



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 343 424**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **05804812 .5**

(96) Fecha de presentación : **06.05.2005**

(97) Número de publicación de la solicitud: **1755660**

(97) Fecha de publicación de la solicitud: **28.02.2007**

(54) Título: **Procedimiento para potenciar o inhibir el factor de crecimiento I similar a la insulina.**

(30) Prioridad: **07.05.2004 US 569147 P**
28.02.2005 US 657151 P

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
30.07.2010

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
30.07.2010

(73) Titular/es:
The University of North Carolina at Chapel Hill
Office of Technology Development
Campus Box 4105, 308 Bynum Hall
Chapel Hill, North Carolina 27599-4105, US

(72) Inventor/es: **Clemmons, David, R. y**
Maile, Laura, A.

(74) Agente: **Carpintero López, Mario**

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

Procedimiento para potenciar o inhibir el factor de crecimiento I similar a la insulina.

5 **Campo de la invención**

La presente invención describe procedimientos para inhibir o potenciar la acción del factor de crecimiento I similar a la insulina (IGF-I).

10 **Antecedentes de la invención**

El IGF-I es una hormona polipeptídica pequeña que estimula el crecimiento de todo tipo de células. Debido a que el IGF-I tiene un espectro amplio de acción y estimula el crecimiento equilibrado de tejidos, se ha visto implicado en el desarrollo de varios cánceres humanos importantes y también en la aterosclerosis. El IGF-I actúa principalmente sobre células dependientes de anclaje que están incluidas en estos tejidos. Estas células poseen también una clase de receptores denominados receptores de integrina, que son responsables de su unión a moléculas de la matriz extracelular. Para que las células se dividan normalmente, la célula, en respuesta a estímulos extracelulares, tiene que sentir que sus receptores de integrina están unidos a moléculas de la matriz extracelular. Por lo tanto, la manipulación de la ocupación del ligando de receptores de integrina puede alterar procesos que son importantes en el desarrollo de enfermedades tales como la división y la migración celular.

Los estudios de los inventores han determinado que el IGF-I estimula la división de las células endoteliales y las del músculo liso. Han determinado, además, que estas células utilizan el receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ para comunicar al núcleo celular que están adheridas adecuadamente a la matriz extracelular con el fin de dividirse. La abundancia de una integrina específica (la integrina $\alpha V\beta 3$) está relativamente restringida en tejidos humanos y se expresa principalmente en células en crecimiento y, en particular, en células implicadas en el mantenimiento del sistema vascular, tales como las células del músculo liso y las endoteliales. Nuestros estudios han mostrado que la ocupación de este receptor de integrina con sus ligandos naturales tales como osteopontina, vitronectina y trombospodina es necesaria para que estas células respondan al IGF-I con un aumento de la síntesis de ADN y de la migración celular. La ocupación de un ligando bloqueante de esta integrina con antagonistas de desintegrina provoca la inhibición del crecimiento y de la migración celular. Nuestros estudios han mostrado que esta interacción cooperativa entre $\alpha V\beta 3$ y el receptor de IGF-I está mediada por regulación de la traslocación de dos moléculas señalizadoras específicas. Estas moléculas son 1) una proteína tirosina fosfatasa denominada SHP-2 y 2) una proteína señalizadora denominada Shc. En circunstancias normales la SHP-2 se localiza en el citoesqueleto y en compartimentos citosólicos de la célula. Tras la ocupación del ligando de $\alpha V\beta 3$, el dominio citoplásmico de la integrina $\beta 3$ experimenta la fosforilación de tirosina. La SHP-2 se transfiere a la membrana celular uniéndose a proteínas que se unen a los restos de tirosina fosforilados en $\beta 3$. Esta transferencia es necesaria para restringir la SHP-2 a la membrana donde capta otras moléculas señalizadoras importantes tales como Shc. La colocalización de SHP-2 con Shc y/o desfosforilación de moléculas señalizadoras dentro de la vía de señalización del IGF-I es necesaria para su activación y para la transmisión subsecuente de señales desde el receptor de IGF-I al núcleo. La activación de las dos vías principales de señalización intracelular que son necesarias para la activación del IGF-I (por ejemplo, las vías de la quinasa PI-3 y de la quinasa MAP) pueden inhibirse inhibiendo la transferencia de bien SHP-2 o bien Shc a la membrana. El sitio de restricción de SHP-2 y Shc es una proteína de membrana denominada SHPS-1. La SHPS-1 se fosforila en respuesta al IGF-I. Esta fosforilación es necesaria para la transferencia de SHP-2 y de Shc. La Shc se fosforila después de la transferencia a SHPS-1. La ocupación del ligando $\alpha V\beta 3$ bloqueante bloquea la transferencia de SHP-2 y Shc, inhibiendo así el crecimiento celular estimulado por el IGF-I.

Aunque se han descrito anteriormente procedimientos para inhibir la ocupación del ligando de la integrina $\alpha V\beta 3$, todos ellos usan una tecnología que inhibe la unión a un sitio de unión específico en el heterodímero $\alpha V\beta 3$ que se une a la secuencia arginina, glicina, aspargina (RGD) dentro de los ligandos de la MEC. La unión de antagonistas de $\alpha V\beta 3$ a este sitio está asociada a toxicidad y efectos secundarios farmacológicos. En consecuencia, existe la necesidad de nuevas vías para inhibir, o activar, la acción de IGF-I, que no utilicen el sitio de unión de $\alpha V\beta 3$ que se une a la secuencia RGD.

El documento WO9207871 describe oligopéptidos útiles para inhibir la replicación del VIH en individuos infectados víricamente. Vogel y col.; J. Cell Biol.) describen una especificidad de las integrinas novedosa.

Sumario de la invención

En la presente invención, los inventores han determinado que existe un segundo sitio de unión en $\alpha V\beta 3$ que se une a varias proteínas de la matriz extracelular. De modo más importante, hemos determinado que la potenciación de la ocupación del ligando de este dominio aumenta la ocupación del ligando de inhibición y señalización del IGF-I de este dominio específico e inhibe la acción de IGF-I. De modo importante, la ocupación del ligando de este segundo sitio de unión no estimula los eventos bioquímicos específicos que están estimulados por péptidos que se unen al sitio de unión RGD.

Un primer aspecto de la presente invención es un antagonista del sitio de unión de la proteína de la matriz extracelular de integrina $\alpha V\beta 3$ (o dominio de un bucle de cisteína incluido en los aminoácidos 177-184 de la subunidad $\beta 3$) (por ejemplo, un péptido antagonista o análogo del mismo o anticuerpo que se une al dominio del bucle de cisteína).

Una realización particular de lo anterior es un anticuerpo que se une específicamente al sitio de unión de la proteína de la matriz extracelular de integrina $\alpha V\beta 3$ (o dominio de bucle de cisteína) (por ejemplo, se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana; opcionalmente, pero preferentemente, no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y opcionalmente, pero preferentemente, se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina).

Un segundo aspecto de la presente invención es un agonista del sitio de unión de proteína de la matriz extracelular de integrina $\alpha V\beta 3$ (o dominio de bucle de cisteína) (por ejemplo, un péptido agonista o análogo del mismo).

Un aspecto adicional de la presente invención es una formulación farmacéutica que comprende un agente activo tal como se describe en el presente documento en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Un aspecto adicional de la presente invención son composiciones y medicamentos para inhibir la acción del IGF-1 en un sujeto con necesidad de ello, comprendiendo dicho sujeto un antagonista del sitio de unión de proteína de la matriz extracelular de integrina $\alpha V\beta 3$ (o dominio de bucle de cisteína). Por ejemplo, el sujeto puede estar afectado por un tumor (por ejemplo, tumores de cáncer de mama, tumores de cáncer de colon, tumores de cáncer de pulmón y tumores de cáncer de próstata) y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar el tumor. En algunas realizaciones, el tumor o los vasos sanguíneos que alimentan el tumor expresan receptores de $\alpha V\beta 3$.

En otro ejemplo, el sujeto está afectado por aterosclerosis (por ejemplo, aterosclerosis coronaria), y el antagonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la aterosclerosis. En algunas realizaciones, la aterosclerosis está caracterizada por células con lesión aterosclerótica que expresan receptores de $\alpha V\beta 3$. En otro ejemplo, el sujeto está afectado por osteoporosis, y el antagonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la osteoporosis.

En otro ejemplo, el sujeto está afectado por angiogénesis patológica (por ejemplo, vascularización de un tumor, incluidos tumores que expresan niveles de integrina $\alpha V\beta 3$ detectables por inmunohistoquímica y tumores que no expresan niveles de integrina $\alpha V\beta 3$ detectables por inmunohistoquímica), y el antagonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la angiogénesis patológica.

En otro ejemplo, el sujeto está afectado por diabetes (por ejemplo, diabetes tipo I, diabetes tipo II, retinopatía diabética, nefropatía diabética), y el antagonista se administra en una cantidad eficaz para tratar estas complicaciones diabéticas.

Un aspecto de la invención proporciona composiciones y medicamentos para tratar un tumor en un sujeto administrando un compuesto antineoplástico o radioterapia, comprendiendo la mejora la administración al sujeto de un antagonista del dominio de bucle de cisteína de integrina $\alpha V\beta 3$ (por ejemplo, y por consiguiente, potenciando la actividad del compuesto antineoplástico o radioterapia en el sujeto, inhibiendo la pérdida de hueso, o ambas cosas). Los sujetos pueden estar afectados por tumores tales como tumores de cáncer de mama, tumores de cáncer de colon, tumores de cáncer de pulmón y tumores de cáncer de próstata. En algunas realizaciones, el tumor expresa receptores de $\alpha V\beta 3$.

Otro aspecto más de la presente invención proporciona composiciones y medicamentos para potenciar la acción del IGF-1 en un sujeto con necesidad de ello, que comprenden un agonista del dominio de bucle de cisteína de integrina $\alpha V\beta 3$. Por ejemplo, el sujeto (por ejemplo, un lactante, niño o adolescente) puede estar afectado por crecimiento deficiente. En otro ejemplo, el sujeto (por ejemplo, un lactante) está afectado por vascularización retinal defectuosa, y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la vascularización retinal defectuosa. En otro ejemplo, el sujeto está afectado por una lesión isquémica (por ejemplo, enfermedad vascular periférica con claudicación, infarto de miocardio, etc.) y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la lesión isquémica. En otra realización, el sujeto está afectado con atrofia neuronal o insuficiencia en el desarrollo de procesos neuronales, y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la atrofia neuronal o facilitar el desarrollo de procesos neurales. En otra realización, el sujeto (por ejemplo, un adulto o anciano) está afectado por una fractura de cadera y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la fractura de cadera. En otra realización, el sujeto está afectado por una úlcera isquémica diabética, y el agonista se administra en una cantidad eficaz para tratar la úlcera isquémica diabética.

Otro aspecto de la presente invención es el uso de un agente activo tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para llevar a cabo un procedimiento para tratar las enfermedades/afecciones descritas en el presente documento.

Un procedimiento informático para identificar compuestos que modulan la actividad del IGF-1 comprende: (a) proporcionar una pluralidad de coordenadas (por ejemplo, al menos 20, 30 ó 40 coordenadas) para el dominio de bucle de cisteína (aminoácidos 177-184) de una integrina $\alpha V\beta 3$ en un ordenador; (b) proporcionar una estructura de un compuesto candidato al ordenador en una forma informáticamente legible; y (c) determinar si el compuesto se encaja en, o se acopla a, la cavidad de unión del dominio de bucle de cisteína o no, determinándose que es probable que un compuesto candidato que se encaja en, o se acopla a, la cavidad de unión module la actividad del IGF-1.

Un procedimiento informático para diseñar racionalmente un compuesto que modula la actividad del IGF-1, comprende: (a) generar un modelo informático legible de un sitio de unión de proteína de la matriz extracelular de una integrina $\alpha V\beta 3$; y después (b) diseñar en un ordenador con el modelo un compuesto que tenga una estructura y una distribución de carga compatible con el sitio de unión, teniendo el compuesto un grupo funcional que interactúe con el sitio de unión para modular la actividad de la acetil-CoA carboxilasa.

En una realización de la presente invención se proporciona un procedimiento para seleccionar compuestos por su actividad en la modulación de la activación celular por IGF-1, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto, preferentemente *in vitro*, un compuesto de ensayo con un sistema que comprende una integrina $\beta 3$; después (b) determinar si el compuesto de ensayo se une al bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de la integrina $\beta 3$; y después (c) identificar el compuesto de ensayo como activo en la modulación de la activación celular por IGF-1 si el compuesto se une al dominio de bucle de cisteína. En algunas realizaciones, el sistema de ensayo comprende integrina $\alpha V\beta 3$ en forma de complejo. La etapa de determinación puede realizarse usando cualquier medio adecuado, tal como la determinación de si el compuesto de ensayo inhibe la unión de un anticuerpo, agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento, que se une específicamente al dominio de bucle de cisteína o no. La integrina es preferentemente una integrina $\beta 3$ de mamífero, tal como una integrina $\beta 3$ humana o porcina.

En otra realización de la presente invención se proporciona un procedimiento para seleccionar compuestos por su actividad en la modulación de la activación celular por IGF-1, que comprende las etapas de: (a) poner en contacto, preferentemente *in vitro*, un compuesto de ensayo con un dominio de bucle de cisteína, siendo el dominio de bucle de cisteína un péptido que comprende los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$; después (b) determinar si el compuesto de ensayo se une al dominio de bucle de cisteína; (c) identificar el compuesto de ensayo como activo en la activación de la activación celular por IGF-1 si el compuesto se une al dominio de bucle de cisteína. El péptido puede constar de no más de 8, 10, 15 ó 20 aminoácidos, e incluye los aminoácidos 177-184 de la integrina $\beta 3$ en secuencia. En algunas realizaciones el dominio de bucle de cisteína está en solución, en algunas realizaciones el dominio de bucle de cisteína está inmovilizado sobre un soporte sólido (por ejemplo, como una columna de afinidad). La etapa de determinación puede realizarse determinando si el compuesto de ensayo inhibe la unión de un anticuerpo, agonista o antagonista, tal como se describe en el presente documento, que se une específicamente al dominio de bucle de cisteína o no. Nuevamente, la integrina es preferentemente una integrina $\beta 3$ de mamífero, tal como una integrina $\beta 3$ humana o porcina. En algunas realizaciones, el péptido comprende los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$.

La presente invención se explica con más detalle posteriormente en los ejemplos no limitantes.

35 Descripción detallada de las realizaciones preferentes

La presente invención se explica a continuación con más detalle.

En general, la presente invención abarca una tecnología para inhibir específicamente la ocupación del ligando de la integrina $\alpha V\beta 3$ a través de un sitio de unión alternativo que no conduce a la activación de eventos de señalización específicos intracelulares que pueden provocar toxicidad farmacológica. Se ha demostrado que la administración de antagonistas que inhiben la unión de vitronectina a este sitio de unión de $\alpha V\beta 3$ alternativo bloquea la activación estimulada por IGF-I de quinasa PI-3, quinasa MAP, la síntesis de ADN y la migración celular. Todos estos eventos son importantes para que el IGF-I estimule el crecimiento de células del músculo liso con lesiones ateroscleróticas. De forma similar, células del músculo liso intestinal que expresan esta integrina, inhibiendo así la acción de IGF-I en este tipo de células, podrían ser útiles en el tratamiento de enfermedades inflamatorias del intestino. Hemos demostrado, también, que esta tecnología es útil para inhibir la unión de ligando a este sitio en $\alpha V\beta 3$ que se expresa sobre la superficie de células endoteliales, por lo que antagonistas que inhiben la unión de ligando inhibirán probablemente la señalización de IGF-I y, por lo tanto, podrían ser tratamientos eficaces de retinopatía diabética y para angiogénesis que está asociada con formación de tumores. La invención implica el desarrollo de compuestos que inhiben la unión y pueden actuar como antagonistas competitivos para unirse a ligandos de la MEC que se unen a este sitio de unión en la integrina $\alpha V\beta 3$.

La presente invención ayuda a solucionar dos problemas principales en el desarrollo de fármacos que han inhibido el progreso en este campo. El primer problema implica al receptor de IGF-I. Aunque se han desarrollado anticuerpos monoclonales que inhiben la unión de ligando al receptor de IGF-I, el radio molecular del sitio de unión en el receptor es grande, por lo que inhibir la unión de ligando al receptor de IGF-I es un problema difícil en el desarrollo de fármacos, debido al tamaño de la molécula que será necesaria para inhibir totalmente la unión. Esta invención, por el contrario, inhibe la unión a un sitio de unión muy pequeño en la integrina $\alpha V\beta 3$. El sitio de unión real en la integrina misma está circunscrito por 8 aminoácidos y el péptido mínimo que es eficaz inhibiendo la unión es de 8 aminoácidos, por lo que el radio molecular del sitio de unión es sustancialmente más pequeño que el sitio de unión de ligando al receptor de IGF-I y es de un tamaño que pueden desarrollar antagonistas de peso molecular pequeño. Un segundo problema al antagonizar el receptor de IGF-I es que está presente de forma ubicua en todas las células. Por lo tanto, si se ha formulado una estrategia para inhibir la actividad del receptor de IGF-I y ésta se usa en combinación con terapias que estimulan la apoptosis (por ejemplo, un fármaco quimioterapéutico o antiangiogénico contra el cáncer) inhibiendo la acción del IGF-I en células normales, podría estar también asociado con una apoptosis amplia de tipos celulares normales tales como células del epitelio GI, células precursoras de la médula ósea y neuronas. Por lo tanto, la toxicidad de un agente administrado conjuntamente sería amplificado en gran medida. De modo similar,

la administración de antagonista del receptor de IGF-I, incluso sin la administración conjunta de un agente, es probable que provoque la inhibición de la síntesis de proteínas y, posiblemente, la apoptosis en tipos celulares normales. Por contra, este fármaco se dirige selectivamente a la integrina $\alpha V\beta 3$. Debido a que las integrinas $\alpha V\beta 3$ que se señalan cooperativamente con el receptor de IGF-I están presentes en células endoteliales vasculares y del músculo liso y sólo se expresan habitualmente en altas concentraciones en células proliferantes, el compuesto desarrollado es bastante selectivo, ya que se dirige específicamente a este tipo de células. Tipos celulares tales como células del epitelio GI y células precursoras de la médula ósea que no expresan abundante integrina $\alpha V\beta 3$ evitarán probablemente toxicidad. Por lo tanto, la invención soluciona el problema de ser capaz de desarrollar inhibidores de bajo peso molecular que inhiben la acción del IGF-I. En segundo lugar, soluciona el problema principal de toxicidad generalizada que sería patente con cualquier antagonista del receptor de anti-IGF-I. Tercero, soluciona el problema de la inhibición del receptor tirosina quinasa del IGF-I, que provoca la inhibición del receptor tirosina quinasa de insulina y el desarrollo de diabetes.

La potenciación de la acción del IGF-I proporciona efectos beneficiosos en diversos estados de la enfermedad. Se ha demostrado que determinadas enfermedades neurológicas, tales como esclerosis lateral amiotrófica, son parcialmente sensibles al IGF-I. Similarmente, ya que la toxicidad por glucosa en neuronas se inhibe por IGF-I, puede ser posible tratar enfermedades tales como neuropatía diabética con agentes que potencien la ocupación de ligando de $\alpha V\beta 3$, ya que éste se expresa ocasionalmente en neurogliocitos que proporcionan un soporte trófico para la regeneración de neuronas. También es posible que una molécula pequeña agonista dada con el IGF-I estimule la cicatrización de heridas o el crecimiento de las células endoteliales dentro de injertos vasculares.

