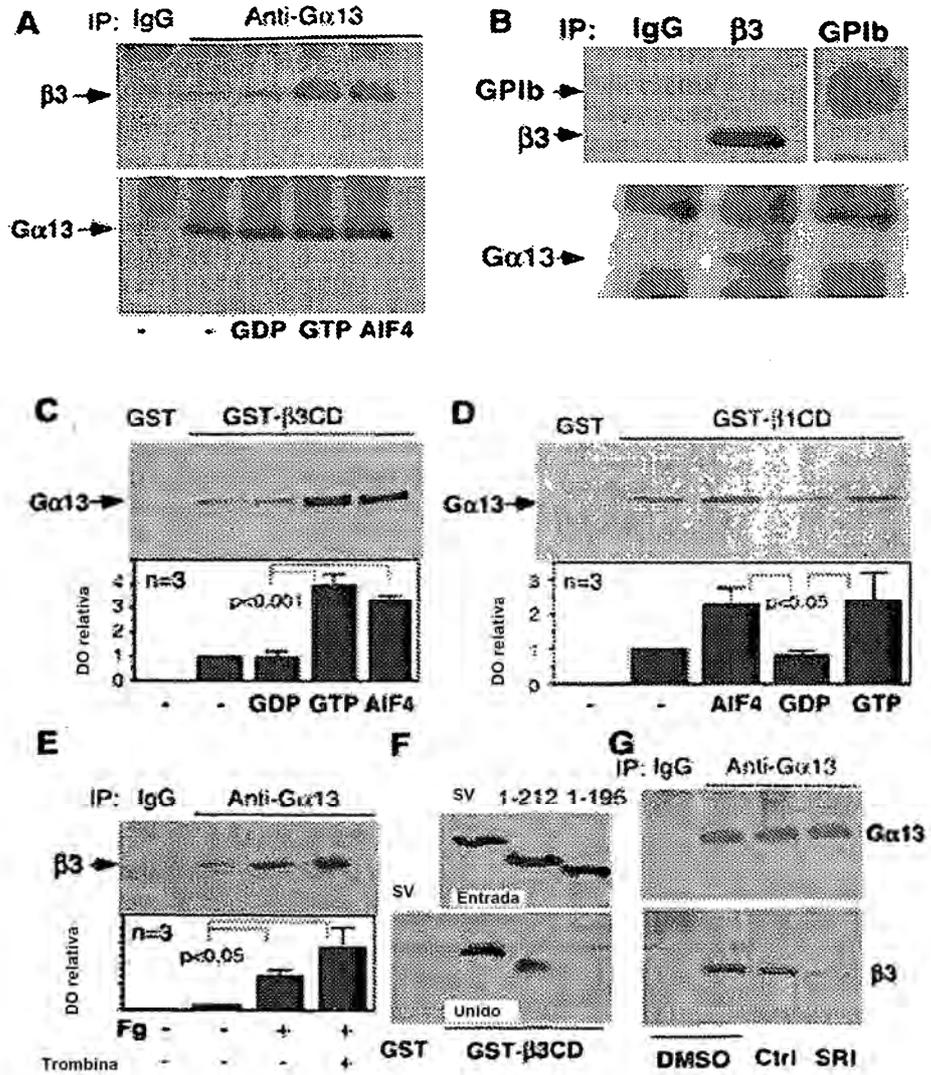


FIG. 2

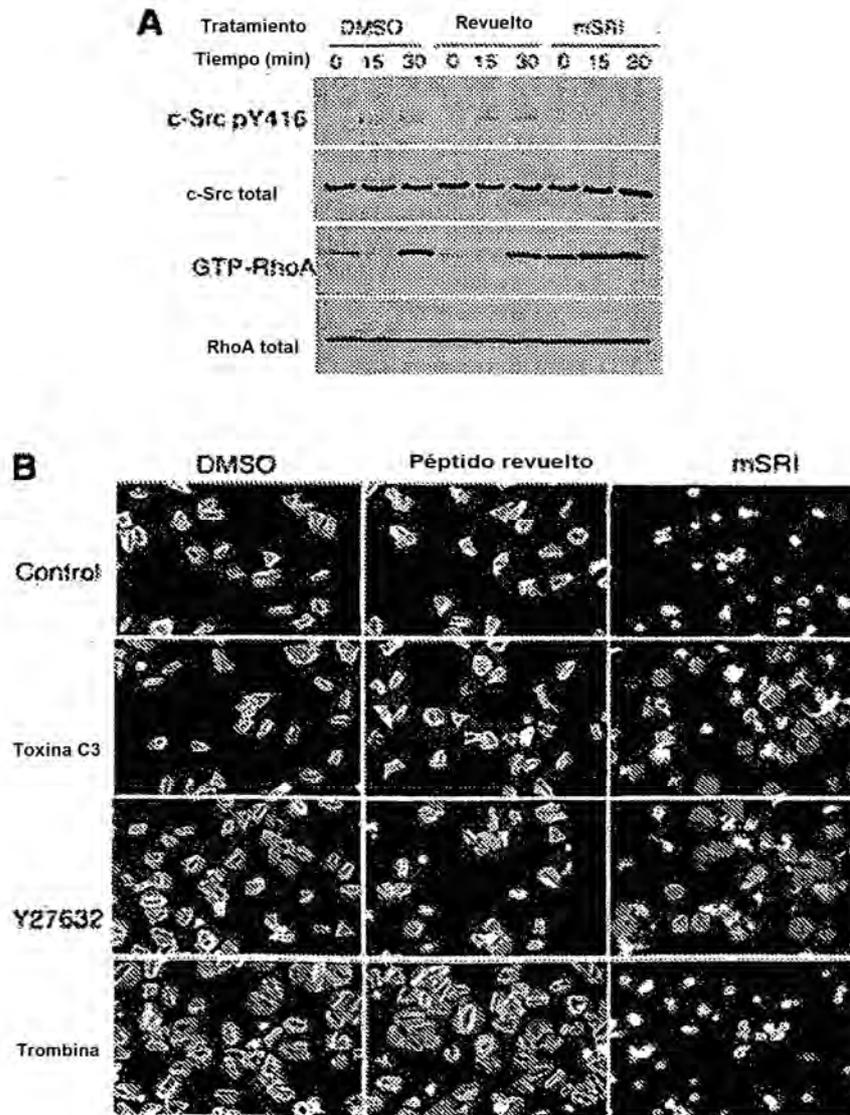


FIG. 3

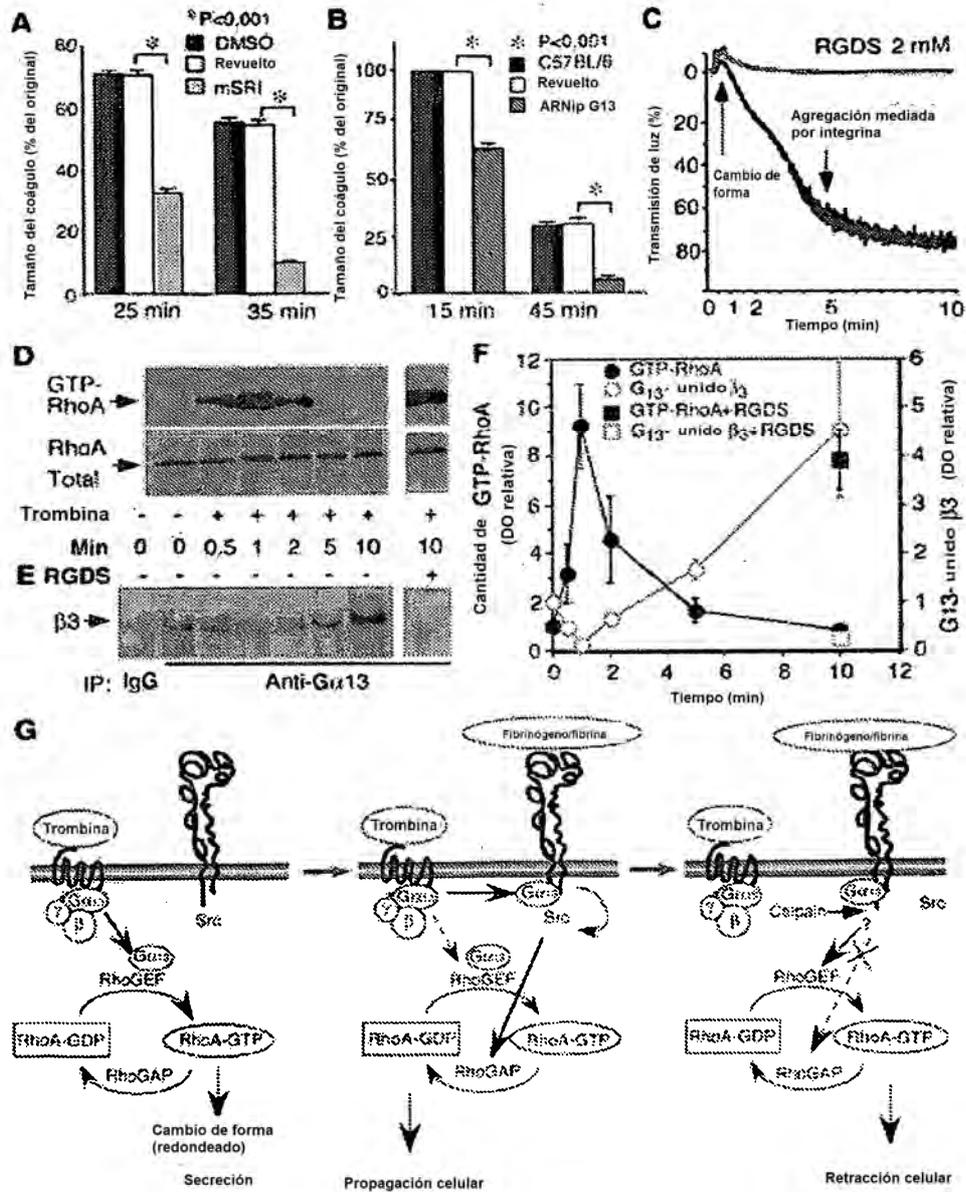


