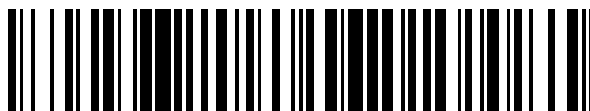


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 439**

51 Int. Cl.:

**C07K 7/08** (2006.01)

**C07K 7/06** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2006 PCT/GB2006/003673**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.04.2007 WO07039728**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2006 E 06794625 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.07.2017 EP 1957522**

54 Título: **Ligandos peptídicos avβ6 y sus usos**

30 Prioridad:

**03.10.2005 GB 0520068**

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

**20.10.2017**

73 Titular/es:

**CANCER RESEARCH TECHNOLOGY LIMITED  
(100.0%)**

**Angel Building 407 St. John Street  
London EC1V 4AD, GB**

72 Inventor/es:

**HOWARD, MARK J.;  
DICARA, DANIELLE y  
MARSHALL, JOHN F.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques  
o Bemerkungen) en el folleto original publicado  
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 638 439 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

Ligandos peptídicos  $\alpha\beta6$  y sus usos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a ligandos peptídicos  $\alpha\beta6$  y sus ácidos nucleicos que los codifican y sus usos en el tratamiento y captura de imágenes de enfermedades mediadas por  $\alpha\beta6$ .

10 **Antecedentes de la invención**

Las integrinas son una gran familia de receptores de superficie celular responsables de mediar en la adhesión célula-célula y células con matriz extracelular (ECM). Hay al menos 24 integrinas diferentes, cada una un heterodímero compuesto de una subunidad  $\alpha$  y  $\beta$ , cuya expresión se determina por varios factores incluyendo tejido, estadio del desarrollo y diversas patologías tisulares tales como inflamación y cáncer. Aunque no poseen ninguna actividad enzimática intrínseca en sí mismas, después de la unión a ligando, las integrinas traducen señales extracelulares en señales intracelulares yuxtaponiendo un complejo de moléculas estructurales y de señalización citoplasmáticas que después interaccionan con y determinan la respuesta celular. Ya que las integrinas están implicadas en la mayoría de elementos de comportamiento celular incluyendo movilidad, proliferación, invasión y supervivencia se ha informado ampliamente de sus papeles en enfermedad. De hecho, se cree que algunas integrinas desempeñan un papel activo en la promoción de ciertas enfermedades incluyendo cáncer. Por ejemplo  $\alpha\beta3$  se ha implicado en la promoción del fenotipo invasivo de melanoma y glioblastoma, debido a sus múltiples capacidades incluyendo regulación positiva de metaloproteinasas pro-invasivas así como provisión de señales promigratorias y de supervivencia. Como la integrina  $\alpha\beta3$  también está regulada positivamente en células endoteliales de vasos sanguíneos angiogénicos y pueden proporcionar señales similares para el desarrollo de vasos nuevos en cáncer, dichos datos han conducido a muchos centros farmacéuticos y académicos a desarrollar antagonistas de  $\alpha\beta3$  para fines terapéuticos muchos de los cuales han sido péptidos o peptidomiméticos. Por lo tanto, el entendimiento de la base estructural de la interacción de integrina-ligando ayudaría al diseño de antagonistas de integrina mejorados.

$\alpha\beta6$  se expresa solamente en células epiteliales. Esta integrina está implicada en procesos tisulares tanto normales como patológicos. Por lo tanto  $\alpha\beta6$  está regulado positivamente por células epiteliales durante la curación de heridas e inflamación. Es probable que la capacidad de  $\alpha\beta6$  para activar localmente TGF $\beta$  uniéndose con su péptido protector, el péptido asociado a latencia (LAP), explique la función de  $\alpha\beta6$  en estas patologías transitorias. Por lo tanto TGF $\beta$  puede suprimir respuestas inflamatorias y proliferación epitelial lo que sugiere que  $\alpha\beta6$  actúa como un control negativo para amortiguar esos procesos. Sin embargo, la inflamación crónica puede conducir a un exceso de activación dependiente de  $\alpha\beta6$  de TGF $\beta$  que da como resultado fibrosis en el pulmón de animales experimentales. Es probable que algunas patologías que dan como resultado fibrosis en seres humanos también puedan implicar activación de TGF $\beta$  dependiente de  $\alpha\beta6$ . La sobreexpresión de  $\alpha\beta6$  constitutiva en la piel de ratones dio como resultado heridas crónicas que aparecían en un número significativo de animales transgénicos. Por lo tanto, las heridas crónicas asociadas con enfermedades humanas (por ejemplo ciertas formas de Epidermólisis Ampollosa) también pueden promoverse o agravarse por la regulación positiva de  $\alpha\beta6$  en los queratinocitos de heridas.

Recientemente, ha resultado evidente que la integrina  $\alpha\beta6$  es una nueva diana importante en el cáncer. Aunque  $\alpha\beta6$  es específico de epitelio, es débil o indetectable en la mayoría de tejidos epiteliales en reposo pero está fuertemente regulada positivamente en muchos tipos de cáncer, con frecuencia en el frente invasivo. Se ha mostrado que  $\alpha\beta6$  puede promover la invasión de carcinoma por MMP regulado positivamente y promover el aumento de la movilidad de modo que  $\alpha\beta6$  promueve la supervivencia de células de carcinoma por regulación positiva de Akt. Estos datos sugieren fuertemente que  $\alpha\beta6$  promueve activamente el fenotipo invasivo. Esta sugerencia está apoyada por el informe reciente que muestra que la alta expresión de  $\alpha\beta6$  se correlaciona con una reducción significativa en la mediana de supervivencia por pacientes de cáncer de colon.

Kraft *et al.*, J. Biol. Chem., 1999, Vol. 274, N.º 4, pp. 1979-1985, describe la definición de un motivo de reconocimiento de ligandos para integrina  $\alpha\beta6$ .

Jackson *et al.*, J. Virol., 1997, Vol. 71, N.º 11, pp. 8357-8361, describe la unión específica de RGD por virus de glosopeda a la integrina purificada  $\alpha\beta3$  *in vitro*.

60 El documento WO 00/37487 describe péptidos que son biológicamente activos como ligandos para integrina  $\alpha\beta6$ .

El documento WO 01/05810 describe derivados peptídicos que son biológicamente activos como ligandos para integrina  $\alpha\beta6$ .

El documento WO 01/00600 describe péptidos que son biológicamente activos como ligandos para integrina  $\alpha\beta_6$ .

$\alpha\beta_6$  se ha identificado como receptor de virus de glosopeda (FMDV) *in vitro* uniéndose a través de un motivo de RGD en la proteína de cápsida vírica, VP1.

5

### Sumario de la invención

La presente invención ha surgido del trabajo dirigido a mejorar terapias dirigidas a  $\alpha\beta_6$ , y más particularmente a encontrar nuevos ligandos de unión, por ejemplo que tienen una afinidad y/o especificidad de unión aumentada que mejoran el tratamiento y captura de imágenes de enfermedades mediadas por  $\alpha\beta_6$ . Estos pueden tener beneficios importantes para pacientes con enfermedades mediadas por  $\alpha\beta_6$  tales como fibrosis crónica o carcinoma. En particular hay alta demanda de antagonistas mejorados de  $\alpha\beta_6$ .

10

En general, la presente invención se basa en el hallazgo sorprendente de que la potencia de antagonistas peptídicos de  $\alpha\beta_6$  depende de la presencia de estructuras secundarias específicas en los antagonistas peptídicos, y en particular péptidos que comprenden el motivo de secuencia RGD LXXL/I, en el que LXXL/I está contenido dentro de una estructura alfa helicoidal. Aunque el análisis de estructura cristalina de FMDV ha mostrado previamente que el motivo de RGD estaba comprendido en un bucle G-H de la proteína de cápsida VP1, que está en la punta de una vuelta en horquilla seguida de una hélice  $3_{10}$ , no hubo ninguna indicación de que la posición del motivo de unión dentro de una estructura secundaria específica fuera importante para su potencia de unión. Los presentes inventores descubrieron que los péptidos truncados que se originaban de la proteína VP1 que comprendía el motivo RGD mostraron potencia de unión y especificidad de unión aumentadas. En particular, la especificidad de unión y la afinidad de unión aumentaron con la mayor propensión helicoidal dentro de la región de unión del péptido. Sin quedar ligado a la teoría se cree que la estructura de hélice alfa dentro del motivo LXXL del péptido de unión a  $\alpha\beta_6$  permite la orientación correcta del motivo RGD LXXL para permitir que las cadenas de lado hidrófobo interaccionen con un sitio de unión en  $\alpha\beta_6$ . Además, los contactos no covalentes entre restos en la hélice y restos en el extremo N terminal estabilizan la estructura en horquilla y por lo tanto presentan el motivo RGD favorablemente para unión específica con  $\alpha\beta_6$ . En consecuencia, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos GFTTGRRGDLATIHGMNRPF; YASARGDLAHLTTTHARHL; y NAVPNLRGDLQVLAQKVART. En particular, el péptido puede ser un péptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART.

15

20

25

30

35

En algunos casos, el péptido está ciclado. En particular, el péptido puede estar ciclado por enlaces disulfuro a través de restos de cisteína.

40

En algunos casos el péptido puede estar unido a un resto detectable. En particular, el resto detectable puede ser detectable por captura de imágenes por resonancia magnética (IRM), Espectroscopia de Resonancia Magnética (ERM), Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales (TCEFI), Tomografía por Emisión de Positrones (TEP) o captura de imágenes óptica.

En ciertos casos, el resto detectable puede ser un resto radiactivo.

45

En algunos casos, el péptido del primer aspecto de la invención puede estar ligado a un resto terapéuticamente activo. En particular, el resto terapéuticamente activo puede ser un agente antineoplásico.

En ciertos casos, el péptido del primer aspecto de la invención puede estar biotilado.

50

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un péptido del primer aspecto de la invención.

En un tercer aspecto, la presente invención proporciona un vector de expresión que comprende una molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención.

55

En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un péptido del primer aspecto de la invención, una molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención o un vector de expresión del tercer aspecto de la invención, para su uso en terapia o diagnóstico.

60

En un quinto aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un péptido del primer aspecto de la invención, una molécula de ácido nucleico del segundo aspecto de la invención o un vector de expresión del tercer aspecto de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

65

En un sexto aspecto, la presente invención proporciona un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART, en la que el péptido está ligado a un agente antineoplásico, para su uso en un método para tratar un cáncer positivo para  $\alpha\beta_6$  en un paciente.

En algunos casos, el péptido para uso del sexto aspecto de la invención puede estar biotinilado.

En un séptimo aspecto, la presente invención proporciona un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART, en la que el péptido está ligado a un resto detectable, para su uso en un método de diagnóstico de un cáncer positivo para  $\alpha\beta 6$  en un paciente.

Se describirán ahora adicionalmente realizaciones de la presente invención como ejemplo y no como limitación en referencia a las figuras y tablas adjuntas.

## 10 Breve descripción de las figuras

**Figura 1.** Espectros de DC de UV lejano de péptidos (A) A20FMDV1, (B) A20FMDV2 y (C) A20LAP en PBS con concentraciones de TFE entre 0-50 % (v/v).

**Figura 2.** Elipticidad molecular media de péptidos (a) A20FMDV1, (b) A20FMDV2 y (c) A20LAP en PBS con concentraciones de TFE entre 0-50 % (v/v).

**Figura 3.** Esquema de tipos de contacto NOE Y ROE principales, aceptores de enlaces de hidrógeno y restos que dan lugar a restricciones f para (a) A20FMDV1, (b) A20FMDV2 y (c) A20LAP.

**Figura 4.** Secciones de espectros de RMN NOESY bidimensionales para A20FMDV1: (a), (d) y (e); A20FMDV2: (b), (e) y (h) y A20LAP: (c), (f) e (i). Los espectros (a-c) abarcan la región Ha-Hb, (d-f) la región NH-NH y (g-i) la región NH-aH. Todos los desplazamientos químicos tienen referencia externa a una solución 100  $\mu\text{M}$  de ácido dimetilsilapetano sulfónico (DSS) en PBS/TFE 30 % (v/v).

**Figura 5.** Estructuras calculadas para A20FMDV1: (a-c); A20FMDV2: (d-f) y A20LAP: (g-i). Grupos de 40 estructuras (a), (d) y (e) muestran todos los enlaces de cadena principal (restos 1-20); grupos de 40 estructuras (b), (e) y (h) muestran enlaces de cadena principal de GLXX al extremo C terminal para destacar la convergencia calculada en cada hélice. Los enlaces coloreados en rojo identifican la región LXX[L/I]XXX que se usó para ajustar los grupos y crear datos en la Tabla 2. Se muestran diagramas en lazo (c), (f) e (i) de la estructura promedio de grupo para cada péptido con el motivo de RGD mostrado en barras y esferas. Todas las figuras se crearon en MOLMOL 2k.2 (Koradi *et al.*, 1996).

**Figura 6.** Espectros de RMN de DTS 1H de integrina  $\alpha\beta 6$  y péptido A20FMDV2 en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ . (a) y (c) son el espectro de control (sin transferencia de DTS que muestre señales peptídicas) mientras que (b) y (d) son el espectro de diferencias de DTS con filtro de bloqueo de espín de 30 ms. Las expansiones (c) y (d) tienen resonancias de restos clave destacados en los datos.

**Figura 7.** Las transferencias de RMN de DTS absolutas entre integrina  $\alpha\beta 6$  y A20FMDV2 mostradas como un porcentaje en cada péptido de aminoácidos en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ .

**Figura 8.** Efecto de péptidos INK y DD19 en la adhesión dependiente de  $\alpha\beta 6$  de 3T3 B6.19 con LAP. Se muestra la concentración peptídica de ambos péptidos representada frente al porcentaje de adhesión celular.

**Figura 9.** Los péptidos cíclicos anti- $\alpha\beta 6$  se unen preferentemente con células que expresan  $\alpha\beta 6$ . Se añadió A20FMDV2-Cyc2 biotinilado o una versión mezclada cíclica a células A375Ppuro o A375Pb6puro. Se detectó unido a estreptavidina-FITC o anticuerpo anti-biotina seguido de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor488 y muestras analizadas por citometría de flujo. Los datos de los péptidos están en gris claro, el fondo (estreptavidina-FITC o anticuerpo de ratón anti-biotina seguido de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con Alexa Fluor488 solamente) se muestran en negro. Obsérvese que la señal de A20FMDV2-Cyc2 es más alta en células A375Pb6puro.

**Figura 10.** Unión dependiente de concentración de péptidos biotinilados con A375Pb6puro y A375Ppuro. Se permitió que los péptidos biotinilados DV1217, A20FMDV1, A20LAP y A20FMDV2 se unieran con A375Pb6puro y A375Ppuro en presencia de cationes ( $\text{MgCl}_2$  0,5 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM) y azida sódica 0,1 %. Los sólidos grises y negros representan la unión de anticuerpos de control, 10D5 (anti- $\alpha\beta 6$ , sólidos grises) e IgG no inmunitarios (sólidos negros). Líneas rojas, péptido biotinilado 10  $\mu\text{M}$ ; líneas naranjas, péptido biotinilado 1  $\mu\text{M}$ ; líneas verdes, péptido biotinilado 0,1  $\mu\text{M}$ ; líneas azules, péptido biotinilado 0,01  $\mu\text{M}$ ; líneas púrpuras, péptido biotinilado 0,001  $\mu\text{M}$ . Los datos son representativos de al menos dos experimentos independientes con resultados similares.

**Tabla 1.** Lista de asignación de RMN de desplazamientos químicos 1H observados para péptidos A20FMDV, A20FMDV-2 y A20LAP en PBS/TFE 30 % (v/v) a 10  $^{\circ}\text{C}$ . Todos los desplazamientos químicos tienen referencia externa a una solución 100  $\mu\text{M}$  de ácido dimetilsilapetano sulfónico (DSS) en PBS/TFE 30 % (v/v).

**Tabla 2.** Lista de NOE, enlace de hidrógeno y conectividades de ángulo de torsión para péptidos A20FMDV,

A20FMDV-2 y A20LAP.

**Tabla 3.** Estadísticas estructurales para 35 grupos de estructuras de péptidos A20FMDV, A20FMDV-2 y A20LAP.

5

**Tabla 4.** Secuencias de aminoácidos de los péptidos usados en los ejemplos experimentales.

### Descripción detallada

#### 10 *Ligandos peptídicos de $\alpha\beta 6$*

La presente divulgación implica el uso de ligandos peptídicos que comprenden el motivo de secuencia  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{L}$  o  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{I}$ , en el que  $\text{LX}^5\text{X}^6\text{L}$  o  $\text{LX}^5\text{X}^6\text{I}$  está contenido dentro de una estructura alfa helicoidal. A no ser que se especifique de otro modo, las posiciones de aminoácidos del presente documento están numeradas desde el extremo N o C terminal del péptido.

15

Se entiende que la expresión “estructura alfa helicoidal” es un grupo secuencial de aminoácidos en un péptido que interacciona con un patrón de enlaces de hidrógeno particular y por lo tanto definen una estructura helicoidal. Por ejemplo, el patrón de enlaces de hidrógeno en una hélice alfa convencional está entre el oxígeno de carbonilo del resto  $n$  y el hidrógeno amida del resto  $n+4$ . Para la hélice  $3_{10}$ , este patrón de enlaces de hidrógeno está entre los restos  $n$  y  $n+3$  y para una hélice  $\pi$  está entre los restos  $n$  y  $n+5$ . El número de restos por vuelta en cada hélice alfa es de 3,6, 3,0 y 4,4 para la hélice alfa convencional, hélice  $3_{10}$  y hélice  $\pi$  respectivamente.

20

Una hélice alfa útil en la presente divulgación puede ser un mimético de hélice alfa como se describe en el documento WO95/00534. Los miméticos de hélices alfa son estructuras alfa helicoidales que son capaces de estabilizar la estructura de un péptido sintético o de origen natural.

25

Los péptidos de la presente divulgación pueden comprender hélices convencionales o hélices  $3_{10}$  o hélices  $\pi$  o cualquier combinación de las mismas. Por ejemplo, las hélices de la presente divulgación pueden comprender aminoácidos que forman una estructura de “recubrimiento”, preferentemente dos recubrimientos, un recubrimiento N terminal y un recubrimiento C terminal que flanquean la hélice.

30

En una realización preferida de la presente divulgación, el péptido definido anteriormente comprende la secuencia  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{LX}^8\text{X}^9\text{X}^{10}$ . Preferentemente, el péptido comprende la secuencia  $\text{RGDLX}^5\text{X}^6\text{LX}^8\text{X}^9\text{X}^{10}\text{Z}_n$ , en la que Z es un resto promotor de hélice y  $n$  es cualquier número entre 1 y 20. Preferentemente,  $n$  es entre 5 y 15, aún más preferentemente  $n$  es entre 8 y 12. La extensión de la hélice para incluir restos helicoidales en la posición Z son realizaciones preferidas ya que potencian adicionalmente el dipolo de hélice que también puede potenciar la unión con  $\alpha\beta 6$ .

35

Los péptidos de la presente divulgación también pueden ser variantes funcionales de los péptidos como se han definido anteriormente, incluyendo péptidos que poseen al menos 70 %, preferentemente 80 %, aún más preferentemente 90 % de identidad de secuencia con los péptidos anteriores, incluyen péptidos adicionales que comprenden aminoácidos no naturales o modificados. Los aminoácidos no naturales adecuados incluyen, por ejemplo, D-aminoácidos, ornitina, ácido diaminobutírico ornitina, norleucina ornitina, pirilalanina, tienilalanina, naftilalanina, fenilglicina, aminoácidos alfa y alfa-disustituidos, N-alkil aminoácidos, ácido láctico, derivados de haluro de aminoácidos naturales, tales como trifluorotirosina, p-Cl-fenilalanina, p-Br-fenilalanina, p-I-fenilalanina, L-alil-glicina, b-alanina, ácido L-a-amino butírico, ácido L-g-amino butírico, ácido L-a-amino isobutírico, ácido L-e-amino caproico, ácido 7-amino heptanoico, L metionina sulfona, L-norleucina, L-norvalina, p-nitro-L-fenilalanina, L-hidroxiprolina, L-tioprolina, derivados de metilo de fenilalanina, tales como 1-metil-Phe, pentametil-Phe, L-Phe(4-amino), L-Tyr(metilo), L-Phe(4-isopropilo), L-Tic(ácido 1,2,3,4-tetrahidroisoquinolina-3-carboxílico), ácido L-diaminopropiónico y L-Phe(4-bencilo). Los péptidos pueden modificarse adicionalmente. Por ejemplo, uno o más enlaces amida pueden reemplazarse por enlaces éster o de cadena principal de alquilo. Puede haber sustituyentes de N o C alquilo, modificaciones de cadenas laterales o restricciones tales como enlaces disulfuro, amida de cadena lateral o enlaces éster.

50

Los péptidos de la presente divulgación pueden incluir tanto péptidos modificados como análogos peptídicos sintéticos. Los péptidos pueden modificarse, por ejemplo, para mejorar la formulación y las propiedades de almacenamiento, o para proteger enlaces peptídicos lábiles incorporando estructuras no peptídicas.

Pueden prepararse péptidos de la presente invención usando métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden producirse péptidos por síntesis química, por ejemplo técnicas de fase sólida y sintetizadores peptídicos automáticos, o por medios recombinantes (usando ácidos nucleicos tales como los descritos en el presente documento). Por ejemplo, pueden sintetizarse péptidos usando estrategias de fase sólida en un sintetizador peptídico múltiple automático (Abimed AMS 422) usando química de 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc). Los péptidos pueden después purificarse mediante HPLC de fase inversa y liofilizarse. El péptido puede prepararse por escisión de un péptido más largo, por ejemplo, el péptido 5T4 (N.º de referencia de Genbank Z29083). Por lo tanto,

65

el péptido puede ser un fragmento de la secuencia de 5T4. Pueden prepararse péptidos por expresión recombinante de los polinucleótidos descritos en el presente documento. Se expresan péptidos en células hospedadoras adecuadas y aislarse usando métodos conocidos en la técnica.