A. Definiciones

Los sujetos que pueden tratarse mediante la presente invención incluyen tanto sujetos humanos con fines médicos y sujetos animales con fines veterinarios y de desarrollo y análisis de fármacos. Otros sujetos animales adecuados son, en general, mamíferos tales como primates, bovinos, ovinos, caprinos, porcinos, equinos, felinos, caninos, lagomorfos, roedores (por ejemplo, ratas y ratones), etc. Los sujetos humanos son los más preferentes. Los sujetos humanos incluyen fetos, recién nacidos, lactantes, niños y adultos.

Aminoácido, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que tiene un grupo carboxilo libre y un grupo amino libre no sustituido en el carbono α , que puede estar unido mediante enlace peptídico formando un agente activo peptídico tal como se describe en el presente documento. Los aminoácidos pueden ser estándar o no estándar, naturales o sintéticos, con ejemplos (y sus abreviaturas) que incluyen, pero no están limitados a:

Asp=D=ácido aspártico

Ala=A=alanina

Arg=R=arginina

Asn=N=asparagina

Cys=C=cisteína

Gly=G=glicina

Glu=E=ácido glutámico

Gln=Q=glutamina

His=H=histidina

Ile=I=isoleucina

Leu=L=leucina

Lys=K=lisina

Met=M=metionina

Phe=F=fenilalanina

Pro=P=prolina

Ser=S=serina

Thr=T=treonina

Trp=W=triptofano

Tyr=Y=tirosina

5 Val=V=valina

Orn=ornitina

Nal=2-naftilalanina

10 Nva=norvalina

Nle=norleucina

15 Thi=2-tienilalanina

Pcp=4-clorofenilalanina

Bth=3-benzotienilalanina

20 Bip=4,4'-bifenilalanina

Tic=tetrahidroisoquinolina-3-ácido carboxílico

25 Aib=ácido aminoisobutírico

Anb=.alfa-ácido aminonormalbutírico

Dip=2,2-difenilalanina

30 Thz=4-tiazolalanina

35 Todos los péptidos mencionados en el presente documento se han escrito de acuerdo con las convenciones habituales, en las que el aminoácido del extremo N está a la izquierda y el aminoácido del extremo C está a la derecha. Una línea corta (o ninguna línea) entre dos restos de aminoácido indica un enlace peptídico.

“Aminoácido básico” se refiere a cualquier aminoácido que está cargado positivamente en un pH de 6,0, incluidos, pero no limitados a, R, K y H.

40 “Aminoácido aromático” se refiere a cualquier aminoácido que tenga un grupo aromático en la cadena lateral acoplada al carbono alfa, incluidos, pero no limitados a, F, Y, W y H.

“Aminoácido hidrófobo” se refiere a cualquier aminoácido que tenga una cadena lateral hidrófoba acoplada al carbono alfa, incluidos, pero no limitados a I, L, V, M, F, W y C, del modo más preferente I, L y V.

45 “Aminoácido neutro” se refiere a un aminoácido no cargado, tales como M, F, W, C y A.

50 “Dominio de bucle de cisteína de la integrina $\alpha V\beta 3$ ” tal como se usa en el presente documento se refiere a una región específica en el receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ (particularmente receptores de mamíferos, por ejemplo, los encontrados endógenamente en el sujeto en tratamiento) que no había sido identificada previamente como una región que causaría la activación del receptor, y excluye específicamente el dominio de unión RGD. Los agonistas que se unen en esta región incluyen los que contienen una región de secuencia que se denomina comúnmente un dominio de unión de heparina. En general, el dominio o región de bucle de cisteína de $\alpha V\beta 3$ se encuentra entre aminoácidos en las posiciones 177 y 183 dentro de la subunidad $\beta 3$. Véase, por ejemplo, B. Vogel y col, A novel integrin specificity exemplified by binding of the alpha v beta 5 integrin to the basic domain of the HIV Tat protein and vitronectin., J. Cell Biol. 121: 461-8 (1993).

“IGF-I” tal como se usa en el presente documento significa factor de crecimiento similar a insulina 1.

60 “Tratar” tal como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de tratamiento o prevención que imparte un beneficio a un sujeto afectado por una enfermedad o en riesgo de desarrollar la enfermedad, incluidas la mejora en la condición del sujeto (por ejemplo, de uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, retraso en la aparición de síntomas o ralentización de la progresión de los síntomas, etc. Como tal, el término “tratamiento” incluye también tratamiento profiláctico del sujeto para prevenir la aparición de síntomas. Tal como se usan en el presente documento, “tratamiento” y “prevención” no significan necesariamente que impliquen la cura o la abolición completa de síntomas para cualquier tipo de tratamiento que imparte un beneficio a un paciente afectado por una enfermedad, incluidas mejora en la condición del paciente (por ejemplo, de uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc.

“Cantidad eficaz para el tratamiento”, “cantidad eficaz para tratar” o similares tal como se usan en el presente documento significan una cantidad del antagonista de la invención suficiente para producir un efecto deseable sobre un paciente afectado por cáncer, tumores, aterosclerosis, retinopatía, neuropatía diabética u otras afecciones médicas no deseables en las que el IGF-I induce un crecimiento celular anormal. Esto incluye la mejora de la condición del paciente (por ejemplo, de uno o más síntomas), retraso en la progresión de la enfermedad, etc.

“Farmacéuticamente aceptable”, tal como se usa en el presente documento, significa que el compuesto o composición es adecuado para su administración a un sujeto, con el fin de lograr los tratamientos descritos en el presente documento, sin efectos secundarios excesivamente deletéreos teniendo en cuenta la gravedad de la enfermedad y la necesidad de tratamiento.

“Anticuerpo” o “anticuerpos”, tal como se usan en el presente documento, se refieren a todos los tipos de inmunoglobulinas, incluidas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. El término “inmunoglobulina” incluye los subtipos de estas inmunoglobulinas, tales como IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, etc. De estas inmunoglobulinas, IgM e IgG son preferentes, e IgG es particularmente preferente. Los anticuerpos pueden ser originarios de cualquier especie, incluidas (por ejemplo) ratón, rata, conejo, caballo o ser humano, o pueden ser anticuerpos quiméricos o humanizados. El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, incluye fragmentos de anticuerpo que conservan la habilidad de unirse a un antígeno diana, por ejemplo, fragmentos de Fab, F(ab')₂, Fv, y los fragmentos correspondientes obtenidos a partir de anticuerpos diferentes al IgG. Tales fragmentos se producen también mediante técnicas conocidas. En algunas realizaciones, los anticuerpos pueden estar acoplados o conjugados a un grupo detectable o un grupo terapéutico de acuerdo con técnicas conocidas.

“Grupo terapéutico” significa cualquier grupo terapéutico adecuado, incluidos, pero no limitados a, radionucleidos, agentes quimioterapéuticos y agentes citotóxicos.

“Radionucleido”, tal como se describe en el presente documento, puede ser cualquier radionucleido adecuado para suministrar una dosis terapéutica de radiación a un tumor o célula cancerosa, incluidos, pero no limitados a ²²⁷Ac, ²¹¹At, ¹³¹Ba, ⁷⁷Br, ¹⁰⁹Cd, ⁵¹Cr, ⁶⁷Cu, ¹⁶⁵Dy, ¹⁵⁵Eu, ¹⁵³Gd, ¹⁹⁸Au, ¹⁶⁶Ho, ^{113m}In, ^{115m}In, ¹²³I, ¹⁸⁹Ir, ¹⁹⁴Ir, ⁵²Fe, ⁵⁵Fe, ⁵⁹Fe, ¹⁷⁷Lu, ¹⁰⁰Pd, ³²P, ²²⁶Ra, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁵³Sm, ⁴⁶Sc, ⁷²Se, ⁷⁵Se, ¹⁰⁵Ag, ⁸⁹Sr, ³⁵S, ¹⁷¹Ta, ^{117m}Sn, ¹²¹Sn, ¹¹⁶Yb, ¹⁶⁹Tb, ⁹⁰Y, ²¹²Bi, ¹¹⁹Sb, ¹⁹⁷Hg, ⁹⁷Ru, ¹⁰⁰Pd, ^{101m}Rh y ²¹²Pb.

“Agente quimioterapéutico”, tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no está limitado a, metotrexato, daunomicina, mitomicina, cisplatina, vincristina, epirubicina, fluorouracilo, verapamilo, ciclofosfamida, arabinósido de citosina, aminopterina, bleomicina, mitomicina C, democolcina, etopósido, mitramicina, clorambucilo, melfalán, daunorubicina, doxorubicina, tamoxifeno, paclitaxel, vincristina, vinblastina, camptotecina, actinomicina D y citarabina.

“Agente citotóxico”, tal como se usa en el presente documento, incluye, pero no está limitado a, ricina (o más particularmente a la cadena A de la ricina), aclacinomicina, toxina de la difteria. Monensina, verrucarina A, abrina, alcaloides de la vinca, tricotecenos y exotoxina A de pseudomonas.

“Grupo detectable”, tal como se usa en el presente documento, incluye cualquier grupo detectable adecuado, tal como radiomarcadores (por ejemplo ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I, etc.), marcadores enzimáticos (por ejemplo peroxidasa de rábano rusticano, fosfatasa alcalina, etc.), marcadores fluorescentes (por ejemplo, fluoresceína, proteína fluorescente verde, etc.), etc., tal como se usan de acuerdo con técnicas conocidas.

“Modulador”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto que se une al sitio de unión indicado (por ejemplo, se une específicamente al bucle de cisteína de $\beta 3$) y es un agonista o antagonista, o se une a un sitio adyacente y afecta, por ello, a la unión al bucle de cisteína del dominio $\beta 3$ (por ejemplo, un inhibidor alostérico).

Los solicitantes pretenden específicamente que todas las referencias de patentes de Estados Unidos citadas en el presente documento se incorporen al mismo por referencia en su totalidad.

B. Agonistas y antagonistas

Los agonistas y antagonistas que pueden usarse como agentes activos en la realización de la presente invención pueden estar en forma de una variedad de estructuras diferentes, tal como se describe adicionalmente a continuación. En general, el agonista se une a una región específica del receptor de integrina $\alpha V\beta 3$ que no ha sido identificada previamente como una región que provocaría la activación del receptor. Todos los agonistas que hemos determinado que se unen en esta región contienen una región de secuencia que se denomina comúnmente dominio de unión de heparina. Este dominio de unión de heparina está presente en 5 ligandos que hemos encontrado hasta la fecha que se unen a esta región de $\alpha V\beta 3$. La documentación de que se unen a una región específica de $\alpha V\beta 3$ se ha proporcionado mediante dos tipos de experimentos, tal como se describe posteriormente en el Ejemplo 1.

La estructura de ligando esencial de un grupo preferente de agonistas está comprendida, generalmente, por 8 aminoácidos. Los cinco ligandos que se ha demostrado que se unen son factor de crecimiento de tejido conectivo, factor epidérmico de unión a heparina, vitronectina, osteopontina y proteína de unión similar a la insulina 5 (IGFBP-5) (SEQ ID N°: 1). Cada uno de estos ligandos tiene la secuencia siguiente: BBXXABBB (SEQ ID N°: 2) (B= básico,

A= aromático, X= cualquiera). Usando la mutagénesis de estos péptidos, hemos realizado múltiples experimentos para determinar que los restos que están subrayados son absolutamente necesarios para la actividad. Las sustituciones con alanina de estos 3 restos básicos dieron como resultado entre un 70 y un 90% de reducción de la afinidad de unión de estos péptidos para esta región de $\alpha V\beta 3$. Hemos determinado, también, que péptidos sintéticos con esta estructura (es decir, la región de vitronectina contiene la siguiente secuencia ³⁶⁷KKQRFRRH³⁷⁴ (SEQ ID N°: 3) provocan la estimulación total de la fosforilación de $\beta 3$, la transferencia de SHP-2 a moléculas señalizadoras cadena abajo y la potenciación de la activación del receptor de IGF-I en respuesta al IGF-I. Hemos demostrado que péptidos sintéticos que poseen esta estructura tienen actividad biológica total y potencian el efecto del IGF-I en la síntesis de ADN, la migración celular y la síntesis de proteínas. La mutagénesis de la única arginina a alanina en la posición 374 en la vitronectina causa no sólo un 70% de disminución en la unión, sino también la reducción correspondiente de la actividad biológica tal como se evalúa por medio de los tres parámetros indicados anteriormente. De manera similar, mutaciones de alanina de los primeros restos básicos causan pérdida de la actividad biológica.

Con respecto a los antagonistas, los inventores han determinado que dejando los dos primeros restos intactos, es decir, dejando a ambos básicos, y continuando con la adición de un resto hidrófobo en la posición 374 o una serina fosforilada en la posición 374, se tiene como resultado un antagonista competitivo: es decir, estos péptidos conservan alguna capacidad de unión a $\alpha V\beta 3$, pero no activan la fosforilación de $\beta 3$ y/o la transferencia de SHP-2 y no potencian la fosforilación del receptor estimulada por el IGF-I o la división celular. Puede prepararse también un antagonista usando secuencias de otros ligandos que se sabe que se unen a este dominio $\beta 3$. Por ejemplo, si el dominio de unión de heparina de IGFBP-5 (SEQ ID N°: 1) se usa y existe una sustitución de lisina 208 por alanina, este péptido se une al $\beta 3$, pero inhibe al acción del IGF-I. Estos datos se describen con mayor detalle a continuación en el Ejemplo 2.

Posteriormente se dan ejemplos más particulares de agentes con actividad agonista o antagonista.

Agonistas. Agonistas que pueden usarse para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no están limitados a, compuestos de Fórmula I:



(SEQ ID N°: 4)

en la que:

A¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

A² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A³ es cualquier aminoácido;

A⁴ es cualquier aminoácido;

A⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A⁸ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

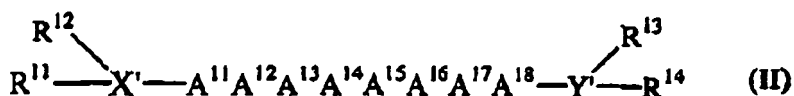
X es una cadena de 0 a 5 aminoácidos (cualesquiera), inclusive, en la que el extremo N de uno de los mismos está opcionalmente unido a R¹ y R²;

Y es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, inclusive, en la que el extremo C de uno de los mismos está opcionalmente unido a R³ y R⁴;

R¹, R², R³ y R⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12 (por ejemplo, metilo), arilo C6-C18 (por ejemplo, fenilo, naftalenoacetilo), acilo C1-C12 (por ejemplo, formilo, acetilo y miristolilo), aralquilo C7-C18 (por ejemplo, bencilo) y alcarilo C7-C18 (por ejemplo, p-metilfenilo);

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

Antagonistas que pueden usarse para llevar a cabo la presente invención incluyen, pero no están limitados a, compuestos de Fórmula II



(SEQ ID N°:5)

en la que:

A¹¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹³ es cualquier aminoácido;

A¹⁴ es cualquier aminoácido;

A¹⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A¹⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁸ es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos (cualesquiera), inclusive, en la que el extremo N de uno de los mismos está opcionalmente unido a R¹¹ y R¹²;

Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, inclusive, en la que el extremo C de uno de los mismos puede ser fosfoserina o está opcionalmente unido a R¹³ y R¹⁴;

R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12 (por ejemplo, metilo), arilo C6-C18 (por ejemplo, fenilo, naftalenoacetilo), acilo C1-C12 (por ejemplo, formilo, acetilo y miristolilo), aralquilo C7-C18 (por ejemplo, bencilo) y alcarilo C7-C18 (por ejemplo, p-metilfenilo);

o una sal farmacéuticamente aceptable de los mismos.

En las fórmulas I y II del presente documento, los símbolos X, Y, Z, A¹, A², A¹², y similares representan un resto de aminoácido, es decir, =N-CH(R)-CO- cuando está en el extremo N, o -NH-CH(R)-CO-N= cuando está en el extremo C, o -NH-CH(R)-CO- cuando no está ni en el extremo N ni en el extremo C, donde R denota la cadena lateral (o grupo de identificación) de un aminoácido o su resto. Además, cuando el resto de aminoácido es ópticamente activo, la configuración deseada es la forma L, a menos que se indique expresamente la forma D.

Los péptidos agonistas o antagonistas de la presente invención, tales como los compuestos de Fórmula I y Fórmula II anteriores, tienen preferentemente una longitud de 8 a 11, 14 ó 20 aminoácidos, y pueden tener un peso molecular de desde 600, 800 ó 900 hasta aproximadamente 1.200 ó 2.000.

Fabricación de péptidos. Pueden fabricarse péptidos de la presente invención de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica. Usando técnicas aceptadas de síntesis química, los péptidos pueden construirse bien a partir del extremo N o bien, más típicamente, del extremo C, usando bien aminoácidos simples o bien péptidos preformados que contienen dos o más restos de aminoácidos. Técnicas particulares para sintetizar péptidos incluyen (a) procedimientos clásicos en los que se aíslan péptidos de tamaño creciente antes de cada adición de aminoácido o péptido preformado, y (b) síntesis de péptidos en fase sólida, en la que los péptidos se construyen unidos a una resina tal como una resina de Merrifield. Generalmente, en estos procedimientos de síntesis, los grupos de los aminoácidos estarán en forma protegida usando grupos protectores estándar tales como t-butoxicarbonilo. Si es necesario, estos grupos protectores se retiran una vez completada la síntesis. Pueden introducirse otras modificaciones durante o después de la síntesis del péptido. Pueden producirse péptidos de la presente invención mediante procedimientos de ADN recombinantes tal como se conoce en la técnica.

Enlaces pseudopeptídicos. En otro aspecto más, la invención proporciona análogos de Fórmula I o Fórmula II que tengan al menos un enlace pseudopeptídico entre los restos de aminoácido de los mismos. Por “enlace pseudopeptídico” se quiere decir que el átomo de carbono que participa en el enlace entre dos restos se reduce de un carbono carbonílico a un carbono metilénico, es decir, CH₂-NH; o menos preferentemente, que el de CO-NH se reemplaza con uno cualquiera de entre CH₂-S, CH₂-CH₂, CH₂-O o CH₂-CO. Además, tales análogos con enlaces pseudopeptídicos pueden usarse para formar análogos diméricos tal como se ha descrito anteriormente. Una descripción detallada sobre la química de enlaces pseudopeptídicos se da en Coy y col. (1988) Tetrahedron 44: 835-841.

Análogos. Los agentes activos incluyen análogos de los compuestos de Fórmula I y Fórmula II descritos en el presente documento. Un “análogo” es un compuesto químico similar en estructura a un primer compuesto y que tiene una acción fisiológica similar u opuesta al primer compuesto. Son análogos los compuestos que, aunque no tengan secuencias de aminoácidos de la proteína o el péptido correspondiente, son capaces de actuar como agonistas o antagonistas de un modo sustancialmente similar a los compuestos activos descritos en el presente documento. Tales análogos pueden ser análogos peptídicos o no peptídicos.

En moléculas de proteínas o de péptidos que interactúan con un receptor (específicamente, el dominio de bucle de cisteína de $\alpha V\beta 3$) la interacción entre la proteína o el péptido y el receptor tiene lugar, generalmente, en sitios accesibles desde la superficie de una molécula tridimensional estable. Disponiendo restos del sitio de unión críticos en una conformación apropiada, pueden generarse y sintetizarse análogos peptídicos que imitan las características de superficie esenciales de los péptidos descritos en el presente documento de acuerdo con técnicas conocidas. Se conocen procedimientos para determinar la estructura peptídica tridimensional y análogos de la misma, que se denominan a veces “técnicas racionales de diseño de fármacos”. Véanse, por ejemplo, el documento de patente de Estados Unidos N° 4,833,092 de Geysen; el documento de patente de Estados Unidos N° 4,859,765 de Nestor; el documento de patente de Estados Unidos N° 4,853,871 de Pantoliano; el documento de patente de Estados Unidos N° 4,863,857 de Blalock.

Véase también Waldrop, Science 247, 28029 (1990); Rossmann, Nature 333, 392 (1988); Weis y col. Nature 333, 426 (1988); James y col. Science 260, 1937 (1993) (desarrollo de compuestos peptidomiméticos de benzodiazepina basados en la estructura y función de ligandos tetrapeptídicos).