FIG. 4

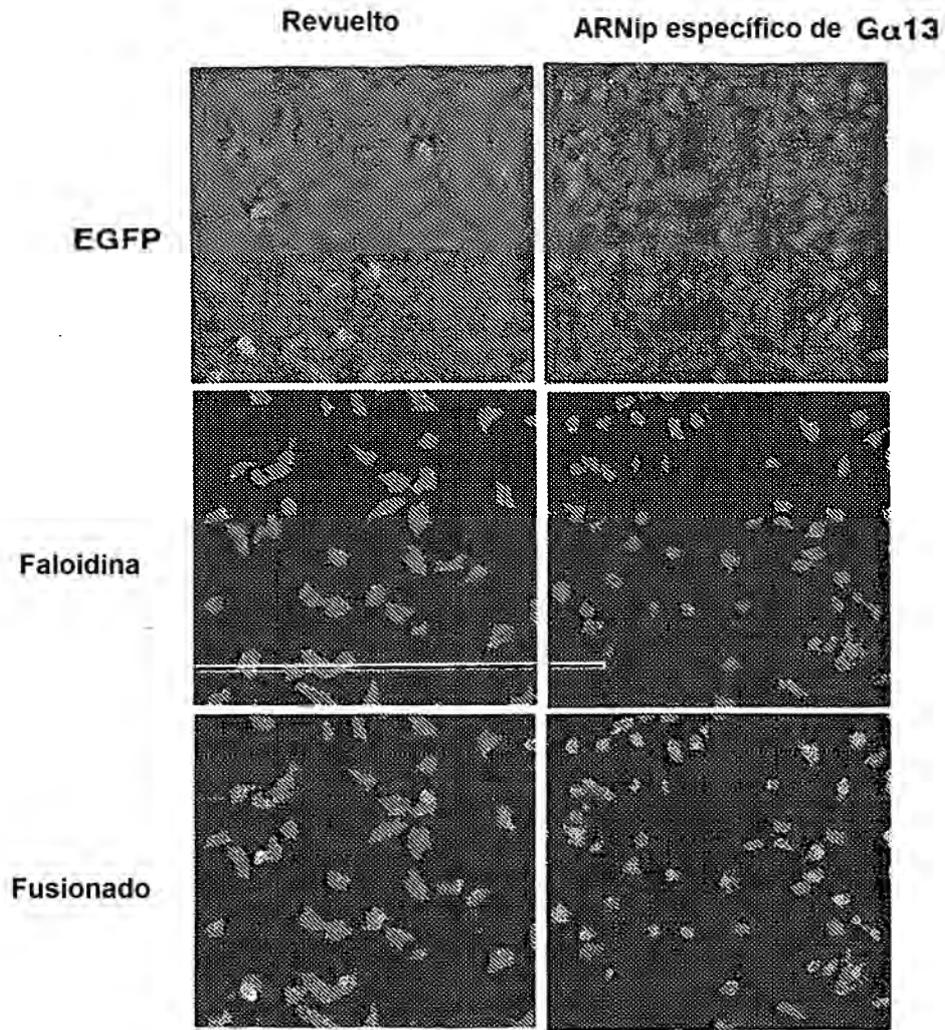


FIG. 5

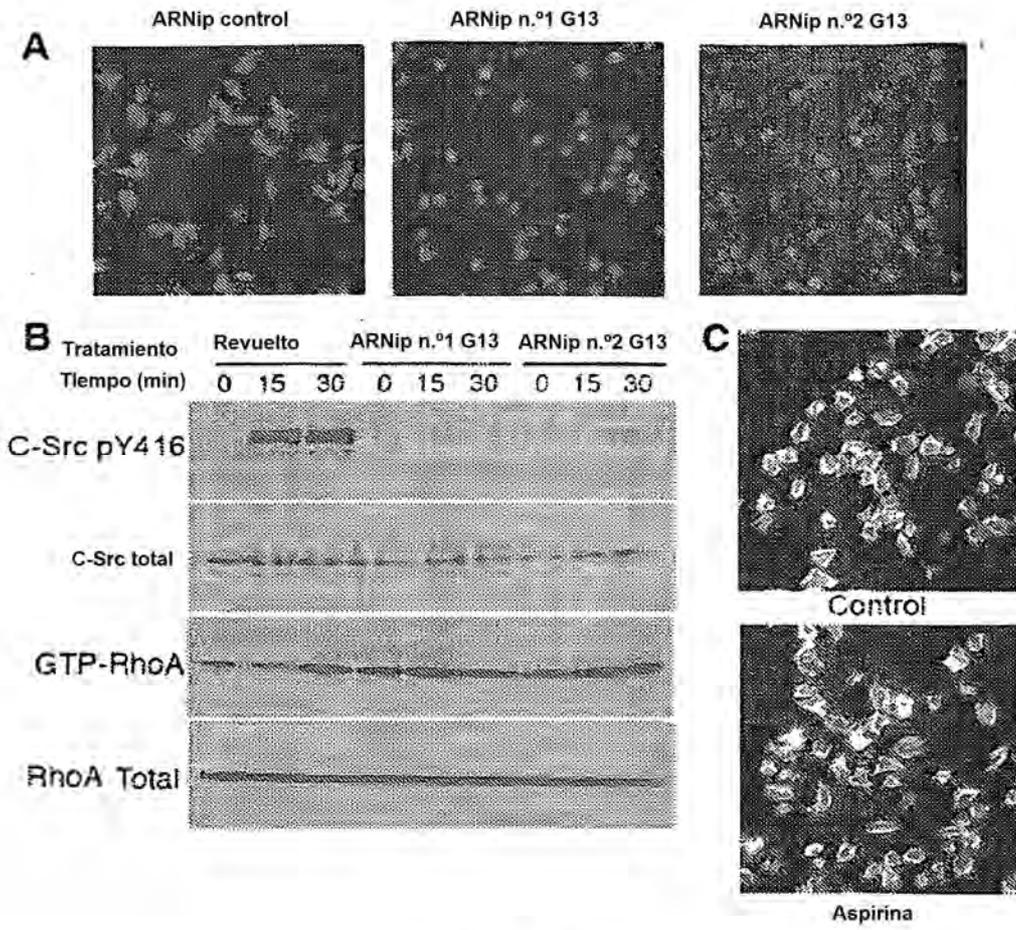


FIG. 6

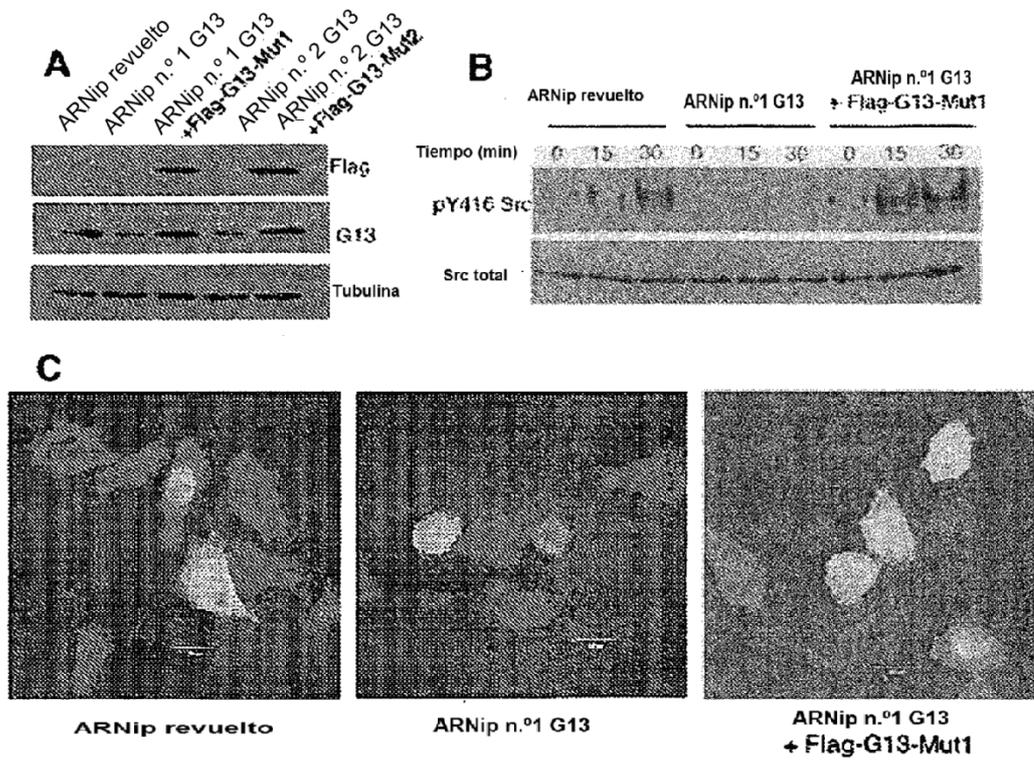