- 5 Preferentemente,  $X^5$ - $X^6$  y  $X^8$ - $X^{10}$  son restos promotores de hélices. Preferentemente, los restos promotores de hélices se seleccionan independientemente del grupo que consiste en Glu, Ala, Leu, Met, Gln, Lys, Arg, Val, Ile, Trp, Phe y Asp. Los restos promotores de hélices podrían ser un aminoácido artificial o un aminoácido modificado.

10 La expresión "restos promotores de hélice" incluye aminoácidos con una preferencia conformacional mayor de 1,0 por hallarse en el medio de una hélice  $\alpha$  (de Creighton, 1993 y Pace C.N. y Scholtz J.M. (1998), *Biophysical Journal*, Vol. 75, páginas 422-427). Sin embargo, combinaciones promotoras de hélices no ortodoxas de aminoácidos también están dentro del alcance de la divulgación si potencian la especificidad y/o afinidad de unión con  $\alpha\beta 6$ .

15 Por "recubrimiento terminal" se entiende la estabilización del dipolo de hélice alfa por el que el extremo N terminal de la hélice se recubre por un aminoácido con carga negativa como ácido glutámico. De forma similar, el extremo C terminal puede recubrirse con un aminoácido con carga positiva como lisina. Los restos de recubrimiento pueden ajustarse a las normas de recubrimiento definidas por Aurora y Rose (*Protein Sci.* 7(1): 21-38; 1998), pero también están dentro del alcance de la divulgación motivos de recubrimiento no ortodoxos si estabilizan el péptido por interacción estructural.

20 En una realización adicional, los péptidos de la presente invención pueden ciclarse. Se conocen bien en la técnica métodos para introducir estructuras cíclicas en los péptidos de la presente invención para seleccionar y proporcionar restricciones conformacionales en la estructura que dan como resultado estabilidad potenciada. Por ejemplo, puede añadirse una cisteína C o N terminal al péptido, de modo que cuando se oxide el péptido contendrá un enlace disulfuro, lo que genera un péptido cíclico. Otros métodos de ciclación de péptidos incluyen la formación de tioéteres y amidas y ésteres carboxilo y amino terminales. Se han desarrollado varias técnicas sintéticas para generar péptidos circulares sintéticos (Tam y Lu, *Protein Sci.*, 7(7): 1583-1592, 1998; Romanovskis y Spatola, *J. Pept. Res.*, 52(5): 356-374, 1998; Camarero y Muir, *J. Amer. Chem. Soc.*, 121: 5597-5598, 1999; Valero *et al.*, *J. Pept. Res.*, 53(1): 56-67, 1999). En general, el papel de ciclación de péptidos es doble: (a) reducir la hidrólisis *in vivo* y (b) desestabilizar termodinámicamente el estado desplegado y promover la formación de estructura secundaria. Existe algo de importancia potencial para el empaquetamiento hidrófobo de restos N terminales de RGD a lo largo de la cara de hélice opuesta de modo que el diseño de los restos  $X^5$ - $X^6$  también podría potenciar la especificidad.

35 En una realización adicional de la presente divulgación, el péptido puede representarse por la siguiente fórmula  $B_n\text{RGDLXXLXXXZ}_m$ , donde el resto B es un resto que potencia las interacciones hidrófobas con la hélice definida a partir de LXXL y también potencia el RGD de cabeza de martillo para unión, y en la que Z es un resto promotor de hélice y en la que n es un número entre 1 y 35 e independientemente m es un número entre 1 y 35. Preferentemente n se selecciona de modo que B sea lo suficientemente largo para facilitar un núcleo de interacción no covalente/hidrófobo. La naturaleza exacta de estos restos depende del diseño general de la región, en particular se prefiere tener una mezcla de interacciones hidrófobas (a partir de restos tales como Val, Ile, Leu) y/o interacciones electrostáticas (usando Asp, Glu, Lys y Arg junto con su par de iones homólogo en las posiciones  $X^{15}$ - $X^{16}$  ahora definidas (entre los dos restos de Leu en LXXL).

45 En una realización adicional, el péptido comprende o consiste en una secuencia seleccionada del grupo GFTTGRRGDLATIHGMNRPF, YTASARGDLAHLTTTHARHL o NAVPNLRGDLQVLAQKVART.

En una realización adicional, la estructura alfa helicoidal del péptido permite que las cadenas del lado hidrófobo de los restos LXXL/I protruyan desde un lado de la hélice.

50 En una realización adicional, la estructura alfa helicoidal tiene al menos una vuelta.

En una realización preferida adicional, el péptido es de entre 7 y 45 aminoácidos de longitud, preferentemente entre 7 y 40, 35, 30, 25, 20 o 15 aminoácidos. Por ejemplo, el péptido puede ser de 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 22, 24, 26, 28, 32, 34, 36, 38, 42 o 44 aminoácidos de longitud. En cualquier caso, el péptido de la presente divulgación no debería superar una longitud que permitiera la formación de estructura terciaria, normalmente un péptido no debería superar los 45 aminoácidos si está disponible como una molécula aislada. Sin embargo, el péptido podría superar los 45 aminoácidos si está fusionado con una molécula mayor tal como un anticuerpo u otra proteína o macromolécula que podría evitar la formación de una estructura terciaria dentro del péptido. Más preferentemente el péptido es de 20 aminoácidos de longitud.

60 En un aspecto adicional, los péptidos descritos en el presente documento pueden unirse a un resto fácilmente detectable. La expresión "resto fácilmente detectable" se refiere a un resto que, cuando se localiza en el sitio diana después de la administración de los péptidos de la invención a un paciente, puede detectarse, normalmente de forma no invasiva desde el exterior del cuerpo y localizar el sitio de la diana. Por lo tanto, los péptidos de esta realización de la invención son útiles en la captura de imágenes y el diagnóstico. Los restos fácilmente detectables son entidades que son detectables por técnicas de captura de imágenes tales como Captura de Imágenes por

Resonancia Magnética (IRM), Espectroscopia de Resonancia Magnética (ERM), Tomografía Computarizada por Emisión de Fotones Individuales (TCEFI) y Tomografía de Emisión de Positrones (TEP) y captura de imágenes óptica. Preferentemente, los restos de captura de imágenes son entidades no tóxicas, estables, que conservan sus propiedades en condiciones *in vitro* e *in vivo*. Los ejemplos de dichos restos incluyen pero sin limitación restos radiactivos, por ejemplo isótopos radiactivos. Los átomos radiactivos adecuados incluyen tecnecio-99m o yodo-123 para estudios escintigráficos. Otros restos fácilmente detectables incluyen, por ejemplo, marcadores de espín para IRM tales como yodo-123 de nuevo, yodo-131, indio-111, fluor-18, carbono-13, nitrógeno-15, oxígeno-17, gadolinio, manganeso o hierro y restos ópticos que incluyen Cy5.5 y puntos cuánticos.

- 5
- 10 En una realización adicional de la presente invención un polipéptido se liga a un resto terapéuticamente activo, preferentemente el resto es citotóxico.

La expresión "resto terapéuticamente activo" abarca un resto que tiene propiedades beneficiosas, profilácticas y/o terapéuticas.

- 15
- En una realización el resto terapéuticamente activo es un agente quimioterapéutico citotóxico. Se conocen bien en la técnica agentes quimioterapéuticos citotóxicos e incluyen agentes antineoplásicos tales como:

- 20 Agentes alquilantes incluyendo mostazas de nitrógeno tales como mecloretamina (HN2), ciclofosfamida, ifosfamida, melfalán (L-sarcolisina) y clorambucilo, 10 etileniminas y metilmelaminas tales como hexametilmelamina, tiotepa; alquil sulfonatos tales como busulfán; nitrosoareas tales como carmustina (BCNU), lomustina (CCNLJ), semustina (metil-CCN-U) y estreptozocina (estreptozotocina); y triacenos tales como decarbacina (DTIC; dimetiltriacenoimidazolcarboxamida); antimetabolitos incluyendo análogos de ácido fólico tales como metotrexato (ametopterina); análogos de pirimidina tales como fluorouracilo (5- fluorouracilo; 5-FU), floxuridina (fluorodesoxiuridina; FUDR) y citarabina (arabinósido de citosina); y análogos de purina e inhibidores relacionados tales como mercaptopurina (6-mercaptopurina; 6-MP), tioguanina (6-tioguanina; TG) y pentostatina (2'-desoxicofonicina). Productos naturales incluyendo alcaloides de la vinca tales como vinblastina (VLB) y vincristina; epipodofilotoxinas tales como etopósido y tenipósido; antibióticos tales como dactinomicina (actinomicina D), daunorubicina (daunomicina; rubidomicina), doxorubicina, bleomicina, plicamicina (mitramicina) y mitomicina (mitomicina Q; enzimas tales como L-asparaginasa; y modificadores de la respuesta biológica tales como interferón alfa. Agentes misceláneos incluyendo complejos de coordinación de platino tales como cisplatino (cis-DDP) y carboplatino; antracénodiona tal como mitoxantrona y antraciclina; urea sustituida tal como hidroxurea; derivado de metil hidracina tal como procarbocina (N-metilhidracina, MIH); y supresor adrenocortical tal como mitotano (o, p'-DDD) y aminoglutetimida; taxol y análogos/derivados; y agonistas/antagonistas de hormonas tales como flutamida y tamoxifeno.
- 25
- 30
- 35

Se conocen bien en la técnica métodos para conjugar polipéptidos con agentes terapéuticos.

- 40 En una realización adicional de la presente invención un polipéptido se une a una partícula que contiene el agente terapéutico. Las partículas en este caso incluyen nanopartículas y vesículas basadas en lípidos tales como liposomas u otras estructuras similares compuestas de lípidos. En consecuencia, la presente invención proporciona los péptidos como se definen en el presente documento y un vehículo de liposoma y nanopartículas que comprenden los péptidos como se definen en el presente documento.

- 45 Los liposomas son vesículas esféricas que comprenden una bicapa fosfolipídica que puede usarse como agentes para suministrar materiales tales como fármacos o material genético. Los liposomas pueden estar compuestos de fosfolípidos derivados de forma natural con cadenas lipídicas mixtas (fosfatidiletanolamina de huevo) o de componentes puros como DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina). La síntesis y el uso de liposomas están ahora bien establecidos en la técnica. Los liposomas se crean en general por aplicación de ultrasonidos de fosfolípidos en un medio adecuado tal como agua. Las bajas tasas de cizallamiento crean liposomas multilamelares que tienen estructuras multicapa. Ultrasonidos de alto cizallamiento continuados tienden a formar liposomas unilamelares más pequeñas. La investigación también ha podido posibilitar liposomas para evitar la detección por el sistema inmunitario, por ejemplo por revestimiento de los liposomas con polietilenglicol (PEG). También es posible incorporar especies en liposomas, tales como los péptidos de la invención para ayudar a dirigirlos a un sitio de suministro, por ejemplo en células o *in vivo*.
- 50
- 55

- El uso de nanopartículas como agentes de suministro para materiales asociados o unidos a las nanopartículas se conoce en la técnica. Algunos tipos de nanopartículas comprenden un núcleo, con frecuencia de átomos metálicos y/o semiconductores, al que pueden ligarse ligandos de uno o más tipos de diferentes, incluyendo, por ejemplo, uno o más de los péptidos de la presente invención, véase por ejemplo documentos WO02/32404, WO2005/10816 y WO2005/116226. Pueden formarse otros tipos de nanopartícula a partir de materiales tales como liposomas. En algunos casos, las nanopartículas pueden derivatizarse o conjugarse con otros ligandos que pueden estar presentes para proporcionar las nanopartículas con diferentes propiedades o funciones. En algunas realizaciones, las nanopartículas pueden ser puntos cuánticos, es decir, nanocristales de materiales semiconductores que tienen las propiedades químicas y físicas sorprendentes que difieren notablemente de las del sólido a granel (véase Gleiter, Adv. Mater. 1992, 4, 474-481). Ahora que se entienden sus efectos de tamaño cuántico, se ha hecho cada vez más
- 60
- 65

popular la investigación fundamental y aplicada en estos sistemas. Una aplicación interesante es el uso de nanocristales como marcadores luminiscentes para sistemas biológicos, véase por ejemplo, Brucher *et al*, Science 1998, 281, 2013-2016, Chan y Nie, Science, 1998, 281, 2016-2018, Mattousi *et al*, J. Am. Chem. Soc., 2000, 122, 12142-12150, y A.P. Alivisatos, Pure Appl. Chem. 2000, 72, 3-9. Los puntos cuánticos tienen varias ventajas frente a los colorantes fluorescentes convencionales; los puntos cuánticos emiten luz a diversas longitudes de onda precisas dependiendo de su tamaño y tienen tiempos de vida luminiscente largos.

En una realización adicional, el resto citotóxico es un resto peptídico o polipeptídico citotóxico por el que se incluye cualquier resto que conduzca a muerte celular.

Se conocen bien en la técnica restos polipéptidos y peptídicos citotóxicos e incluyen, por ejemplo, ricina, abrina, exotoxina de *Pseudomonas*, factor tisular y similares. El uso de ricina como un agente citotóxico se describe en Burrows y Thorpe, P.N.A.S. USA 90: 8996-9000, 1993, y el uso de factor tisular, que conduce a coagulación sanguínea localizada e infarto de un tumor, se ha descrito en Ran *et al*, Cancer Res. 58: 4646-4653, 1998 y Huang *et al*, Science 275: 25 547-550, 1997. Tsai *et al*, Dis. Colon Rectum 38: 1067- 1074, 1995 describe la cadena A de abrina conjugada con un anticuerpo monoclonal. Se describen otras proteínas inactivadoras de ribosomas como agentes citotóxicos en el documento WO 96/06641. También puede usarse exotoxina de *Pseudomonas* como el resto polipeptídico citotóxico (véase, por ejemplo, Aiello *et al*, P.N.A.S. USA 92: 10457-10461, 1995).

Ciertas citocinas, tales como TNF $\alpha$  e IL-2, también pueden ser útiles como agentes citotóxicos y/o terapéuticos.

Ciertos átomos radiactivos también pueden ser citotóxicos si se suministran en suficientes dosis. Por lo tanto, el resto citotóxico puede comprender un átomo radiactivo que, en su uso, suministra una cantidad suficiente de radiactividad al sitio diana para ser citotóxico. Los átomos radiactivos adecuados incluyen fósforo-32, yodo-125, yodo-131, indio-111, renio-186, renio-188 o itrio-90, o cualquier otro isótopo que emita suficiente energía para destruir células adyacentes, orgánulos o ácido nucleico. Preferentemente, los isótopos y la densidad de átomos radiactivos en el compuesto de la invención son tales que se suministra una dosis de más de 4000 cGy, y más preferentemente al menos 6000, 8000 o 10000 cGy, al sitio diana y, preferentemente, a las células en el sitio diana y sus orgánulos, particularmente el núcleo.

El átomo radiactivo puede unirse al resto de unión de maneras conocidas. Por ejemplo, puede unirse EDTA u otro agente quelante al resto de unión y usarse para unir  $^{111}\text{In}$  o  $^{90}\text{Y}$ . Los restos de tirosina pueden marcarse con  $^{125}\text{I}$  o  $^{131}\text{I}$ .

En una realización adicional, la presente divulgación proporciona un polipéptido que está unido a una proteína de cubierta vírica distinta de FMDV para cambiar el tropismo del virus para suministro de ADN que codifica genes terapéuticos.

Como alternativa, cualquiera de estos sistemas puede incorporarse en un sistema de profármaco. Dichos sistemas de profármaco se conocen bien en la técnica.

En otros aspectos, la presente invención usa ácido nucleico que codifica un péptido como se define en el presente documento.

La expresión "ácido nucleico que codifica" (un péptido) se refiere a una secuencia de ARN o ADN que codifica un péptido que comprende el motivo de secuencia RGD $\text{LX}^5\text{X}^6\text{L}$  o RGD $\text{LX}^5\text{X}^6\text{I}$ , en el que  $\text{LX}^5\text{X}^6\text{L}$  o  $\text{LX}^5\text{X}^6\text{I}$  está contenido dentro de una estructura alfa helicoidal que puede usarse de acuerdo con la divulgación o una variante funcional de la misma o un estadio precursor de la misma, por ejemplo un propéptido o un prepropéptido. El péptido puede codificarse por una secuencia de longitud completa o cualquier parte de la secuencia codificante siempre que el péptido sea una variante funcional. El término "variantes" indica todas las secuencias de ADN que son complementarias de una secuencia de ADN (secuencia de referencia), que codifica péptidos usados de acuerdo con la divulgación, especialmente péptidos como se han definido anteriormente o sus variantes funcionales y que muestran al menos aprox. 70 %, en particular al menos aprox. 80 %, especialmente al menos aprox. 90 % de identidad de secuencia con la secuencia de referencia. El término "variantes" indica además todas las secuencias de ADN que son complementarias de la secuencia de referencia y que hibridan con la secuencia de referencia en condiciones rigurosas y codifican un péptido que muestra esencialmente la misma actividad que el péptido codificado por la secuencia de referencia, y también sus formas degradadas. Se sabe que pueden estar presentes cambios pequeños en la secuencia de los ácidos nucleicos que pueden usarse de acuerdo con la divulgación; por ejemplo, sin que se pierda la propiedad de una variante funcional, estos cambios pueden conseguirse por la degradación del código genético y por secuencias no traducidas que están adjuntas al extremo 5' y/o el extremo 3' del ácido nucleico. Esta divulgación también abarca por lo tanto las denominadas "variantes" de los ácidos nucleicos previamente descritos. Debe entenderse, en particular, que la expresión "condiciones de hibridación rigurosas" significa las condiciones en las que tiene lugar una hibridación, por ejemplo, a 60 °C en tampón de SSC 2,5x, seguido de varias etapas de lavado a 37 °C en una concentración de tampón menor, y permanece estable.

Se entiende en general que los péptidos y ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser de origen natural,



recombinante o sintético. Se conocen bien en la técnica métodos para preparar, sintetizar o modificar péptidos. Los métodos adecuados incluyen síntesis química, amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), clonación o escisión directa a partir de un polinucleótido mayor. Los polinucleótidos de la invención tienen utilidad en la producción de los péptidos de la invención, que pueden tener lugar *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*. Los polinucleótidos pueden usarse como agentes terapéuticos o de inmunización por propio derecho o pueden estar implicados en síntesis de péptidos recombinantes.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico como se define en el presente documento.

El vector de la presente invención es preferentemente un vector de expresión, preferentemente un vector de expresión eucariota que puede adaptarse para aplicaciones farmacéuticas.

Un "vector" se refiere a una estructura que consiste en o que incluye una molécula de ácido nucleico que es adecuada para transferir material genético a una célula. Normalmente se inserta una secuencia de ácido nucleico seleccionada en la molécula de ácido nucleico del vector. Los ejemplos incluyen vectores plasmídicos y víricos. Un "vector de expresión" es un vector construido y adaptado para permitir la expresión de una secuencia codificante de ácido nucleico insertada en una célula. Por lo tanto, el vector incluye secuencias de ácido nucleico, que permiten el inicio de la transcripción en una localización apropiada con respecto a la secuencia codificante. Los vectores de expresión pueden adaptarse para expresión en células procariotas o eucariotas, por lo tanto, se construye un "vector de expresión eucariota" para permitir la expresión de una secuencia codificante en una célula eucariota. Los ejemplos preferidos de vectores de expresión de la presente invención incluyen adenovirus, AAV y lentivirus.

En un aspecto adicional, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende péptido y/o ácido nucleico y/o vector de expresión como se ha definido anteriormente y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye en general componentes que son compatibles con el péptido, ácido nucleico o vector y no son deletéreos para los receptores de los mismos. Normalmente, los vehículos serán agua o solución salina que será estéril y sin pirógenos; sin embargo, pueden usarse otros vehículos aceptables. Normalmente las composiciones o formulaciones farmacéuticas de la invención son para administración parenteral, más particularmente para administración intravenosa.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona el uso de un péptido y/o ácido nucleico y/o vector de expresión de acuerdo con la presente invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad mediada por  $\alpha\beta6$  o una enfermedad en la que  $\alpha\beta6$  está sobreexpresada.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad mediada por  $\alpha\beta6$  que comprende administrar un péptido y/o ácido nucleico y/o vector de expresión y/o composición farmacéutica como se ha definido anteriormente a un paciente. Como se ha mencionado en el presente documento, estas condiciones pueden estar en el área general de curación de heridas e inflamación.

Preferentemente, la enfermedad se selecciona de fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema de pulmón, enfermedad de la piel de herida crónica (por ejemplo, epidermolísis ampollosa) o cáncer.

El medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención como se ha definido anteriormente pueden administrarse de forma útil a un paciente al que también se administran otros medicamentos, como conocerán los expertos en la técnica. Por ejemplo, en el caso de cáncer, el medicamento o la composición farmacéutica de la presente invención pueden administrarse a un paciente antes, después o durante la administración del otro o los otros agentes antitumorales, por ejemplo antes, después o durante la quimioterapia. El tratamiento con el péptido después de quimioterapia puede ser particularmente útil en la reducción o prevención de la reaparición del tumor o metástasis. Por ejemplo, el agente antitumoral puede estar unido covalentemente directa o indirectamente (mediante liposomas/nanopartículas) a un péptido de la invención.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para capturar imágenes de células epiteliales que sobreexpresan  $\alpha\beta6$  en el cuerpo de un individuo, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un péptido como se ha definido anteriormente. El método es particularmente útil para la captura de imágenes de fibrosis crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfisema pulmonar, enfermedad de piel herida crónica (por ejemplo epidermolísis ampollosa) o células tumorales epiteliales. Por ejemplo, el método de captura de imágenes puede incluir unir el péptido diana a una sonda fluorescente e incorporar en un colutorio, una goma de mascar, una pulverización u otro emolumento de modo que el conjugado de sonda-péptido unido a  $\alpha\beta6$  pueda visualizarse por su marcador fluorescente.