Pueden generarse miméticos no proteicos de acuerdo con técnicas conocidas tales como el uso de modelación gráfica por ordenador para diseñar moléculas orgánicas no peptídicas capaces de agonizar o antagonizar la unión de un modo similar a los agentes activos que se describen en el presente documento. Véase, por ejemplo Knight, BIO/Technology 8, 105 (1990); Itzstein y col., Nature 363, 418 (1993) (inhibidores peptidomiméticos de la enzima del virus de la gripe, sialidasa) Itzstein y col., Nature 363, 418 (1993), modelado de la estructura cristalina de la proteína del receptor de sialidasa usando datos de estudios cristalográficos con rayos X y desarrollo de un inhibidor que se uniría a sitios activos del modelo; el uso de datos de resonancia magnética nuclear (RMN) para modelación es también conocido en la técnica, y tales técnicas pueden usarse para llevar a cabo la invención actual. Véase también Lam y coll., Science 263, 380 (1994) con relación al diseño racional de ureas cíclicas no peptídicas biodisponibles que funcionan como inhibidores de la proteasa del VIH. Lam y col. Uso de información de estudios por rayos X de estructuras cristalinas de complejos inhibidores de la proteasa del VIH para diseñar inhibidores no peptídicos.

Grupos hidrófilos. Los agentes activos de la presente invención pueden incluir grupos hidrófilos acoplados a los mismos, en particular acoplados covalentemente a los mismos, para facilitar la administración de los mismos, o mejorar la estabilidad, de acuerdo con técnicas conocidas (por ejemplo, al extremo N del péptido). Grupos hidrófilos adecuados son, típicamente, grupos polioles u óxido de polialquileno, incluidos polioles lineales o de cadena ramificada, con ejemplos particulares que incluyen, pero no están limitados a, poli(propilenglicol), polietileno-polipropilenglicol o poli(etilenglicol). Los grupos hidrófilos pueden tener un peso molecular numérico medio de 20.000 a 40.000 ó 60.000. Se conocen grupos hidrófilos adecuados y el modo de acoplamiento de los mismos y se describen en, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 4,179,337; 5,681,811; 6,524,570; 6,656,906; 6,716,811 y 6,720,306. Por ejemplo, pueden pegarse agonistas o antagonistas peptídicos usando un resto único de polietilenglicol de peso molecular 40.000 que se une al péptido.

Sales farmacéuticas. Los compuestos activos desvelados en el presente documento pueden, como se ha indicado anteriormente, prepararse y administrarse en forma de sus sales farmacéuticamente aceptables. Sales farmacéuticamente aceptables son sales que conservan la actividad biológica deseada del compuesto progenitor y no tienen excesivos efectos toxicológicos. Ejemplos de dichas sales son (a) sales de adición de ácidos formadas con ácidos inorgánicos, por ejemplo ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido sulfúrico, ácido fosfórico, ácido nítrico y similares; y sales formadas con ácidos orgánicos tales como, por ejemplo, ácido acético, ácido oxálico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido glucónico, ácido cítrico, ácido málico, ácido ascórbico, ácido benzoico, ácido tánico, ácido palmítico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácido naftalenosulfónico, ácido metanosulfónico, ácido p-toluenosulfónico, ácido naftalenodisulfónico, ácido poligalacturónico y similares; (b) sales formadas a partir de aniones elementales tales como cloruro, bromuro y yoduro y (c) sales derivadas de bases, tales como sales de amonio, sales de metal alcalino tales como las de sodio y potasio, sales de metal alcalinotérreo tales como las de calcio y magnesio, y sales como bases orgánicas tales como diciclohexilamina y N-metil-D-glucamina.

C. Formulaciones y administración

Para la administración, en los procedimientos de uso que se describen a continuación, el agente activo se mezclará, generalmente, antes de la administración, con una sustancia vehículo no tóxica, farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, solución salina normal o solución salina tamponada con fosfato) y se administrará usando cualquier procedimiento médicamente apropiado, por ejemplo, administración parenteral (por ejemplo, inyección) tales como inyección intravenosa o intraarterial.

Los agentes activos descritos anteriormente pueden formularse para su administración en un vehículo farmacéutico de acuerdo con técnicas conocidas. Véase, por ejemplo, Remington, *The Science And Practice of Pharmacy* (9ª Ed. 1995). En la preparación de una formulación farmacéutica de acuerdo con la invención, el compuesto activo (incluidas las sales fisiológicamente aceptables del mismo) se mezcla, típicamente, con, entre otras cosas, un vehículo aceptable. El vehículo debe, ciertamente, ser aceptable, en el sentido de ser compatible con cualquier otro ingrediente de la formulación y no debe ser deletéreo para el paciente. El vehículo puede ser un líquido y se formula, preferentemente, con el compuesto como una formulación de dosificación unidad que puede contener desde el 0,01 o el 0,5% al 95 o el 99% en peso del compuesto activo.

Las formulaciones de la presente invención adecuadas para administración parenteral comprenden soluciones de inyección acuosas y no acuosas del compuesto activo, cuyas preparaciones son, preferentemente, isotónicas con la sangre del receptor deseado. Estas preparaciones pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen la formulación isotónica con la sangre del receptor deseado.

Los agentes activos pueden administrarse por medio de cualquier procedimiento médicamente apropiado, por ejemplo, administración intravenosa o intraarterial normal. En determinados casos, puede ser deseable la administración directa al vaso aterosclerótico.

Pueden proporcionarse agentes activos en forma liofilizada en un contenedor aséptico estéril o pueden proporcionarse en una formulación farmacéutica en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como agua estéril exenta de pirógeno o solución salina fisiológica estéril exenta de pirógeno.

La dosificación del agente activo para los procedimientos de uso que se describen a continuación dependerá, entre otras cosas, de la condición del sujeto, la categoría o tipo particular de cáncer que se trata, la vía de administración, la naturaleza del agente terapéutico que se usa y la sensibilidad del tumor a un agente terapéutico particular. Por ejemplo, la dosis será, típicamente, de aproximadamente 1 a 10 microgramos por kilogramo de peso corporal del sujeto. La dosis específica del anticuerpo no es crítica, mientras sea eficaz para producir algunos efectos beneficiosos en algunos individuos dentro de la población afectada. En general, la dosis puede ser tan baja como aproximadamente 0,05, 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 ó 50 microgramos por kilogramo de peso corporal del sujeto, o inferior, y tan alta como aproximadamente 5, 10, 20, 50, 75 ó 100 microgramos por kilogramo de peso corporal del sujeto, o incluso superior.

D. Procedimientos de uso: Agonistas

Pueden usarse agentes activos agonistas de la presente invención para una variedad de enfermedades diferentes. Un estado morboso diana preferente sería el de niños de estatura corta que segregan cantidades normales de hormona del crecimiento. Hay niños que, tras un análisis diagnóstico, no puede verificarse que tengan deficiencia de hormona del crecimiento, pero tienen baja estatura. Hay una cantidad razonable de evidencias que muestran que son relativamente resistentes a la acción de la hormona del crecimiento y del IGF-I. Por lo tanto, un factor que potencia la acción del IGF-I debería potenciar el crecimiento de estos niños y ya que su secreción de IGF-I permanece intacta, no debería necesitarse otra terapia para la optimización del crecimiento.

Otra aplicación es para sujetos afectados por vascularización retinal defectuosa. Niños prematuros que están gravemente desnutridos y no sintetizan el IGF-I adecuado, en particular en la parte posterior de la retina. Esto causa una vascularización de la retina deficientemente desarrollada que puede derivar en ceguera o en agudeza visual extremadamente disminuida. Hay un periodo crítico entre las semanas 26 y 29 en las que se precisa la acción del IGF-I. Aunque la causa de la acción defectuosa del IGF-I no ha sido establecida firmemente, un factor que potencia la acción del IGF-I en las células endoteliales vasculares de la retina debería proporcionar un beneficio terapéutico ya que estas células portan receptores de $\alpha V\beta 3$.

Otra aplicación es facilitar el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales después de una lesión isquémica. Tanto la enfermedad vascular periférica con claudicación como el infarto de miocardio están asociados con el desarrollo de vasos sanguíneos colaterales durante el periodo de sanación. La capacidad de formar colaterales determina en gran medida la capacidad de recuperar a partir de los mismos lesiones isquémicas. Aunque se ha demostrado que varios factores tales como el factor de crecimiento endotelial vascular potencian la colateralización, ninguno ha demostrado ser clínicamente eficaz en pacientes. Un uso potencial de este compuesto sería para estimular células del músculo liso y endoteliales durante el proceso de desarrollo de vasos colaterales.

Otra aplicación implica el tratamiento o inhibición de atrofia neuronal e insuficiencia en el desarrollo de procesos neurales. Esto se aplica específicamente a demencias degenerativas y a neuropatías diabéticas.

Otra aplicación más es tratar fracturas de cadera en ancianos. Se ha demostrado que la infusión de altas concentraciones de IGF-I acelera la consolidación de fracturas de cadera en ancianos. La disponibilidad de este agente posibilitaría inyectarlo directamente en el sitio de la fractura con un péptido que potencie, presumiblemente, la actividad osteoblástica en presencia del IGF-I adecuado. El agonista puede administrarse con o sin IGF-I para mejorar la consolidación de la fractura de cadera.

Otra aplicación es tratar úlceras isquémicas diabéticas. En modelos animales diabéticos, se ha demostrado que la adición de IGF-I con una de sus proteínas de unión a heridas da como resultado la mejora en la cicatrización de heridas. Ya que en la diabetes las concentraciones de IGF-I son bajas, la adición de este agonista con IGF-I a heridas es probable que cause una mejora en la cicatrización de heridas en presencia de ulceraciones diabéticas. En neuropatía diabética se ha demostrado que las neuronas experimentan una apoptosis rápida y tienen una pobre excrecencia axonal a menos que esté presente el IGF-I adecuado. Ya que los receptores de $\alpha V\beta 3$ están presentes en los neurogliocitos que proporcionan soporte para neuronas es posible que este agonista podría potenciar la excrecencia neuronal y el desarrollo de procesos y conexiones axonales en neuropatía diabética. En enfermedades degenerativas tales como la esclerosis lateral amiotrófica (ALS) y varias demencias, el IGF-I ha mostrado que inhibe la apoptosis neuronal, por lo que la terapia con este agente puede ser de algún uso en la prevención de estas afecciones neurodegenerativas.

E. Procedimientos de uso: Antagonistas

Se ha mostrado la acción antagonista del IGF-I para bloquear la formación de lesiones y el desarrollo de lesiones ateroscleróticas tempranas. La administración de un antagonista que bloquea este sitio de unión en $\alpha V\beta 3$ antagonizaría el efecto de proteínas de matriz que son abundantes en lesiones ateroscleróticas tales como vitronectina, osteopontina y fibrinógeno. En la medida en que el factor epidérmico de unión a heparina y el factor de crecimiento del tejido conectivo estén activos en el desarrollo de la lesión aterosclerótica, el antagonista también actuaría para inhibir sus efectos.

Otro uso de antagonistas sería tratar una enfermedad inflamatoria del intestino.

Las células del músculo liso intestinal expresan receptores de $\alpha V\beta 3$ y su proliferación en estas enfermedades conduce a constricción intestinal. Por lo tanto, la inhibición de su crecimiento con un antagonista podría causar la prevención de esta complicación.

Otro uso de antagonistas de la invención se encuentra en el tratamiento de la osteoporosis. Los osteoblastos no expresan $\alpha V\beta 3$, pero se expresa en osteoclastos que estimulan la reabsorción ósea. Por lo tanto, la inhibición de la estimulación de la ocupación de ligando en osteoclastos debería causar una potenciación de la formación de huesos mediante el uso de antagonistas. Varias proteínas tales como osteopontina son abundantes en la matriz extracelular ósea y podrían estimular osteoclastos mediante este mecanismo, por lo que el antagonismo de su acción puede permitir al IGF-I aumentar la formación ósea sin aumentar la resorción ósea.

Otro uso de antagonistas es tratar estados de angiogenesis anormal. La angiogénesis es importante en el desarrollo de tumores pero es casi tan importante en otros procesos patofisiológicos tales como retinopatía diabética. Ya que las células endoteliales expresan abundantes antagonistas de receptores de $\alpha V\beta 3$ que inhiben la unión de factores del crecimiento endotelial tales como el factor de crecimiento endotelial vascular o el factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina a $\alpha V\beta 3$ a través de este dominio de unión a heparina sería de esperar que conduzcan a la inhibición de angiogénesis, por lo que este antagonista es un fármaco útil en estas condiciones clínicas.

Otro uso de antagonistas es tratar cánceres o tumores, en particular los que tienen receptores de (por ejemplo, el tumor de Wilms, nefroblastoma, neuroblastoma). Aunque $\alpha V\beta 3$ no es un receptor abundante en todas las células tumorales, se han descrito varios tipos de células tumorales que expresan $\alpha V\beta 3$. Los enfoques hasta la fecha se han dirigido generalmente a la secuencia RGD en ligandos que estimulan $\alpha V\beta 3$ y usan antagonistas que se unen a este dominio para inhibir acciones de $\alpha V\beta 3$. Nuestro enfoque, que es antagonizar el bucle de cisteína en $\alpha V\beta 3$ proporciona un enfoque único dirigido a este receptor en oposición al sitio de unión RGD y así pueden tener una eficacia superior en la inhibición del desarrollo de estos tumores.

En el tratamiento de cánceres o tumores, los agentes activos de la presente invención pueden administrarse opcionalmente conjuntamente con otros agentes diferentes citotóxicos, tales como compuestos quimioterapéuticos o antineoplásticos o radioterapia, útiles en el tratamiento de los trastornos o afecciones que se describen en el presente documento (por ejemplo, compuestos quimioterapéuticos o antineoplásticos). Los otros compuestos pueden administrarse concurrentemente. Tal como se usa en el presente documento, la palabra "concurrentemente" significa de forma suficientemente cercana en el tiempo para producir un efecto combinado (es decir, concurrentemente puede ser simultáneamente, o puede ser dos o más administraciones que tienen lugar antes o después una de otra). Tal como se usa en el presente documento, el término "radioterapia" incluye, pero no está limitado a, rayos X o rayos gamma, que se administran a partir de bien una fuente aplicada externamente, tal como un haz de rayos, o bien mediante

implantación de pequeñas fuentes radioactivas. Ejemplos de otros agentes quimioterapéuticos adecuados que pueden administrarse concurrentemente con agentes activos tal como se describe en el presente documento incluyen, pero no están limitados a, agentes alquilantes (incluidos, sin limitación, mostazas de nitrógeno, derivados de etilenimina, sulfonatos de alquilo, nitrosoureas y triazenos): mostaza de uracilo, clormetina, ciclofosfamida (citoxano. RTM.), ifosfamida, melfalan, clorambucilo, pipobroman, trietilenomelamina, trietilenotiofosforamina, busulfán, carmustina, lomustina, estreptozocina, dacarbazina y temozolomida; antimetabolitos (incluidos, sin limitación, antagonistas de ácido fólico, análogos de pirimidina, análogos de purina e inhibidores de adenosina deaminasa): metotrexato, 5-fluorouracilo, floxuridina, citarabina, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, fosfato de fludarabina, pentostatina y gemcitabina; productos naturales y sus derivados (por ejemplo, alcaloides de la vinca, antibióticos antitumorales, enzimas, linfocinas y epipodofilotoxinas): vinblastina, vincristina, vindesina, bleomicina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, ara-C, paclitaxel (paclitaxel está disponible comercialmente como Taxol®), mitramicina, deoxicoformicina, mitomicina-C, L-asparaginasa, interferones (especialmente IFN- α), etopósido y tenipósido; otros agentes citotóxicos antiproliferativos son navelbino, CPT-11, anastrozol, letrozol, capecitabina, reloxafina, ciclofosfamida, ifosamida y droloxafina. Agentes citotóxicos antiproliferativos adicionales incluyen, pero no están limitados a, melfalan, hexametil melamina, tiotepa, citarabina, idatrexato, trimetrexato, dacarbazina, L-asparaginasa, camptotecina, topotecán, bicalutamida, flutamida, leuprolida, derivados de piridobenzoindol, interferones, e interleucinas. Clases preferentes de agentes citotóxicos antiproliferativos son los inhibidores de EGFR, inhibidores de Her-2, inhibidores de CDK e Herceptin® (trastuzumab). (véase, por ejemplo los documentos de patente de Estados Unidos N° 6,537,988 y 6,420,377). Dichos compuestos pueden proporcionarse de acuerdo con técnicas conocidas actualmente para la administración de los mismos.

F. Anticuerpos

Los anticuerpos son conocidos, así como la producción de los mismos. Véase, por ejemplo el documento de patente de Estados Unidos N° 6,849,719; véanse también los documentos de patente de Estados Unidos N° 6,838,282; 6,835,817; 6,824,989.

Los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos que están modificados, es decir, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula al anticuerpo de modo que la unión covalente no impida que el anticuerpo se una específicamente a su sitio de unión. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención pueden estar modificados, por ejemplo, por glucosilación, acetilación, pegilación, fosfilación, amidación o con otros grupos de protección/de bloqueo, escisión proteolítica, unión a un ligando celular u otra proteína, etc. Cualquiera de las numerosas modificaciones químicas puede llevarse a cabo mediante técnicas conocidas, incluidas, pero no limitadas a, escisión química específica, acetilación, formilación, síntesis metabólica de tunicamicina, etc. Adicionalmente, los anticuerpos pueden contener uno o más aminoácidos no clásicos.

Pueden generarse anticuerpos monoclonales de la invención mediante cualquier procedimiento adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, puede administrarse un antígeno adecuado a varios huéspedes animales, incluidos, pero no limitados a, conejos, ratones, ratas, etc. para inducir la producción de sueros que contienen anticuerpos policlonales específicos para el antígeno. Pueden usarse varios coadyuvantes para aumentar la respuesta inmunológica, dependiendo de las especies huéspedes, e incluyen, pero no están limitados a, coadyuvante de Freund (completo e incompleto), geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles plurónicos, polianiones, péptidos, emulsiones de aceite, hemocianinas de lapa californiana, dinitrofenol y coadyuvantes humanos potencialmente útiles tales como BCG (bacilo de Calmette-Guerin) y *corynebacterium parvum*.

Pueden prepararse anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de técnicas, incluidas tecnología de hibridoma, recombinante y de presentación en fagos o una combinación de las mismas. Por ejemplo, pueden producirse anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridoma incluidas las enseñadas, por ejemplo, en Harlow y col., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ª ed. 1988); Hammerling, y col., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563- 681 (Elsevier, N. Y., 1981). El término “anticuerpo monoclonal” tal como se usa en el presente documento no está limitado a anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridoma. El término “anticuerpo monoclonal” se refiere a un anticuerpo que está derivado de un clon sencillo, incluidos cualquier clon de eucariota, procariota o fago, y no al procedimiento por el que se produce.

Procedimientos para producir y seleccionar anticuerpos específicos que usan tecnología de hibridoma son rutinarios y conocidos. Sucintamente, los ratones se inmunizan con un antígeno o una célula que expresa dicho antígenouando se detecta una respuesta inmunológica, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para el antígeno en el suero murino, se retira el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Los esplenocitos se fusionan después por técnicas conocidas a cualesquiera células adecuadas del mieloma, por ejemplo células de la línea celular SP20 disponibles en la ATCC.