FIG. 7

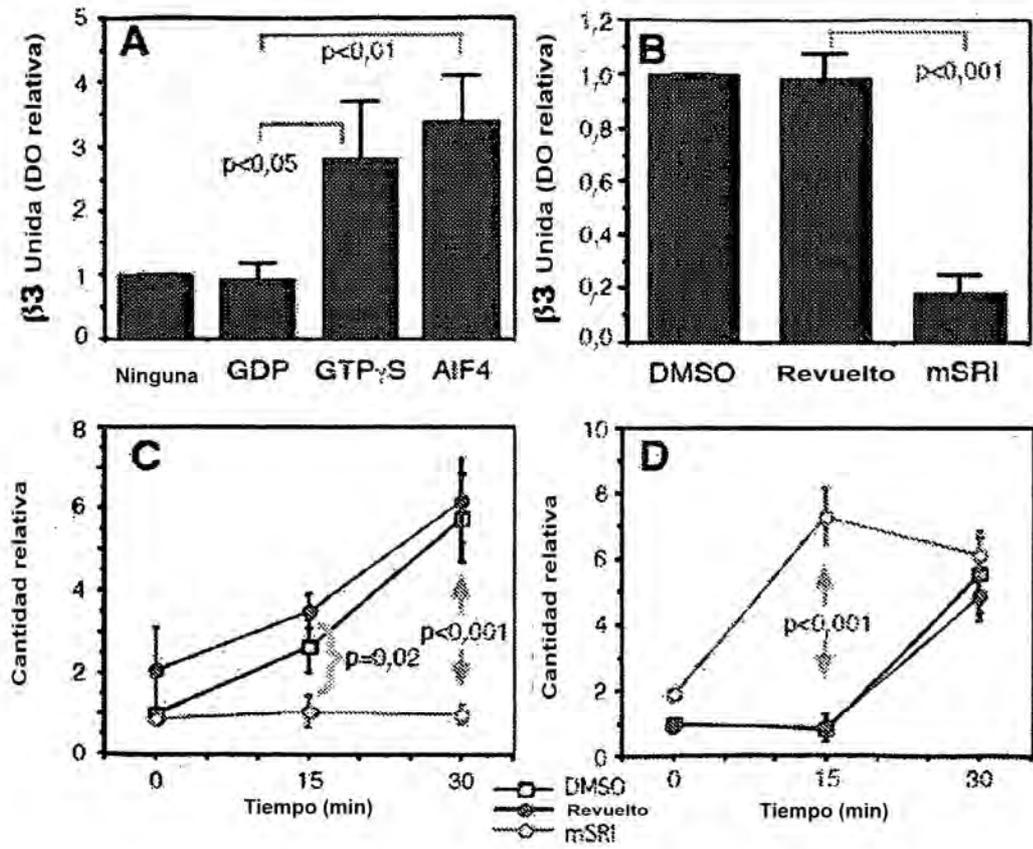


FIG. 8

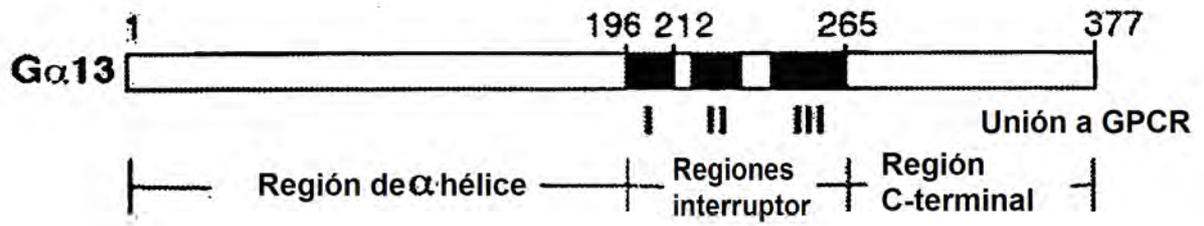


FIG. 9