En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para el diagnóstico o pronóstico en un

individuo de una enfermedad mediada por  $\alpha\beta6$  o una enfermedad en la que  $\alpha\beta6$  está sobreexpresada, comprendiendo el método administrar al individuo una cantidad eficaz de un péptido como se ha definido anteriormente y detectar la unión del péptido con  $\alpha\beta6$ .

- 5 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para suministrar un resto terapéutico activo a una célula que expresa  $\alpha\beta6$  o un tejido que contiene células que expresan  $\alpha\beta6$  en un paciente, comprendiendo el método administrar un péptido unido a un resto terapéutico activo como se ha definido anteriormente al paciente.

- 10 En un aspecto adicional, la presente divulgación proporciona un método para mejorar la especificidad de unión de un péptido de unión a  $\alpha\beta6$  aumentando o modificando el contenido alfa helicoidal del péptido. Por ejemplo, el contenido alfa helicoidal del péptido puede aumentarse cambiando los restos dentro de la secuencia  $B_n$  RGD LXXLXXX  $Z_m$  en cualquier otro aminoácido natural o sintético y medir el contenido alfa helicoidal de los péptidos resultantes. Como alternativa, el péptido puede mejorarse usando la RMN de diferencia de transferencia de saturación para determinar qué restos en un péptido más probablemente interaccionen directamente con integrinas purificadas (que pueden incluir  $\alpha5\beta1, \alpha8\beta1, \alpha11\beta3, \alpha\beta1, \alpha\beta3, \alpha\beta5, \alpha\beta6, \alpha\beta8$ ) y con restos posteriormente inertes según sea apropiado que posean cadenas laterales particulares, distribución de carga específica u otras modificaciones que reduzcan la unión con integrinas distintas de  $\alpha\beta6$  o aumenten la unión con integrinas  $\alpha\beta6$ .

- 20 La expresión "mejorar la especificidad de unión" incluye un aumento de la afinidad de un péptido por  $\alpha\beta6$  en comparación con su afinidad por otra integrina, por ejemplo,  $\alpha\beta3$ .

## Ejemplos

### *Líneas celulares y anticuerpos*

- 25 Se utilizó infección retroviral para generar líneas celulares  $\alpha\beta6$  positivas y negativas para este estudio. Se infectaron fibroblastos 3T3 de ratón y las líneas celulares de melanoma humano A375P y DX3 con retrovirus (Thomas *et al.*, Invest Dermatol.116(6): 898-904, 2001) que codificaban b6 humano y gen resistente a puomicina para generar 3T3 $\beta6$ puro, A375P $\beta6$ puro y DX3 $\beta6$ puro. Las células de control expresaban solamente puomicina (células 3T3 parentales A375Ppuro y DX3puro sirvieron como controles para 3T3 $\beta6$ puro, en ocasiones denominada 3T3 $\beta6$ .19 o NIH3T3 $\beta6$ .19).

- 35 Células CHO $\beta6$ , que secretaban  $\alpha\beta6$  soluble recombinante que carecía de los dominios citoplasmático y transmembrana de las subunidades de integrina. VB6 es un carcinoma escamoso oral que expresa  $\alpha\beta6$  en alta cantidad (Thomas *et al.*, 2001) y V(+)-B2 es un melanoma humano que expresa  $\alpha\beta1$  en alta cantidad (Marshall *et al.* 1995). Se usó diversos anticuerpos monoclonales de ratón. Se obtuvieron anticuerpos para  $\alpha\beta3$  (LM609),  $\alpha\beta6$  (10D5) y  $\alpha5$  (P1D6) de Chemicon International, (emecula CA., Estados Unidos). Se produjeron 63G9 (anti  $\alpha\beta6$ ) y 37E1 (anti- $\alpha\beta8$ ), P2W7 (anti- $\alpha\beta$ ; producido de forma interna), L230 (anti- $\alpha\beta$ ; de ATCC), P1F6 (anti- $\alpha\beta5$ ; un regalo del Dr Dean Sheppard) y A1B2 (anti- $\beta1$ ; obtenido de hibridoma de desarrollo), de forma interna a partir de sus hibridomas respectivos. Se biotiniló fibronectina (F2006; Sigma Aldrich) usando un kit (Amersham International, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Todos los otros reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich a no ser que se indique de otro modo.

### *Producción de $\alpha\beta6$ soluble recombinante*

- 45 Se cultivaron células CHO $\beta6$  hasta 80-90 % de confluencia en RPMI complementado con suero de ternero fetal 10 % (FCS), se lavaron una vez con un medio de suero bajo (MSBajo; RPMI 0,5 % v/v FCS) y se incubaron durante 48 horas en MSBajo. Se retiró el residuo celular de medio acondicionado por centrifugación a 982 g y se añadió azida sódica 0,1 % (p/v) como conservante. El medio acondicionado se concentró (hasta 300 veces) y se diafiltró simultáneamente frente a PBS usando dispositivos de filtro de centrifuga Centricon Plus-80 con un punto de corte de 100 kDa (Millipore). El concentrado se añadió a una columna de inmunoafinidad que se generó conjugando el anticuerpo monoclonal de ratón anti- $\alpha\beta$  L230 (en Tampón de Acoplamiento tampón de Fosfato Sódico 0,1 M, pH 7,0) con una columna de perlas de agarosa de flujo por gravedad de 7 ml usando el kit Carbolink (Perbio Science UK Ltd) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La  $\alpha\beta6$  soluble recombinante ( $rs\alpha\beta6$ ) se eluyó con glicina 100 mM pH 2,5-3,0 y se neutralizó inmediatamente mediante la adición de 300  $\mu$ l de Tris 1 M pH 7,5 a cada fracción de 2 ml. Se seleccionaron las fracciones pico de acuerdo con su absorbancia a 280 nm y se dializaron frente a PBS usando dispositivos de filtro de centrifuga Amicon Ultra-15 con un punto de corte de peso molecular nominal (PCPMN) de 50 kDa (Millipore). La pureza de la proteína eluida se determinó mediante SDS-PAGE y la concentración se determinó mediante Ensayo de Concentración de Proteínas BioRad DC, usando patrones de BSA. Se confirmó la integridad funcional de la  $rs\alpha\beta6$  mostrando la integrina unida a fibronectina y péptido asociado a latencia (LAP) (ligandos de  $\alpha\beta6$ ) inmovilizados en placas de 96 pocillos.

*Ensayos de adhesión celular*

Se ha descrito previamente adhesión de células marcadas con [<sup>51</sup>Cr] a placas flexibles de 96 pocillos recubiertas con ligandos de ECM (Thomas *et al*, 2001). Brevemente, las placas se recubrieron con LAP (0,25 µg/ml para NIH 3T3B6.19, 0,5 µg/ml para VB6) o vitronectina (10 µg/ml; BD Biosciences, Oxford, Reino Unido). Se permitió que las células se adhirieran durante 40 minutos (VB6, NIH 3T3 β6.19) o 60 minutos (V+B2) antes de lavarse la placa dos veces con PBS complementado con cationes (Mg<sup>2+</sup> 0,5 mM, Ca<sup>2+</sup> 1 mM). Las placas se cortaron con tijeras y la radiactividad de cada pocillo se cuantificó en Contador Gamma Automático Wizard 1470 (Perkin-Elmer, Boston, MA, Estados Unidos). Se calculó el porcentaje de adhesión comparando la radiactividad residual asociada con cada pocillo con la radiactividad del aporte inicial de la siguiente manera:

$$\text{Adhesión (\%)} = \frac{\text{Radiactividad residual (cpm) de pocillo}}{\text{Radiactividad (cpm) de aporte}} \times 100$$

Todas las muestras se ensayaron en pocillos por cuadruplicado en al menos tres ensayos separados.

*ELISA de tipo sándwich competitivo*

Se recubrieron placas de 96 pocillos (Immulon IB, Thermo LifeSciences) con P2W7 10 µg/ml en PBS a 4 °C durante una noche, después se bloqueó por incubación con caseína 2 % (p/v) en PBS antes de lavar con PBS. Todos los lavados posteriores usaron Tampón de Lavado (Tris 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM), y todas las incubaciones posteriores tuvieron lugar en Tampón Conjugado (Caseína 1 %, Tris 20 mM, NaCl 150 mM, MnCl<sub>2</sub> 1 mM). Los pocillos se incubaron con rsαvβ6 durante una hora, se lavaron y se expusieron a una solución premezclada de péptido y fibronectina biotinilada 2 µg/ml. La fibronectina biotinilada unida se detectó con ExtrAvidina HRP (SIGMA) a una dilución de 1:1000, y se desarrolló usando el sistema TMB+ (DAKO). Los ensayos se cuantificaron por lectura de la absorbancia a A450 nm en un lector de placas Tecan GENios. Todos los datos se obtuvieron en el intervalo lineal, confirmado por una curva patrón de fibronectina biotinilada en cada placa.

*Citometría de flujo*

Se evaluó la expresión de integrinas por líneas celulares por citometría de flujo como se ha descrito previamente (Marshall *et al*, 1995). Brevemente, se incubaron suspensiones celulares con anticuerpos anti-integrina a 10 µg/ml o péptidos biotinilados a diversas concentraciones. Después de 45 min a 4 °C, las células se lavaron y se detectó el péptido/anticuerpo unido por incubación de 30 min a anti-biotina de ratón (1:100, Stratech, Reino Unido) seguido de una incubación adicional durante 30 minutos con Alexafluor 488 conjugado con anti-IgG de ratón (dilución final 1:500; Molecular Probes) o estreptavidina-FITC (concentración final de 1:200) respectivamente. Las células se analizaron en un FACScan (Becton-Dickinson) equipado con software CellQuest que capturaba 10.000 acontecimientos por muestra.

*Síntesis peptídica*

Los péptidos fueron sintetizados usando síntesis peptídica en fase sólida convencional por el laboratorio de Síntesis de Péptidos del Reino Unido de Investigación de Cáncer. Brevemente, se obtuvieron aminoácidos protegidos y resinas Wang precargadas de Calbiochem-Novabiochem (Nottingham, Reino Unido). Se obtuvieron disolventes y HBTU [2-hexafluorofosfato de (1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio] de Applied Biosystems (Warrington, Reino Unido). Los péptidos se sintetizaron en un Modelo 431A actualizado y Sintetizador de Fase Sólida de Applied Biosystems 433A en resina Wang precargada usando ciclos de supervisión de retroalimentación básicos y HBTU como un reactivo de acoplamiento. Se usó 9-fluorenilmetiloxycarbonilo para protección de grupos α-amino temporales y se retiró usando piperidina. Fueron grupos protectores de cadena lateral *terc*-butiloxycarbonilo para Lys; tritilo para His, Asn y Gln; 2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonilo para Arg; *terc*-butiléster para Glu y Asp y *terc*-butiléster para Thr, Ser y Tyr.

Se consiguió escisión de la resina y desprotección de los péptidos mediante el tratamiento de la resina de peptidilo con 10 ml de una mezcla que contenía 9,25 ml de ácido trifluoroacético, 0,25 ml de etanoditiol, 0,25 ml de trisopropilsilano y 0,25 ml de agua a 20 °C (temperatura ambiente) durante 4 horas. El péptido se precipitó usando dietiléter helado y el después se filtró en un embudo de filtro de vidrio sinterizado fino con vacío ligero. El precipitado de péptido se disolvió en solución de agua/ácido acético 10 % y se liofilizó.

Los péptidos en bruto se purificaron por HPLC de fase inversa en una columna Aquapore ODS de 20 micrómetros de 250 x 10 mm y se confirmó después la autenticidad del péptido purificado por espectroscopia de masas MALDI-TOF (ionización y desorción por láser asistida por matriz tiempo de vuelo) en un espectrómetro de masas de trampa iónica MAT LCQ Finningan. Algunos péptidos se biotinilaron *in situ* en soporte de resina usando procedimientos convencionales.

*Preparación de muestras de RMN*

Se prepararon todas las muestras de RMN hasta un volumen final de 300  $\mu$ l para su uso en un tubo de RMN BMS005V Shigemi disolviendo péptido liofilizado, purificado, en solución salina tamponada con fosfato (PBS) 2 mM a pH 6,4 con una concentración de fosfato de 25 mM y concentración salina de 100 mM. Para estudios estructurales, se añadió trifluoroetanol-d3 (TFE) como un estabilizador de hélice para proporcionar una concentración final del 30 % (v/v). Se prepararon muestras de RMN de Diferencia de Saturación (RMNDTS) de forma similar con componentes adicionales: integrina  $\alpha$ v $\beta$ 6 28  $\mu$ M, Mg<sup>2+</sup> 0,5 mM (añadido como MgCl<sub>2</sub>) y Ca<sup>2+</sup> 1,0 mM (añadido como CaCl<sub>2</sub>). Las muestras de RMNDTS no contenían TFE.

*Espectroscopia de RMN*

Todos los experimentos se registraron en un espectrómetro de RMN a 600 MHz INOVA Varian Unity con una sonda de resonancia triple de gradiente con protección z usando procedimientos convencionales. Los experimentos estructurales, procesados a 10 °C para cada muestra peptídica incluyeron experimentos de espectroscopia de efecto Overhauser nuclear bidimensional (2D) (NOESY), espectroscopia de correlación total (TOCSY) y espectroscopia de efecto Overhauser de marco rotatorio (ROESY) que se registraron con tiempos de mezcla de 250, 70,0 y 100 ms respectivamente. Estos experimentos se recogieron con 512 y 1024 puntos complejos con tiempos de adquisición de 64 y 128 ms en las dimensiones de 1H adquiridas indirecta y directamente, respectivamente. Además, se recogió un experimento de espectroscopia correlacionada con doble filtración cuántica bidimensional (DQFCOSY) para cada péptido a 10 °C, con 1024 y 2048 puntos complejos con tiempos de adquisición de 128 y 256 ms en las dimensiones de 1H adquiridas indirecta y directamente, respectivamente. Se detectaron protones de amida de intercambio lento de la región de identificación de un experimento NOESY de tiempo de mezclado de 50 ms que se recogió con 128 y 1024 puntos complejos con tiempos de adquisición de 16 y 128 ms en las dimensiones de 1H adquiridas indirecta y directamente, respectivamente. Se llevaron a cabo procesamiento y análisis de datos en estaciones de trabajo Sun Blade 100, Silicon Graphic Octane2 y Transtec X2100 Linux usando NMRPipe (Delaglio *et al.*, 1995) para procesar y NMRView (Johnson y Blevins, 1994) para ver estructuras calculadas. Se procesaron experimentos de RMN de Diferencia de Saturación (RMN DTS) usando experimento de transferencia de saturación convencional como se describe en Mayer y Meyer (1999, 2001), pero incorporando un filtro de eco de Hahn como se describe en Yan *et al.*, 2003. Se obtuvieron datos de diferencias de DTS a 25 °C con una anchura espectral de 6000 Hz, usando una longitud de eco de Hahn de 30 ms y un número total de puntos de datos y transitorios de 8192 y 16384, respectivamente. La irradiación de resonancia de activación se ajustó a -2,5 ppm y la irradiación de resonancia de desactivación se ajustó a -70,0 ppm. La irradiación se aplicó usando un tren de pulsos gaussianos de 9,4 ms, cada uno con una anchura de banda de 100 Hz con cada pulso separado por un retardo de 1,7 ms. El tren de pulso total se aplicó durante 2,0 s. Para permitir la asignación de datos de transferencia de RMN DTS, se realizaron asignaciones de péptidos a partir de experimentos de espectroscopia de efecto Overhauser nuclear (2D) (NOESY), espectroscopia de correlación total (TOCSY) y espectroscopia de efecto Overhauser de marco rotatorio (ROESY) obtenidos a 25 °C. Se obtuvieron integrales de volumen de resonancia usando software VNMR que funciona en una estación de trabajo UNIX SUN y los datos se analizaron de acuerdo con los métodos perfilados por Mayer y Meyer (2001) para obtener el factor de amplificación de DTS usando un exceso de ligando de 71,4. Se obtuvo un factor de amplificación individual para cada resto de aminoácido a partir de una suma de factores de amplificación de cada resonancia de 1H para cada resto. El factor de amplificación de resto se convirtió a factores de amplificación de DTS de porcentaje residual para permitir una comparación con el factor de resto mayor (que se proporcionó como 100 %).

*Dicroísmo circular*

Se registraron espectros de DC en un espectropolarímetro J-600 Jasco a temperatura ambiente usando concentraciones de 0,4 mM de péptido en tampones idénticos a los usados en las investigaciones de RMN y que contenían TFE entre 0-50 % (v/v). Cada solución se cargó en cubetas de cuarzo de longitud de camino de 5 mm y cada espectro se obtuvo de un promedio de 4 exploraciones a un intervalo de entre 190 y 260 nm, registrado a la velocidad de 20 nm/min, con una anchura de 1 nm, una respuesta de 2 s y una resolución de 0,2 nm. Los espectros se muestran sin corrección de línea basal. Los valores de DO obtenidos por el espectropolarímetro se convirtieron a elipticidad y se ajustaron a las concentraciones de péptidos relativas por el software de análisis convencional de Windows J-700 (v.1.50.01). Los valores de elipticidad a 3 longitudes de onda: 222, 208 y 192 nm se convirtieron después a la elipticidad media ( $q_{media}$ ) obtenida para cada péptido a concentraciones de TFE entre 0-50 % (v/v) usando el enfoque descrito en Forod *et al.* 1993.

*Cálculos estructurales y análisis*

Todos los cálculos estructurales se obtuvieron usando el Sistema de Cristalografía y RMN (CNS) versión 1.1 ejecutado en estaciones de trabajo Silicon Graphics Octane2 y Transtec X2100 Linux (Brunger *et al.*, 1998). Todos los contactos de NOE y ROE se clasificaron en una amplia clasificación entre 2,5-5,0 Å con estructuras finales calculadas a partir de coordenadas extendidas usando el protocolo de hibridación de RMN de CNS convencional con un promedio de sumas para hibridación dinámica con restricciones de precursores tanto extendidos como plegados. Se produjo un grupo estructural final de 40 estructuras para cada péptido con todas las estructuras usadas para

producir energía estadística e información estructural de desviación de la media cuadrática (m.c.). Se obtuvieron valores de desviación de m.c. de cadena principal y átomos pesados usando MOLMOL versión 2k.2 (Koradi *et al.*, 1996) en un PC con Microsoft Windows 2000. La integridad estructural de cada conjunto se evaluó usando PROCHECK-NMR (Laskowski *et al.*, 1996) ejecutado en una estación de trabajo Linux Transtec X2100. Se realizaron comparaciones de energía entre conjuntos estructurales creados en CNS usando el conjunto de parámetros de GROMOS96 43B1 (van Gunsteren, 1994) dentro de DEEVIEW versión 3.7 (Guey y Peitsch, 1997).

## Resultados

10 *Los péptidos derivados de ligandos de  $\alpha\beta 6$  confirman el requisito de DLXXL*

La integrina  $\alpha\beta 6$  se une con sus ligandos, en parte, mediante reconocimiento del motivo peptídico RGD (Arg-Gly-Asp). Los ligandos de la integrina  $\alpha\beta 6$  incluyen el péptido asociado a latencia (LAP) TGF $\beta$ , que se ha descubierto que es un ligando adhesivo de  $\alpha\beta 6$  altamente específico, fibronectina y ciertos virus incluyendo el virus de la glosopeda (FMDV). Se ha elegido por lo tanto examinar péptidos lineales de 7-12 unidades solapantes de ligandos  $\alpha\beta 6$  conocidos, que incluían el motivo de RGD necesario, de LAP y dos serotipos de FMDV (DD1-DD19). En estudios iniciales, se ensayaron los péptidos a una concentración de 500  $\mu\text{M}$  con respecto a su capacidad para inhibir la adhesión dependiente de  $\alpha\beta 6$  con LAP de las células tumorales 3T3 $\beta 6.19$  y VB6. Se ha mostrado que los péptidos más potentes tuvieron la secuencia DLXXL (o la similar DLXXI), una secuencia cuya importancia se había descubierto previamente (Kraft *et al.*, J Biol Chem. 22 ene; 274(4): 1979-85 1999).

*Péptidos dirigidos a  $\alpha\beta 6$  de segunda generación: péptidos RGDLLXXL/I de 20 unidades, basados en ligando*

También hubo una sugerencia de que péptidos largos o al menos los que tenían más restos C terminales del motivo RGD, eran inhibidores más potentes de la adhesión dependiente de  $\alpha\beta 6$ , en comparación con péptidos con secuencia N terminal adicional. Para examinar esta posibilidad, se generaron péptidos de 20 unidades con regiones C terminales extendidas derivadas de LAP  $\beta 1$ (A20LAP) y los serotipos de virus de glosopeda C-S8c1 (A20 FMDV1 - Mateu *et al.*, 1996) y O1BFS (A20 FMDV2 - Logan *et al.*, 1993) y se repitieron los experimentos.

A20	LAP	GFTTGRRGDLATIHGMNRPF
A20	FMDV-1	YTASARGDLAHLTTTHARHL
A20	FMDV-2	NAVPNLRGDLQVLAQKVART

30 La Figura 2 confirma que A20 LAP, A20 FMDV y A20 FMDV2 eran muchos más potentes en la inhibición de la unión dependiente de  $\alpha\beta 6$  de 3T3 $\beta 6.19$  (Figura 2A) y VB6 (Figura 2B) con LAP. Por lo tanto, mientras que la CI50 de la inhibición de DD1 de 3T3 $\beta 6.19$ , el mejor péptido de LAP corto, es de 216  $\mu\text{M}$  (datos no mostrados), la CI50 para A20 LAP es de 13,8  $\mu\text{M}$ . De forma similar, la CI50 para DD19, el péptido de FMDV2 corto, es de 190  $\mu\text{M}$  en comparación con 1,2  $\mu\text{M}$  para A20FMDV2.