Los hibridomas se seleccionan y se clonan mediante dilución limitada. Los clones de hibridoma se analizan después mediante procedimientos conocidos en la técnica para células que segregan anticuerpos capaces de unirse a un polipéptido de la invención. El fluido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, pueden generarse inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

En consecuencia, la presente invención proporciona procedimientos para generar anticuerpos monoclonales así como anticuerpos producidos por el procedimiento que comprende el cultivo de una célula de hibridoma que segrega un anticuerpo de la invención, en el que, preferentemente, el hibridoma se genera fusionando esplenocitos aislados a partir de ratón inmunizado con un antígeno de la invención con células de mieloma y después seleccionando los
 5 hibridomas que resultan de la fusión para clones de hibridoma que segregan un anticuerpo capaz de unirse a un polipéptido de la invención.

Pueden generarse mediante técnicas conocidas fragmentos de anticuerpo que reconocen epítomos específicos. Por ejemplo, pueden producirse Fab y F(ab')₂ de la invención por escisión proteolítica de moléculas de inmunoglobulina, usando enzimas tales como papaína (para producir fragmentos Fab) o pepsina (para producir fragmentos F(ab')₂). Los
 10 fragmentos F(ab')₂ contienen la región variable, la región constante de cadena ligera y el dominio CHI de la cadena pesada.

Por ejemplo, también pueden generarse anticuerpos usando varios procedimientos de presentación en fagos conocidos en la técnica. En los procedimientos de presentación en fagos, los dominios de anticuerpos funcionales se presentan sobre la superficie de partículas de fagos que portan las secuencias de polinucleótidos que los codifican. En particular, dichos fagos pueden usarse para representar dominios de unión a antígenos expresados a partir de un repertorio o biblioteca combinatoria de anticuerpos (por ejemplo, humana o murina). Los fagos que expresan un dominio de unión a antígenos que se une al antígeno de interés pueden seleccionarse o identificarse con antígeno, por ejemplo, usando antígeno marcado o antígeno unido o capturado en una superficie sólida o una perla. Los fagos que se usan en estos procedimientos son, típicamente, fagos filamentosos que incluyen los dominios de unión fd y M13 expresados a partir de fagos con dominios de anticuerpo Fab, Fv o Fv estabilizado con disulfuro, fusionados de modo recombinante con bien el gen del fago III o la proteína del gen VIII. Ejemplos de procedimientos de presentación en fagos que pueden usarse para fabricar los anticuerpos de la presente invención incluyen, pero no están limitados a, los desvelados en los documentos de patente de Estados Unidos N° 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 y 5,969,108.
 25

Tal como se describe en las referencias anteriores, después de la selección de fago, pueden aislarse las regiones codificantes del anticuerpo a partir del fago y usarse para generar anticuerpos completos, incluidos anticuerpos humanos, o cualquier otro fragmento de unión de anticuerpo deseado, y expresarse en cualquier huésped deseado, incluidas células de mamífero, células de insecto, células vegetales, levaduras y bacterias, por ejemplo, tal como se describe en detalle a continuación. Por ejemplo, también pueden emplearse técnicas para producir de modo recombinante Fab, Fab' y F(ab')₂ usando procedimientos conocidos en la técnica.
 30

Ejemplos de técnicas que pueden usarse para producir Fvs y anticuerpos de cadena sencilla incluyen las descritas en los documentos de patente de Estados Unidos 4,946,778 y 5,258,498; Huston y col., *Methods in Enzymology* 203: 46-88 (1991); Shu y col., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); y Skerra y col., *Science* 240: 1038-1040 (1988).
 35

Para algunos usos, incluido el uso *in vivo* de anticuerpos en humanos y ensayos de detección *in vitro*, puede ser preferible usar anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la que diferentes porciones del anticuerpo están derivados de especies animales distintas, tales como anticuerpos que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murino y una región constante de inmunoglobulina humana. Procedimientos para producir anticuerpos quiméricos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, Morrison, *Science* 229: 1202 (1985); Oi y col., *BioTechniques* 4: 214 (1986); Gillies y col., (1989) *J. Immunol. Methods* 125:191-202; documentos de patente de Estados Unidos N° 5,807,715; 4,816,567 y 4,816,397, que se incorporan la presente documento por referencia en su totalidad. Anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo obtenidas a partir de anticuerpos de especies no humanas que se unen al antígeno deseado que tienen una o más regiones de determinación complementaria (CDR) de especies no humanas y regiones estructurales de una molécula de inmunoglobulina humana. Frecuentemente, los restos estructurales de las regiones estructurales humanas se sustituirán por el resto correspondiente del anticuerpo donante de las CDR para modificar, preferentemente para mejorar, la unión al antígeno. Estas sustituciones estructurales se identifican por procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante un modelo de las interacciones de las CDR y los restos estructurales para identificar restos estructurales importantes de unión al antígeno y la comparación de secuencias para identificar restos estructurales no habituales en posiciones particulares. (Véase, por ejemplo Queen y col., documento de patente de Estados Unidos N° 5,585,089; Riechmann y col., *Nature* 332: 323 (1988). Los anticuerpos pueden humanizarse usando una variedad de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, injerto de CDR (véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 5,225,539; 5,530,101 y 5,585,089), acondicionamiento de superficie (véanse, por ejemplo, los documentos de patente EP 592,106; EP 519,596; Padlan, *Molecular Immunology* 28 (4/5):489-498 (1991); Studnicka y col., *Protein Engineering* 7 (6):805-814 Roguska. Y col., *PNAS* 91: 969-973 (1994)), y reordenamiento de cadenas (documento de patente de Estados Unidos N° 5,565,332).
 40
 45
 50
 55
 60

Son deseables los anticuerpos completamente humanos para tratamiento terapéutico, diagnóstico y/o detección de pacientes humanos. Los anticuerpos humanos pueden fabricarse por medio de una variedad de procedimientos conocidos en la técnica, incluidos procedimientos de presentación en fagos, descritos anteriormente, usando bibliotecas de anticuerpos derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Véanse, por ejemplo, los documentos de patente de Estados Unidos N° 4,444,887 y 4,716,111.
 65

También pueden producirse anticuerpos humanos usando ratones transgénicos que no son capaces de expresar inmunoglobulinas endógenas funcionales, pero que pueden expresar genes de inmunoglobulinas humanas. Por ejemplo, los complejos de genes de inmunoglobulina de cadena pesada y cadena ligera pueden introducirse aleatoriamente o mediante recombinación homóloga en células madre embrionarias de ratón. Alternativamente, pueden introducirse en células embrionarias de ratones la región variable, la región constante y la región de diversidad humanas, en adición a los genes de cadena ligera y pesada humanos. Los genes de inmunoglobulinas de cadena pesada y ligera de ratón pueden suministrarse no funcionalmente separada o simultáneamente con la introducción de loci de inmunoglobulina humana mediante recombinación homóloga. En particular, la delección homocigótica de la región JH evita la producción la producción endógena de anticuerpos. Las células madre embrionarias modificadas se expanden y se microinyectan en blastocistos para producir ratones quiméricos. Después, los ratones quiméricos se crían para producir vástagos homocigóticos que expresan anticuerpos humanos. Los ratones transgénicos se inmunizan de una manera normal con un antígeno seleccionado, por ejemplo, la totalidad o una porción de un polipéptido de la invención. Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno a partir de ratones transgénicos inmunizados usando tecnología de hibridoma convencional. Los transgenes de inmunoglobulina humana que alberga el ratón transgénico se reordenan durante la diferenciación de linfocitos B y, subsecuentemente, experimentan permutación de clase o mutación somática. Así, usando una técnica semejante, es posible producir anticuerpos IgG, IgA, IgM e IgE terapéuticamente útiles. Para una visión general de esta tecnología para producir anticuerpos humanos, véase Lonberg y Huszar (1995, Int. Rev. Immunol. 13: 65-93). Para una descripción detallada de esta tecnología para producir anticuerpos humanos y anticuerpos monoclonales humanos y protocolos para producir dichos anticuerpos, véanse los documentos de patente de Estados Unidos N° 5,413,923; 5,625,126; 5,633,425; 5,569,825; 5,661,016; 5,545,806; 5,814,318; y 5,939,598.

Pueden generarse anticuerpos completamente humanos que reconozcan un epítipo seleccionado usando una técnica denominada "selección guiada". En esta estrategia se usa un anticuerpo monoclonal no humano seleccionado, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, para guiar la selección de un anticuerpo completamente humano que reconoce el mismo epítipo. (Jespers y col., Bio/technology 12: 899-903 (1988)).

Además, pueden utilizarse anticuerpos en vez de polipéptidos de la invención para generar anticuerpos antiidiotipo que "imitan" polipéptidos de la invención usando técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica (véanse, por ejemplo, Greenspan y Bona, FASEB J. 7 (5):437-444; y Nissinoff, J. Immunol. 147 (8):2429-2438 (1991)). Por ejemplo, anticuerpos que se unen a un polipéptido de la invención, e inhiben competitivamente la multimerización de polipéptidos y/o la unión de un polipéptido de la invención a un ligando, pueden usarse para generar antiidiotipos que "imitan" la multimerización y/o el dominio de unión de polipéptidos y, como consecuencia, se unen a, y neutralizan, polipéptidos y/o su ligando. Dichos antiidiotipos de neutralización o fragmentos Fab de dichos antiidiotipos pueden usarse en regímenes terapéuticos para neutralizar el ligando del polipéptido. Por ejemplo, tales anticuerpos antiidiotípicos pueden usarse para unirse a un polipéptido de la invención y/o para unirse a sus ligandos/receptores y, por lo tanto, bloquear su actividad biológica.

La invención proporciona, además, polinucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótido que codifica un anticuerpo de la invención tal como se ha descrito anteriormente. Los polinucleótidos pueden obtenerse, y la secuencia de nucleótidos de los polinucleótidos determinarse, mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Por ejemplo, si se conoce la secuencia de nucleótidos del anticuerpo, puede ensamblarse un polinucleótido que codifique el anticuerpo a partir de oligonucleótidos sintetizados químicamente (por ejemplo, tal como se describe en Kutmeier y col., BioTechniques 17: 242 (1994)), que, brevemente, implica la síntesis de oligonucleótidos superpuestos que contienen porciones de la secuencia que codifica el anticuerpo, alineamiento y ligación de estos oligonucleótidos y, después, la amplificación de los oligonucleótidos ligados por PCR. Alternativamente, un polinucleótido que codifica un anticuerpo puede generarse a partir de ácido nucleico de una fuente adecuada. Si un clon que contiene un ácido nucleico que codifica un anticuerpo particular no está disponible, pero la secuencia de la molécula de anticuerpo es conocida, puede obtenerse un ácido nucleico que codifica la inmunoglobulina a partir de una fuente adecuada (por ejemplo, una biblioteca de ADNc de anticuerpo, o una biblioteca de ADNc generada a partir de, o ácido nucleico, preferentemente ARN poliA+, aislado de, cualquier tejido o células que expresan el anticuerpo, tales como células de hibridoma seleccionadas para expresar un anticuerpo de la invención) por amplificación PCR usando cebadores sintéticos hibridizables en los extremos 3' y 5' de la secuencia o mediante clonación usando una sonda de oligonucleótido específica para la secuencia génica particular que hay que identificar, por ejemplo, un clon de ADNc a partir de una biblioteca de ADNc que codifica el anticuerpo. Ácidos nucleicos amplificados generados por PCR pueden clonarse, después, en vectores de clonación replicables usando cualquier procedimiento bien conocido en la técnica.

G. Implantes

Los compuestos activos de la invención, en particular antagonistas tales como anticuerpos o péptidos como se describen anteriormente, pueden acoplarse a o conjugarse a implantes o dispositivos médicos implantables de acuerdo con técnicas conocidas para llevar a cabo los procedimientos descritos en el presente documento, o para combatir problemas asociados con el implante tales como estenosis y reestenosis. Véanse, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos N.ºs: 6,786,922; 6,746,686; 6,718,208; 6,617,142; 6,352,832; 6,238,872. Cualquier implante puede utilizarse así, incluyendo pero no limitado a endoprótesis de tubo expansible (por ejemplo endoprótesis de tubo expansible vasculares), electrodos, catéteres, sondas, marcapasos implantable de alojamientos cardioversores, juntas,

tornillos, varillas, implantes oftálmicos (incluyendo pero no limitados a implantes de lentes intraoculares, implantes de glaucoma o implantes de drenaje, e implantes o tapones puntuales), etc. Los implantes pueden ser de cualquier material adecuado, incluyendo pero no limitado a polímeros orgánicos (incluyendo polímeros estables o inertes y polímeros biodegradables), metales tales como acero inoxidable y titanio, materiales inorgánicos tales como silicona, y compuestos de los mismos.

H. Ensayos de rastreo

Los procedimientos, medios de almacenaje, estructuras de datos, y similares, junto con compuestos identificados por tales procedimientos y procedimientos de uso de los mismos, se pueden implementar de acuerdo con técnicas conocidas tal como se describen en L. Tong y col., Solicitud PCT WO 2004/063715, titulada *Methods of Using Crystal Structure of Carboxyltransferase Domain of Acetyl-CoA Carboxylase, Modulators Thereof, and Computer Methods*.

Ventajosamente la estructura cristalina de integrina $\beta 3$, incluyendo el dominio de bucle de cisteína, se conoce, aunque no se conoce para los propósitos descritos en el presente documento.

Peterson y col. Biochemistry 44: 565, 205 han utilizado dispersión lumínica de ángulo pequeño, y en una publicación más temprana, RMN, para determinar la estructura trimimensional de vitronectina. En el modelo de los autores el dominio de unión de heparina está expuesto en superficie y está claramente definido a partir del dominio de unión RGD así como el dominio de unión de inhibidor-1 de activador de plasminógeno. Aunque el dominio de unión de heparina no es crítico los autores comentan que la vitronectina polimerizada es probable para unir con más avidéz la heparina debido a una exposición incluso mejor de este dominio. Dado que las formas multiméricas de vitronectina se dan en estados morbosos tales como aterosclerosis y en vitronectina que está asociada con matriz extracelular, esto puede tener significancia patológica. De forma similar se ha comunicado la estructura cristalina de la parte extracelular de un dímero $\alpha V\beta 3$ con y sin estar formando complejos con ligandos de RGD (documentos Science 294: 339, 2001 y Science 296: 151, 2002). Estos dos artículos comunican los coordinados moleculares de la estructura de bucle de cisteína entre residuos cisteína 177 y cisteína 184 llamada en adelante el bucle de cisteína. Esta estructura está mapeada y la estructura tridimensional está ilustrada en la Figura 6 del primer manuscrito. El artículo ilustra claramente que este sitio de unión es distinto del sitio de unión de la secuencia RGD. Se describe como una región de especificidad de ligando pero no se da descripción adicional de sus propiedades funcionales en esta publicación. Esta claro a partir de la estructura cristalina que su superficie está expuesta. De forma similar la confirmación activa de la proteína da como resultado exposición de superficie adicional de este dominio de unión. Se describen los coordinados moleculares y los números de extensión de GI son 232004340, 20664279 y 16975254. De forma similar los números de extensión de la estructura cristalina son IL5GAZ-A5 y B0, B6, 7, 8, 9, 10 y C0.

Los números de acceso del Banco de Datos de Proteínas (PDB) para las estructuras no unidas a ligando y unidas a ligando de RGD de integrina $\alpha V\beta 3$ son 1JV2 y 1L5G, las revelaciones de las cuales están incorporadas en el presente documento en su totalidad por sus enseñanzas. Las Tablas 1 y 2 presentadas más adelante proporcionan las coordenadas moleculares para residuos aminoacídicos entre cisteína 177 y cisteína 184 de las estructuras no unidas a ligando y unidas a ligando de RGD de integrina $\beta 3$, respectivamente.

TABLA 1

Coordinados atómicos para residuos aminoacídicos entre cisteína 177 y cisteína 184 de integrina $\beta 3$

CRYST1	130,000	130,000	307,300	90,00	90,00	120,00	P	32	2	1	6
ORIGX1	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000	0,000000						
ORIGX2	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000	0,000000						
ORIGX3	0,000000	0,000000	1,000000	0,000000	0,000000						
ESCALA1	0,007692	0,004441	0,000000	0,000000	0,000000						
ESCALA2	0,000000	0,008882	0,000000	0,000000	0,000000						
ESCALA3	0,000000	0,000000	0,003254	0,000000	0,000000						

ES 2 343 424 T3

	ÁTOMO	8193	N	CYS	B	177	30,617	38,285	38,020	1,00	51,69	N
	ÁTOMO	8194	CA	CYS	B	177	29,881	38,955	39,076	1,00	61,73	C
5	ÁTOMO	8195	C	CYS	B	177	30,997	39,840	39,641	1,00	63,92	C
	ÁTOMO	8196	O	CYS	B	177	31,309	39,784	40,819	1,00	67,08	O
	ÁTOMO	8197	CB	CYS	B	177	29,473	37,927	40,157	1,00	67,19	C
10	ÁTOMO	8198	SG	CYS	B	177	28,097	36,748	39,847	1,00	89,98	S
	ÁTOMO	8199	N	TYR	B	178	31,638	40,596	38,756	1,00	64,48	N
	ÁTOMO	8200	CA	TYR	B	178	32,764	41,495	39,061	1,00	64,75	C
15	ÁTOMO	8201	C	TYR	B	178	32,786	42,370	40,337	1,00	64,07	C
	ÁTOMO	8202	O	TYR	B	178	33,761	42,313	41,085	1,00	62,11	O
	ÁTOMO	8203	CB	TYR	B	178	33,022	42,386	37,846	1,00	74,79	C
20	ÁTOMO	8204	CG	TYR	B	178	31,983	43,478	37,675	1,00	89,90	C
	ÁTOMO	8205	CD1	TYR	B	178	30,617	43,197	37,784	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8206	CD2	TYR	B	178	32,364	44,805	37,472	1,00	97,33	C
25	ÁTOMO	8207	CE1	TYR	B	178	29,656	44,214	37,704	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8208	CE2	TYR	B	178	31,409	45,833	37,391	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8209	CZ	TYR	B	178	30,058	45,528	37,508	1,00	100,00	C
30	ÁTOMO	8210	OH	TYR	B	178	29,105	46,526	37,450	1,00	99,70	O
	ÁTOMO	8211	N	ASP	B	179	31,761	43,212	40,540	1,00	61,63	N
35	ÁTOMO	8212	CA	ASP	B	179	31,664	44,120	41,705	1,00	62,19	C
	ÁTOMO	8213	C	ASP	B	179	32,085	43,413	42,972	1,00	68,31	C
	ÁTOMO	8214	O	ASP	B	179	33,148	43,669	43,539	1,00	70,06	O
40	ÁTOMO	8215	CB	ASP	B	179	30,224	44,597	41,919	1,00	60,12	C
	ÁTOMO	8216	CG	ASP	B	179	29,704	45,424	40,782	1,00	66,56	C
	ÁTOMO	8217	OD1	ASP	B	179	28,590	45,129	40,294	1,00	60,98	O
45	ÁTOMO	8218	OD2	ASP	B	179	30,399	46,381	40,386	1,00	80,12	O
	ÁTOMO	8219	N	MET	B	180	31,209	42,519	43,415	1,00	79,09	N
	ÁTOMO	8220	CA	MET	B	180	31,470	41,708	44,591	1,00	88,86	C
50	ÁTOMO	8221	C	MET	B	180	32,586	40,865	43,984	1,00	90,63	C
	ÁTOMO	8222	O	MET	B	180	32,520	40,553	42,794	1,00	92,27	O
55	ÁTOMO	8223	CB	MET	B	180	30,219	40,863	44,929	1,00	98,30	C