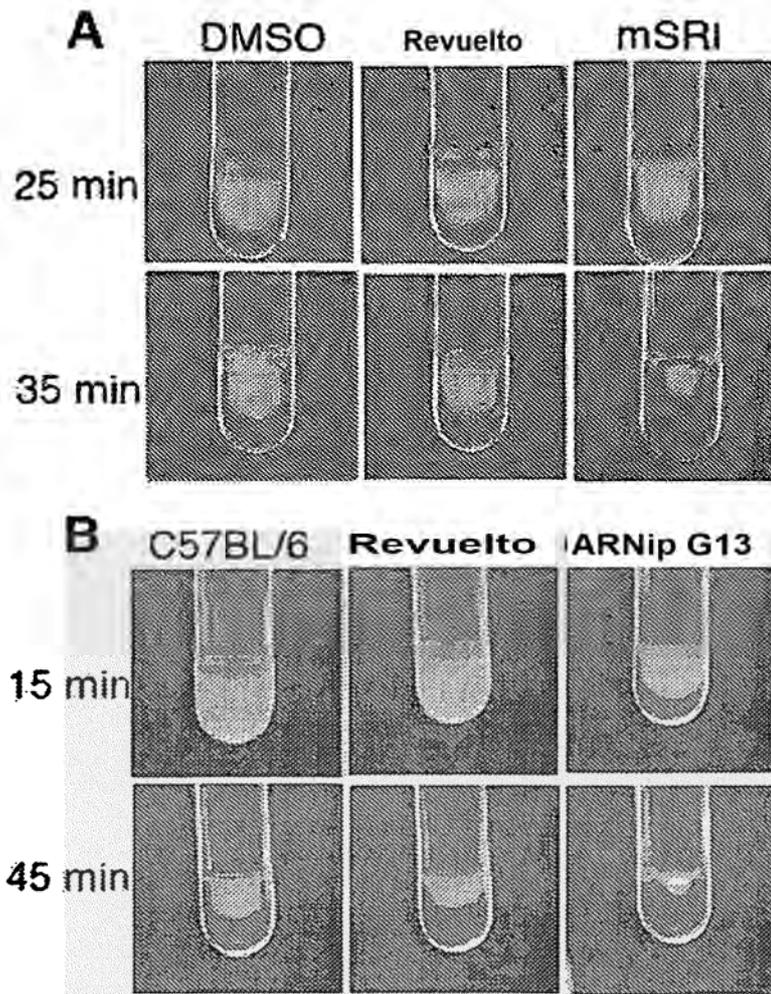


FIG. 10

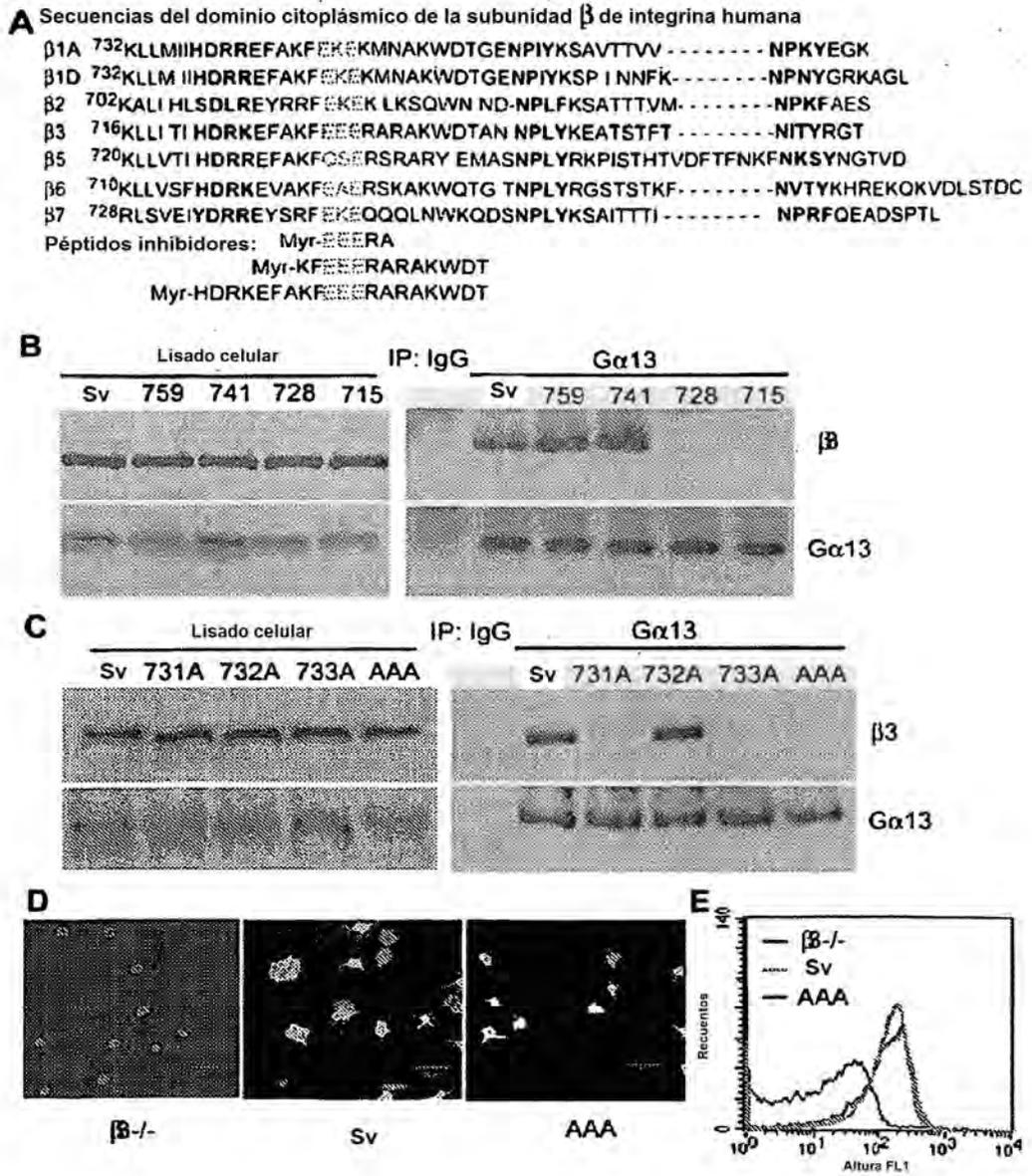


FIG. 11

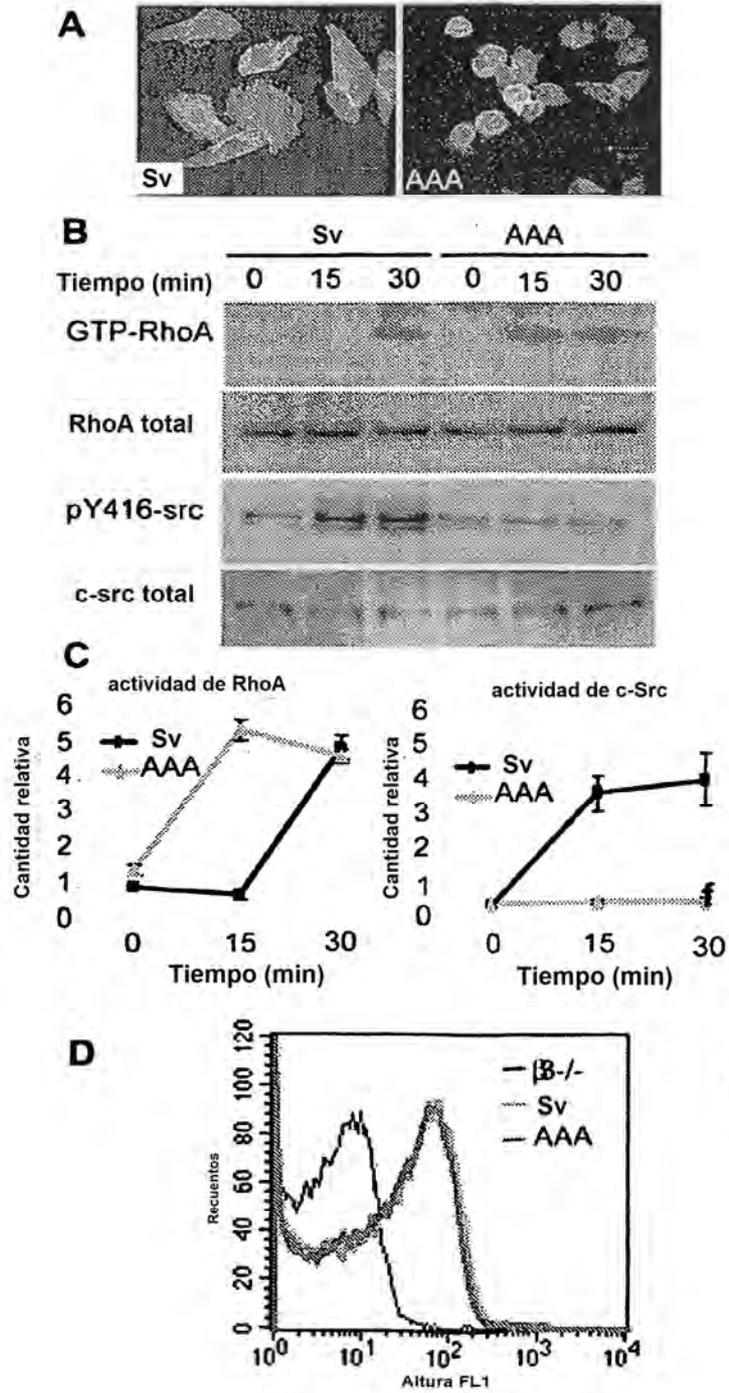


FIG. 12