*Los péptidos RGDLLXXL/I de 20 unidades son inhibidores más potentes de la adhesión celular dependiente de  $\alpha\beta 6$  que los péptidos RGDLLXXL/I más cortos*

40 Para ensayar la hipótesis de que una secuencia C terminal extendida aumenta la eficacia de péptidos anti- $\alpha\beta 6$ , la actividad específica de  $\alpha\beta 6$  de A20LAP se comparó con versiones más cortas del mismo péptido, DD1, 2 y 3. A20LAP fue significativamente mejor en la inhibición de la adhesión celular dependiente de  $\alpha\beta 6$  de 3T3 $\beta 6.19$  con placas recubiertas con LAP. Por lo tanto, el número de aminoácidos C terminales de RGD para A20LAP, DD1 y DD3 es de 11, 5 y 4, respectivamente. Esto replica el orden de potencia de los péptidos; por lo tanto en presencia de A20-LAP, DD1 y DD3 20  $\mu\text{M}$ , la adhesión de 3T3 $\beta 6.19$  con LAP fue de solamente  $32 \pm 7\%$ ,  $57 \pm 4\%$  y  $79 \pm 22\%$  de la adhesión celular de control respectivamente. Además, los experimentos se repitieron usando otra línea celular, VB6. VB6 es un carcinoma de células escamosas oral humano que expresa altos niveles de  $\alpha\beta 6$  (Thomas *et al.* 2001b). Es por lo tanto un modelo más apropiado ya que se expresa  $\alpha\beta 6$  completamente humana en su ambiente natural, epitelial. De forma similar a 3T3 $\beta 6.19$ , la adhesión de VB6 con LAP se anula por el anticuerpo de bloqueo de  $\alpha\beta 6$  63G9 y, por lo tanto, se considera completamente dependiente de  $\alpha\beta 6$ . Aunque es difícil de cuantificar debido a la variación intra-ensayo, el mismo patrón que se vio con 3T3 $\beta 6.19$  es ampliamente observable en ensayos que usan VB6. Por lo tanto a 100  $\mu\text{M}$  de DD1, DD2 y DD3 tienen poco efecto en la adhesión de VB6 con LAP, mientras que el péptido más largo A20LAP bloquea completamente la adhesión celular a esta concentración.

55 De forma similar, A20FMDV2 es un inhibidor notablemente mejor de la adhesión de VB6 con LAP que DD19, un péptido más corto basado en la misma secuencia de aminoácidos. El efecto es aquí más drástico: la adhesión celular en presencia de DD19 20  $\mu\text{M}$  es la misma que la adhesión en ausencia de péptido, sin embargo la adhesión se reduce a niveles de fondo en presencia de A20FMDV2 20  $\mu\text{M}$ .

60

*ELISA de tipo sándwich competitivo*

Para ver si este patrón era repetible en un ensayo de proteínas aislado, se realizaron ELISA de tipo sándwich competitivos. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con el anticuerpo anti- $\alpha v \beta 6$  incubando durante una noche a 4 °C. Los sitios de unión no específica restantes se bloquearon con incubación con una solución de caseína 2 % (v/v) en PBS. Los pocillos se incubaron después con  $rs\alpha v \beta 6$  antes de lavado y exposición a una solución premezclada de fibronectina y péptido biotinilados. La fibronectina biotinilada unida se detectó con ExtrAvidina conjugada con peroxidasa. Se generaron curvas de respuesta a dosis de nueve puntos usando siete concentraciones de péptido y controles positivo y negativo, y se determinó una concentración CI50 usando un modelo de ajuste de curvas sigmoideo con software GraphPad Prism.

Resulta interesante que el patrón visto en ELISA de tipo sándwich competitivo es ligeramente diferente al visto en los ensayos de adhesión celular. Aunque los péptidos basados en LAP cortos DD2 y DD3 tienen una CI50 significativamente menor que el péptido más largo A20LAP, el péptido corto DD1 tiene una CI50 muy similar a A20LAP.

Tabla 5

Péptido	Secuencia	CI50 media (nM)	Desviación típica (nM)
DD1	RRGDLATIH	9,2	0,7
DD2	FTTGRRGDLATI	30,9	3,3
DD3	TGRRGDLATI	22,6	4,0
A20LAP	GFTTGRRGDLATIHGMNRPF	6,7	0,9
DD19	VPNLRGDLQVLA	85,0	31,1
A20FMDV2	NAVPNLRGDLQVLAQKVART	15,6	5,3

## Análisis de péptidos RGDXXL/I de 20 unidades por ensayo de adhesión celular

Se evaluaron los tres péptidos de 20 unidades A20LAP, A20FMDV1 y A20FMDV2 con respecto a inhibición de adhesión celular dependiente de  $\alpha v \beta 6$ . Se usaron múltiples concentraciones de péptido para generar curvas de inhibición, a partir de las que se calcularon los valores CI50 usando Software Prism como se muestra en la tabla posterior. En los ensayos tanto de 3T3 $\beta 6$ .19 como de VB6, A20FMDV2 fue el inhibidor más potente de la adhesión celular dependiente de  $\alpha v \beta 6$ , seguido de A20LAP. A20FMDV1 fue el inhibidor menos potente en ambos ensayos. Por lo tanto, la helicidad predicha se correlaciona con potencia del péptido en ensayos de inhibición de la adhesión celular dependiente de  $\alpha v \beta 6$ . Resulta interesante que las CI50 para todos los péptidos era aproximadamente 1000 veces mayor en ensayos de adhesión celular que en ELISA competitivos; este efecto se ha indicado previamente para péptidos anti- $\alpha v \beta 3$  (Goodman *et al.* 2002).

Tabla 6

Péptido	Secuencia	3T3 $\beta 6$ .19	VB6
A20FMDV1	YASARGDLAHLTTTHARHL	86,5 $\pm$ 49,9 $\mu$ M	38,2 $\pm$ 31,1 $\mu$ M
A20LAP	GFTTGRRGDLATIHGMNRPF	13,8 $\pm$ 3,3 $\mu$ M	28,7 $\pm$ 11 $\mu$ M
A20FMDV2	NAVPNLRGDLQVLAQKVART	1,2 $\pm$ 0,2 $\mu$ M	1,54 $\pm$ 0,4 $\mu$ M

*Jerarquía de unión de antagonistas peptídicos de 20 unidades*

Para comparar las capacidades de unión de cada péptido para  $\alpha v \beta 6$ , se inmovilizó  $rs\alpha v \beta 6$  en placas de 96 pocillos. Se añadieron diversas concentraciones de A20 FMDV1, A20 LAP o A20 FMDV2 biotinilados a las placas durante 45 min en presencia de iones  $Ca^{2+}$  1 mM y  $Mg^{2+}$  0,5 mM. Se detectó péptido unido a estreptavidina-HRP. Además, también se ensayaron versiones mezcladas, biotiniladas, de cada péptido. La Figura 3 muestra que la capacidad para unirse a  $\alpha v \beta 6$  siguió el orden A20 FMDV2, A20 LAP y A20 FMDV1. Por lo tanto, a todas las concentraciones A20 FMDV2 se unió más fuertemente con el  $rs\alpha v \beta 6$  inmovilizado. A concentraciones 10 nM cada péptido aún mostraba unión casi máxima a diferencia de controles mezclados que no mostraban ninguna unión. Incluso a 1 nM A20 FMDV1 mostró 50 % de unión máxima. Resulta interesante que A20 LAP mezclado sí mostró unión a 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M a diferencia de péptidos de FMDV mezclados que mostraron poca unión a cualquier concentración ensayada.

AGADIR predice la propensión helicoidal de antagonistas de  $\alpha v \beta 6$  de 20 unidades

Para péptidos basados tanto en LAP como en FMDV, péptidos más largos inhibieron  $\alpha v \beta 6$  con un mayor grado de potencia que péptidos más cortos, incluso cuando todos los péptidos implicados contenían el motivo RGDXXL/I crucial. Sin embargo, aparte de este motivo, no hubo ninguna similitud evidente entre las secuencias de A20LAP y A20FMDV2; por lo tanto, se consideró improbable que el motivo se había simplemente extendido en los péptidos más largos. Otra posible explicación fue que la longitud aumentada provoca un cambio en la afinidad del péptido por  $\alpha v \beta 6$  cambiando la presentación del motivo RGDXXL/I. Se consideró por lo tanto la presencia de la estructura secundaria, que podría estabilizar potencialmente conformaciones activas de RGDXXL/I.

De forma intuitiva, es más probable que los péptidos lineales largos puedan adoptar muchas más formas en espacio tridimensional (3D) que péptidos más cortos y es probable que pocas de estas formas largas sean ligandos óptimos para un receptor. Por lo tanto en los experimentos de los inventores los péptidos más largos fueron inhibidores más potentes de  $\alpha\beta 6$  que los péptidos más cortos, lo que sugirió que puede haber una estructura secundaria que minimiza el número de posibles conformaciones tridimensionales. En solución, la proteína de cubierta VP1 está desestructurada (Logan *et al* 1993). Sin embargo, Logan y colaboradores caracterizaron la estructura cristalina del bucle de G-H inmunogénico del dominio VP1 de FMDV. Informaron de que el bucle parecía tener una estructura helicoidal en el cristal. Por lo tanto se consideró que estos péptidos de 20 unidades también pueden tener estructuras helicoidales que estabilizarían termodinámicamente la estructura. Se insertaron las secuencias de aminoácidos en software AGADIR (Munoz y Serrano, 1994, 1995) que predice la propensión helicoidal dentro de péptidos. El software asigna valores de probabilidad de que restos individuales en una secuencia peptídica sean parte de una estructura helicoidal. Este software está ampliamente reconocido como un método razonablemente preciso de predicción de helicidad. La Figura 4 muestra la predicción de que los tres péptidos de 20 unidades tienen una propensión helicoidal en la región DLXXL/I en el orden A20 FMDV2>A20 LAP>A20 FMDV1 pero que A20 FMDV2 tiene una propensión helicoidal predicha mucho mayor que A20 LAP o A20 FMDV1 y se extiende más allá de DLXXL/I. Por lo tanto, la propensión helicoidal predicha de los péptidos de 20 unidades se correlaciona con su potencia como antagonistas de  $\alpha\beta 6$ . Para ensayar esta hipótesis se estudiaron los tres péptidos de 20 unidades en más detalle, tanto bioquímica como estructuralmente.

#### 20 *Análisis de DC de UV lejano*

El dicroísmo circular es una técnica óptica basada en los cambios de polarización que se producen cuando pasa luz UV a través de un ambiente quirál. La absorción diferencial de luz polarizada a izquierda y derecha provoca que la luz polarizada circularmente se convierta en polarizada elípticamente. Los ambientes quirales diferentes de las diferentes formas de estructura secundaria (láminas beta, vueltas y hélices; además del estado "enrollado aleatorio" desestructurado) provocan que cada uno tenga sus propios espectros de DC de UV lejano característicos; por lo tanto puede usarse el DC para estudiar la cantidad de cada tipo de estructura secundaria en una proteína o un péptido particular.

30 Para confirmar si estos péptidos de 20 unidades formaban estructuras helicoidales se determinaron los espectros de dicroísmo circular de ultravioleta lejano (DC de UV lejano) para cada péptido en concentraciones crecientes del estabilizador helicoidal, TFE (Figura 5). Para permitir la comparación cruzada entre muestras, la elipticidad de restos media ( $\theta$ -[q]222) para cada péptido en proporciones de TFE entre 0-50 % (v/v) en PBS se muestran en la Figura 5. Las Figuras 4(a-c) ilustran cada una un punto isodicroico a 202 nm que indica que existe un equilibrio entre los dos estados entre el estado peptídico desplegado y el helicoidal para cada péptido (Khandelwal *et al*, 199). La elipticidad molecular media identifica que tanto A20FMDV2 como A20LAP experimentan transición a hélice entre 10-25 % de TFE mientras que A20FMDV experimenta transición sobre un intervalo de concentración mucho más amplio (10-40 % v/v en PBS) de TFE. Por lo tanto, los datos de DC muestran que si está presente una influencia estabilizadora los tres péptidos de 20 unidades forman hélices en su estructura pero hay una propensión aumentada a que A20 FMDV2 y A20 LAP formen hélices en comparación con A20 FMVD1. La propensión helicoidal determinada de forma empírica se correlaciona por lo tanto con potencia anti- $\alpha\beta 6$ .

#### *Análisis de RMN de antagonistas peptídicos de 20 unidades de $\alpha\beta 6$*

45 Se identificaron sistemas de espín por análisis de DQF-COSY bidimensional y espectros de RMN TOCSY junto con asignaciones de resonancia y todos los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  observados se enumeran en la Tabla 3. Las asignaciones para la mayoría de núcleos en todos los sistemas de espín de  $^1\text{H}$  fueron posibles para péptidos A20FMDV1, A20FMDV2 y A20LAP excepto para Thr2 de A20FMDV y Gly1 de A20LAP.

50 Se consiguieron asignaciones a través del espacio usando espectros de ROESY y NOESY bidimensionales de cada péptido en TFE 30 % (v/v). Se identificaron originalmente amidas en intercambio lento y consideradas capaces de ser donantes de enlaces de hidrógeno a partir de un experimento de NOESY obtenido después de re-suspensión en cada péptido en D2O y se confirmó por inspección visual de estructuras intermedias de cálculos de CNS. Se obtuvieron restricciones f adicionales a partir de la aplicación de la relación de Karplus a 3JHNHa que se obtuvieron de espectros de DQF-COSY de alta resolución. Se usaron valores de 3JHNHa menores de 5 Hz para restricción f para ese resto a  $-60^\circ \pm 30^\circ$ . Se usó un valor de punto de corte de 5 Hz para permitir el hecho de que los valores de 3JHNHa obtenidos por DQF-COSY sean siempre mayores que los obtenidos por métodos de RMN heteronuclear más precisos (Cavanagh *et al*. 1996).

60 Se descubrió que la distribución de contacto de NOE y ROE era mayor para restos en los extremos C terminales siguiendo a partir de RGD en cada uno de los péptidos estudiados. Se muestra un resumen de tipos de contacto y restricciones adicionales en la Tabla 4 con la distribución de restricciones a través de cada péptido mostrada en la Figura 6(a), (b) y (c). Los tipos de contacto observados en las Figuras 6(a) apoyan las conformaciones helicoidales convencionales directamente C terminales del motivo RGD con contactos observados entre Ha:i y HN:i+3 así como Ha:i y Hb:i+3. Adicionalmente, se observaron intercambio de HN lento y valores de 3JHNHa menores de 5 Hz en

algunos restos como se muestra en la Figura 6.

La Figura 7 destaca las regiones de contacto helicoidales principales de espectros de NOESY 2D para los tres péptidos y demuestra que el número de contactos y la dispersión de resonancia es mayor con A20FMDV2 y menor con A20FMDV1. Los contactos que apoyan el carácter helicoidal aparecen más esporádicamente en A20FMDV1 y están mejor definidos en A20FMDV2 quedando la distribución en contacto de A20LAP entre estos dos extremos.

#### *Cálculos estructurales y análisis*

Se usó RMN para determinar las estructuras en solución de los tres péptidos de 20 unidades, y por lo tanto confirmar los datos de DC y por ordenador (AGADIR). Los datos de RMN generan una serie de restricciones, por ejemplo en forma de Efectos de Overhauser Nucleares (NOE). Se observan NOE cuando dos átomos están suficientemente cerca en el espacio para que se produzca entre ellos relajación electroscópica de RMN. Si los dos átomos se identifican como no adyacentes en la secuencia primaria, cada NOE proporciona pruebas que apoyan la presencia de estructura secundaria que mantiene estas regiones en proximidad estrecha. Además, los NOE proporcionan restricciones de distancia que pueden tabularse y usarse en tándem para producir un modelo de la estructura. Restricciones como estas limitan el número de conformaciones peptídicas que son físicamente posibles; se usa después un algoritmo informático para generar varias conformaciones (conocidas como conjuntos) que se ajustan a las restricciones.

Todos los datos estructurales se determinaron usando CNS como se describe en los procedimientos experimentales. Ninguna estructura calculada proporcionó infracciones mayores de 0,2 Å o infracciones de ángulo de enlace mayores de 5° cuando las 40 estructuras se usaron para calcular el conjunto estructural promedio de grupo. Se muestran todas las estadísticas de energía estructural y desviaciones de m.c. de cadena principal para los tres péptidos en la Tabla 3 y se muestran todos los grupos y estructuras promedio de grupo en la Figura 5. Las desviaciones de m.c. de cadena principal se citan sobre los restos LXX[L/I]XX para cada péptido para permitir el análisis comparativo de cada péptido. El análisis de RMN-PROCHECK para cada uno de los 40 grupos de estructuras identificó que 94,3, 94,8 y 93,6 % de todos los restos quedaban en las regiones permitidas de la representación de Ramachandran para A20FMDV1, A20FMDV2 y A20LAP respectivamente. Los restos que quedaron fuera de las regiones permitidas eran de los primeros cuatro aminoácidos en cada grupo y sus desviaciones fueron coherentes con datos obtenidos de cálculos de estructuras para regiones donde se proporcionan pocos datos de restricción o donde no se proporciona ningún dato de restricción. Los límites de hélice mostrados en la Figura 3 y en la Figura 5 se identificaron a partir del ángulo dihédrico y la geometría de enlaces de hidrógeno se obtuvo de los grupos estructurales calculados y no de los datos originales. Este enfoque permitió que la combinación de toda la información estructural contribuyera a las características geométricas de cada péptido. Los restos asociados con hélice para cada péptido se identificaron como Ala10-Thr14 para A20FMDV1; Leu10-Val17 para A20FMDV2 y Leu10-Gly15 para A20LAP.

Se muestran en la Figura 5 40 grupos de estructuras para A20FMDV1, A20LAP y A20FMDV2. Los tres péptidos muestran una estructura similar, formando la secuencia de RGD la cabeza de un bucle que se sigue inmediatamente de una región helicoidal. Los restos de Arginina y Aspartato apuntan hacia fuera desde el bucle, formando un tipo de cabeza de martillo similar al observado en la estructura cristalina de  $\alpha\beta 3$  unida a un péptido RGD (Xiong *et al*, 2002). La longitud de la región helicoidal varía entre los tres péptidos. A20FMDV2 tiene el mayor grado de estructura ordenada (Figura 5E y F) y la hélice más larga, que contiene aproximadamente tres vueltas. A20LAP tiene una hélice ligeramente más corta y A20FMDV1 tiene una hélice muy corta, que consiste en solamente una vuelta. Por lo tanto la estructura helicoidal en la región LXXL/I se correlaciona con la actividad biológica anti- $\alpha\beta 6$ .

Por lo tanto, el análisis de RMN confirmó datos de DC de que los tres péptidos tenían hélices en su estructura y que la localización de este elemento  $\alpha$ -helicoidal extendido estaba directamente C terminal del motivo de RGD. Los contactos de restos i-j, como muestra para NH-NH en la Figura 3, identifican restricciones que hacen que los tres péptidos adopten una conformación de vuelta que permite que el motivo de RGD se presente en la vuelta de una estructura en horquilla. Se observaron contactos a larga distancia entre Ala3-Thr17 y Ser4-Thr15 para A20FMDV; Val3-Arg19, Val3-Thr20, Pro4-Val17, Leu6-Val12 y Gly8-Val12 para A20FMDV-2 y Pro2-Ala11, Pro2-Ile13, Pro2-His14, Thr4-Ala11 y Gly5-His14 para A20LAP.

#### *RMN de diferencia de transferencia de saturación*

Resulta evidente que la longitud de las  $\alpha$ -hélices en sentido C terminal del motivo de RGD en los tres péptidos de 20 unidades aumenta a medida que aumenta la eficacia de los péptidos (véase Figura 3). Estos datos sugieren que la longitud o la estabilidad de la hélice pueden contribuir a la potencia de los péptidos para actuar como antagonistas de  $\alpha\beta 6$ . Sin embargo, la identificación de RMN de una hélice  $\alpha$  en sentido C terminal de RGD en los péptidos se realizó en presencia de un disolvente estabilizador de hélices, TFE. Para determinar si los péptidos en forma de una hélice cuando se asocian con  $\alpha\beta 6$  en tampón fisiológico se utilizó RMN de diferencia de transferencia de saturación. Se muestran en la Figura 6 espectros de RMN DTS que identifican las interacciones del péptido antagonista de  $\alpha\beta 6$  más potente A20FMDV2, con la integrina  $\alpha\beta 6$  en la Figura 6. El análisis del espectro de



diferencia de DTS se hizo posible por la dispersión razonable de resonancias de RMN en este péptido en ausencia de TFE. Cuando los desplazamientos químicos degradados crearon solapamiento, cualquier valor de diferencia de DTS se atribuyó igualmente a ambos núcleos para eliminar cualquier sesgo potencial de los datos. Los espectros de RMNDTS de 1H de control de la Figura 6(a) y la Figura 6(c) destacan toda las resonancias de RMN de 1H del péptido y los espectros de diferencia de DTS mostrados en las Figuras 6(b) y 6(d) destacan las resonancias de 1H que han estado en proximidad a la integrina durante el acontecimiento de unión. Las Figuras 6(c) y 6(d) permiten la identificación de puntos de contacto clave incluyendo Hd y Hb de Leu13 y Leu10 así como Arg7 Hb/Hd, Thr20 Hg y Lys16 Hb/Hd. Las resonancias clave que ilustraban espectros de diferencia DTS reducidos o ausentes incluyeron Leu6 Hd y Hg de Gln11, Val12 y Gln15 y Val17. Se calcularon factores de amplificación de DTS para núcleos individuales a partir de estos datos para que fueran de 0,0 a 8,81 con factores de amplificación de suma de restos observados para todos los restos en A20FMDV2. Los factores de amplificación de DTS relativos por todos los restos de A20FMDV2 se muestran en la Figura 7 e identifican que el contacto está destacado por todo el péptido completo con interacciones importantes observadas para Arg7, Asp9, Leu10, Val12, Leu13, Lys16, Val17 y Thr20. Estos datos pueden sugerir que son importantes contactos más allá del motivo helicoidal DLXXL/I para mejor unión a  $\alpha\beta6$ .