60

65

ES 2 343 424 T3

	ÁTOMO	8224	CG	MET	B	180	29,616	40,019	43,759	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8225	SD	MET	B	180	27,803	40,099	43,408	1,00	91,76	C
5	ÁTOMO	8226	CE	MET	B	180	27,856	41,139	41,950	1,00	88,30	C
	ÁTOMO	8227	N	LYS	B	181	33,663	40,604	44,724	1,00	89,72	N
	ÁTOMO	8228	CA	LYS	B	181	34,763	39,289	44,143	1,00	93,91	C
10	ÁTOMO	8229	C	LYS	B	181	34,430	38,380	43,748	1,00	93,74	C
	ÁTOMO	8230	O	LYS	B	181	35,074	37,810	42,857	1,00	94,02	O
	ÁTOMO	8231	CB	LYS	B	181	36,004	39,857	45,047	1,00	98,76	C
15	ÁTOMO	8232	CG	LYS	B	181	37,208	39,133	44,442	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8233	CD	LYS	B	181	38,370	39,089	45,410	1,00	100,00	C
	ÁTOMO	8234	CE	LYS	B	181	39,471	38,167	44,899	1,00	100,00	C
20	ÁTOMO	8235	NZ	LYS	B	181	40,690	38,200	45,762	1,00	100,00	N
	ÁTOMO	8236	N	THR	B	182	33,382	37,836	44,360	1,00	92,50	N
	ÁTOMO	8237	CA	THR	B	182	32,941	36,458	44,122	1,00	95,53	C
25	ÁTOMO	8238	C	THR	B	182	32,590	36,101	42,662	1,00	94,42	C
	ÁTOMO	8239	O	THR	B	182	31,417	36,137	42,272	1,00	100,00	O
	ÁTOMO	8240	CB	THR	B	182	31,723	36,138	45,009	1,00	99,31	C
30	ÁTOMO	8241	OG1	THR	B	182	31,913	36,732	46,313	1,00	100,00	O
	ÁTOMO	8242	CG2	THR	B	182	31,526	34,632	45,150	1,00	99,19	C
35	ÁTOMO	8243	N	THR	B	183	33,584	35,681	41,879	1,00	92,69	N
	ÁTOMO	8244	CA	THR	B	183	33,346	35,309	40,483	1,00	88,83	C
	ÁTOMO	8245	C	THR	B	183	32,313	34,189	40,349	1,00	83,16	C
40	ÁTOMO	8246	O	THR	B	183	32,163	33,327	41,224	1,00	81,19	O
	ÁTOMO	8247	CB	THR	B	183	34,653	34,915	39,734	1,00	87,66	C
	ÁTOMO	8248	OG1	THR	B	183	35,311	33,836	40,416	1,00	93,17	O
45	ÁTOMO	8249	CG2	THR	B	183	35,597	36,121	39,631	1,00	90,15	C
	ÁTOMO	8250	N	CYS	B	184	31,593	34,226	39,236	1,00	78,27	N
	ÁTOMO	8251	CA	CYS	B	184	30,543	33,265	37,459	1,00	71,84	C
50	ÁTOMO	8252	C	CYS	B	184	30,528	32,977	36,719	1,00	68,43	C
	ÁTOMO	8253	O	CYS	B	184	31,391	33,445	36,719	1,00	68,40	O
	ÁTOMO	8254	CB	CYS	B	184	29,193	33,867	39,372	1,00	78,22	C
55	ÁTOMO	8255	SG	CYS	B	184	28,756	35,396	38,458	1,00	81,45	S

60

65

ES 2 343 424 T3

TABLA 2

Coordinados atómicos para residuos aminoacídicos entre cisteína 177 y cisteína 184 de integrina $\beta 3$ formando complejo con ligando Arg-Gly-Asp (RGD)

5													
		CRYST1	129,790	129,790	308,780	90,00	90,00	120,00	P 32 2 1			6	
		ORIGX1	1,000000	0,000000		0,000000		0,000000					
10		ORIGX2	0,000000	1,000000		0,000000		0,000000					
		ORIGX3	0,000000	0,000000		1,000000		0,000000					
		ESCALA1	0,007705	0,004448		0,000000		0,000000					
15		ESCALA2	0,000000	0,008897		0,000000		0,000000					
		ESCALA3	0,000000	0,000000		0,003239		0,000000					
20		ÁTOMO	8193	N	CYS	B	177	29,514	39,700	37,901	1,00	39,17	N
		ÁTOMO	8194	CA	CYS	B	177	29,723	40,091	39,299	1,00	49,86	C
		ÁTOMO	8195	C	CYS	B	177	31,188	40,306	39,619	1,00	51,72	C
25		ÁTOMO	8196	O	CYS	B	177	31,741	39,770	40,581	1,00	52,27	O
		ÁTOMO	8197	CB	CYS	B	177	29,045	39,124	40,271	1,00	48,58	C
		ÁTOMO	8198	SG	CYS	B	177	29,786	37,472	40,399	1,00	47,78	S
30		ÁTOMO	8199	N	TYR	B	178	31,806	41,091	38,742	1,00	55,89	N
		ÁTOMO	8200	CA	TYR	B	178	33,192	41,474	38,835	1,00	56,91	C
35		ÁTOMO	8201	C	TYR	B	178	33,247	42,935	39,269	1,00	55,86	C
		ÁTOMO	8202	O	TYR	B	178	34,278	43,428	39,698	1,00	55,78	O
		ÁTOMO	8203	CB	TYR	B	178	33,886	41,150	37,519	1,00	60,90	C
40		ÁTOMO	8204	CG	TYR	B	178	34,649	42,246	36,813	1,00	70,75	C
		ÁTOMO	8205	CD1	TYR	B	178	34,050	43,464	36,482	1,00	72,46	C
		ÁTOMO	8206	CD2	TYR	B	178	35,952	42,013	36,363	1,00	82,19	C
45		ÁTOMO	8207	CE1	TYR	B	178	34,732	44,415	35,712	1,00	85,76	C
		ÁTOMO	8208	CE2	TYR	B	178	36,638	42,943	35,596	1,00	86,77	C
		ÁTOMO	8209	CZ	TYR	B	178	36,026	44,137	37,270	1,00	89,20	C
50		ÁTOMO	8210	OH	TYR	B	178	36,707	45,026	34,463	1,00	91,89	O
		ÁTOMO	8211	N	ASP	B	179	32,110	43,616	39,165	1,00	58,12	N
		ÁTOMO	8212	CA	ASP	B	179	31,996	44,992	39,625	1,00	62,70	C
55		ÁTOMO	8213	C	ASP	B	179	31,630	44,883	41,112	1,00	64,92	C
		ÁTOMO	8214	O	ASP	B	179	30,827	45,659	41,645	1,00	62,59	O
		ÁTOMO	8215	CB	ASP	B	179	30,929	45,780	38,833	1,00	63,77	C
60		ÁTOMO	8216	CG	ASP	B	179	29,536	45,155	38,899	1,00	67,28	C
		ÁTOMO	8217	OD1	ASP	B	179	29,164	44,447	37,938	1,00	73,03	O
65		ÁTOMO	8218	OD2	ASP	B	179	28,800	45,397	39,886	1,00	59,16	O

ES 2 343 424 T3

	ÁTOMO	8219	N	MET	B	180	32,200	43,857	41,747	1,00	66,78	N
	ÁTOMO	8220	CA	MET	B	180	32,010	43,546	43,162	1,00	74,44	C
5	ÁTOMO	8221	C	MET	B	180	33,018	42,463	43,546	1,00	75,25	C
	ÁTOMO	8222	O	MET	B	180	33,614	42,506	44,625	1,00	79,74	O
	ÁTOMO	8223	CB	MET	B	180	30,585	43,043	43,437	1,00	74,85	C
10	ÁTOMO	8224	CG	MET	B	180	30,158	41,826	42,616	1,00	72,71	C
	ÁTOMO	8225	SD	MET	B	180	28,776	40,893	43,337	1,00	69,56	C
	ÁTOMO	8226	CE	MET	B	180	27,571	42,205	43,619	1,00	71,52	C
15	ÁTOMO	8227	N	LYS	B	181	33,189	41,504	42,633	1,00	76,92	N
	ÁTOMO	8228	CA	LYS	B	181	34,102	40,354	42,748	1,00	77,50	C
	ÁTOMO	8229	C	LYS	B	181	33,709	39,072	43,481	1,00	72,04	C
20	ÁTOMO	8230	O	LYS	B	181	33,668	39,012	44,714	1,00	72,51	O
	ÁTOMO	8231	CB	LYS	B	181	35,525	40,773	43,147	1,00	79,56	C
	ÁTOMO	8232	CG	LYS	B	181	36,399	41,191	41,967	1,00	80,77	C
25	ÁTOMO	8233	CD	LYS	B	181	35,869	40,672	40,615	1,00	81,67	C
	ÁTOMO	8234	CE	LYS	B	181	39,834	39,138	40,467	1,00	85,27	C
	ÁTOMO	8235	NZ	LYS	B	181	34,951	38,704	39,323	1,00	80,43	N
	ÁTOMO	8236	N	THR	B	182	33,503	38,032	42,678	1,00	63,31	N
	ÁTOMO	8237	CA	THR	B	182	33,138	36,694	43,133	1,00	63,32	C
35	ÁTOMO	8238	C	THR	B	182	33,327	35,778	41,921	1,00	62,57	C
	ÁTOMO	8239	O	THR	B	182	33,167	34,561	42,003	1,00	67,53	O
	ÁTOMO	8240	CB	THR	B	182	31,670	36,635	43,650	1,00	64,03	C
40	ÁTOMO	8241	OG1	THR	B	182	31,565	37,379	44,873	1,00	70,53	O
	ÁTOMO	8242	CG2	THR	B	182	31,225	35,189	43,915	1,00	61,90	C
	ÁTOMO	8243	N	THR	B	183	33,718	36,385	40,805	1,00	59,72	N
45	ÁTOMO	8244	CA	THR	B	183	33,960	35,682	39,549	1,00	60,67	C
	ÁTOMO	8245	C	THR	B	183	32,872	34,710	39,065	1,00	56,82	C
	ÁTOMO	8246	O	THR	B	183	32,177	33,743	38,357	1,00	59,75	O
50	ÁTOMO	8247	CB	THR	B	183	35,333	34,960	39,557	1,00	58,54	C
	ÁTOMO	8248	OG1	THR	B	183	35,680	34,597	40,895	1,00	53,98	O
	ÁTOMO	8249	CG2	THR	B	183	36,419	35,845	38,966	1,00	61,78	C
55	ÁTOMO	8250	N	CYS	B	184	31,612	34,971	39,424	1,00	52,33	N
	ÁTOMO	8251	CA	CYS	B	184	30,493	34,121	38,998	1,00	43,94	C
	ÁTOMO	8252	C	CYS	B	184	30,506	34,081	37,486	1,00	38,56	C
60	ÁTOMO	8253	O	CYS	B	184	30,486	35,116	36,837	1,00	35,49	O
	ÁTOMO	8254	CB	CYS	B	184	29,161	34,704	39,457	1,00	46,67	C
65	ÁTOMO	8255	SG	CYS	B	184	28,929	36,411	38,895	1,00	44,19	S

En general se puede usar cualquier procedimiento conocido por aquellos expertos en la técnica para procesar los datos de difracción de rayos X. Además, con el fin de determinar la estructura atómica de una integrina $\beta 3$ según la presente invención, se puede llevar a cabo análisis de reemplazo isomorfo múltiple (MIR), construcción de modelo y refinamiento de modelo. Para análisis de MIR, los cristales pueden empaparse en átomos pesados para producir derivados de átomos pesados necesarios para análisis de MIR. Como se usa en el presente documento, derivado de átomo pesado o derivatización de átomos pesados hacen referencia al procedimiento de producir una forma modificada químicamente de un cristal de proteína o de complejo de proteína en el que dicha proteína está específicamente unida a un átomo pesado dentro del cristal. En la práctica un cristal está empapado en una solución que contiene átomos de metales pesados o sales, o compuestos organometálicos, por ejemplo, cloruro de plomo, cianuro de oro, timerosal, acetato de plomo, acetato de uranilo, cloruro de mercurio, cloruro de oro, etc., que puede difundirse a través del cristal y unirse específicamente a la proteína. La(s) localización/localizaciones del/de los átomo(s) de metal(es) pesado(s) unido(s) o sales se pueden determinar por análisis de difracción de rayos X del cristal empapado. Esta información se usa para generar información de fase de MIR que se usa para construir la estructura tridimensional del dominio de bucle de cisteína cristalizado de una integrina $\beta 3$. De ahí en adelante, se puede construir un modelo inicial de la estructura tridimensional usando el programa O (Jones y col., 1991, Acta Crystallogr. A47: 110-119). La interpretación y construcción de la estructura puede facilitarse adicionalmente por uso del programa CNS (Brunger y col., 1998, Acta Crystallogr. D54: 905-921).

El procedimiento de reemplazo molecular se refiere a grandes rasgos a un procedimiento que implica generar un modelo preliminar de la estructura tridimensional del cristal de una estructura de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$ de la presente invención. El reemplazo molecular se logra orientando y colocando una molécula cuyas coordenadas estructurales se conocen dentro de la célula unitaria según se define por el patrón de difracción de rayos X obtenido a partir del dominio de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$ en estudio (o el correspondiente complejo enzima/sustrato o complejo enzima/inhibidor) tal como para dar cuenta mejor del patrón de difracción observado del cristal desconocido. Las fases se pueden calcular después a partir de este modelo y se pueden combinar con las amplitudes observadas para dar una síntesis de Fourier aproximada de la estructura. Esto puede estar sujeto en cambio a cualesquiera de varias formas de refinamiento para proporcionar una estructura final, correcta. El procedimiento de reemplazo molecular puede aplicarse usando técnicas conocidas por el trabajador experto.

Las estructuras tridimensionales y las coordenadas atómicas específicas asociadas con dichas estructuras del dominio de bucle de cisteína de $\beta 3$, solas o en complejo con un sustrato o ligando de unión específico tal como heparina, son útiles para esclarecer la estructura de formas cristalizadas de dominios de unión a heparina de otros ligandos $\beta 3$. Tales proteínas comprenden una desviación de media cuadrada de la raíz (RMSD) de no más de 2,0 Å, 1,5 Å, 1,0 Å o 0,5 Å en las posiciones de átomos de Ca para al menos el 50 por ciento o más de los aminoácidos de la estructura del dominio de bucle de cisteína de la integrina $\beta 3$. Puede esperarse una RMSD basada en la identidad de secuencia aminoacídica. Chothia y Lesk, 1986, EMBO J. 5: 823-826.

Los moduladores de una integrina $\beta 3$, y así de actividad de IGF-1, pueden diseñarse usando estructuras tridimensionales obtenidas como se expone en la sección precedente y la sección de los Ejemplos más adelante. Estas estructuras se pueden usar para diseñar o rastrear moléculas que sean capaces de formar las interacciones deseadas con uno o más sitios de unión del dominio de bucle de cisteína.

Los modelos del dominio de bucle de cisteína (y sub-regiones, incluyendo sitios activos, sitios de unión o cavidades de los mismos) de una integrina $\beta 3$ descritos en el presente documento se pueden usar para desarrollar directamente un modulador cualquiera para una integrina $\beta 3$. La capacidad de un modulador tal para modular la actividad de un dominio de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$ se puede confirmar por análisis computerizado adicional, y/o por realización de pruebas *in vitro* y/o *in vivo*.

Un modelo de un dominio de bucle de cisteína puede estar comprendido en una estructura proteica virtual o real que es más pequeña que, más grande que, o del mismo tamaño que un dominio de bucle de cisteína o nativo de una proteína integrina $\beta 3$. El ambiente proteico que rodea el modelo de sitio activo puede ser homólogo o idéntico al dominio de bucle de cisteína nativa de una integrina $\beta 3$, o puede ser parcialmente o completamente no homólogo.

Un procedimiento para diseñar racionalmente un modulador de una integrina $\beta 3$, comprende las etapas de (i) producir un modelo legible por computador de una molécula que comprende una región (es decir, un sitio activo, sitio reactivo, o un sitio de unión) de un dominio de bucle de cisteína de integrina $\beta 3$ (por ejemplo, integrina $\beta 3$ humana o de cerdo); y (ii) usar el modelo para diseñar un compuesto de prueba que tiene una estructura y una distribución de cargas compatible con (es decir capaz de acomodarse dentro de) la región del dominio de bucle de cisteína. Si la estructura cristalina no está disponible para que se examine el dominio de bucle de cisteína los procedimientos de modelización de homología conocidos por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica se pueden usar para producir un modelo, que se puede usar para diseñar los compuestos de prueba como se describen anteriormente.

Las coordenadas atómicas de átomos del dominio de bucle de cisteína (o de una región/parte del mismo) de una integrina $\beta 3$ o una enzima relacionada con integrina $\beta 3$ se pueden usar en conjunción con modelización de computador usando un programa de acoplamiento tal como GRAM, DOCK, HOOK o AUTODOCK (Dunbrack y col., 1997, Folding & Design 2: 27-42) para identificar moduladores potenciales. Este procedimiento puede incluir ajuste de

computador o moduladores potenciales a un modelo de un dominio de bucle de cisteína (incluyendo modelos de regiones de un dominio de bucle de cisteína, por ejemplo, un sitio activo, o un sitio de unión) para averiguar como de bien la forma y la estructura química del modulador potencial complementará el sitio activo o para comparar los moduladores potenciales con la unión de sustrato o moléculas de inhibidor conocidas en el sitio activo.

Los programas de ordenador se pueden emplear para estimar la atracción, repulsión y/o impedimento estérico asociados con una interacción postulada entre el modelo de sitio reactivo y el compuesto de modulador potencial. Generalmente, las características de una interacción que están asociadas con actividad moduladora incluyen, pero no se limitan a, ajuste estrecho, impedimento estérico bajo, fuerzas de atracción positivas y especificidad.

Los compuestos moduladores de la presente invención se pueden diseñar inspeccionando visualmente la estructura tridimensional de un sitio reactivo del dominio de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$, una técnica conocida en la técnica como diseño de fármacos "manual". El diseño de fármacos manual puede emplear inspección visual y análisis usando un programa de visualización de gráficos conocido en la técnica.

Como una alternativa o un adjunto a moduladores de diseño de forma racional, el rastreo al azar de una biblioteca de moléculas pequeñas, una biblioteca de péptidos o una biblioteca de fagos para compuestos que interactúan con y/o se unen a un sitio/una región de interés (es decir, un sitio de unión, sitio activo o un sitio reactivo, por ejemplo) del dominio de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$ se puede usar para identificar compuestos útiles. Tal rastreo puede ser virtual; las bases de datos de moléculas pequeñas pueden rastrearse computacionalmente para entidades químicas o compuestos que pueden unirse a o interaccionar de lo contrario con un modelo virtual de un sitio activo, sitio de unión o sitio reactivo de un dominio de bucle de cisteína de una integrina $\beta 3$. Alternativamente, el rastreo puede ser frente a modelos moleculares reales del dominio de bucle de cisteína o frente a partes de los mismos. Adicionalmente, se pueden generar anticuerpos que se unan a un sitio de interés del dominio de bucle de cisteína de $\beta 3$. Después de que se han identificado compuestos candidatos (o compuestos "de prueba") que se pueden unir al dominio de bucle de cisteína, se pueden poner a prueba los compuestos para determinar si pueden modular actividad de dominio de bucle de cisteína (véase más adelante).

En una realización, las integrinas $\beta 3$ que contienen dominios de bucle de cisteína, ácidos nucleicos y las células que contienen y/o expresan los dominios de bucle de cisteína se usan en ensayos de rastreo. Los rastreos se pueden diseñar para encontrar primero compuestos candidatos que se puedan unir a un dominio de bucle de cisteína o a parte del mismo, y que después esos compuestos se puedan usar en ensayos que evalúen la capacidad del compuesto candidato para modular la actividad del dominio de bucle de cisteína o de la integrina $\beta 3$. Así, como se apreciará por aquellos expertos en la técnica, hay un número de diferentes ensayos que pueden hacerse funcionar, incluyendo ensayos de unión y ensayos de actividad. En un aspecto, los compuestos candidatos se prueban primero para determinar si pueden unirse a un sitio de unión en particular del dominio de unión a heparina.