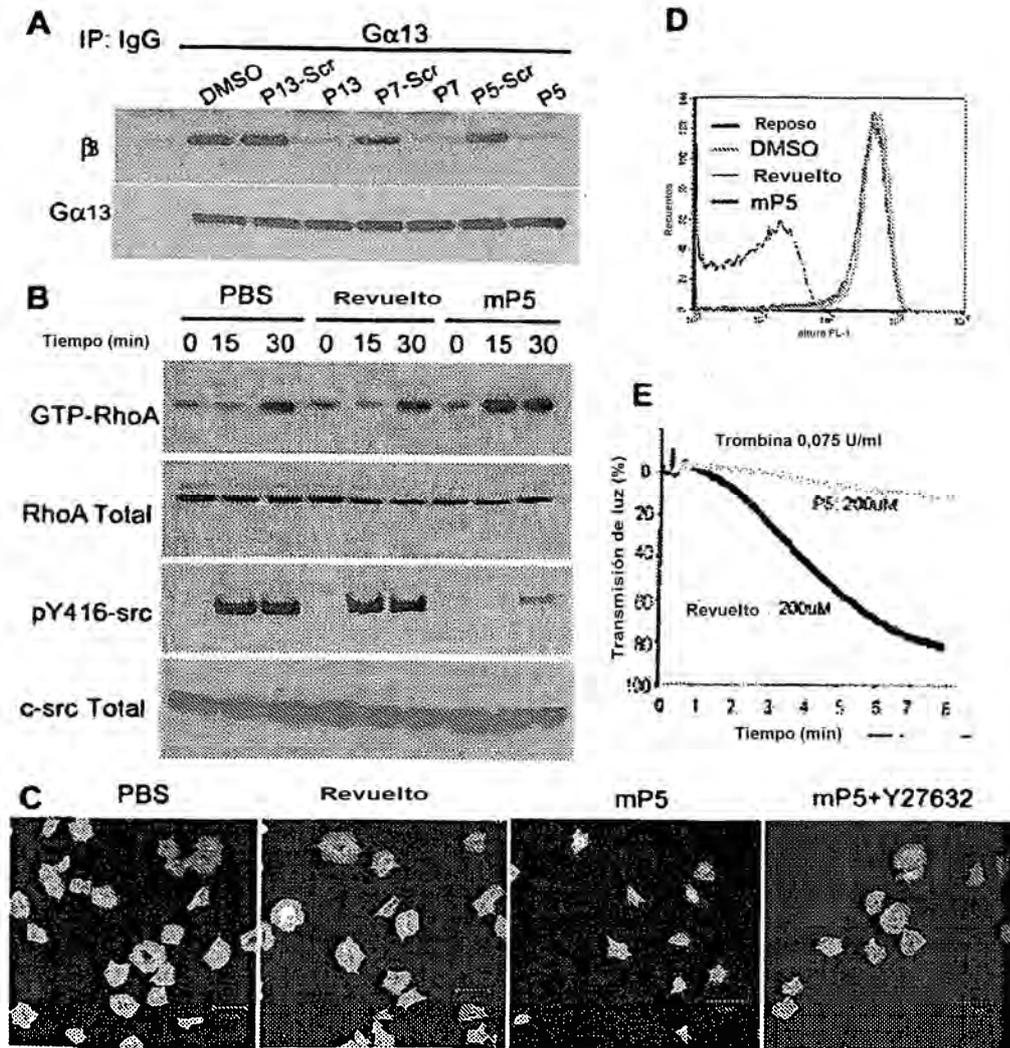


FIG. 13

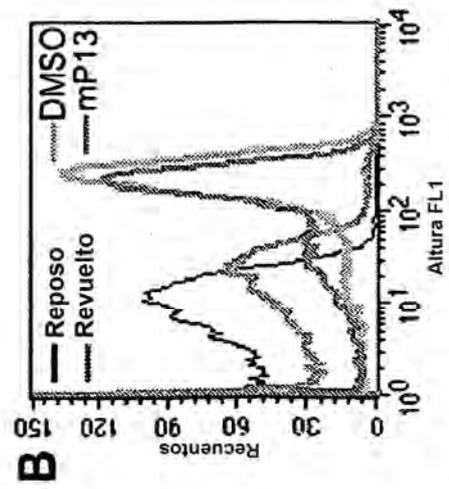
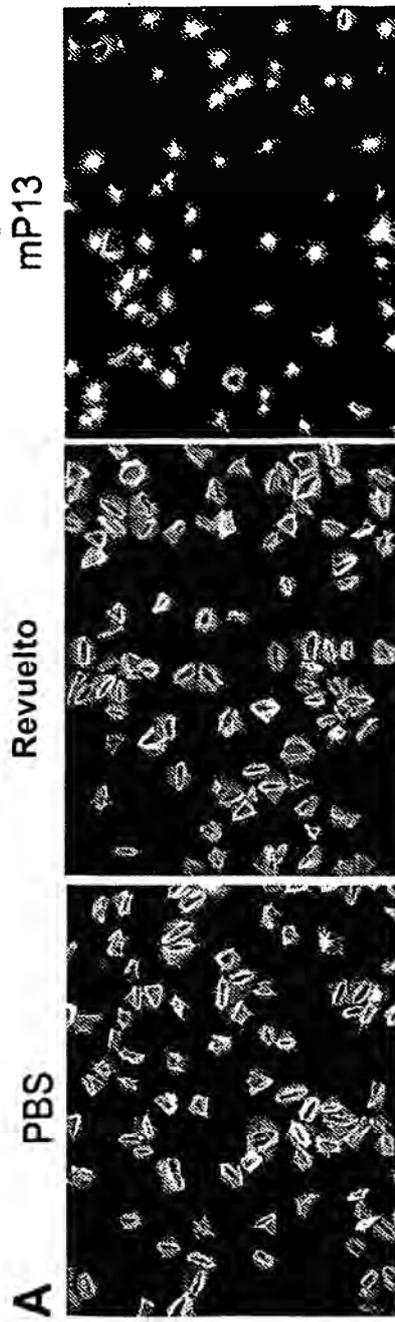