*Presencia de estructura helicoidal en péptido unido a  $\alpha\beta6$*

La presencia de esta hélice provoca que los restos de leucina y leucina/soleucina no consecutivos del motivo DLXXL/I se pongan en yuxtaposición, formando de este modo un parche hidrófobo pequeño. Ya que las interacciones entre parches hidrófobos son uno de los mecanismos clásicos para unión proteína-proteína, es posible plantear la hipótesis de que el parche leucina-leucina o leucina-soleucina proporcionado por la hélice está implicado directamente en la unión de los péptidos con  $\alpha\beta6$ . Esto explicaría por qué la identidad de los restos "XX" es menos importante que los restos de leucina y leucina/soleucina en el motivo DLXXL/I (Kraft *et al*, 1999). Para ensayar esta hipótesis se empleó la RMN de Diferencia de Transferencia de Saturación (DTS), una técnica que mide la transferencia de energía de una proteína grande, en este caso  $r\alpha\beta6$ , a una molécula mucho menor, en este caso el péptido A20FMDV2. La técnica actúa de una manera específica de átomo y proporciona una medición de proximidad de restos individuales en un ligando pequeño (A20FMDV2) a una proteína receptora grande ( $r\alpha\beta6$ ). De esta manera es posible obtener una indicación de los restos precisos implicados en la unión del péptido con el receptor. Excluyendo Arg<sup>7</sup>, que como parte del motivo de RGD se espera que muestre fuertes contactos con  $\alpha\beta6$ , los restos con los mayores niveles de transferencia de energía son Leu<sup>10</sup>, Leu<sup>13</sup>, Lys<sup>16</sup> y Val<sup>17</sup>. Por lo tanto, los contactos importantes con  $\alpha\beta6$  tienen una periodicidad regular de aproximadamente tres restos. Esto es fuertemente indicativo de la presencia de estructura helicoidal tras la unión. Es importante observar que, a diferencia de los experimentos de RMN de solución, la RMN DTS se llevó a cabo en tampón fisiológico (PBS) y en ausencia del alcohol estabilizante de hélice TFE. Por lo tanto esta es una fuerte prueba de que aunque A20FMDV2 existe en solución en equilibrio entre estados helicoidales y enrollamiento aleatorio, el péptido unido a  $\alpha\beta6$  existe en un estado predominantemente helicoidal. De hecho, cuando los restos que muestran el mayor grado de contacto estrecho con  $\alpha\beta6$  se mapean en la estructura tridimensional media de A20FMDV2 en TFE al 30 %, estos restos se alinean en una única cara del péptido. Esto indica fuertemente que la presencia de estructura helicoidal pone a estos restos de otro modo no adyacentes en yuxtaposición, formando una única cara de unión para interacción directa con  $\alpha\beta6$ .

*Se quiere una hélice  $\alpha$  para unión óptima con  $\alpha\beta6$*

Los datos anteriores muestran claramente que cuando A20FMDV2 se une con  $\alpha\beta6$  hay una hélice  $\alpha$  en sentido C terminal de RGD. Además, poniendo en yuxtaposición las dos leucinas no contiguas en L10 y L13 esto permite un contacto estrecho entre el ligando (A20 FMDV2) y la integrina. Para demostrar que la hélice  $\alpha$  se requería para la unión de ligando con  $\alpha\beta6$ , se sintetizaron tres péptidos variantes A20 FMDV2 que reemplazaron L-valinas con D-valinas en las posiciones D12 y D17. La Figura 4 muestra la predicción de que cada una de estas valinas está dentro de la hélice  $\alpha$  formada por A20FMDV2, lo que se confirmó por RMN. Insertando D-valinas, se esperaría alterar la naturaleza helicoidal del péptido sin eliminar la posibilidad de que interaccionen restos de contacto clave (Arg7, Asp9, Leu10 y Leu13), manteniendo al mismo tiempo otros aspectos del péptido, tales como distribución de carga y pH.

Los péptidos de D-valina se analizaron en ensayos de adhesión celular con líneas celulares 3T3 $\beta6$ .19 y VB6 y los datos se resumen en la tabla posterior. Los resultados indican que los cambios de L a D tienen un efecto acumulativo: mientras que los péptidos DV12 y DV17 tienen CI50 aproximadamente tres veces mayores que la del péptido "parental" A20FMDV2, la eficacia de DV12/17 se reduce aproximadamente 20 veces en ensayos de VB6 y 40 veces en los ensayos de 3T3 $\beta6$ .19, véase la tabla posterior.

Tabla 7: Valores de CI50 para péptidos que contienen D-Valina en ensayos de adhesión celular, DT, desviación típica; n, número de experimentos; ND, no determinado.

Péptido	3T3 $\beta6$ .9			VB6		
	CI50 ( $\mu$ M)	DT ( $\mu$ M)	n	CI50 ( $\mu$ M)	DT ( $\mu$ M)	n
A20FMDV2	1,2	0,2	4	0,96	0,16	3

DV12	ND	ND	0	3,35	0,65	3
DV17	ND	ND	0	2,97	2,02	3
DV1217	48,5	37	4	22,81	N/A	2

El péptido DV1217 también se comparó con A20FMDV1, A20LAP y A20FMDV2 en un ensayo de unión a receptor aislado, usando péptidos sintetizados con una biotina N terminal. Brevemente, se recubrieron placas de 96 pocillos con  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$  y los sitios de unión a proteínas no específicos restantes se bloquearon por incubación con caseína 1 % (p/v) en PBS. Los pocillos se incubaron con péptidos biotinilados antes del lavado y la posterior detección de péptido unido a ExtrAvidina HRP.

Los péptidos biotinilados se unieron específicamente con  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$  inmovilizada, ya que no hubo ninguna unión en ausencia de  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$ . La unión fue específica de secuencia, ya que los péptidos de control con secuencias mezcladas se unieron muy poco en comparación con las secuencias originales, y no mostraron ninguna unión a todas las concentraciones por debajo de 100 nM. El péptido A20FMDV2 mostró un mayor grado de unión con  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  que A20LAP, y ambos se unieron más que A20FMDV1. El péptido DV1217, que excepto por el isomerismo de D-Val<sup>12</sup> y D-Val<sup>17</sup> y la falta posterior de estructura helicoidal es químicamente idéntico a A20FMDV2, solamente se unió igual que A20FMDV1. Por lo tanto, la estructura helicoidal se correlaciona con unión con  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$  en ensayos de proteínas aisladas así como inhibición de ensayos de adhesión celular. Estos datos también muestran que aunque la presencia de estructura helicoidal promueve la unión con  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ , el potencial de formar estructura helicoidal no es un pre-requisito para la unión; como se demuestra por la unión dependiente de dosis de A20 DV1217.

Para confirmar que las sustituciones de D-valina habían alterado de hecho la formación de hélices se analizó el mutante doble por DC y RMN. Los datos de DC muestran que el mutante de DV1217 fue incapaz de formar una hélice incluso en TFE al 50 % y análisis de RMN de que la formación de hélice no se predijo a partir de 40 grupos solapantes. Ya que hubo solamente diferencias estructurales, sin diferencias de secuencia o carga entre A20 FMDV2 y el mutante doble DV1217, estos datos sugieren fuertemente que una hélice  $\alpha$  C terminal de RGD es un componente esencial de un motivo de unión específico de  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  óptimo.

#### *Péptidos derivados de P18-INK6*

Mientras que los péptidos A20FMDV1, A20FMDV2 y A20LAP derivaron de secuencias de proteínas que se sabe que se unen con integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ , se investigó si otras secuencias contenían el motivo de secuencia RGD LXXL/I por el que el motivo LXXL/I está contenido dentro de una estructura alfa-helicoidal. Se eligió el motivo contenido en el gen de P18-INK6 (también conocido como inhibidor C de quinasa dependiente de ciclina 4 o P18-INK4c) con la secuencia mostrada a continuación.

DD19	VPNLRGDLQVLA
P18-INK	SAAARGDLEQLTSLQNNVNV

La secuencia de P18-INK contiene la secuencia RGD LXXL y cuando se analizó usando el software AGADIR se mostró que la secuencia LEQL en el péptido P18-INK formaba un motivo alfa-helicoidal. Se predeciría por lo tanto que esta secuencia tiene propiedades de unión a  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ , a pesar de la probabilidad limitada de que esta sea una interacción fisiológica debido a que el sitio de unión a ligando de  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  es extracelular mientras que p18-INK5 es intracelular.

La comparación de la afinidad de unión del P18-INK con la de DD19 (un péptido RGD LXXL con secuencia LXXL que no está en la estructura alfa helicoidal) con integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  mostró que la afinidad de unión de P18-INK era significativamente mayor que la de DD19 (Figura 8). Esto indica que las secuencias RGD LXXL que están contenidas en proteínas que no se sabe que se unen con  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  pero que contienen el motivo LXXL como parte de una hélice alfa aún se unen con  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  cuando se presentan aisladas.

#### *Modelización por ordenador de péptidos P-INK usando AGADIR*

Además, se decidió usar este sistema para explorar la posibilidad de usar el diseño por ordenador (mediante el algoritmo AGADIR) para potenciar la helicidad peptídica, y de este modo aumentar potencialmente la potencia anti- $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ . Se contemplaron diferentes modos de combinación de las secuencias de A20FMDV2 y p18-INK, y se eligió para estudio posterior la que proporcionó el mayor grado de helicidad predicha en la región LXXLXX (INK-FMDV). Posteriormente, se prepararon dos péptidos más, con cambios de aminoácidos individuales: el primero, INK-FMDV-X, aumentó la helicidad predicha general del péptido; el segundo pINK-FMDV2-XX, aumentó la helicidad predicha de la región LXXLXX reduciendo al mismo tiempo la helicidad predicha del RGD.

Estos péptidos se analizaron usando el ELISA de Exploración. Brevemente, se inmovilizó  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$  en la superficie de placas de 96 pocillos por exposición a placas recubiertas con un anticuerpo monoclonal anti- $\alpha\text{v}$  (P2W7). El  $\text{rs}\alpha\text{v}\beta\text{6}$  inmovilizado se expuso después a una mezcla de péptido y fibronectina biotinilada durante una hora, después de lo

cual el material no unido se retiró por lavado y la fibronectina biotinilada unida se detectó con ExtrAvidina-HRP. Las diluciones en serie de péptido permitieron la generación de una curva de respuesta a dosis, a partir de la que se calculó una CI50 usando un modelo de ajuste de curva sigmoideo (software Prism).

- 5 Los resultados mostraron que un péptido de 20 unidades derivado de la secuencia de p18-INK6 es un inhibidor funcional de  $\alpha\beta6$  recombinante, con una CI50 de 23 nM en ELISA competitivo. El péptido P-INK también inhibió la adhesión dependiente de  $\alpha\beta6$  en un ensayo de adhesión celular preliminar.

- 10 Los péptidos derivados de la proteína intracelular p18-INK6 son por lo tanto capaces de inhibir  $\alpha\beta6$  recombinante y celular. Es poco probable que esto tenga un impacto fisiológico ya que el dominio de unión a ligando de  $\alpha\beta6$  es extracelular y por lo tanto es poco probable que “vea” a p18-INK6; sin embargo estos datos apoyan el modelo propuesto en el presente documento, de que un motivo RGDLXXL con una tendencia helicoidal en la región LXXL probablemente posea actividad de unión a  $\alpha\beta6$ .

15 *Evaluación de la especificidad peptídica por citometría de flujo*

- 20 Se permitió que los péptidos biotinilados se unieran con A375Puro y A375P $\beta6$ puro y la unión se detectó con un anticuerpo de ratón anti-biotina seguido de anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado con AlexaFluor488. El uso de un anticuerpo secundario que se unió con biotina proporcionó una etapa de purificación importante, ya que los experimentos preliminares usando detección directa con estreptavidina-FITC dieron como resultado poca o ninguna señal detectable. Los péptidos se ensayaron a varias concentraciones diferentes y demostraron unión diferencial específica de concentración con la línea celular A375P $\beta6$ puro. DV1217 fue altamente específico para A375P $\beta6$ puro, ya que no se unió de forma notable con A375Puro a ninguna de las concentraciones ensayadas (hasta 100  $\mu$ M), pero se unió a A375P $\beta6$ puro a 10  $\mu$ M y a 1  $\mu$ M. A20FMDV2 sí se unió con A375Puro, pero solamente a 10  $\mu$ M, mientras que la unión con A375P $\beta6$ puro se observó a 10  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 0,1  $\mu$ M, 0,01  $\mu$ M y 0,001  $\mu$ M; unión diferencial de cuatro órdenes de magnitud. A20FMDV1 también fue relativamente específico, mostrando unión con A375P $\beta6$ puro a 1  $\mu$ M, una concentración a la que no se unió con A375Puro. A20LAP mostró relativamente poca especificidad por A375P $\beta6$ puro y se unió con ambas líneas celulares a 10  $\mu$ M y 1  $\mu$ M, aunque la unión con A375P $\beta6$ puro fue ligeramente mayor a ambas concentraciones.

- 30 Todos los péptidos contenían un motivo RGD LXXL/I; por lo tanto la presencia de este motivo no es una garantía de especificidad por  $\alpha\beta6$ . Además, de los cuatro péptidos ensayados, los dos péptidos con las hélices más estables (A20FMDV2) y las menos estables (A20DV1217) en la secuencia post-RGD fueron los más específicos para  $\alpha\beta6$  frente a las otras integrinas dirigidas a RGD presentes; por lo tanto la helicidad en la región post-RGD no proporciona especificidad para  $\alpha\beta6$ . Sin embargo, estos datos sí confirman la importancia de la helicidad post-RGD para unión de alta afinidad con  $\alpha\beta6$ , ya que se requirió A20 DV1217 10  $\mu$ M para obtener un grado similar de unión a A20FMDV2 10 nM. En este ensayo, por lo tanto, la pérdida de helicidad dio como resultado una pérdida de 1000 veces de potencia anti- $\alpha\beta6$ .

40 *Diseño racional de derivados cíclicos de disulfuro de A20FMDV2*

- 45 Se pensó que ya que los péptidos lineales pueden en ocasiones ser susceptibles a ataque por proteasas del suero *in vivo*, podría investigarse la ciclación y el uso de D-aminoácidos para estabilizar los péptidos manteniendo, o mejorando, al mismo tiempo su actividad biológica (Okarvi, 2004). Se usó por lo tanto un diseño guiado por estructura, racional, para obtener dos variantes cicladas por disulfuro de péptido candidato A20FMDV2. El objetivo fue triple: estabilizar la estructura activa, aumentando de este modo la afinidad; mejorar la resistencia a proteasas del suero; e introducir restos de lisina y tirosina situados adecuadamente para permitir el radiomarcage directo con ácido 4- $^{18}$ F]fluorobenzoico ( $^{18}$ F-FBA) o  $^{125}$ I, respectivamente.

- 50 Se usó software Disulphide by Design (Dombkowski, 2003; www.ehscenter.org/dbd/) con la estructura en solución de A20FMDV2 en TFE al 30 % para identificar un par de restos que se consideraba que cumplían las especificaciones espaciales y geométricas para posible reemplazo con restos de cisteína con enlace disulfuro. Se añadieron restos de lisina y tirosina para radiomarcage. Sin embargo, para mantener la unidad estructural completa de A20FMDV2 y evitar una posible interferencia con la actividad de unión a  $\alpha\beta6$ , estos restos se añadieron en el extremo N terminal del péptido como una “cola” de D-aminoácidos. Este péptido se designó DBD1 (véase la tabla posterior). Irónicamente, los estudios de estabilidad en suero preliminares indicaron que la “cola” de D-aminoácidos puede en sí misma ser susceptible a proteólisis. Se diseñó por lo tanto péptido DBD2 en el que todos los restos están contenidos dentro del anillo disulfuro (Tabla 6.1). El péptido “Ran” se sintetizó como un control y consiste en los mismos restos que DBD1; sin embargo los restos dentro del anillo disulfuro se han mezclado. Para permitir el análisis directo de unión peptídica a  $\alpha\beta6$  celular y recombinante, también se añadió un resto de biotina y un espaciador al extremo N terminal de cada péptido (A20FMDV2, DBD1, Ran y DBD2 biotinilado se denominan por lo tanto B-A20FMDV2, B-DBD1, B-Ran y B-DBD2).

Tabla 8: Secuencias de péptidos cíclicos y de control. Los restos en minúscula representan D-aminoácidos. El

motivo RGD<sup>L</sup>XXL está subrayado. Los restos de cisteína usados para ciclación están destacados en negrita y están subrayados. Los restos de tirosina (y/Y) y lisina (k/K) se añadieron para permitir el radiomarcado directo con <sup>125</sup>I y <sup>18</sup>F-ácido fluorobenzoico respectivamente. Los restos de ácido glutámico (e) y lisina (K) se añadieron para permitir potencialmente la ciclación covalente de cadena lateral a cadena lateral.

Péptido	Secuencia	Modificaciones
A20FMDV2	NAVPNLRGD <sup>L</sup> QVLAQKVART	Ninguna
DBD1	eykCPNLRGD <sup>L</sup> QVLAQKVCR <b>T</b> K	Ciclación por disulfuro
Ran	eykCKLVGALQPDNVLQRC <b>R</b> T <b>K</b>	Ciclación por disulfuro
DBD2	CYVPNLRGD <sup>L</sup> QVLAQK <b>V</b> AK <b>C</b>	Ciclación por disulfuro

5 Afinidad y especificidad de péptidos cíclicos *in vitro*. La afinidad de los péptidos cíclicos por  $\alpha\beta 6$  se ensayó en primer lugar en un ELISA de unión no competitivo. Se permitió que los péptidos biotinilados se unieran con  $r\alpha\beta 6$  inmovilizada en placas de ELISA y el péptido unido se detectó con ExtrAvidina conjugada con peroxidasa. El péptido mezclado B-Ran no mostró ninguna unión, pero tanto B-DBD1 como B-DBD2 mostraron unión dependiente de la  
10 concentración con  $r\alpha\beta 6$ . Los niveles de unión fueron similares a los de B-A20FMDV2. La cuantificación de los datos por ajuste de una curva de respuesta a dosis y cálculo posterior de las concentraciones peptídicas requirieron que la unión al 50 % (CE50) demostrara que B-A20FMDV2, B-DBD1 y B-DBD2 muestran niveles de potencia similares en este ensayo, mostrando uniformemente unión detectable a concentraciones nanomolares bajas (véase Tabla posterior).

15 **Tabla 9:** CE50 para unión de péptidos cíclicos biotinilados con  $r\alpha\beta 6$  inmovilizada. Los datos se ajustaron a una curva de respuesta a dosis sigmoidea y la concentración peptídica requerida para unión máxima al 50 % (CE50) se determinó para cada péptido. Los datos representan la media y desviación típica de las CE50 de cuatro experimentos independientes. ND, no determinado.

Péptido	CE50 media (nM)	Desviación típica
B-Ran	ND	ND
B-A20FMDV2	1,20	0,28
B-DBD1	0,69	0,18
B-DBD2	1,70	1,16

20 Se evaluó la especificidad peptídica para  $\alpha\beta 6$  por comparación de unión con líneas celulares emparejadas  $\alpha\beta 6$  positivas y  $\alpha\beta 6$  negativas A375P $\beta 6$  y A375Puro (Figura 9 y 10). Ambas líneas celulares expresan integrinas  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$  y  $\alpha 5\beta 1$  a niveles comparables, sin embargo solamente A375P $\beta 6$  expresa  $\alpha\beta 6$ . Se evaluó la unión de péptidos biotinilados por citometría de flujo. B-A20FMDV2, B-DBD1 y B-DBD2 mostraron unión dependiente de la  
25 concentración con A375P $\beta 6$ , con altos niveles de unión a concentraciones tan bajas como 1 nM. Por el contrario, estos tres péptidos mostraron solamente niveles bajos de unión con A375Puro y además solo a altas concentraciones. El péptido mezclado de control (B-Ran) no se unió con ninguna de las líneas celulares.

30 Para confirmar la especificidad de la interacción con A375P $\beta 6$ , se evaluó la unión de péptido 1 nM en presencia de 63G9, un anticuerpo monoclonal de bloqueo de función específico de  $\alpha\beta 6$ , o un control de IgG irrelevante. B-A20FMDV2, B-DBD1 y B-DBD2 se unieron fuertemente en presencia de IgG de control; sin embargo en presencia de 63G9, la unión se redujo en gran medida, y en el caso de B-A20FMDV2 y B-DBD2, se anuló completamente. B-Ran no se unió en presencia de ninguno de los anticuerpos. Los resultados confirman que a 1 nM, B-A20FMDV2, B-DBD1 y B-DBD2 se unen con A375P $\beta 6$  principalmente a través de  $\alpha\beta 6$ . Por lo tanto B-A20FMDV2, B-DB1 y B-DBD2 tienen tanto alta afinidad como alta especificidad por  $\alpha\beta 6$  frente a  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 5$ ,  $\alpha\beta 8$  y  $\alpha 5\beta 1$ . Además, la unión peptídica es estable y de larga duración, ya que los complejos de péptido-integrina son estables a tratamiento repetido con EDTA.

40 Estudios *in vitro* e *in vivo* con A20FMDV2 y DBD2 marcados con <sup>18</sup>F

Los péptidos candidatos B-A20FMDV2 y B-DBD2 muestran por lo tanto alta afinidad y alta especificidad por  $\alpha\beta 6$  *in vitro*. A20FMDV2 y DBD2 pueden estar radiomarcados en el extremo N terminal del péptido para generar <sup>18</sup>F-A20FMDV2 y <sup>18</sup>F-DBD2. El uso potencial de integrina  $\alpha\beta 6$  para fines de captura de imágenes y dirección puede evaluarse por inyección de péptidos marcados (con <sup>18</sup>F u otro resto radiactivo) en ratones que portan xenoinjertos emparejados  $\alpha\beta 6$  positivos (DX3 $\beta 6$ ) y  $\alpha\beta 6$  negativos (DX3puro) para permitir la visualización específica de los tumores  $\alpha\beta 6$  positivos.