Así, en una realización, los procedimientos comprenden combinar un dominio de bucle de cisteína o una parte del mismo y un compuesto candidato, y determinar la unión del compuesto candidato al dominio de bucle de cisteína o a parte del mismo. En algunas realizaciones de los procedimientos en el presente documento, el dominio de bucle de cisteína (o parte del mismo) o el agente candidato está unido de forma no difundible a un soporte insoluble que tiene áreas que reciben muestra aislada (por ejemplo, una placa de microvaloración, una disposición, etc.). Los soportes insolubles pueden fabricarse de cualquier composición a la que puedan unirse las composiciones, se separe fácilmente del material soluble y sea compatible por el contrario con el procedimiento general de rastreo. La superficie de tales soportes puede ser sólida o porosa y de cualquier forma conveniente. Ejemplos de soportes insolubles adecuados incluyen placas de microvaloración, disposiciones, membranas y perlas. Éstas están típicamente hechas de vidrio, plástico (por ejemplo, poliestireno), polisacáridos, nailon o nitrocelulosa, Teflón™, etc. Las placas y disposiciones de microvaloración son especialmente convenientes debido a que se puede llevar a cabo un gran número de ensayos simultáneamente, usando cantidades pequeñas de reactivos y muestras -es decir, permiten rastreo de alto rendimiento. Tras unión del dominio de bucle de cisteína, el material no unido en exceso se retira lavando. Las áreas que reciben la muestra se pueden bloquear después por incubación con seroalbúmina bovina (BSA), caseína u otra proteína inocua u otro resto.

Se añade un compuesto candidato al ensayo. Los compuestos candidatos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos específicos, compuestos de bibliotecas químicas, análogos peptídicos, etc. Son de particular interés ensayos de rastreo para compuestos que tienen una baja toxicidad para células humanas. Se puede usar una amplia diversidad de ensayos para este propósito, incluyendo ensayos de unión proteína-proteína *in vitro*, inmunoensayos para unión proteica, ensayos de RMN para determinar unión proteína-proteína o proteína-compuesto químico, y similares. Los compuestos candidatos pueden incluir también insecticidas, herbicidas o fungicidas.

El término "compuesto candidato" como se usa en el presente documento describe una molécula, por ejemplo, proteína, oligopéptido, molécula orgánica pequeña, polisacárido, polinucleótido, etc., con la capacidad de modular directa o indirectamente el dominio de unión a heparina o la actividad de integrina $\beta 3$. Generalmente una pluralidad de mezclas de ensayos se hace funcionar en paralelo con diferentes concentraciones de compuestos para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones sirve como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los compuestos candidatos pueden comprender numerosas clases químicas, aunque típicamente son moléculas orgánicas, y en una realización son compuestos orgánicos pequeños que tienen un peso molecular de más de 100 y menos de aproximadamente 2.500 daltons. Los compuestos candidatos pueden comprender grupos funcionales necesarios para interacción estructural con proteínas, por ejemplo formación de puentes de hidrógeno, y típicamente incluyen al menos un grupo amina, carbonilo, hidroxilo, o carboxilo, preferentemente al menos dos de los grupos químicos funcionales. Los compuestos candidatos pueden comprender estructuras de carbono cíclicas o heterocíclicas y/o estructuras aromáticas o poliaromáticas sustituidas con uno o más de los grupos funcionales anteriores. Los agentes candidatos se encuentran también entre biomoléculas que incluyen péptidos, sacáridos, ácidos grasos, esteroides, purinas, pirimidinas, derivados, análogos estructurales o combinaciones de los mismos.

Los compuestos candidatos se pueden obtener a partir de una amplia diversidad de fuentes incluyendo bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, están disponibles numerosos medios para síntesis al azar y dirigida de una amplia diversidad de compuestos orgánicos y biomoléculas, incluyendo síntesis química combinatoria y la expresión de péptidos u oligonucleótidos al azar. Alternativamente, las bibliotecas de compuestos naturales en la forma de extractos bacterianos, fúngicos, vegetales y animales están disponibles o se producen fácilmente. Adicionalmente, las bibliotecas y compuestos producidos natural o sintéticamente se modifican fácilmente por medios químicos, físicos y bioquímicos convencionales. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones dirigidas o al azar, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación para producir análogos estructurales. En una realización, la biblioteca está elaborada totalmente al azar, sin ninguna preferencia de secuencia o constante en cualquier posición. En otra, la biblioteca es parcial. Es decir, algunas posiciones en la secuencia bien se mantienen constantes o bien se seleccionan a partir de un número limitado de posibilidades.

La determinación de la unión del compuesto candidato al dominio de bucle de la cisteína se puede hacer en un número de maneras. En una realización, el compuesto candidato está marcado y la unión se determina directamente. Por ejemplo, esto puede hacerse uniendo todo el dominio de bucle de cisteína o una parte a un soporte sólido, añadiendo un compuesto candidato marcado (por ejemplo una marca fluorescente o una marca radiactiva), eliminando por lavado el exceso de reactivo y determinando si la marca está presente en el soporte sólido. Diversas etapas de bloqueo y lavado se pueden utilizar como se conocen en la técnica.

Por “marcado” en el presente documento se quiere decir que el compuesto está marcado bien directamente o bien indirectamente con una marca que proporciona una señal detectable, por ejemplo, radioisótopo, productos fluorescentes, enzima, anticuerpos, partículas tales como partículas magnéticas, productos quimioluminiscentes, o moléculas de unión específicas, etc. Las moléculas de unión específica incluyen pares, tales como biotina o estreptavidina, digoxina y antidigoxina, etc. Para los miembros de unión específicos, el miembro complementario se marcaría normalmente con una molécula que proporcione detección, de acuerdo con procedimientos conocidos, como se resume anteriormente. La marca puede proporcionar directa o indirectamente una señal detectable.

En una realización, la unión del compuesto candidato se determina por el uso de ensayos de unión competitivos. En esta realización, el competidor es un resto de unión conocido por unirse al dominio de bucle de cisteína, tal como un anticuerpo, péptido, ligando, etc. En ciertas circunstancias, puede haber unión competitiva como entre el compuesto candidato y el resto de unión conocido, con el resto de unión desplazando el compuesto bioactivo.

En una realización, el compuesto candidato está marcado. Bien el compuesto candidato, o bien el competidor, o bien ambos, se añaden primero al dominio de bucle de cisteína durante un tiempo suficiente para permitir unión, si está presente. Las incubaciones se pueden llevar a cabo a cualquier temperatura que facilite unión óptima, típicamente entre 4 y 40°C. Los periodos de incubación están seleccionados para unión óptima pero pueden optimizarse también para facilitar rastreo de alto rendimiento rápido. Típicamente entre 0,1 y 1 hora será suficiente. El reactivo en exceso generalmente se retira o se elimina por lavado. Se añade después el segundo componente, y se sigue la presencia o ausencia del compuesto marcado, para indicar unión.

En una realización, se añade primero el competidor, seguido por el compuesto candidato. El desplazamiento del competidor es una indicación de que el compuesto candidato está uniéndose al dominio de bucle de cisteína y es así capaz de unirse a y potencialmente modular la actividad del, dominio de bucle de cisteína. En esta realización, cualquier componente puede estar marcado. Así, por ejemplo, si el compuesto candidato está marcado, la presencia de la marca en el soporte indica desplazamiento del compuesto candidato.

En una realización, se puede obtener un ligando potencial para un dominio de bucle de cisteína rastreando una biblioteca de bacteriófagos (Scott y Smith, Science, 249: 386-390 (1990); Cwirla y col., Proc. Natl. Acad. Sci., 87: 6378-6382 (1990); Devlin y col., Science, 249: 404-406 (1990)). Específicamente, la biblioteca de fagos se puede mezclar en diluciones bajas con *E. coli* permisiva en agar LB de punto de fusión bajo que después se vierte en la parte superior de placas de agar LB. Después de incubar las placas a 37°C durante un periodo de tiempo, se formarán placas transparentes pequeñas en un césped de *E. coli* que representa crecimiento de fagos activo y lisis de la *E. coli*. Un representante de estos fagos puede absorberse a filtros de nailon situando filtros secos sobre las placas de agar. Los filtros pueden marcarse para orientación, retirarse y situarse en soluciones de lavado para bloquear todos los sitios absorbentes que quedan. Los filtros pueden situarse en una solución que contiene, por ejemplo, un dominio de unión a heparina radiactiva (o parte del mismo). Después de un periodo de incubación especificado, los filtros pueden lavarse y desarrollarse cuidadosamente para autorradiografía. Se pueden identificar las placas que contienen el fago que se une al dominio de unión a heparina radiactivo o a parte del mismo. Estos fagos se pueden clonar adicionalmente y

después se pueden volver a poner a prueba para su capacidad para unir el dominio de bucle de cisteína como antes. Una vez se han purificado los fagos, la secuencia de unión contenida dentro del fago se puede determinar por técnicas de secuenciación de DNA estándar. Una vez se conoce la secuencia de DNA, se pueden generar péptidos sintéticos que representan estas secuencias, y se pueden llevar a cabo estudios de unión adicionales como se trata en el presente documento.

En otra realización, se puede obtener un ligando potencial para un dominio de bucle de cisteína rastreando compuestos candidatos por RMN (véase, por ejemplo, Publicación de la Solicitud de Patente de los Estados Unidos N.º US2003/0148297A1 o Pellechia y col., Nature Reviews Drug Discovery. 1: 211-219 (2002)). Como se menciona, un dominio de bucle de cisteína o partes del mismo se pueden inmovilizar a todos los tipos de soporte sólido. No es necesario que la unión sea una unión covalente. Sólo se requiere que el objetivo se mantenga inmovilizado en el ambiente de medición de RMN. Además, no es necesario que la inmovilización sea directamente al soporte sólido; puede tener lugar también indirectamente a través de restos o moléculas de formación de puentes, o a través de espaciadores. Soportes muy adecuados son polímeros sólidos usados en cromatografía, tales como resinas de poliestireno, sefarosa y agarosa y geles, por ejemplo en forma de perla o en forma de matriz porosa. Adicionalmente, los materiales basados en silicio modificados químicamente apropiadamente son también soportes muy adecuados.

Cualquier molécula soluble se puede usar como un compuesto que sea un candidato para unirse al dominio de bucle de cisteína. No es necesario que la citada molécula soluble sea soluble en agua. Cualquier medio líquido que no desnaturalice el citado compuesto ni la molécula de dominio de bucle de cisteína se puede usar en las medidas de RMN. La molécula objetivo de dominio de bucle de cisteína se inmoviliza a un soporte adecuado, tal como una resina sólida, y se sitúa adicionalmente en una sonda de RMN, por ejemplo, una sonda de RMN de inyección de flujo, durante la duración del rastreo. Cada muestra de los compuestos a rastrearse, por ejemplo los compuestos de una biblioteca, se aplica después al objetivo inmovilizado bombeándola a través, a lo largo o por medio del soporte sólido. La muestra a someterse a ensayo puede contener un componente único sospechoso de unión a la molécula objetivo de dominio de bucle de cisteína, o puede contener múltiples componentes de una librería de compuestos u otro tipo de colección o mezcla. El flujo puede detenerse cuando se alcanza un nivel de concentración deseado de los compuestos a ensayarse en la sonda o envase que contiene el objetivo.

Para la adquisición de los espectros de RMN, en principio cualquier secuencia de pulso de RMN capaz de detectar resonancias de muestras de moléculas disueltas y, preferentemente señales de disolvente residuales supresoras, tales como por gradientes de campo en pulsos, pueden usarse para detectar unión. En la práctica, sin embargo, se adquiere un espectro de RMN-¹H unidimensional con resolución y sensibilidad suficientes para detectar y cuantificar resonancias derivadas de cada compuesto que se esté ensayando en la presencia del soporte sólido de control. Además, un segundo espectro registrado usando el mismo protocolo de RMN, se adquiere para la misma solución de compuestos rastreables en la presencia del soporte sólido que contiene la molécula objetivo de dominio de bucle de cisteína inmovilizada con el fin de detectar unión al objetivo extremadamente débil. Este espectro se puede registrar usando mientras una difusión o un filtro T2.

Después de adquisición del espectro de RMN, la muestra de compuesto o compuestos pequeños se lava aparte de la sonda de RMN que contiene el soporte sólido inmovilizado objetivo. Subsiguientemente, la siguiente muestra se puede aplicar a la sonda en una manera de flujo detenido. Por todo el procedimiento de rastreo entero permanece en la sonda de RMN una muestra individual del soporte sólido inmovilizado objetivo. El soporte sólido inmovilizado objetivo necesita sólo cambiarse, el objetivo debería ser desnaturalizado, químicamente degradado o saturado por un compuesto de unión estrecha que no pueda eliminarse por lavado. Con el fin de salvaguardar que ciertos compuestos no se unan en una forma tal que la molécula objetivo esté bloqueada, en ciertas fases, se lleva a cabo un control para inspeccionar la disponibilidad de oportunidades de unión a la molécula objetivo.

Los espectros de RMN se comparan preferentemente sustrayendo uno de los dos grupos de datos de RMN del otro, creando de este modo un espectro de diferencia. En general, dado que la molécula objetivo está esencialmente en la fase sólida, las resonancias de compuestos que unen a la molécula objetivo se amplían tras la detección mientras estén en el estado unido. Así, la unión es sensiblemente y fiablemente detectable por un decrecimiento en altura de picos que deriva exclusivamente de la forma de solución de compuestos que se unen a la molécula objetivo. Este efecto se ve lo más fácilmente en los espectros de diferencia. Una aproximación alternativa que se puede usar para cuantificar la afinidad de la interacción objetivo-ligando es determinar áreas de picos (por ejemplo integrando) en los espectros control y experimentales y comparar los valores de éstas áreas. Aunque es posible llevar a cabo el procedimiento de rastreo de RMN en el modo de lote, en el sistema de inyección de flujo, se puede usar una muestra de objetivo para rastrear una biblioteca entera.

Ensayos de rastreo biológicos o bioquímicos. Los compuestos se pueden rastrear adicionalmente por actividad en modular la activación celular por IGF-1 en bioensayos o ensayos químicos de la presente invención. Los compuestos identificados como moduladores o moduladores potenciales de actividad IGF-1 por procedimientos como se describen anteriormente pueden rastrearse adicionalmente por actividad específica como agonistas o antagonistas en ensayos *in vivo* o *in vitro* de acuerdo con técnicas conocidas, y/o como se tratan adicionalmente más adelante.

Metodologías de Ensayo

Procedimientos para valorar actividad bioquímica y biológica de mejoras o inhibidores de $\alpha V\beta 3$. Modificación de acciones de IGF-1. Además de ensayos de unión competitiva, con el fin de determinar si los compuestos que se unen al sitio de unión del bucle de cisteína en $\alpha V\beta 3$ influyen en la señalización y las acciones de IGF-I ello ha necesitado la utilización de ensayos que valoran las acciones bioquímicas y biológicas que se estimulan cuando este sitio se activa por ligandos y que valoran cómo esto altera las respuestas celulares a IGF-I. Los inhibidores inhibirán obviamente la capacidad de IGF-I para estimular estos procesos celulares mientras que los estimuladores facilitarán su capacidad para hacer tal cosa. Estos ensayos incluyen pero no se limitan totalmente a lo siguiente: fosforilación de subunidad $\beta 3$, unión de $\beta 3$ a SEPS-1 y proteína asociada a integrinas (IAP) como un complejo, la asociación de IAP con SHPS-1, fosforilación de SHPS-1 y reclutamiento de She a SHPS-1, fosforilación de She, estimulación de síntesis de DNA y replicación celular o migración celular. Los ligandos que se unen a $\beta 3$ a través del dominio de bucle de cisteína a menudo inducen tanto cambios conformacionales como fosforilación de $\beta 3$. De forma similar, la estimulación de fosforilación de $\beta 3$ puede inducir un cambio conformacional en $\beta 3$ secundariamente. La fosforilación de $\beta 3$ se mide aplicando el compuesto que une a $\beta 3$ a las células musculares lisas y endoteliales en cultivo. Los primeros compuestos se añaden usando concentraciones que varían de 0,1 a 1 $\mu\text{g/ml}$ para monocapas de células musculares lisas o endoteliales confluyentes en placas de 10 cm. Tras un periodo de tiempo fijo de exposición a las células (2-4 horas) las células se lisan en 900 μl de tampón de RIPA (1,2). Los lisados bien se analizan directamente por inmunotransferencia para $\beta 3$ para medir polimerización o bien inmunoprecipitan con un anticuerpo anti $\beta 3$ y después se inmunotransfieren por fosfotirosina. La inmunotransferencia se analiza tras separación de las proteínas contenidas en 30 μl de lisado celular por electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE). Para inmunoprecipitar el anticuerpo de $\beta 3$ primario se añade a una dilución 1:300 para 900 μl de lisado y se incuba durante toda una noche. Los complejos inmunitarios se precipitan con proteína A-sefarosa y se eluyen con tampón de muestra de Laemmli (Maile LA y Clemmons DR, Endocrinology 143: 4259-4264 (2002); Maile LA, Clarke JB, Clemmons DR, J Biol Chem, 277: 8955-8960 (2003)). La cantidad de $\beta 3$ fosforilado se determina después por SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia con un anticuerpo anti-fosfotirosina monoclonal (PY99) (Ling Y, Maile LA, Clemmons DR, Mol Endocrinol, 17: 1824-1833 (2003)).

La metodología para determinar formación de complejos entre SHPS-1 e IAP se ha publicado previamente (Maile LA, Clarke JB, Clemmons DR, Mol Biol Cell, 14: 3519-28 (2003)). Brevemente las células se exponen a agentes de prueba que activan $\beta 3$ a través del dominio de bucle de cisteína y después se exponen a IGF-I. Tras exposición de IGF-I si $\beta 3$ está ocupado por ligando por un ligando activador IAP y SHPS-1 se asociarán en un complejo de peso molecular grande. De forma importante si esto está completamente inhibido por un anticuerpo que se une al dominio de bucle de cisteína u otros inhibidores, no se asociarán. Para detectar este complejo se preparan lisados celulares como se describe previamente y se inmunoprecipitan por SHPS-1 usando una dilución 1:330 de un antisero policlonal. Las proteínas inmunoprecipitadas se separan por SDS-PAGE y se inmunoprecipitan usando un anticuerpo monoclonal purificado para detectar IAP (B6H12) (*Id.*).

Fosforilación de SHPS-1. Para determinar la fosforilación de SHPS-1 el ligando de $\beta 3$ (bien agonista o bien antagonista) se añade a los cultivos durante periodos entre 30 minutos y 2 horas a 37°C. Se añade después IGF-I y los lisados celulares se prepararon en puntos temporales específicos. Además se preparan lisados de 3, 5, 10 y 20 minutos de línea base después de exposición a IGF-I. Los lisados se preparan como se describe previamente e inmunoprecipitaron por SHPS-1 usando antisero policlonal antiSHPS-1 a una dilución 1:330. El inmunoprecipitado que se sedimenta con proteína A-sefarosa se analiza después por SDS-PAGE seguido por inmunotransferencia por fosfotirosina usando el anticuerpo monoclonal PY99 que detecta residuos de tirosina fosforilados (Maile LA y Clemmons DR, Endocrinology 143: 4259-4264 (2002); Maile LA, Clarke JB, Clemmons DR, J Biol Chem, 277: 8955-8960 (2002); Maile LA y Clemmons DR Circ Res, 93: 925-931 (2003)). La respuesta esperada es que IGF-I estimula fosforilación de SHPS-1 y que los agonistas bien incrementan la intensidad de fosforilación de SHPS-1 o bien prolongan su duración. En contraste, los antagonistas disminuirán la intensidad y acortarán su duración.