FIG. 14

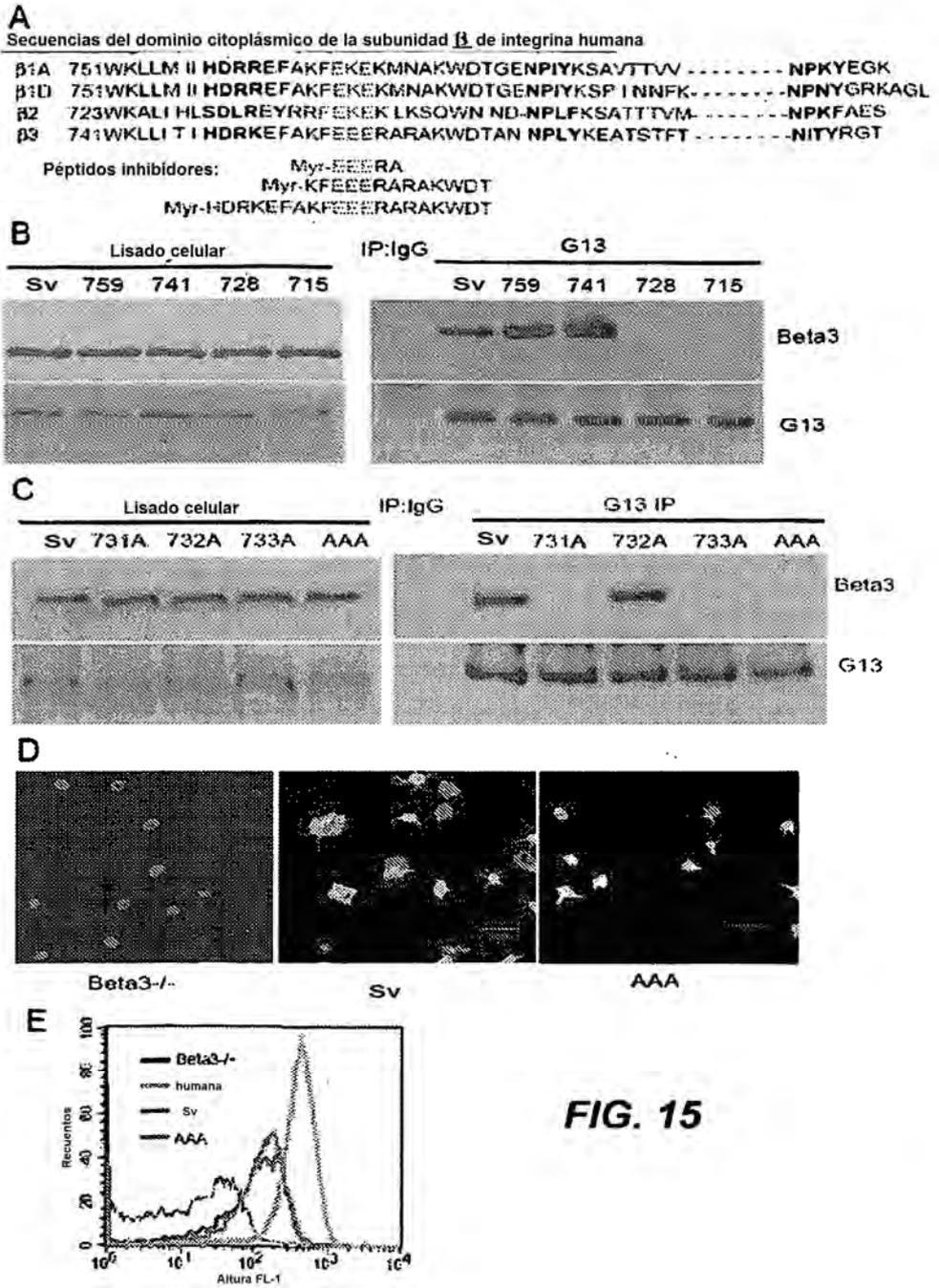


FIG. 15

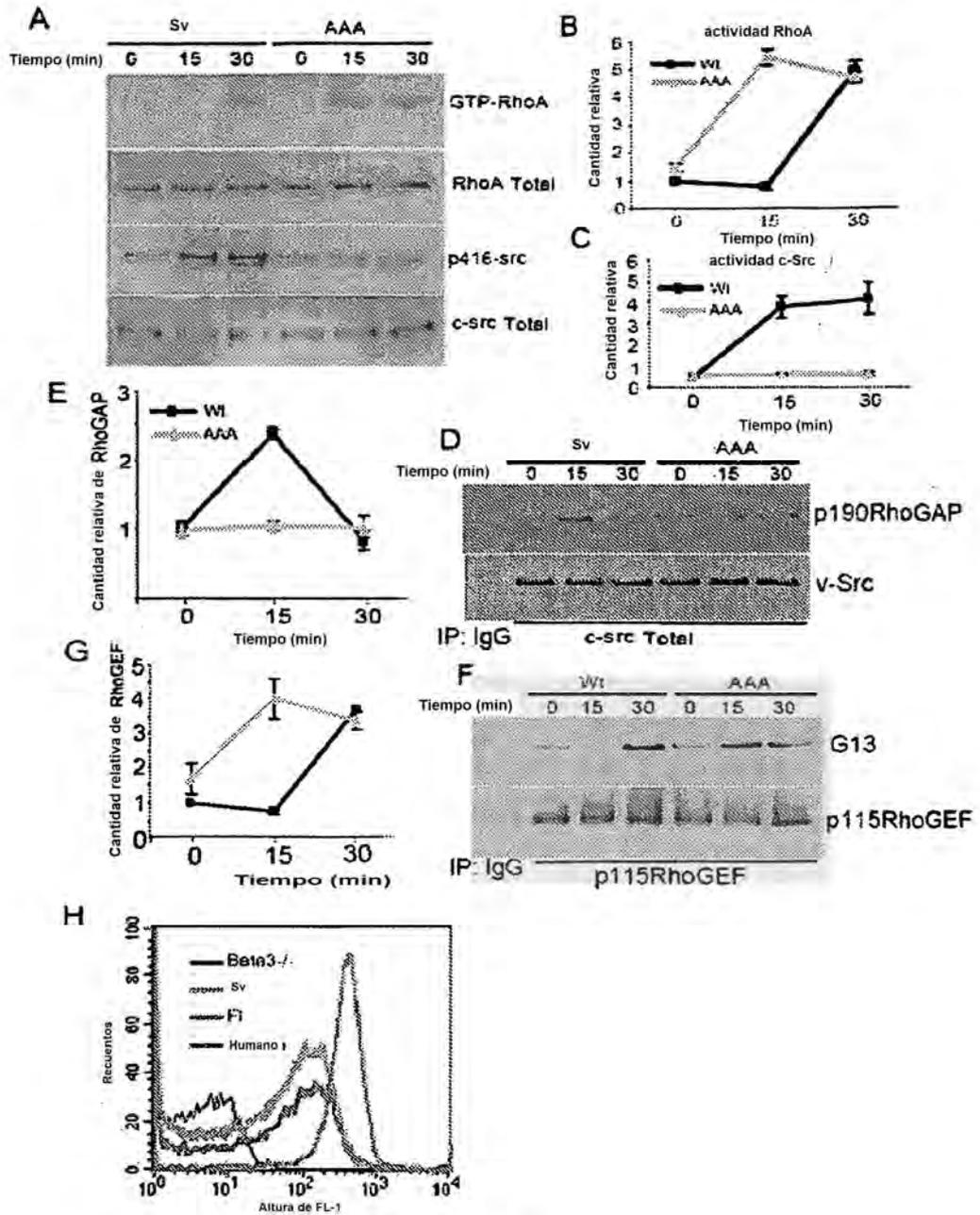


FIG. 16

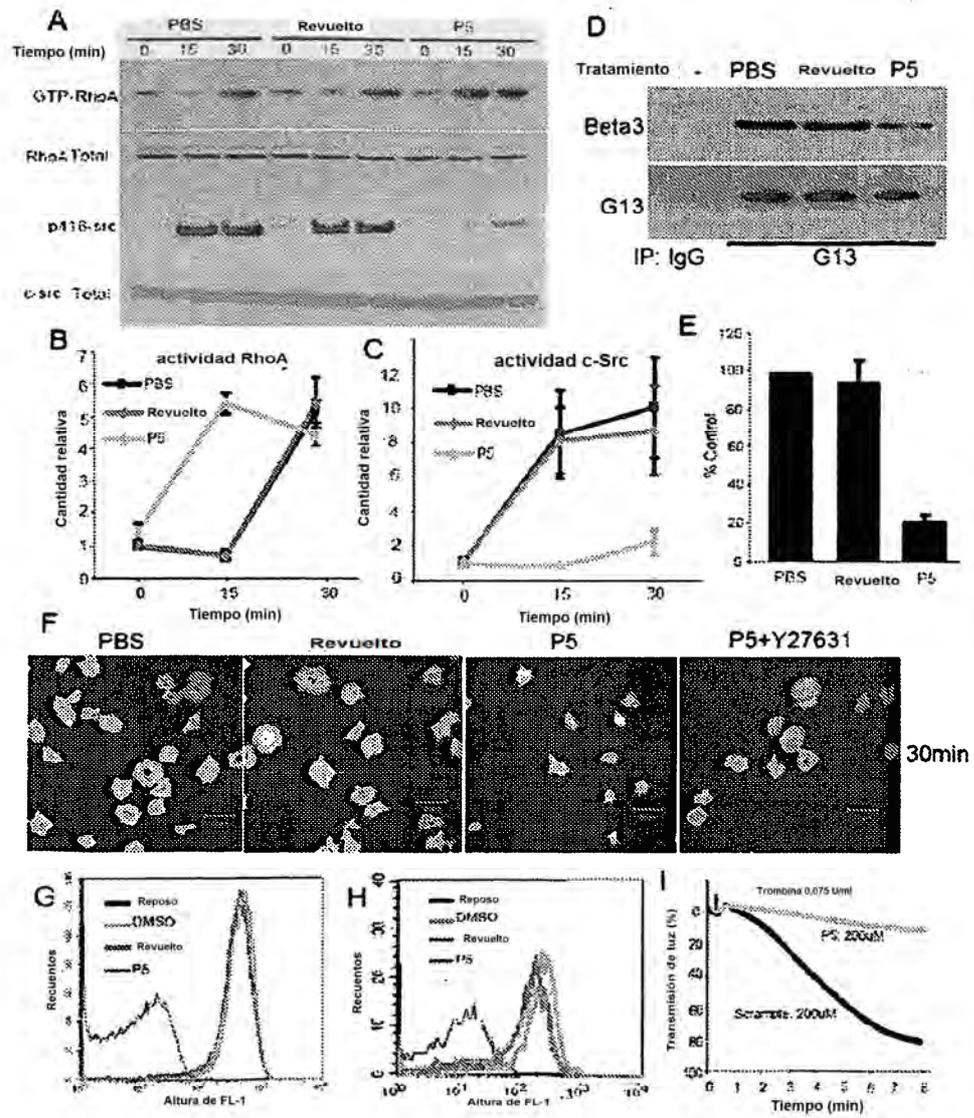