## Discusión

50 La integrina  $\alpha\beta 6$  es una nueva diana importante para la captura de imágenes y terapia de cáncer. Como una etapa hacia la creación de reactivos anti- $\alpha\beta 6$  se usó un enfoque de diseño racional basado en ligandos conocidos de  $\alpha\beta 6$  para generar antagonistas peptídicos para  $\alpha\beta 6$ . Estos estudios han revelado la base estructural de nuevas interacciones de integrina-ligando que son importantes para el comportamiento biológico de  $\alpha\beta 6$ . Se observó en primer lugar que la potencia de antagonistas peptídicos para  $\alpha\beta 6$  aumentaba a medida que aumentaba la longitud

de péptido lo que sugiere una estructura secundaria en estos péptidos lineales. La posibilidad de que estos péptidos puedan tener un motivo helicoidal se basó en la estructura cristalina de FMDV (Logan *et al* 1993). Estos autores han mostrado que el bucle G-H de la proteína de la cápsida VP1 de FMDV consistía en un motivo RGD en la punta de una vuelta de horquilla seguida de una hélice  $3_{10}$ . Esa estructura se reveló solamente si estaba presente reticulación de cisteína de disulfuro entre las proteínas VP1 y VP2. Se examinó la propensión helicoidal de los tres péptidos candidatos de los inventores A20 FMDV1, A20 FMDV2 y A20 LAP usando software AGADIR. La predicción fue que hubo una propensión helicoidal creciente en el orden A20FMDV<A20LAP<A20FMDV2, una secuencia que se correlacionaba con la potencia biológica. El análisis de DC/UV lejano confirmó que todos los 20meros mostraron una naturaleza helicoidal aumentada tras la adición de TFE de 0-50 % (v/v). El perfil más amplio para transición a la forma helicoidal para A20FMDV sugiere que se requiere una mayor proporción de TFE con este péptido para formar una hélice estable y que la propensión helicoidal de este péptido es menor que para A20FMDV2 o A20LAP, datos que confirman la predicción de AGADIR. Los datos de UV lejano-DC también se usaron predecir qué concentración de TFE era necesaria para obtener estructuras comparativas de los tres péptidos por RMN. La representación de elipticidad media sugirió que a 40-50 % de TFE se obligaba a completar la estabilización de la hélice para los 3 péptidos. Por lo tanto se usó una concentración del 30 % (v/v) ya que quedaba en el límite de transición tanto para A20FMDV2 como para A20LAP y permitía revelar diferencias en la propensión helicoidal de los péptidos. (Para permitir la comparación directa, también se seleccionó 30 % de TFE para todos los análisis de RMN posteriores).

La asignación estructural de los tres péptidos por RMN permitió la identificación de más del 97 % de todas las resonancias siendo la mayoría de resonancias ausentes de Thr2 de A20FMDV1 y Gly1 de A20LAP difíciles de asignar como el resultado de intercambio de hidrógeno de amida y solapamiento. El alto grado de asignación permitió asignaciones de contacto precisas para dilucidación de la estructura de cada péptido y la evaluación y documentación de contactos clave implicados en la formación de hélices  $\alpha$  como se muestra en la Figura 3 y la Figura 4. Los contactos mostrados en la Figura 3(a) para A20FMDV destacan que esta hélices es la menos definida en las condiciones usadas. aH-NH i-i+3 y aH-bH i-i+3 no se definen continuamente por toda la región C terminal de RGD y el tramo helicoidal de Ala10-Thr14 no se define con aceptores de enlaces de hidrógeno y restricciones f. Por el contrario, los contactos de A20FMDV2 como se muestra en la Figura 3(b) destacan una hélice bien formada de Leu10-Val17 con aH-NH i-i+3, aH-bH i-i+3, NH-NH i-i+1 y enlace hidrógeno y restricciones f. Las restricciones A20LAP en la Figura 3(c) quedan entre medias de las observadas para A20FMDV1 y A20FMDV2. Sobre la región helicoidal de Leu10-Gly15, A20LAP tiene un alto grado de contactos aH-NH i-i+3 definidos, pero tiene un número más escaso de contactos aH-bH i-i+3 definidos. Además en A20LAP, el enlace hidrógeno y las restricciones f están mejor definidas en el extremo N terminal de la hélice pero están ausentes en la sección C terminal. La insuficiencia en el enlace de hidrógeno y restricciones f definidos tanto para A20FMDV1 como para A20LAP han contribuido a la reducción de formación de hélices en los modelos creados por datos de RMN pero refleja las diferencias fundamentales entre estos péptidos en 30 % de TFE (v/v). La escala de helicidad proporcionada a partir de los datos de contacto en los que se observa helicidad ideal por A20FMDV2, con A20LAP algo menos ideal y siendo A20FMDV1 escasa también puede verse directamente a partir de los datos experimentales como se muestra en la Figura 4. Los datos de A20FMDV2 en las Figuras 4(b), 4(e) y (4h) muestran más contactos y mayor dispersión de señales que son indicativos de la presencia de estructura. De nuevo, estas observaciones se reducen en A20LAP siendo el número de contactos y la dispersión los menores en A20FMDV. Los datos de contacto de la Tabla 2 confirman estas observaciones visuales. Independientemente de la naturaleza de estas hélices, resulta evidente que cada péptido adopta una conformación de vuelta y que se observan contactos a larga distancia (es decir entre restos en las mitades N y C terminales de los péptidos) en todos los péptidos. Estos contactos son más numerosos y están mejor definidos en A20FMDV2 y sugieren que la formación de hélice es clave para formar una conformación de vuelta estable. Sin embargo, incluso aunque los 6-7 aminoácidos N terminales no parecen tener estructura, aun pueden ser importantes a partir de consideraciones de actividad ya que hay varias interacciones de NOE entre los restos N y C terminales que probablemente sirven para estabilizar la estructura tridimensional general.

La tendencia en la helicidad general para cada uno de estos péptidos (A20FMDV2 » A20LAP » A20FMDV1) como se perfila a partir de los datos de contacto está apoyada adicionalmente por la dilucidación de la estructura usando software de CNS. La información estructural ha permitido el análisis cuantitativo de la propensión helicoidal de estos péptidos de una manera que no ha sido inmediatamente evidente a partir de los datos de DC-UV lejano presentados en la Figura 1 y la Figura 2. Los promedios de grupo en la Figura 5 muestran que para cada péptido hay una sección helicoidal que queda directamente en sentido C terminal del motivo RGD. Se muestra que la hélice es de aproximadamente 1,4, 16 y 2,2 vueltas para A20 FMDV1, A20 LAP y A20 FMDV2 respectivamente y parece estar de acuerdo con la tendencia observada a partir de AGADIR con respecto a las helicidad predichas generales de estos péptidos. La naturaleza de la hélice que se forma directamente después del motivo RGD permite que las cadenas laterales de los restos previamente destacados LXX[L/I] protruyan desde un lado de la hélice. Como resultado, esto crearía un motivo estructural que implica una hélice que no es muy diferente del motivo LXXLL recientemente ilustrado que se une con receptor de activador-proliferador de peroxisoma (PPAR) (Klien *et al*, 2005). La secuencia RGDLLXXL se identificó como un motivo específico de  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  en Kraft *et al* (1999) usando presentación de péptidos en fagos y la importancia de estos restos se descubrió en estudios anteriores que examinaron los aminoácidos críticos en péptidos derivados de FMDV que se requerían para inhibir la infección experimental por FMDV (Mateu *et al*, 1996).

La investigación de RMNDTS de los inventores usando péptido A20FMDV2 con integrina  $\alpha\text{v}\beta\text{6}$  permitió la

confirmación de que los restos LXXL eran importantes en la unión de ligando a  $\alpha\beta 6$ . Los datos de diferencias de RMNDTS mostrados en la Figura 6 destacan la importancia de interacciones mediante el Hd de los restos Leu10 y Leu13 junto con la ausencia de Hd de Leu6 que destaca inmediatamente que la unión implica principalmente la sección del péptido de Arg7-Thr20. Esto se confirma por análisis de factor de amplificación de DTS mostrado para cada resto que también destaca que la interfaz primaria se produce con los restos Arg7, Leu10, Leu13, Lys16 y Val17. Por lo tanto los datos de los inventores proporcionan una explicación estructural para el descubrimiento de RGD LXXL como un ligando específico de  $\alpha\beta 6$  ya que la hélice pone en yuxtaposición los restos Leu10 y Leu13 no contiguos que interaccionan con la superficie de  $\alpha\beta 6$  de una manera lineal. La importancia de los restos Lys16 y Val17 en el reconocimiento de integrina  $\alpha\beta 6$  también requiere atención ya que esta observación destaca la probable importancia de un motivo extendido más allá de RGD LXXL. También se observan interacciones secundarias elevadas para Asp9, Val12 y Thr20. Ya que los datos de DTS se obtuvieron en un tampón fisiológico (PBS) sin TFE, se sugiere fuertemente que A20FMDV2 se une como una hélice con  $\alpha\beta 6$ . Los restos de interfaz primaria que aparecen en etapas de tres aminoácidos ilustran la formación de una hélice dentro de A20FMDV2 durante la interacción con  $\alpha\beta 6$  que permitiría que todas las cadenas laterales de restos primarios interaccionaran como una cara con la diana de integrina. Además, es posible que al menos la sección N terminal de la hélice entre Leu10-Lys16 podría adoptar una estructura de hélice 3,10 debido al patrón regular LXXLXXK de acuerdo con Logan *et al* (1993). Los datos de los inventores sugieren que los péptidos específicos para integrina  $\alpha\beta 6$  requieren una conformación de vuelta extendida con un motivo basado en RGD LXXL. Además de la importancia inmediata de este motivo, los péptidos específicos de  $\alpha\beta 6$  requieren propensión helicoidal aumentada y la capacidad de formar hélices con números crecientes de restos en sentido C terminal de RGD que se unirán con mayor eficacia. Esto fue, quizás, un hallazgo inesperado ya que el desarrollo de inhibidores peptídicos para otras integrinas tales como  $\alpha\beta 3$  y  $\alpha 1 \text{Ibb}3$  han buscado con frecuencia el péptido cíclico más pequeño posible. El motivo de hélice  $\alpha$  para  $\alpha\beta 6$  parece tener varios papeles. Principalmente, permite la orientación correcta del LXXL para permitir que cadenas laterales hidrófobas interaccionen con un sitio de unión en  $\alpha\beta 6$ , pero además promueve la unión presentando también restos de contacto en las posiciones YY en una secuencia extendida RGD LXXLXXYY. Además, los contactos a larga distancia entre restos en la hélice y restos en el extremo N terminal estabilizan la estructura en horquilla y por lo tanto presentan el motivo RGD favorablemente.

La combinación de datos estructurales (análisis de RMN y DC/UV lejano) y funcionales (ensayos ELISA y de adhesión) han predicho que los antagonistas peptídicos de los inventores asumirían un componente helicoidal cuando interaccionaran con  $\alpha\beta 6$ . Esto se confirmó para la interacción de A20 FMDV2/ $\alpha\beta 6$  por RMNDTS. La importancia de la hélice en la unión de péptidos a  $\alpha\beta 6$  se mostró destruyendo de forma conservativa la hélice reemplazando valinas en la hélice con sus D-isómeros. El péptido DV1217 resultante no tuvo ninguna propensión helicoidal y tuvo una potencia reducida 20-40 veces como un inhibidor de  $\alpha\beta 6$ .

No se predice que algunos sustratos, tales como fibronectina, tengan una hélice  $\alpha$  en sentido C terminal de RGD pero pueden actuar como ligandos para  $\alpha\beta 6$ . Sin embargo,  $\alpha\beta 6$  tiene una afinidad de unión mucho mayor por LAP que por fibronectina. Ya que LAP posee un motivo de hélice  $\alpha$  de RGD los resultados de los inventores ofrecen una explicación estructural para esta afinidad aumentada, ya que, supuestamente, hay más interacciones físicas entre  $\alpha\beta 6$  y LAP que con  $\alpha\beta 6$  y fibronectina. Los datos de los inventores también pueden explicar cómo  $\alpha\beta 6$  puede activar TGF $\beta$ . Por lo tanto la activación de TGF $\beta$ 1 (y supuestamente TGF $\beta$ 3) por  $\alpha\beta 6$  requiere un citoesqueleto de actina funcional lo que posiblemente sugiere que debe aplicarse tensión física al propéptido de TGF $\beta$ , LAP. El gran número de sitios de contacto que aparecen en sentido C terminal del motivo de unión RGD en los péptidos de los inventores ofrece una explicación acerca de cómo esta fuerte unión con LAP podría estar mediada. Esta puede ser activación de  $\alpha\beta 6$  de TGF $\beta$  mediante unión mediada por hélice, fuerte, que implica tracción/tensión o posiblemente la estabilización inducida por unión del bucle desestructurado con la hélice provoque un cambio conformacional en el LAP que libera TGF $\beta$ .

El motivo RGD LXXL se encuentra en muchas proteínas, no todas las cuales son proteínas extracelulares. Basándose en estas investigaciones se puede sugerir que existen nuevos ligandos, aún no caracterizados, para  $\alpha\beta 6$ , que pueden incluir, por ejemplo, proteína C asociada a tensioactivo pulmonar de macaco rhesus. La presencia de proteínas intracelulares con motivos RGD LXXL puede sugerir que pueden unirse a  $\alpha\beta 6$  intracelular, lo que podría tener un uso biológico.

En resumen, el péptido de 20 unidades A20 FMDV2 forma una hélice  $\alpha$  C terminal de RGD cuando se asocia con la integrina. Ya que hay una correlación entre la propensión helicoidal y la eficacia peptídica, esto sugiere que la formación de hélice no es una consecuencia de la unión con  $\alpha\beta 6$  sino más bien que el ligando (A20FMDV2) debe adoptar una hélice  $\alpha$  C terminal de RGD antes de la unión y que esta unión probablemente estabilice la hélice. Una función importante de la hélice es permitir que restos no contiguos en sentido C terminal del motivo RGD se presenten como una cara lineal a la superficie de  $\alpha\beta 6$  aumentando de este modo los puntos de contacto potenciales entre el ligando y la integrina. Estos datos actuarán como un armazón estructural sobre el que diseñar potentes reactivos específicos de  $\alpha\beta 6$  que serán necesarios para la captura de imágenes y terapia de cáncer así como el tratamiento de algunas enfermedades fibróticas.

## Referencias

- Brunger *et al*, (1998) Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr., 54 (Pt 5), 905-921.
- 5 Cavanagh, J., Fairbrother, W. J., Palmer, A. G. y Skelton, N. J. (1996) Protein NMR Spectroscopy: Principles and Practice, Academic Press, Londres.
- Delaglio *et al*, (1995) J. Biomol. NMR 6, 277-293.
- 10 Forood *et al*, (1993) "Stabilization of  $\alpha$ -helical structures in short peptides via end capping." Proc. Natl Acad. Sci. 90: 838-842.
- Guex y Peitsch, (1997) Electrophoresis 18, 2714-2723.
- 15 Johnson y Blevins, (1994) Journal of Biomolecular NMR 4, 603-614.
- Klein *et al*, (2005). J. Biol. Chem. 280, 5682-5692.
- Koradi *et al*, (1996) J. Mol. Graph. 14, 51-55.
- 20 Khandelwal *et al*, Eur. J. Biochem. 264, 468-478.
- Laskowski *et al*, (1996) J Biomol NMR 8, 477-486.
- 25 van Gunsteren *et al*, (1994) en Methods in Enzymology: Nuclear Magnetic Resonance (James, T. L. y Oppenheimer, N. J., eds) Vol. 239, pp. 619-654, Academic Press, Nueva York.
- Yan *et al*, (2003). J. Magn. Reson. 163, 270-276.

- 30 **Tabla 1.** Lista de asignación de RMN de desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  observados para péptidos A20FMDV-1, A20FMDV-2 y A20LAP en PBS/TFE 30 % (v/v) a 10 °C. Todos los desplazamientos químicos tienen referencia externa a una solución 100  $\mu\text{M}$  de ácido dimetilsilapetano sulfónico (DSS) en PBS/TFE 30 % (v/v).

Resto	$\text{H}^{\text{N}}$	$\text{H}^{\alpha}$	Otros
<b>A20FMDV-1</b>			
1Tyr	8,336	4,341	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 2,830; $\text{H}^{\delta 2/\delta 3}$ 7,205; $\text{H}^{\epsilon 1/\epsilon 2}$ 6,913
2Thr			
3Ala	8,615	4,350	$\text{H}^{\beta}$ 1,522
4Ser	8,335	4,496	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 4,000, 3,920
5Ala	8,426	4,415	$\text{H}^{\beta}$ 1,500
6Arg	8,317	4,308	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,872, 1,969; $\text{H}^{\gamma 2/\gamma 3}$ 1,706, 1,774; $\text{H}^{\delta 2/\delta 3}$ 3,285
7Gly	8,407	4,007	
8Asp	8,337	4,677	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 3,227, 3,364
9Leu	8,245	4,286	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,782; $\text{H}^{\gamma}$ 1,722; $\text{H}^{\delta 1/\delta 2}$ 0,941, 0,990
10Ala	8,235	4,394	$\text{H}^{\beta}$ 1,328
11His	8,226	4,604	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 3,295, 3,394; $\text{H}^{\epsilon 1}$ 7,275
12Leu	8,231	4,343	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,862; $\text{H}^{\gamma}$ 1,695; $\text{H}^{\delta 1/\delta 2}$ 0,931, 0,970
13Thr	8,276	4,386	$\text{H}^{\beta}$ 4,202; $\text{H}^{\gamma 2}$ 1,471
14Thr	8,148	4,323	$\text{H}^{\beta}$ 4,244; $\text{H}^{\gamma 2}$ 1,281
15Thr	8,246	4,347	$\text{H}^{\gamma 2}$ 1,474
16His	8,312	4,762	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 3,225, 3,343; $\text{H}^{\epsilon 1}$ 7,145
17Ala	8,506	4,425	$\text{H}^{\beta}$ 1,498
18Arg	8,278	4,392	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,838, 1,917; $\text{H}^{\gamma 2/\gamma 3}$ 1,679, 1,742; $\text{H}^{\delta 2/\delta 3}$ 3,325
19His	8,315	4,702	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 3,302; $\text{H}^{\epsilon 1}$ 7,140
20Leu	8,188	4,286	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,688, $\text{H}^{\gamma}$ 1,688; $\text{H}^{\delta 1/\delta 2}$ 0,941, 0,988
<b>A20FMDV-2</b>			
1Asn		4,115	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 2,912; $\text{H}^{\delta 2 1/\delta 2 2}$ 6,912, 7,622
2Ala	8,250	4,300	$\text{H}^{\beta}$ 1,394
3Val	8,197	4,491	$\text{H}^{\beta}$ 2,197; $\text{H}^{\gamma 1/\gamma 2}$ 1,079
4Pro		4,459	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,961; $\text{H}^{\gamma 2/\gamma 3}$ 2,124; $\text{H}^{\delta 2/\delta 3}$ 3,773, 3,920
5Asn	8,605	4,810	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 2,838, 3,001; $\text{H}^{\delta 2 1/\delta 2 2}$ 6,743, 7,776
6Leu	8,140	4,387	$\text{H}^{\beta 2/\beta 3}$ 1,714; $\text{H}^{\gamma}$ 1,714; $\text{H}^{\delta 1/\delta 2}$ 0,906, 0,946

ES 2 638 439 T3

7Arg	8,253	4,257	H <sup>β2/β3</sup> 1,922, 1,997; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,717, 1,801; H <sup>δ2/δ3</sup> 3,321
8Gly	8,272	3,982	
9Asp	8,400	4,574	H <sup>β2/β3</sup> 2,799
10Leu	8,279	4,253	H <sup>β2/β3</sup> 1,841, 1,896; H <sup>γ</sup> 1,681; H <sup>δ1/δ2</sup> 0,955, 1,011
11Gln	8,065	4,123	H <sup>β2/β3</sup> 2,452, 2,572; H <sup>γ2/γ3</sup> 2,284; H <sup>ε21/ε22</sup> 6,866, 7,510
<b>A20FMDV-2</b>			
12Val	7,733	3,825	H <sup>β</sup> 2,310; H <sup>γ1/γ2</sup> : 1,040, 1,155
13Leu	7,987	4,149	H <sup>β2/β3</sup> 1,773; H <sup>γ</sup> 1,867; H <sup>δ1/δ2</sup> 0,966
14Ala	8,455	4,107	H <sup>β</sup> 1,553
15Gln	7,823	4,192	H <sup>β2/β3</sup> 2,517, 2,659; H <sup>γ2/γ3</sup> 2,298; H <sup>ε21/ε22</sup> 6,870, 7,515
16Lys	8,109	4,265	H <sup>β2/β3</sup> 1,748, 2,076; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,659; H <sup>δ2/δ3</sup> 1,540; H <sup>ε2/ε3</sup> 2,988
17Val	8,282	4,012	H <sup>β2</sup> 2,250; H <sup>γ1/γ2</sup> : 1,025, 1,083
18Ala	8,030	4,367	H <sup>β</sup> 1,562
19Arg	7,946	4,516	H <sup>β2/β3</sup> 1,927, 2,100; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,781, 1,849; H <sup>δ2/δ3</sup> 3,283
20Thr	7,759	4,357	H <sup>β</sup> 4,253; H <sup>γ2</sup> 1,297
<b>A20LAP</b>			
1Gly			
2Phe	8,276	4,576	H <sup>β2/β3</sup> 3,114, 3,263; H <sup>δ2/δ3</sup> 7,260; H <sup>ε1/ε2</sup> 7,183; H <sup>ζ</sup> 7,298
3Thr	8,208	4,407	H <sup>β</sup> 4,236; H <sup>γ2</sup> 1,156
4Thr	8,110	4,314	H <sup>β</sup> 4,256; H <sup>γ2</sup> 1,239
5Gly	8,433	3,920	
6Arg	8,254	4,362	H <sup>β2/β3</sup> 1,745, 1,868; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,614 H <sup>δ2/δ3</sup> 3,166
7Arg	8,461	4,237	H <sup>β2/β3</sup> 1,797, 1,880; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,611, 1,686; H <sup>δ2/δ3</sup> 3,221
8Gly	8,042	4,257	
9Asp	8,151	4,574	H <sup>β2/β3</sup> 2,724
10Leu	8,144	4,174	H <sup>β2/β3</sup> 1,717; H <sup>γ</sup> 1,569; H <sup>δ1/δ2</sup> 0,851, 0,915
11Ala	8,176	4,204	H <sup>β</sup> 1,438
12Thr	7,880	4,188	H <sup>β</sup> 4,281; H <sup>γ2</sup> 1,188
13Ile	7,920	3,984	H <sup>β</sup> 1,829; H <sup>γ12/γ13</sup> 1,130 H <sup>γ2</sup> 0,778; H <sup>δ1/δ2</sup> 0,890
14His	8,292	4,329	H <sup>β2/β3</sup> 3,117, 3,274; H <sup>ε1</sup> 7,295
15Gly	8,174	3,941	A
16Met	8,139	4,457	H <sup>β2/β3</sup> 2,007, 2,105; H <sup>γ2/γ3</sup> 2,517, 2,601; H <sup>ε</sup> 2,130
17Asn	8,304	4,681	H <sup>β2/β3</sup> 2,708, 2,773; H <sup>δ21/δ22</sup> 6,915, 7,650
18Arg	8,035	4,565	H <sup>β2/β3</sup> 1,657, 1,761; H <sup>γ2/γ3</sup> 1,483, 1,563; H <sup>δ2/δ3</sup> 3,097
19Pro		4,400	H <sup>β2/β3</sup> 2,137; H <sup>γ2/γ3</sup> : 1,944; H <sup>δ2/δ3</sup> 3,515
20Phe	7,277	4,384	H <sup>β2/β3</sup> 3,051, 3,133; H <sup>δ2/δ3</sup> 7,310; H <sup>ε1/ε2</sup> 7,383; H <sup>ζ</sup> 7,281

**Tabla 2.** Lista de NOE, enlace de hidrógeno y conectividades de ángulo de torsión para péptidos A20FMDV-1, A20FMDV-2 y A20LAP.