Fosforilación de Shc. La unión y el reclutamiento de She a SHPS-1 es crítica para la fosforilación de She que es necesaria para señalización de IGF-1 particularmente en células musculares lisas y en endotelio en diabetes. Para medir la fosforilación de She los cultivos celulares se exponen a agonistas o antagonistas como se describe previamente y después los cultivos celulares se exponen a IGF-I durante periodos de 10, 20 ó 30 minutos. Los lisados celulares se preparan en cada punto temporal como se describe previamente e inmunoprecipitan usando una dilución 1:100 de un antisero policlonal anti-She. El inmunoprecipitado se aclara con proteína A-sefarosa y después las proteínas se eluyen con tampón de muestra Laemmli y se analizan por SDS-PAGE seguida por inmunotransferencia con el anticuerpo PY99 anti-fosfotirosina. La respuesta esperada es que IGF-I estimulará fosforilación de She. Esto se prolongará significativamente y se intensificará particularmente en los últimos puntos temporales en cultivos expuestos a agonistas $\beta 3$. En contraste, los antagonistas inhibirán fosforilación de She.

Reclutamiento de She a SHPS-1. Los cultivos se exponen bien a agonistas o bien a antagonistas durante los periodos de tiempo enumerados previamente. Los cultivos se lavan después y se añade IGF-I durante periodos de 5, 10, 20 ó 30 minutos. Los lisados celulares se preparan según se describe previamente (Maile LA y Clemmons DR, Endocrinology 143: 4259-4264 (2002)) y se inmunoprecipitan usando antiseros anti-SHPS-1 usando una dilución 1:330. Tras el aclarado de complejos inmunes con proteína A-sefarosa, los inmunoprecipitados se analizan por SDS-PAGE seguida por inmunotransferencia para She usando una dilución 1:2000 de antisero anti-She. La respuesta esperada es que IGF-I estimulará el reclutamiento de She a SHPS-1 que se requiere por She para sufrir fosforilación. Sin embargo si

se usa un antagonista, después SHPS-1 no se fosforilará y She no se unirá a SHPS-1 por lo tanto el reclutamiento será indetectable o estará grandemente disminuido.

5 *Activación de MAP quinasa.* La activación de MAP quinasa es crítica para estimulación de división celular y de migración celular en células musculares lisas y endotelio por IGF-I. La fosforilación y el reclutamiento de She a la membrana como se destaca previamente se requieren para la activación de MAP quinasa. Para determinar si la activación de MAP quinasa está dañada, las células se exponen a agonistas o antagonistas durante los periodos de tiempo descritos previamente después se preparan los lisados como se describe previamente (Maile LA y Clemmons DR Circ Res, 93: 925-931 (2003)). Se analizaron 30 μ l de lisado celular directamente por SDS-PAGE con inmunotransferencia para la forma fosforilada de ERK 1/2 (una indicación de actividad de MAP quinasa) (Ling Y, Maile LA, Clemmons DR, Mol Endocrinol, 17: 1824-1833 (2003)). Se anticiparía que la intensidad en el curso del tiempo de activación de MAP quinasa se prolongará por antagonistas de β 3 y se inhibirá por agonistas de β 3.

15 *Replicación celular.* El músculo liso y el endotelio se plaquean a densidad relativamente baja, $10^4/\text{cm}^2$ en suero bajo (0,2%) que contiene medio. 24 horas después de plaquear, las células entran en quiescencia en medio que contiene plasma pobre en plaquetas al 0,2%. 24 horas más tarde los cultivos se exponen a concentraciones crecientes de IGF-I entre 0 y 10 ng/ml y los agonistas o antagonistas de β 3. Después de 48 horas, los cultivos celulares se tiñen con azul de tripano y el número de células se determina por conteo manual. Si β 3 está ocupado por un agonista después hay al menos un incremento de dos veces en número de células durante este periodo de tiempo. Mientras que si se añade un antagonista hay a menudo menos del 20% de incremento en número de células.

25 *Migración celular.* Se hieren con una hoja de afeitar cultivos de células musculares lisas o de células endoteliales en quiescencia confluyentes como se describe en Maile LA, Imai Y, Clarke JB, Clemmons DR, J. Biol. Chem., 277: 1800-1805 (2002). Las heridas se examinan para determinar que se ha obtenido un borde recto y que no hay ningún surco en la placa. Se identifican después al menos cinco áreas que estén heridas correctamente con un marcador de color. Se añade IGF-I a concentraciones bien de 50 o bien de 100 ng/ml y se añaden diversas concentraciones de los agonistas y antagonistas a al menos cultivos por duplicado. Después de 72 horas se determina el número de células que han migrado al menos 50 micrómetros desde el borde recto y se cuenta tras teñir con azul de metileno. IGF-I estimula normalmente entre 20 y 50 células por campo microscópico a migrar esta distancia. En la presencia de un agonista, hay 30 generalmente menos de 5 células/campo microscópico que migran pero los agonistas pueden incrementar la respuesta a IGF-I en tanto como 2 veces.

La presente invención se explica en mayor detalle en los siguientes Ejemplos no limitantes.

35 Ejemplo 1

Síntesis de DNA

40 Las células se plaquean a una densidad de $2,5 \times 10^4/\text{cm}^2$ en placas de cultivo de tejidos de 96 pocillos y se cultivan durante 5 días sin un cambio de medio. Se aclararon una vez con DMEM libre de suero y se privaron de suero incubando con DMEM más plasma pobre en plaquetas al 0,2% (PPP) durante 24 horas. Las células se exponen después a IGF-I más cualquier tratamiento y se incuban a 37°C durante 24 horas, y la cantidad de [H^3]-timidina incorporada dentro de DNA se determina como se describe en: Imai Y y Clemmons DR. Roles of Phosphatidylinositol 45 3-Kinase and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Stimulation of Vascular Smooth Muscle Cell Migration and Deoxyribonucleic Acid Synthesis by Insulin-Like Growth Factor-I. Endocrinology 140, 4228-4235 (1999).

50 Ejemplo 2

Síntesis Peptídica

55 Los péptidos se sintetizan usando química de FMOC en un sintetizador de Péptidos Múltiple de Rainin. La activación y la acilación de aminoácidos FMOC utilizan HATU en presencia de una base (N-metilmorfolina). Tras finalización de acilación, el grupo protector de FMOC se retira con piperidina al 20% en dimetilformamida. Después de síntesis, el péptido se retira de la resina y se desprotege por tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% que contiene desoxidantes orgánicos apropiados.

60 Los péptidos escindidos, desprotegidos se precipitan en éter frío, se resuspenden en una mezcla de TFA diluido/acetonitrilo, y se purifican por cromatografía líquida de alta resolución en una resina de fase reversa con un gradiente de acetonitrilo creciente.

65 El control de calidad del producto peptídico se valora por HPLC analítico y por espectrometría de masas de dispersión de ionización de desorción de láser asistida por matriz. El péptido purificado se liofiliza y se almacena a 20°C.

Ejemplo 3

Identificación de Agonistas

Como se destacó anteriormente, los agonistas se unen a una región específica en un receptor de integrinas $\alpha V\beta 3$ que no se ha identificado previamente como una región que daría como resultado activación de receptor. Todos los agonistas que los autores de la presente invención han determinado que se unen en esta región contienen una región de secuencia que se llama comúnmente un dominio de unión a heparina. Este dominio de unión a heparina está presente en 5 ligandos que los autores de la presente invención han encontrado hasta la fecha que se unen a esta región de $\alpha V\beta 3$. La documentación que está ligada a una región específica de $\alpha V\beta 3$ se ha proporcionado por dos tipos de experimentos. Primero los autores de la presente invención tienen un anticuerpo policlonal que se sabe que reacciona con esta región de $\alpha V\beta 3$, que es la región de la subunidad $\beta 3$ que se localiza entre los aminoácidos en posiciones 177 y 183. Cuando este anticuerpo policlonal se incubaba con cualquiera de los agonistas conocidos, ello inhibe completamente su capacidad de unir.

Se llevó a cabo un experimento más definitivo en el que la región idéntica de la integrina $\beta 1$ se sustituyó por mutagénesis por esta región de 8 aminoácidos dentro de $\beta 3$. La proteína mutante se expresó después en células CHO que no expresaban constitutivamente $\beta 3$. Los ensayos de unión se llevaron a cabo después usando estos ligandos. Se mostró que esta mutación dio como resultado una pérdida completa de unión y una incapacidad para activar $\beta 3$. La activación se midió por fosforilación de $\beta 3$ que se ha mostrado que se estimula por unión de estos agonistas a esta región de $\beta 3$. Estos datos indican que ésta es la región de $\beta 3$ que se une a estos ligandos.

Ejemplo 4

Identificación de Antagonista

Se encontró que un péptido sintético que lleva la siguiente estructura: KKQRFRL (SEQ ID N.º: 6) tiene actividad inhibidora en cada uno de estos ensayos biológicos. La activación del receptor de IGF-I por IGF-I podría inhibirse en aproximadamente el 60%. Además el análisis ha mostrado que un péptido ciclado que contiene esta secuencia es un inhibidor más potente. La sustitución de un residuo hidrófobo por arginina en posición 208 da como resultado la pérdida de actividad más grande.

Ejemplo 5

Agonistas Adicionales

Los agonistas de péptidos adicionales que se pueden usar para llevar a cabo la presente invención se exponen en la Tabla 1 más adelante. Tales agonistas de péptidos se sintetizan como se describe en el Ejemplo 1 anterior.

TABLA 1

Ejemplos de péptidos agonistas de IGF-I adicionales

Agonista ($X_mBBXXABBBX_n$)* (SEQ ID N.º: 7)
KKQRFRL (SEQ ID N.º: 8)
RKQRFRL (SEQ ID N.º: 9)
KRQRFRL (SEQ ID N.º: 10)
KKQRFKRL (SEQ ID N.º: 11)
KKQRFRLK (SEQ ID N.º: 12)
KKQRFRLR (SEQ ID N.º: 13)

ES 2 343 424 T3

	KKQRFRR (SEQ ID N.º: 14)
	KKQRFRR (SEQ ID N.º: 15)
5	HKQRFRR (SEQ ID N.º: 16)
	KHQRFRR (SEQ ID N.º: 17)
	RRQRFRR (SEQ ID N.º: 18)
10	KKQRFKHK (SEQ ID N.º: 19)
	KKQKFRHR (SEQ ID N.º: 20)
	KKNRFRHR (SEQ ID N.º: 21)
15	KKQRYRHR (SEQ ID N.º: 22)
	KKQRWRHR (SEQ ID N.º: 23)
20	KKQRHRHR (SEQ ID N.º: 24)
	AKKQRFRRN (SEQ ID N.º: 25)
	LAKKQRFRRNR (SEQ ID N.º: 26)
25	Agonista ($X_mBBXXABBBX_n$)* (SEQ ID N.º: 7)
	SLAKKQRFRRNRK (SEQ ID N.º: 27)
	PSLAKKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 28)
30	RPSLAKKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 29)
	AKKQRFRR (SEQ ID N.º: 30)
	LAKKQRFRR (SEQ ID N.º: 31)
35	SLAKKQRFRR (SEQ ID N.º: 32)
	PSLAKKQRFRR (SEQ ID N.º: 33)
	FIPSLAKKQRFRR (SEQ ID N.º: 34)
40	KKQRFRRN (SEQ ID N.º: 35)
	KKQRFRRNR (SEQ ID N.º: 36)
	KKQRFRRNRK (SEQ ID N.º: 37)
45	KKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 38)
	RPSLAKKQRFRRN (SEQ ID N.º: 39)
	RPSLAKKQRFRRNR. (SEQ ID N.º: 40)
50	RPSLAKKQRFRRNRK (SEQ ID N.º: 41)
	AKKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 42)
	LAKKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 43)
55	SLAKKQRFRRNRKG (SEQ ID N.º: 44)
60	*B = aminoácido básico (R, K, H); X = cualquier aminoácido; A = aminoácido aromático (F, Y, W, H). m = cualquier número entero de 0-5, n = cualquier número entero de 0-4.

Ejemplo 6

Antagonistas Adicionales

- 5 Los antagonistas de péptidos adicionales que se pueden usar para llevar a cabo la presente invención se exponen en la Tabla 2 más adelante. Tales antagonistas de péptidos se sintetizan como se describe en el Ejemplo 2 anterior.

TABLA 2

Ejemplos de péptidos antagonistas de IGF-I adicionales

15	Antagonista (X _m BBXXABBHX _n)* (SEQ ID N.º: 45)
	KKQRFRL (SEQ ID N.º: 46)
	KKQRFRLHA (SEQ ID N.º: 47)
20	RKGRYKRA (SEQ ID N.º: 48)
	Antagonista (X _m BBXXABBHX _n)* (SEQ ID N.º: 45)
	KKQRFRLH (SEQ ID N.º: 49)
25	KKQRFRLHV (SEQ ID N.º: 50)
	KKQRFRLHM (SEQ ID N.º: 51)
	KKQRFRLHC (SEQ ID N.º: 52)
30	KKQRFRLHF (SEQ ID N.º: 53)
	KKQRFRLHW (SEQ ID N.º: 54)
	RKQRFRL (SEQ ID N.º: 55)
35	RKQRFRLH (SEQ ID N.º: 56)
	RKQRFRLHV (SEQ ID N.º: 57)
	RKQRFRLHM (SEQ ID N.º: 58)
40	RKQRFRLHC (SEQ ID N.º: 59)
	RKQRFRLHF (SEQ ID N.º: 60)
	RKQRFRLHW (SEQ ID N.º: 61)
45	AKKQRFRLN (SEQ ID N.º: 62)
	LAKKQRFRLNFI (SEQ ID N.º: 63)
	SLAKKQRFRLNFIK (SEQ ID N.º: 64)
50	PSLAKKQRFRLNFIKG (SEQ ID N.º: 65)
	RPSLAKKQRFRLNFIKG (SEQ ID N.º: 66)
	AKKQRFRL (SEQ ID N.º: 67)
55	LAKKQRFRL (SEQ ID N.º: 68)
	SLAKKQRFRL (SEQ ID N.º: 69)
60	PSLAKKQRFRL (SEQ ID N.º: 70)

	RPSLAKKQRFRLH (SEQ ID N.º: 71)
	KKQRFRLH (SEQ ID N.º: 72)
5	KKQRFRLHNR (SEQ ID N.º: 73)
	KKQRFRLHNRK (SEQ ID N.º: 74)
	KKQRFRLHNRKG (SEQ ID N.º: 75)
10	RPSLAKKQRFRLH (SEQ ID N.º: 76)
	RPSLAKKQRFRLHNR (SEQ ID N.º: 77)
	RPSLAKKQRFRLHNRK (SEQ ID N.º: 79)
15	AKKQRFRLHNRKG (SEQ ID N.º: 80)
	LAKKQRFRLHNFILK (SEQ ID N.º: 81)
20	SLAKKQRFRLHNFILK (SEQ ID N.º: 82)
25	*B = aminoácido básico (R, K, H); X = cualquier aminoácido; A = aminoácido aromático (F, Y, W, H) y H = aminoácido hidrófobo (I, L, V, M, F, W, C). H (cuando hace referencia a aminoácido hidrófobo y no hace referencia a histidina) puede ser también fosfo-serina (S-PO ₄). m = cualquier número entero de 0-5, n = cualquier número entero de 0-4.

Ejemplo 7

Preparación de Péptido para Inmunización

Con el fin de preparar un anticuerpo, la secuencia de la subunidad $\beta 3$ que se une al dominio de unión a heparina de vitronectina y otros ligandos, se preparó un péptido sintético. El péptido se sintetizó usando química de FMOC usando una síntesis de péptidos múltiple de Rainin. La activación y acilación de aminoácidos FMOC utiliza HTAU en la presencia de una base (n-metilmorfolina). Tras la finalización de la acilación, los grupos protectores FMOC se eliminan con piperidina al 20% en dimetilformamida. Después de la síntesis, el péptido se retira de la resina y se desprotege por tratamiento con ácido trifluoroacético al 95% que contiene desoxidantes orgánicos apropiados. El péptido escindido y desprotegido se precipitó después con éter frío y se resuspendió en TFA diluido/acetonitrilo y se purificó por cromatografía líquida de alta resolución en una resina en fase reversa y se eluyó con un gradiente de acetonitrilo creciente. La calidad del producto peptídico se valoró por HPLC analítica y por espectrometría de masas de dispersión de ionización de láser asistida por matriz. El péptido purificado se liofilizó y se almacenó a -20°C. La masa del péptido eluyente se verificó según contiene los aminoácidos correctos por comparación con las masas conocidas en la base de datos.

Conjugación del péptido de bucle de cisteína $\beta 3$ (CYDMKTTC) (SEQ ID N.º: 83) para Inyectar Hemocianina de Lapa de California de Maricultura Activada con Maleimida (PIERCE, Rockford, II). Se pesaron cantidades de 0,7 mg, 1,2 mg y 2,1 mg de péptido y se disolvió cada una por separado antes de adición a KLH en 500 mcl de NaH₂PO₄ 0,03 M, pH 7,2 conteniendo cloruro de sodio 0,9 M. Se disolvieron 2 mg de KHL activada por maleimida en 500 mcl de agua destilada. Se añadieron después 0,7 mg de péptido disuelto a la solución de KLH y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 minutos. Se incubó un tubo adicional que contenía 0,7 mg de péptido disuelto en tampón y se añadió a la misma solución de KLH se incubó de nuevo 25 minutos a temperatura ambiente. Se añadieron secuencialmente 1,2 mg y 2,1 mg de péptido a la solución de KHL y se incubaron adicionalmente durante intervalos de 1 hora después de cada adición, a temperatura ambiente. El conjugado peptídico se eliminó y se dializó 24 horas frente a 21 de H₂PO₄ de sodio 0,083 M pH 7,2, NaCl 0,9 M con un intercambio. El conjugado total de 4,7 mg de péptido/KLH se dividió en 5 alícuotas iguales, se liofilizó y se congeló a -20°C para uso más tardío.

Ejemplo 8

Inmunización de Conejos

Se usaron para inmunización hembras de conejo blanco Nueva Zelanda entre 2 ó 3 meses de edad. Una de las 5 alícuotas liofilizadas que contenían 1,34 mg de conjugado se disolvió en 450 mcl de agua destilada. Se añadieron 450 mcl de coadyuvante de Freund completo y la mezcla se homogeneizó. Se utilizaron 10 inyecciones intradérmicas que contenían entre 40-50 μ l de mezcla por inyección y se inyectaron dentro de la espalda de los conejos. Después de un intervalo entre 4 y 5 semanas el animal se sangró y se retiraron 9-11 ml de sangre completa. El animal recibió después una inyección de refuerzo de 1,3 mg de conjugado disueltos en 450 mcl de agua destilada conteniendo 450 μ l de

ES 2 343 424 T3

coadyuvante de Freund incompleto. Esta mezcla se inyectó en un sitio subcutáneamente. El conejo se sangró después mensualmente por medio de la arteria central de la oreja, recogién dose 9-12 ml en cada sangrado. Las inmunizaciones se repitieron 4 veces y los sangrados se llevaron a cabo a intervalos de 4-5 semanas.

5 Ejemplo 9

Purificación de Anticuerpos

El anticuerpo se purificó sobre una columna de afinidad a proteína G que se ha adquirido de Sigma. Se diluyeron
10 10-15 ml de suero de conejo en bruto con un volumen igual de H_2PO_4 de sodio 25 mM, pH 7,2 y se hicieron pasar
múltiples veces sobre una columna de afinidad de proteína G previamente equilibrada en el mismo tampón durante
16 horas a 4°C. La columna se eluyó después con 10 volúmenes de columna (total de 100 ml) de fosfato de sodio 25
mM 7,2 y la IgG se eluyó con HCl-glicina 0,1 M, pH 2,7. Las fracciones cromatográficas que contienen el anticuerpo
15 se neutralizaron con TRIS 1,0 M, pH 9 a pH 7,2 y se dializaron contra fosfato de sodio 25 mM, pH 7,2 conteniendo
cloruro de sodio 50 mM. Después de la diálisis el anticuerpo purificado de proteína G se almacenó a -20°C.