FIG. 17

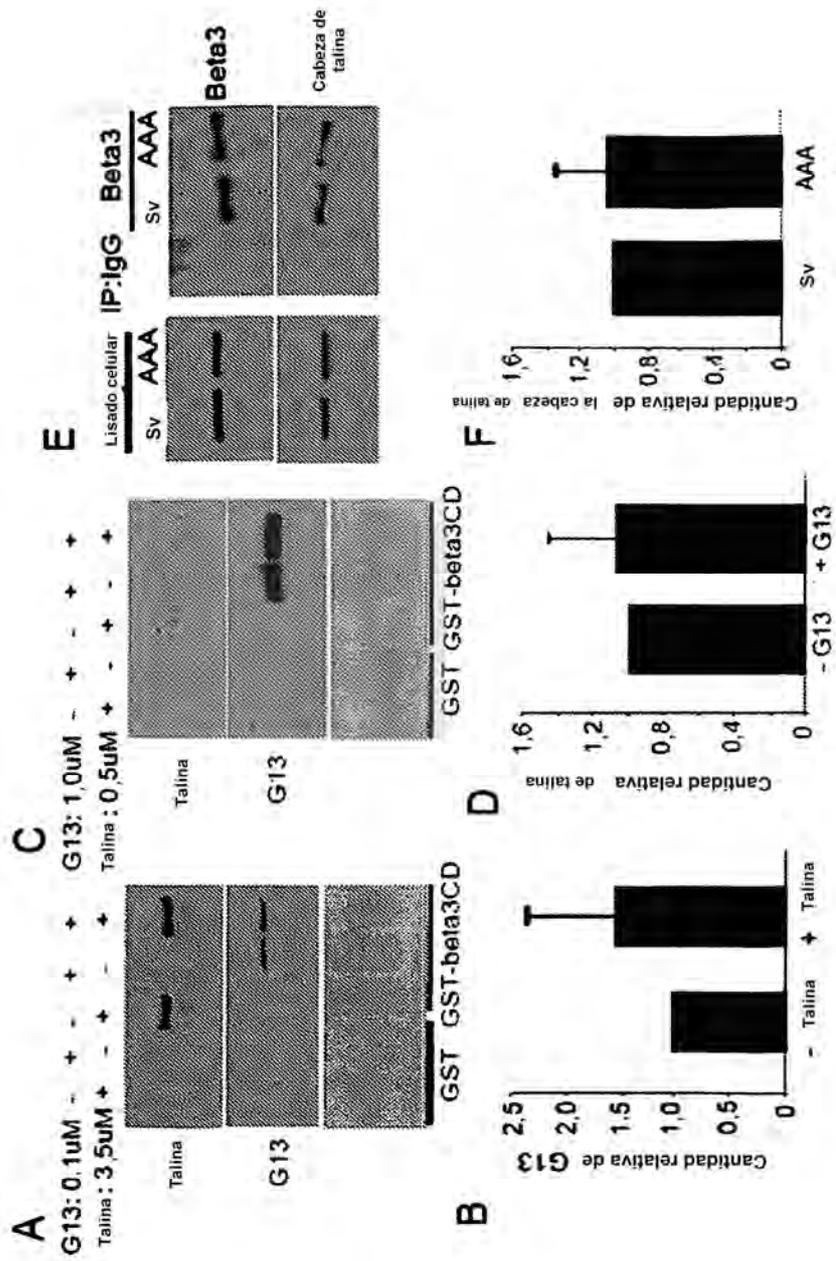


FIG. 18

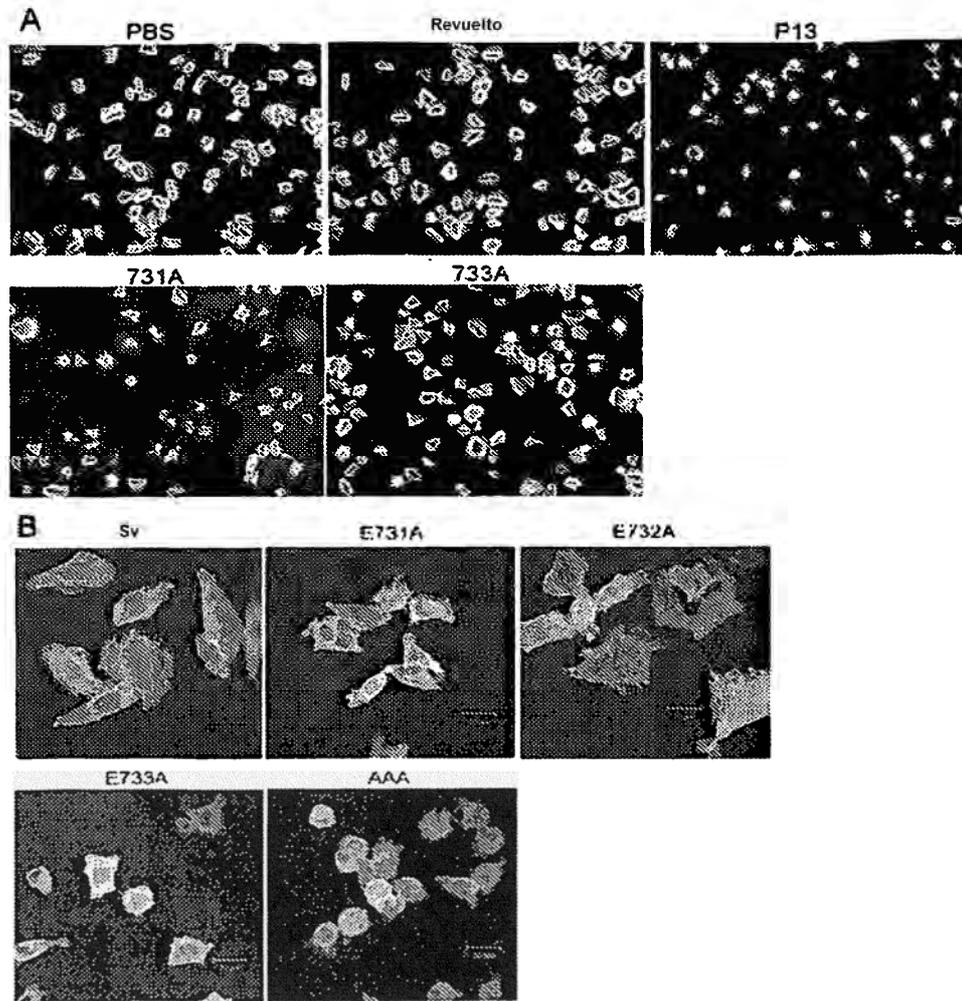


FIG. 19