		A20FMDV-1	A20FMDV-2	A20LAP
NOE	Intra-resto	17	39	41
	Secuencial	18	31	24
	i-i+2	16	35	36
	i-i+3	12	32	26
	i-j (>3)	10	40	23
	Total	73	177	150
Donantes de enlaces de hidrógeno		3	8	3
Ángulos de torsión	φ	4	10	4



**Tabla 3.** Estadística estructural para 35 grupos estructurales de péptidos A20FMDV-1, A20FMDV-2 y A20LAP.

	A20FMDV-1	A20FMDV-2	A20LAP
Desviación de m.c. de cadena principal a través del grupo sobre seis restos que incluye: DLXX(L/I)XX (Å)	0,65	0,59	0,63
Contribuciones de energía (kcal mol <sup>-1</sup> )	a	a	a
$E_{\text{NOE}}$	0,18 ± 0,05	0,25 ± 0,06	0,20 ± 0,04
$E_{\text{dihédrico}}$	0,45 ± 0,06	0,91 ± 0,02	0,33 ± 0,04

**Tabla 4:** Secuencia de aminoácidos de péptidos. Los D-aminoácidos se muestran en minúscula y se destacan en negrita. Todos los péptidos DBD1, DBD2 y Ran contienen un enlace disulfuro entre las dos cisteínas.

Serie	Nombre	Secuencia	Número de restos
7-12 unidades iniciales	DD1	RRGDLATIH	9
	DD2	FTTGRRGDLATI	12
	DD3	TGRRGDLATI	10
	DD4	GRRGDLA	7
	DD5	FTTGRRGDL	9
	DD6	LRRGDRPSLRY	11
	DD7	LRRGDRPSL	9
	DD8	LRRGDRP	7
	DD9	GGLRRGDRPSL	11
	DD10	GGLRRGDRP	9
	DD11	GLRRGDRPSL	10
	DD12	RGDRPSL	7
	DD13	GGFRRGDRPSL	11
	DD14	GSYDGYVFPY	12
	DD15	NAGRRGDLGSL	11
	DD16	GRRGDLGSL	9
	DD17	NAGRRGDLGS	10
	DD18	NAGRRGDL	8
	DD19	VPNLRGDLQVLA	12
Serie A20	A20FMDV1	YASARGDLAHLTTTHARHL	20
	A20LAP	GFTTGRRGDLATIHGMNRP	20
	A20FMDV2	NAVPNLRGDLQVLAQKVART	20
Serie p18-INK	P_FMDV2	VPNLRGDLQVLAQKVARTLP	20
	P_18INK	SAAARGDLEQLTSLQNNVN	20
	P_FMDV2-INK	VPNLRGDLQVLTSLQNNVN	20
	P_INK-FMDV2	SAAARGDLEQLAQKVARTLP	20
	P_INK-FMDV2-X	SAAARGDLEQLRQKVARTLP	20
	P_INK-FMDV2-XX	SAAARGDLETLRQKVARTLP	20
Péptidos D-valina	A20DV12	NAVPNLRGDLQvLAQKVART	20
	A20DV17	NAVPNLRGDLQvLAQKvART	20
	A20DV1217	NAVPNLRGDLQvLAQKVART	20
Péptidos biotinilados	B-A20FMDV1	Biotina-εAhx-YASARGDLAHLTTTHARHL	20
	B-A20FMDV1-Ran	Biotina-εAhx-ARHALTYRTGATHLAHTDSL	20
	B-A20LAP	Biotina-εAhx-GFTTGRRGDLATIHGMNRP	20
	B-A20LAP-Ran	Biotina-εAhx-PGRTFHRFGMGAITRTGNL	20
	B-A20FMDV2	Biotina-εAhx-NAVPNLRGDLQVLAQKVART	20
	B-A20FMDV2-Ran	Biotina-εAhx-RQLNVDALNVAGVRALKPTQ	20
Cíclicos de 1ª generación	DBD1	eykCPNLRGDLQVLAQKVCRTK	22
	B-DBD1	Biotin-εAhxeykCPNLRGDLQVLAQKVCRTK	22
	B-Ran	Biotina-εAhxeykCKLVGALQPDNVLQRCRTK	22
Cíclicos de 2ª generación	DBD2	CYVPNLRGDLQVLAQKVAKC	20
	B-DBD2	Biotina-εAhx-CYVPNLRGDLQVLAQKVAKC	20

## REIVINDICACIONES

1. Un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en una cualquiera de las siguientes secuencias de aminoácidos:
- 5 GFTTGRRGDLATIHGMNRPF;  
YTASARGDLAHLTTTHARHL; y  
NAVPNLRGDLQVLAQKVART.
- 10 2. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART.
3. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde el péptido está ciclado.
- 15 4. El péptido que tiene una secuencia de aminoácidos como se expone en la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el péptido está ciclado por enlaces disulfuro a través de restos de cisteína.
5. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido está unido a un resto detectable.
- 20 6. El péptido de acuerdo con la reivindicación 5, en donde el resto detectable es detectable por Captura de Imágenes por Resonancia Magnética (IRM), Espectroscopia de Resonancia Magnética (ERM), Tomografía Computarizada de Emisión de Fotones Individuales (TCEFI), Tomografía de Emisión de Positrones (TEP) o captura de imágenes óptica.
- 25 7. El péptido de acuerdo con las reivindicaciones 5 o 6, en el que el resto detectable es un resto radiactivo.
8. El péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el péptido está unido a un resto terapéuticamente activo.
- 30 9. El péptido de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el resto terapéuticamente activo es un agente antineoplásico.
10. El péptido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el péptido está biotinilado.
- 35 11. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el péptido de acuerdo con la reivindicación 1.
12. Un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11.
- 40 13. El péptido, la molécula de ácido nucleico o el vector de expresión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 para uso en terapia o en diagnóstico.
- 45 14. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 11 o el vector de expresión de acuerdo con la reivindicación 12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 50 15. Un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART, en donde el péptido está unido a un agente antineoplásico para uso en un método de tratamiento de un cáncer  $\alpha\beta 6$  positivo en un paciente.
- 55 16. El péptido para uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el péptido está biotinilado.
17. Un péptido, cuya secuencia de aminoácidos consiste en la secuencia de aminoácidos NAVPNLRGDLQVLAQKVART, en donde el péptido está unido a un resto detectable, para uso en un método de diagnóstico de un cáncer  $\alpha\beta 6$  positivo en un paciente.