Ejemplo 10

Preparación de Columna de Afinidad y Purificación de Anticuerpos

20 Con el fin de purificar el anticuerpo a partir de suero completo, se preparó una columna de afinidad peptídico que
contenía la secuencia aminoacídica exacta de inmunógeno. El péptido de bucle de cisteína (CYDMKTC) (SEQ ID
N.º: 83) se acopló a azarosa usando gel de acoplamiento de Sulfolink (Pierce Chemical Co.). Se equilibraron 5 ml de
gel de acoplamiento con un tampón que contiene Tris 50 mM pH 8,5, ETDA de sodio 5 mM. Se disolvieron 0,7 mg
25 del péptido sintético en 1 ml de tampón de acoplamiento y se añadieron a 5 ml de gel y se incubaron a temperatura
ambiente mezclando durante 30 minutos. El procedimiento se repitió con alícuotas de 0,8 y 2 mg de péptido añadido
secuencialmente al mismo tubo que contenía el gel de acoplamiento y se incubó durante 30 minutos. Durante la última
etapa se añadieron 3,2 mg de péptido en el tampón de acoplamiento y la mezcla completa se reincubó durante 3 horas
adicionales. Después de la incubación final de 3 horas, el material se centrifugó a 1000 x g y se retiró el sobrenadante.
30 Se añadieron 5 ml de cisteína 50 M en el tampón descrito anteriormente al gel de acoplamiento y la incubación
continuó a temperatura ambiente durante 1 hora con mezclado suave bloqueando los sitios que no han reaccionado.
El gel se almacenó en azida de sodio al 0,25% en agua destilada hasta usar. Para purificar el anticuerpo la columna de
afinidad se equilibró primero con Tris 50 mM pH 7,2, conteniendo cloruro de sodio 50 mM. La reserva de anticuerpo
que se ha eluido a partir de la columna de afinidad de la proteína G y se ha dializado previamente se hizo circular
35 por la columna durante 36 horas. La reserva de anticuerpos que se ha eluido a partir de la columna de afinidad por
proteínas G y se ha dializado previamente se hizo circular en la columna durante 36 horas. La columna se lavó con 10
volúmenes de columna (100 ml) del tampón de carga y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,7. El anticuerpo se neutralizó
después con Tris 1 M, pH 9 y se almacenó a -20°C hasta usar. La concentración de proteína final fue de 180 mcg/ml.

40 Ejemplo 11

Producción y Rastreo de Anticuerpos Monoclonales

Inmunización. Se utilizaron ratones Swiss Webster libres de patógenos para inmunización. El péptido conjugado
45 anteriormente se mezcla con coadyuvante RIBI de ratón emulsionado (emulsión de MPL + TDDTM) y se inyectan
300 mcg del antígeno emulsionado intraperitonealmente. Las inyecciones se repiten a intervalos de tres semanas, dos
veces. Las valoraciones de anticuerpos se determinan retirando 50-100 mcl de sangre de la vena del rabo a intervalos
de tres semanas. La valoración se determina poniendo a prueba la reactividad del suero de ratón para antígeno β 3
inmovilizado. En los ratones donde se obtiene suficiente valoración de anticuerpos después de seis semanas los ratones
50 se sacrifican y los bazo y nódulos linfáticos se retiran por fusión con células de mieloma para formación de hibridoma.

Formación de hibridoma. Se seleccionan dos ratones para recogida de bazo. Estos ratones se refuerzan una tercera
vez con 300 mcg de antígeno después cuatro días más tarde se sacrifican. Se recogen sangre y bazo. Las células del
bazo se recogerán y se condensarán con células 63-AGA65 (ATCCCL-1580) usando solución de PEG al 50%.
55 Estas células condensadas se plaquean después en una placa de 96 pocillos a 1×10^5 células por pocillo en medio
de selección HAT. Después de 12-14 días las placas o clones de condensación se alimentan en medios HT. En este
momento se recogió medio para rastrear por ensayo de ELISA según se describe más adelante para identificar las
células de hibridoma deseadas.

60 *Materiales de ELISA.* El ELISA se llevó a cabo con los siguientes materiales:

placas Immulon IV de 96 pocillos (n.º de catálogo de Fisher 14-245-153)

65 tampón de revestimiento 1x (tampón de carbonato al 0,05 M/bicarbonato pH 9,6 n.º de catálogo de Sigma
C3041)

BSA al 2% en PBS (Tampón de Bloqueo)

ES 2 343 424 T3

BSA al 0,5% en PBS (Tampón de ELISA)

Tween al 0,05% en PBS (Tampón de Lavado)

Desarrollador de DEA

El Desarrollador de DEA (para 500 ml): se produce a partir de 4,8 ml de Dietanolamina al 85% (n.º de catálogo de Fisher D45); 0,25 ml de $MgCl_2$ 1 M; y comprimidos pNPP (n.º de catálogo de Sigma N2765). Para preparar el desarrollador, disolver DEA en 40 ml de agua estéril y ajustar pH a 10 con HCl y NaOH. Añadir $MgCl_2$. Llevar volumen hasta 500 ml. Almacenar a 4°C. Envolver en hoja fina metálica protegiendo de la luz. Inmediatamente antes de usar añadir un comprimido de pNPP a 20 ml de tampón.

El Anticuerpo Secundario es conjugado de fosfatasa alcalina de IgG anti-ratón de cabra (n.º de catálogo de Jackson Immunoresearch 115-055-164).

Péptido a 1 mg/ml en PBS.

Procedimiento de ELISA. Con materiales preparados como se describe anteriormente, el rastreo de ELISA de anticuerpos monoclonales producido como se describe anteriormente se lleva a cabo aislando y proporcionando un anticuerpo monoclonal de la presente invención como sigue:

1. Recubrir placas con 50 μ l/pocillo de péptido en tampón de recubrimiento a concentración de 5 μ g/ml a 4°C durante toda una noche
2. Lavar placas con Tween al 0,05%
3. Bloquear placas con tampón de bloqueo a 200 l/pocillo durante toda una noche a 4°C
4. Repetir etapa 2
5. Añadir anticuerpo primario (anticuerpo de prueba) a 40 μ l/pocillo (Sobrenadantes) o a 50 μ l/pocillo (diluciones de suero) e incubar durante 1 hora a temperatura ambiente
6. Lavar las placas con Tween 0,05% en PBS
7. Añadir 50 μ l/pocillo de anticuerpo secundario a dilución 1:2000 e incubar a temperatura ambiente durante 1 horas
8. Lavar las placas con Tween al 0,05% en PBS
9. Añadir 50 μ l/pocillo de desarrollador DEA y dejar incubar
10. Leer en espectrofotómetro a 405 nM

Lo anterior es ilustrativo de la presente invención, y no debe interpretarse como limitante de la misma. La invención se define por las siguientes reivindicaciones, con equivalentes de las reivindicaciones incluyéndose la misma.

REIVINDICACIONES

1. Un compuesto de Fórmula II:



en la que:

A¹¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹³ es cualquier aminoácido;

A¹⁴ es cualquier aminoácido;

A¹⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A¹⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁸ es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está unido opcionalmente a R¹¹ y R¹²;

Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos PUEDE ser fosfoserina o ESTÁ opcionalmente unido a R¹³ y R¹⁴;

R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para la inhibición de la acción del IGF-1 en un sujeto.

2. Uso de un compuesto de Fórmula II:



en la que:

A¹¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹³ es cualquier aminoácido;

A¹⁴ es cualquier aminoácido;

A¹⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A¹⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A¹⁸ es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está unido opcionalmente a R¹¹ y R¹²;

Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos PUEDE ser fosfoserina o ESTÁ opcionalmente unido a R¹³ y R¹⁴;

R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para la fabricación de un medicamento para inhibir la acción del IGF-I en un sujeto.

3. El compuesto o uso de la reivindicación 2, en el que dicho sujeto está afectado por un tumor seleccionado del grupo constituido por tumores de cáncer de mama, tumores de cáncer de colon, tumores de cáncer de pulmón y tumores de cáncer de próstata.

4. El compuesto o uso de la reivindicación 3, en el que dicho tumor o los vasos sanguíneos que alimentan el tumor expresa los receptores de $\alpha V\beta 3$.

5. El compuesto o uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho sujeto está afectado por aterosclerosis, y administrándose dicho antagonista en una cantidad eficaz para tratar dicha aterosclerosis.

6. El compuesto o uso de la reivindicación 5, en el que dicha aterosclerosis es aterosclerosis coronaria, carótida o femoral.

7. El compuesto o uso de la reivindicación 5, en el que dicha aterosclerosis está **caracterizada** por células con lesión aterosclerótica que expresan receptores de $\alpha V\beta 3$.

8. El compuesto o uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho sujeto está afectado por osteoporosis, y administrándose dicho antagonista en una cantidad eficaz para tratar dicha osteoporosis.

9. El compuesto o uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicho sujeto está afectado por angiogénesis patológica, retinopatía o nefropatía, y administrándose dicho antagonista en una cantidad eficaz para tratar dicha angiogénesis patológica, retinopatía o nefrepatía.

10. El compuesto o uso de la reivindicación 9, comprendiendo dicha angiogénesis patológica la vascularización de un tumor.

11. Un compuesto de la Fórmula I:



en la que:

A¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

A² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A³ es cualquier aminoácido;

A⁴ es cualquier aminoácido;

A⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

ES 2 343 424 T3

A⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A⁸ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

5 X es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está opcionalmente unido a R¹ y R²;

10 Y es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos está opcionalmente unido a R³ y R⁴; y

R¹, R², R³ y R⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

15 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para potenciar la acción de IGF-I en un sujeto.

12. Uso de un compuesto de Fórmula I:

20



25

en la que:

30 A¹ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

A² es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A³ es cualquier aminoácido;

35 A⁴ es cualquier aminoácido;

A⁵ es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

40 A⁶ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A⁷ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A⁸ es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H o una serina fosforilada;

45 X es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está opcionalmente unido a R¹ y R²;

Y es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos está opcionalmente unido a R³ y R⁴; y

50

R¹, R², R³ y R⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

55 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para la fabricación de un medicamento para potenciar la acción del IGF-I en un sujeto.

60 13. El compuesto o uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho sujeto está afectado por crecimiento deficiente, y administrándose dicho agonista una cantidad eficaz para potenciar el crecimiento de dicho sujeto.

14. El compuesto o uso de la reivindicación 13, en el que dicho sujeto es un lactante, niño o adolescente.

65 15. El compuesto o uso de la reivindicación 13, en el que dicho sujeto está afectado por vascularización retinal defectuosa, y administrándose dicho agonista en una cantidad eficaz para tratar dicha vascularización retinal defectuosa.

16. El compuesto o uso de la reivindicación 15, en el que dicho sujeto es un lactante.

17. El compuesto o uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho sujeto está afectado por una lesión isquémica, y administrándose dicho agonista en una cantidad eficaz para tratar dicha lesión isquémica.

18. El compuesto o uso de la reivindicación 17, en el que dicha lesión isquémica comprende enfermedad vascular periférica con claudicación.

19. El compuesto o uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho sujeto está afectado por atrofia neuronal o insuficiencia en el desarrollo de procesos neuronales, y administrándose dicho agonista en una cantidad eficaz para tratar dicha atrofia neuronal o facilitar el desarrollo de procesos neurales.

20. El compuesto o uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho sujeto está afectado por una fractura de cadera y administrándose dicho agonista en una cantidad eficaz para tratar dicha fractura de cadera.

21. El compuesto o uso de la reivindicación 20, en el que dicho sujeto es un adulto o anciano.

22. El compuesto o uso de las reivindicaciones 11 ó 12, en el que dicho sujeto está afectado por una úlcera isquémica diabética, y administrándose dicho agonista en una cantidad eficaz para tratar dicha úlcera isquémica diabética.

23. Un anticuerpo que: (a) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana, (b) no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y (c) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina para su uso en la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto.

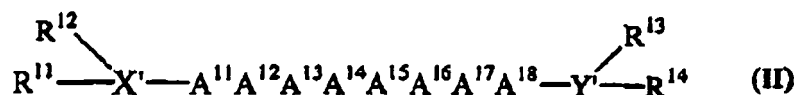
24. El uso de un anticuerpo que: (a) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana, (b) no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y (c) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina en la fabricación de un medicamento para la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto.

25. El compuesto o uso de las reivindicaciones 1 ó 2, 23 ó 24, en el que dicho sujeto está afectado por retinopatía o nefropatía diabética con necesidad de tratamiento, administrándose dicho antagonista del dominio de bucle de cisteína de la integrina $\alpha V \beta 3$ en una cantidad eficaz de tratamiento.

26. Un compuesto seleccionado del grupo constituido por las SEQ ID N°: 8-37 y 39-44.

27. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 26 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

28. Un compuesto de Fórmula II:



en la que:

A^{11} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{12} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{13} es cualquier aminoácido;

A^{14} es cualquier aminoácido;

A^{15} es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A^{16} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{17} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{18} es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está unido opcionalmente a R^{11} y R^{12} ;

ES 2 343 424 T3

Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos puede ser fosfoserina o está opcionalmente unido a R¹³ y R¹⁴;

R¹¹, R¹², R¹³ y R¹⁴ están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

29. Una formulación farmacéutica que comprende un compuesto de la reivindicación 28 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30. Un implante que tiene un compuesto de la reivindicación 28 acoplado al mismo.

31. El implante de la reivindicación 30, en el que dicho implante es una endoprótesis vascular o un implante oftálmico.

32. Un anticuerpo que: (a) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana, (b) no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y (c) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina.

33. Un anticuerpo de la reivindicación 32 acoplado a un grupo detectable.

34. El anticuerpo de la reivindicación 32 acoplado a un grupo terapéutico.

35. Una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo de la reivindicación 32 en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

36. Un implante que tiene un anticuerpo de la reivindicación 32 acoplado al mismo.

37. El implante de la reivindicación 36, en el que dicho implante es una endoprótesis vascular o un implante oftálmico.

38. Un procedimiento para seleccionar compuestos por su actividad en la activación de la modulación celular por IGF-I, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un dominio de bucle de cisteína; después

(b) determinar si dicho compuesto de ensayo se une al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de dicha integrina $\beta 3$

(c) identificar dicho compuesto de ensayo como activo en la activación de la activación celular por IGF-1 si dicho compuesto se une al dominio de bucle de cisteína.

39. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicho sistema comprende una integrina $\alpha V\beta 3$.

40. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicha etapa de puesta en contacto se realiza *in vitro*.

41. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicha etapa de determinación se realiza determinando si dicho compuesto de ensayo inhibe o no la unión de un anticuerpo que se une específicamente a dicho dominio de bucle de cisteína.

42. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicha integrina $\beta 3$ es una integrina $\beta 3$ de mamífero.

43. El procedimiento de la reivindicación 38, en el que dicha integrina $\beta 3$ es una integrina $\beta 3$ de mamífero seleccionada del grupo constituido por integrina $\beta 3$ humana y porcina.

44. Un procedimiento para seleccionar compuestos por su actividad en la modulación de la activación celular por IGF-I, que comprende las etapas de:

(a) poner en contacto un compuesto de ensayo con un dominio de bucle de cisteína; después

(b) determinar si dicho compuesto de ensayo se une al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de dicha integrina $\beta 3$;

(c) identificar dicho compuesto de ensayo como activo en la activación de la activación celular por IGF-1 si dicho compuesto se une al dominio de bucle de cisteína.

45. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicho dominio de bucle de cisteína está inmovilizado en un soporte sólido.

46. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicha etapa de puesta en contacto se realiza *in vitro*.

47. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicha etapa de determinación se realiza determinando si dicho compuesto de ensayo inhibe la unión de un anticuerpo que se une específicamente a dicho dominio de bucle de cisteína o no.

48. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicha integrina $\beta 3$ es una integrina $\beta 3$ de mamífero.

49. El procedimiento de la reivindicación 44, en el que dicha integrina $\beta 3$ es una integrina $\beta 3$ de mamífero seleccionada del grupo constituido por integrina $\beta 3$ humana y porcina.

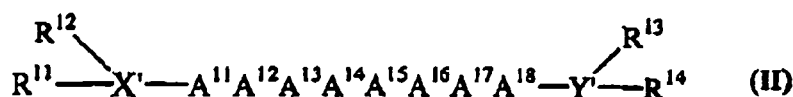
50. Un dominio de bucle de cisteína inmovilizado que comprende un péptido acoplado a un soporte sólido, comprendiendo dicho péptido los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$.

51. El dominio de bucle de cisteína inmovilizado de la reivindicación 50, en el que dicha integrina $\beta 3$ es una integrina $\beta 3$ humana o porcina.

52. El dominio de bucle de cisteína inmovilizado de la reivindicación 50, en el que dicho soporte es un soporte polimérico.

53. El dominio de bucle de cisteína inmovilizado de la reivindicación 50, en el que dicho péptido está construido por no más de 15 aminoácidos.

54. Un compuesto de Fórmula II:



en la que:

A^{11} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{12} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{13} es cualquier aminoácido;

A^{14} es cualquier aminoácido;

A^{15} es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A^{16} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{17} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{18} es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está unido opcionalmente a R^{11} y R^{12} ;

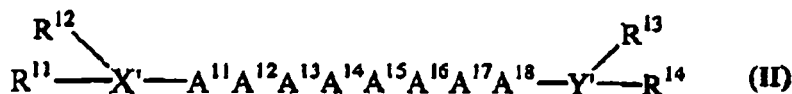
Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos PUEDE ser fosfoserina o ESTÁ opcionalmente unido a R^{13} y R^{14} ;

R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para su uso en la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto en tratamiento con un compuesto antineoplástico o radioterapia.

55. Uso de un compuesto de Fórmula II:



en la que:

A^{11} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{12} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{13} es cualquier aminoácido;

A^{14} es cualquier aminoácido;

A^{15} es un aminoácido aromático seleccionado del grupo constituido por F, Y, W y H;

A^{16} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{17} es un aminoácido básico seleccionado del grupo constituido por R, K y H;

A^{18} es un aminoácido hidrófobo seleccionado del grupo constituido por I, L y V o un aminoácido neutro seleccionado del grupo constituido por M, F, W, C y A;

X' es una cadena de 0 a 5 aminoácidos, en la que el extremo N de uno de los mismos está unido opcionalmente a R^{11} y R^{12} ;

Y' es una cadena de 0 a 4 aminoácidos, en la que el extremo C de uno de los mismos PUEDE ser fosfoserina o ESTÁ opcionalmente unido a R^{13} y R^{14} ;

R^{11} , R^{12} , R^{13} y R^{14} están presentes o ausentes y están seleccionados, cada uno independientemente, del grupo constituido por H, alquilo C1-C12, arilo C6-C18, acilo C1-C12, aralquilo C7-C18 y alcarilo C7-C18;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo

para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto en tratamiento con un compuesto antineoplástico o radioterapia.

56. Un anticuerpo que: (a) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana, (b) no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y (c) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina para su uso en la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto en tratamiento con un compuesto antineoplástico o radioterapia.

57. Uso de un anticuerpo que: (a) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ humana, (b) no se une específicamente al sitio de unión RGD de una integrina $\beta 3$ humana; y (c) se une específicamente al dominio de bucle de cisteína en los aminoácidos 177 a 184 de una integrina $\beta 3$ porcina para la fabricación de un medicamento para la inhibición de la acción del IGF-I en un sujeto en tratamiento con un compuesto antineoplástico o radioterapia.

58. El compuesto o uso de las reivindicaciones 54-57, seleccionándose dicho tumor del grupo constituido por tumores de cáncer de mama, tumores de cáncer de colon, tumores de cáncer de pulmón y tumores de cáncer de próstata.

59. El compuesto o uso de la reivindicación 58, expresando dicho tumor un receptor $\alpha V\beta 3$.