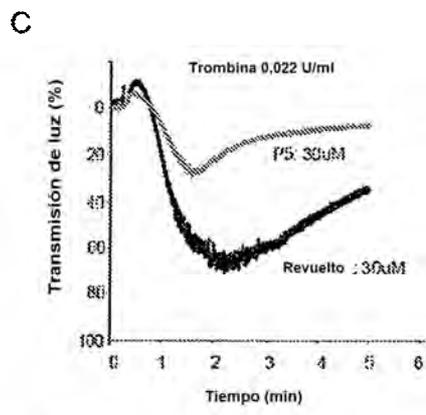
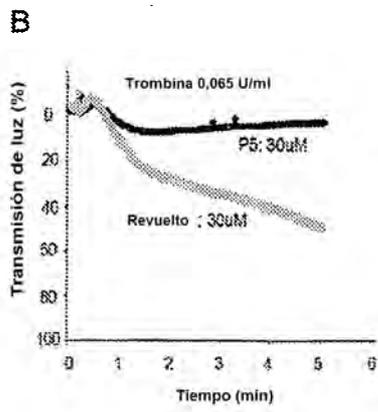
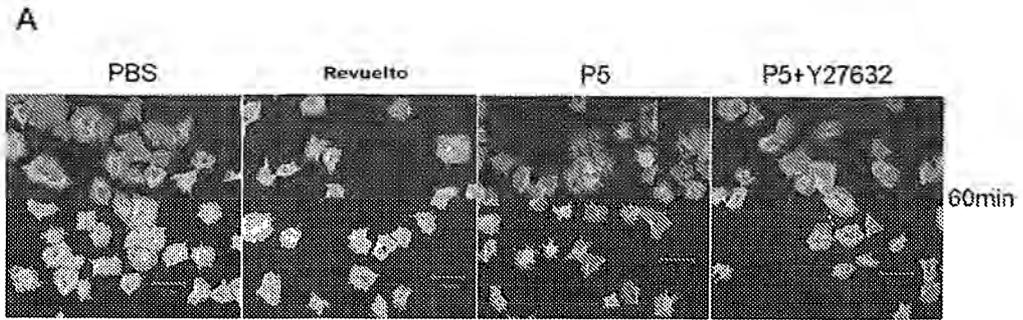


FIG. 20