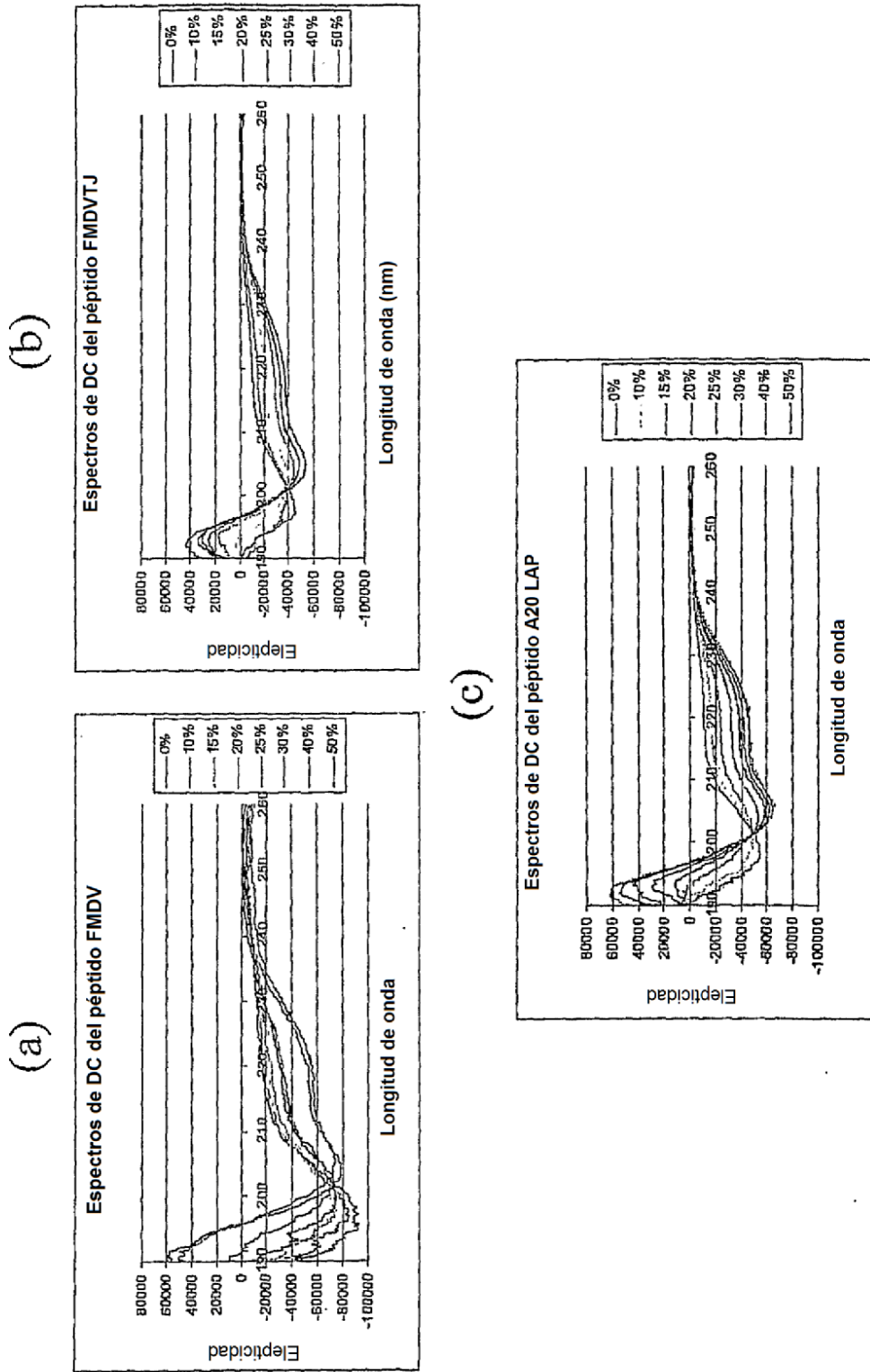


Figura 1

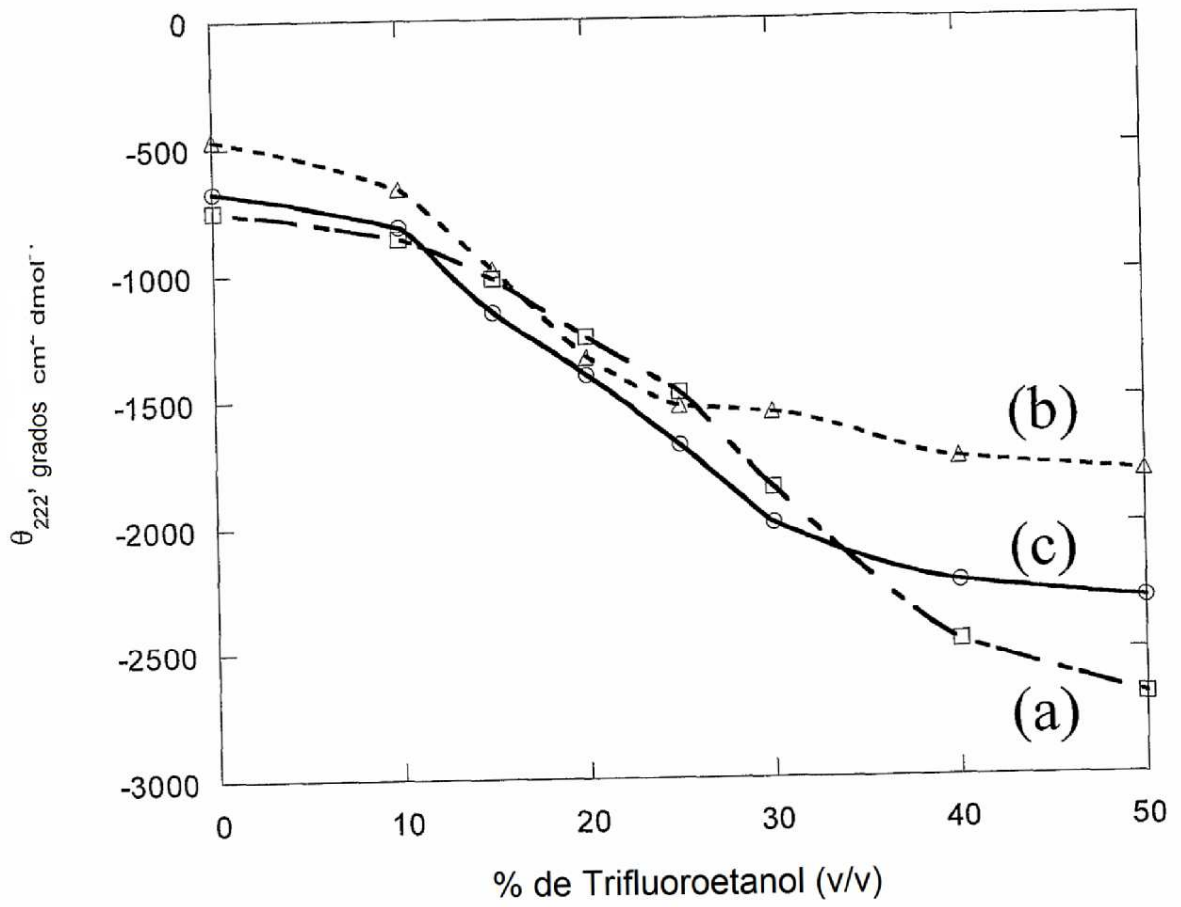


Figura 2

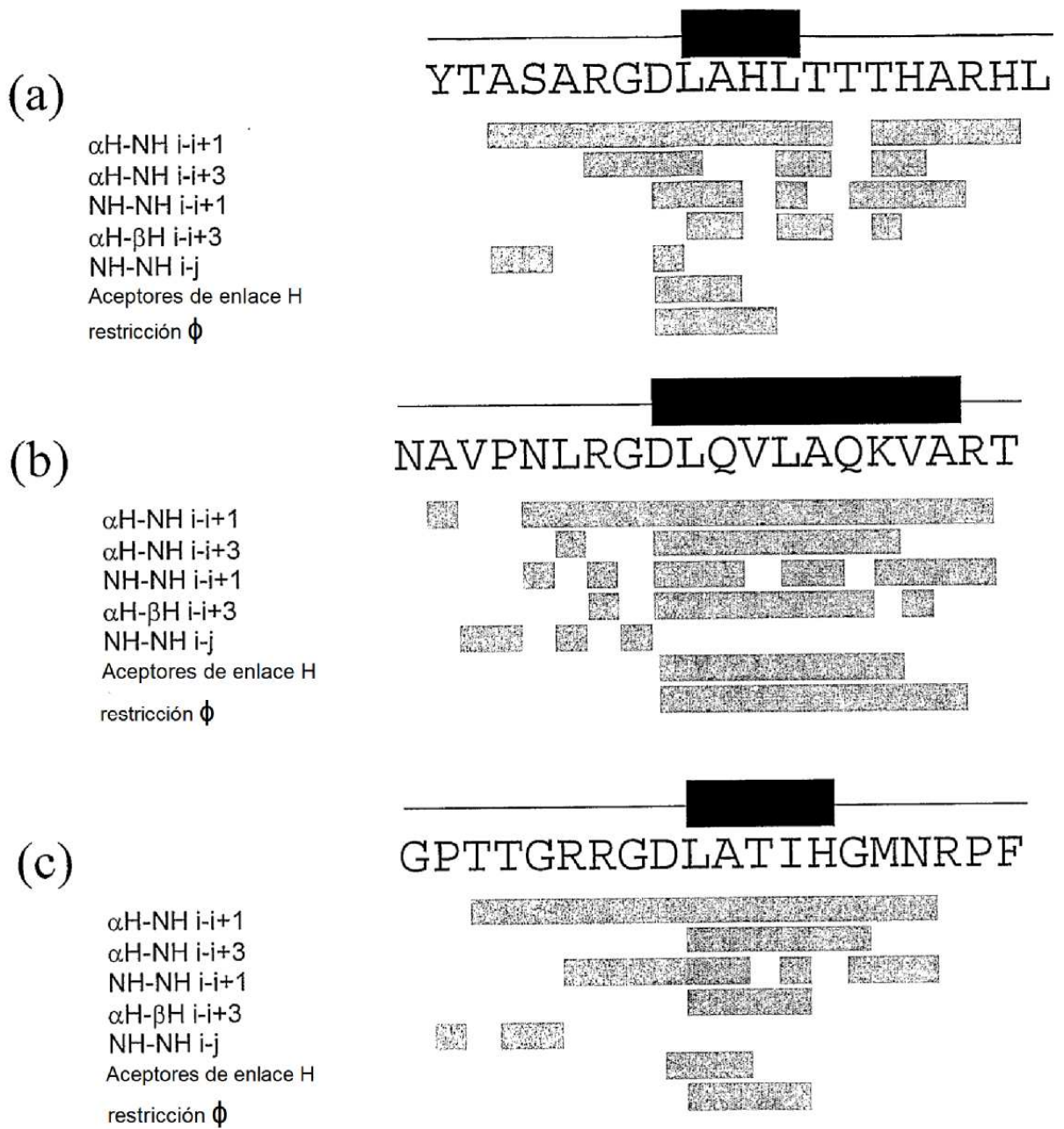


Figura 3

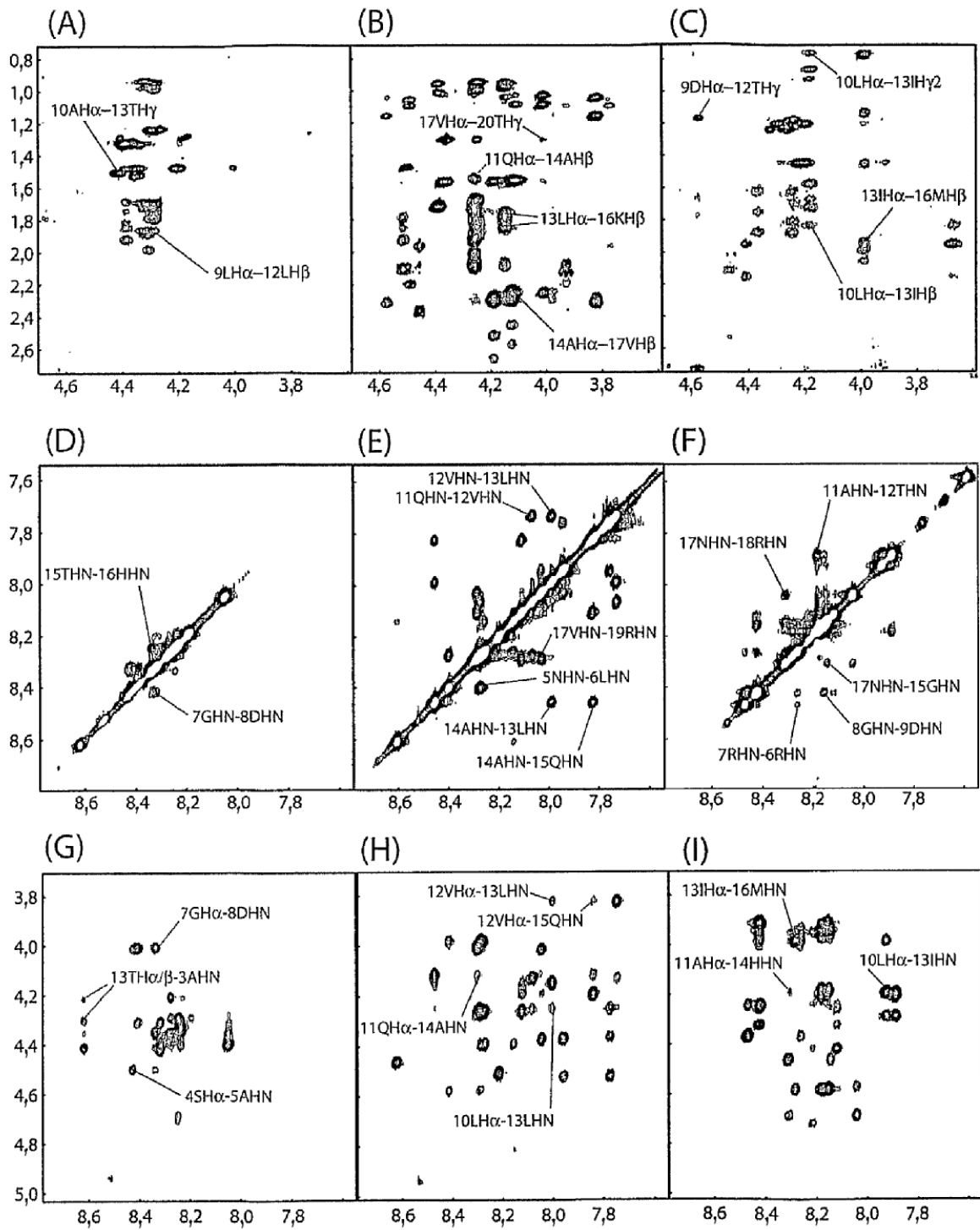


Figura 4

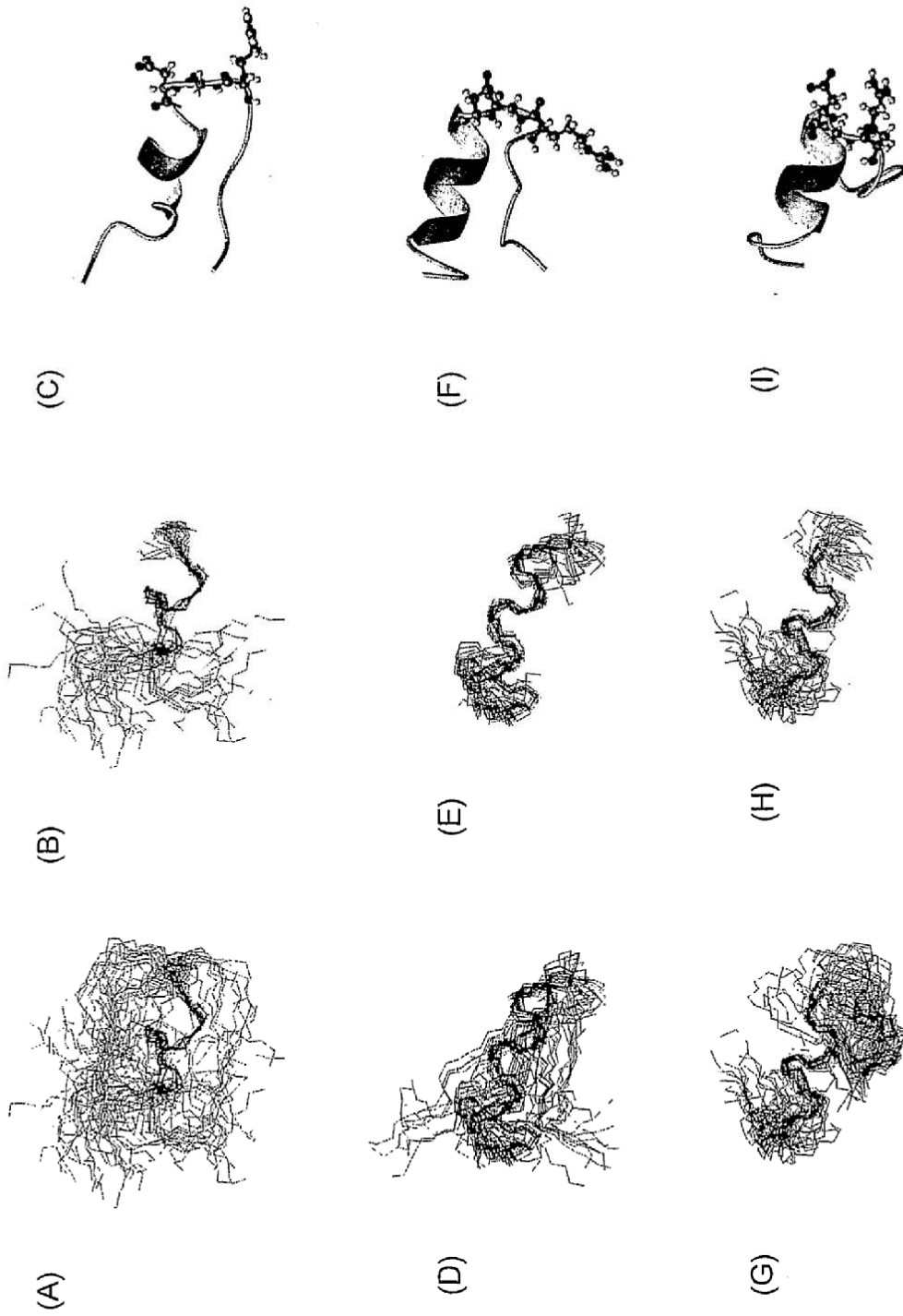


Figura 5

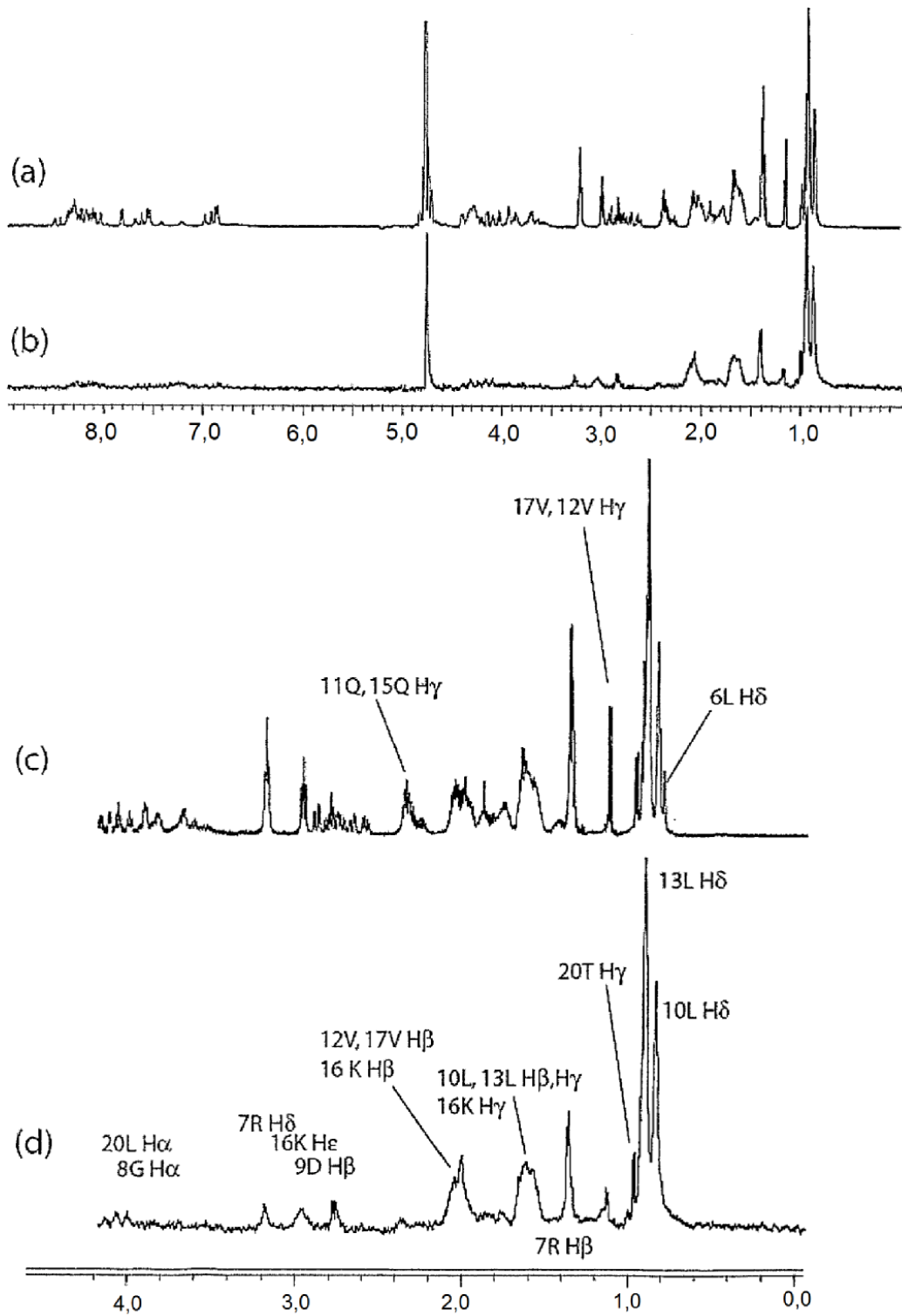


Figura 6



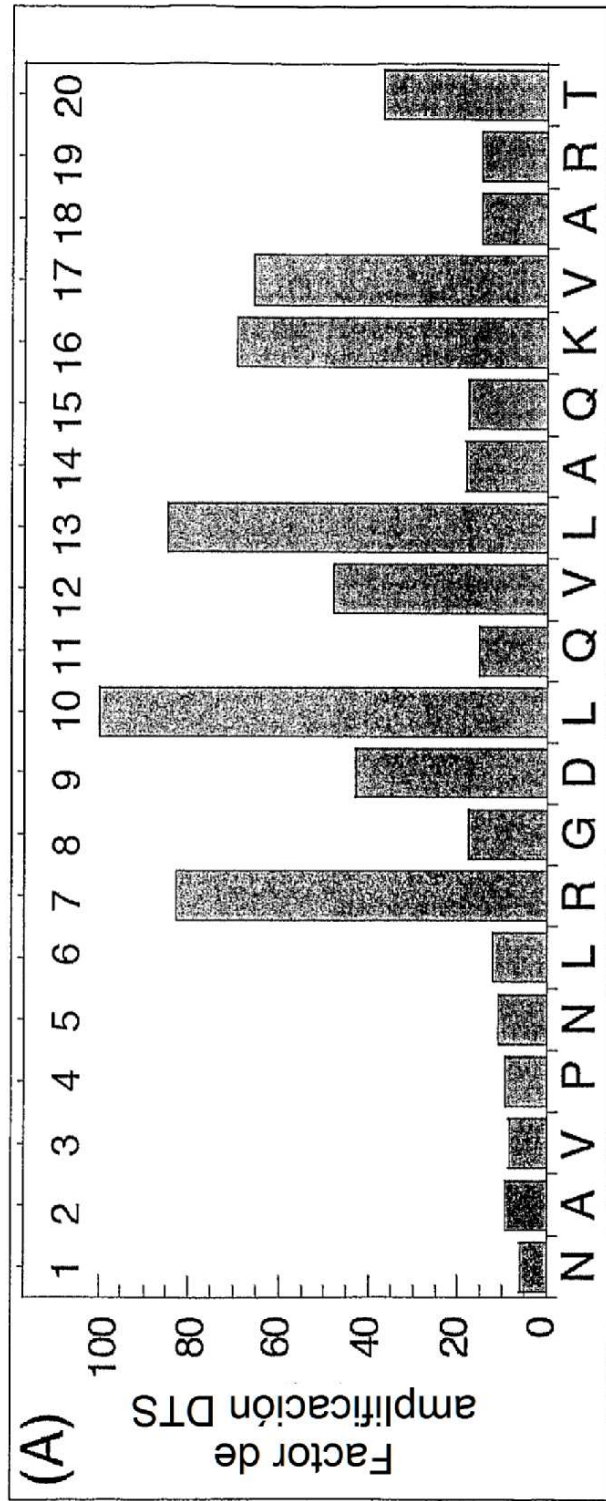


Figura 7

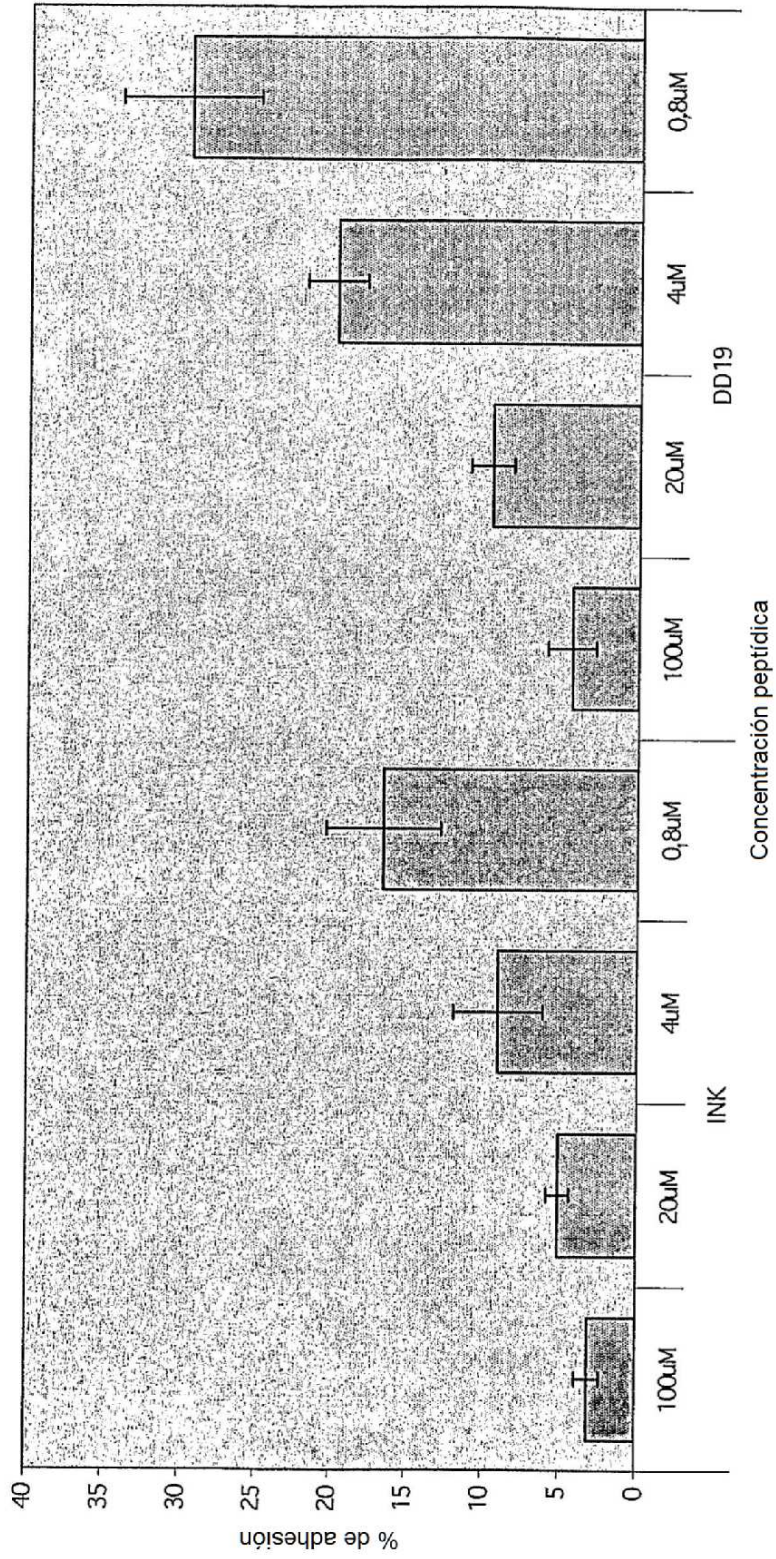


Figura 8

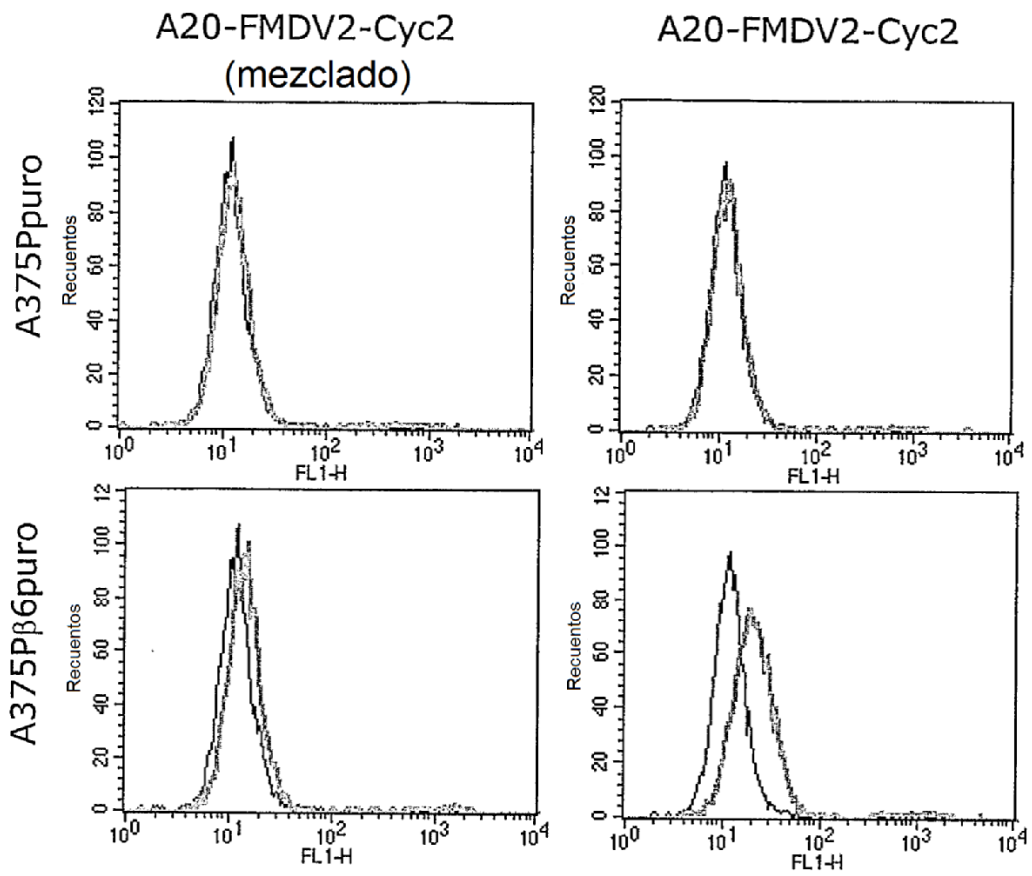


Figura 9

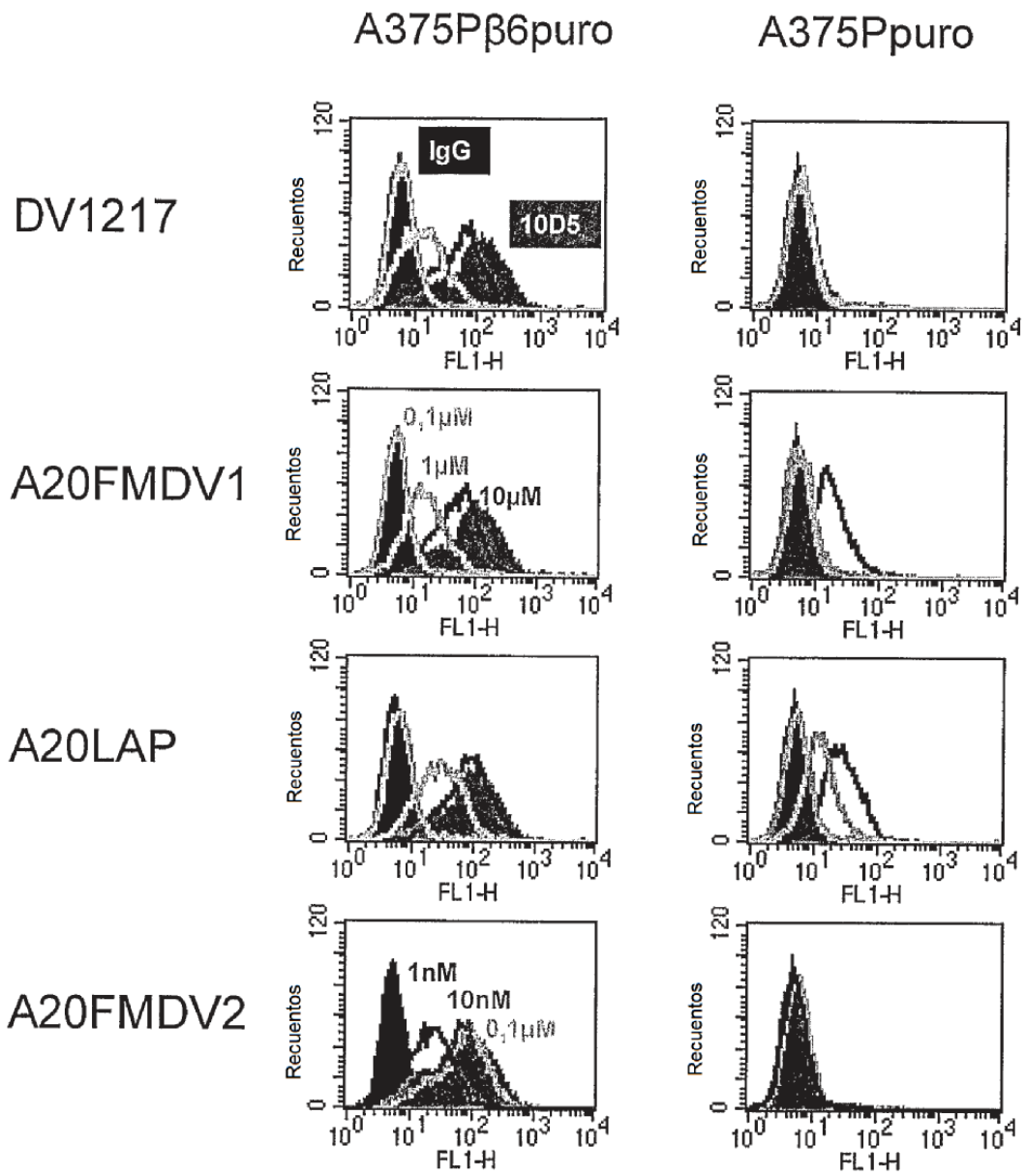


Figura 10