

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 694 240**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.10.2010 PCT/AU2010/001367**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2011 WO11044636**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.10.2010 E 10822911 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2488256**

54 Título: **Modulación de bomba de Na-K**

30 Prioridad:

15.10.2009 AU 2009905055

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

19.12.2018

73 Titular/es:

**RASMUSSEN, HELGE H. (100.0%)
29 Mosman Street
Mosman, NSW 2088, AU**

72 Inventor/es:

RASMUSSEN, HELGE H.

74 Agente/Representante:

CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes

Observaciones:

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

ES 2 694 240 T3

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

DESCRIPCIÓN

Modulación de bomba de Na-K

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a la modulación de la inhibición oxidativa de la actividad de la bomba de Na⁺-K⁺. En particular, la presente invención se refiere a la modulación de la inhibición oxidativa de la actividad de la bomba Na⁺-K⁺ por las proteínas FXYD. La presente invención también se refiere a proteínas FXYD y derivados de las mismas, 10 útiles en el tratamiento de mamíferos, particularmente seres humanos, que tienen afecciones que implican la inhibición oxidativa de la bomba de Na⁺-K⁺.

Antecedentes

15 Las proteínas FXYD 1-7 son una familia de proteínas que abarcan una sola transmembrana que reciben el nombre de su motivo de aminoácido FXYD compartido en el dominio extracelular. Las proteínas FXYD son conocidas por un efecto que se cree que tienen sobre las proteínas de membrana con las que se asocian, en particular, la membrana Na⁺-K⁺ ATPasa. Las proteínas FXYD no forman parte de la bomba de Na⁺-K⁺ *per se*, sino que actúan como moduladores específicos de tejido de la función de la bomba de Na⁺-K⁺. Garty H y Karlish S (Annu. Rev. Physiol. 20 2006, 68: 431-59) revisan el papel de las proteínas FXYD en el transporte de iones. Las proteínas FXYD se han visto ampliamente implicadas en la regulación de la función de la bomba de Na⁺-K⁺, y se sabe que, de hecho, modifican las propiedades funcionales de la bomba. En particular, se entiende que FXYD1, única entre las proteínas FXYD, ya que puede fosforilarse en residuos de serina C-terminal, regula la bomba de Na⁺-K⁺ en respuesta a la fosforilación. Sin embargo, un problema con este entendimiento es que las proteínas FXYD 2-7 no tienen sitios de 25 fosforilación funcional y la mayoría de los tejidos no expresan FXYD1, por lo que la fosforilación de las proteínas FXYD no puede ser un esquema universalmente aplicable para la regulación de la bomba de Na⁺-K⁺ por las proteínas FXYD.

Los gradientes transmembrana para Na⁺ y K⁺ mantenidos por la bomba de Na⁺-K⁺ son críticos para la generación de 30 potenciales de membrana y, por lo tanto, para la excitabilidad de las células. También impulsan procesos secundarios de co y contra-transporte para otros iones, así como para una gran cantidad de compuestos orgánicos, críticos para el metabolismo celular. La bomba y la superfamilia más amplia de ATPasas transportadoras de cationes a la que pertenece son dianas terapéuticas importantes. Sin embargo, a pesar de haber sido descubierta hace más de 50 años, la modulación de la actividad de la bomba de Na⁺-K⁺ sigue siendo poco conocida.

35 Los inventores han ilustrado previamente un papel para la señalización oxidativa en la regulación de la bomba de Na⁺-K⁺, ya que la subunidad β₁ del heterodímero α/β de la bomba de Na⁺-K⁺ tiene un residuo de cisteína "reactivo" capaz de glutationilarse y que dicha glutationilación inhibe reversiblemente la función de la bomba de Na⁺-K⁺. La glutationilación puede ser inducida por oxidantes químicos o mediada por la activación de la NADPH oxidasa 40 dependiente del receptor de membrana y la proteína cinasa.

El estrés oxidativo es un factor importante en varias enfermedades que incluyen infarto de miocardio, ictus y cáncer. El aumento del estrés oxidativo y los altos niveles de miocitos Na⁺ y Ca⁺ contribuyen al daño miocárdico y las anomalías contráctiles en la isquemia y la reperfusión.

45 En respuesta al estrés oxidativo, la subunidad β₁ de la bomba de Na⁺-K⁺ se glutationila en el infarto y la inhibición de la bomba causada por éste puede contribuir a los niveles elevados de Na⁺ y Ca²⁺. El estrés oxidativo también se ha relacionado con el daño isquémico cerebral con el ictus, y se han examinado estrategias antioxidantes. Además, se sabe que el estrés oxidativo es un factor importante en la lesión por isquemia-reperfusión.

50 Sigue existiendo la necesidad de métodos mejorados para la modulación de la actividad de la bomba de Na/K, tal como para su uso en un contexto terapéutico en el que la inhibición de la actividad de la bomba está asociada con el detrimento de la salud.

55 **Resumen**

El alcance de la presente invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que las proteínas FXYD modulan la inhibición

oxidativa de la bomba de Na^+/K^+ al alterar la glutationilación de la bomba de Na^+/K^+ .

En el presente documento se divulgan métodos para modular la actividad de la bomba de Na^+/K^+ mediante la alteración de la glutationilación de la bomba de Na^+/K^+ . En formas de realización preferidas, la presente divulgación
5 pretende proporcionar métodos para el tratamiento del infarto de miocardio, ictus, cáncer y lesión por isquemia-reperusión.

En un aspecto, la divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una afección asociada con el exceso de glutationilación de una bomba de Na^+/K^+ , comprendiendo el método poner en contacto dicha bomba con
10 una cantidad eficaz de una proteína FXYD.

Una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una afección asociada con una glutationilación excesiva de una bomba de Na^+/K^+ .

15 En una forma de realización, la afección asociada con una glutationilación excesiva de la bomba de Na^+/K^+ se selecciona del grupo que consiste en infarto de miocardio, ictus, cáncer y lesión por isquemia-reperusión.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para modular la actividad de la bomba de Na^+/K^+ , comprendiendo el método poner en contacto la bomba de Na^+/K^+ con una proteína FXYD o un fragmento o
20 variante de la misma, en el que la glutationilación de dicha bomba de Na^+/K^+ se altera por dicha proteína FXYD o fragmento o variante de la misma.

Una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma para su uso en un método para modular la actividad de la bomba de Na^+/K^+ .

25 En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar infarto de miocardio, ictus o lesión por isquemia-reperusión mediante la modulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ en un sujeto, comprendiendo el método administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma, en el que dicha proteína FXYD o fragmento o variante de la misma promueve
30 la desglutinationilación de dicha bomba de Na^+/K^+ modulando de este modo la actividad de la bomba de Na^+/K^+ .

Una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma para su uso en un método para tratar infarto de miocardio, ictus o lesión por isquemia-reperusión.

35 En una forma de realización, el tratamiento puede comenzar en aproximadamente 24 horas después del infarto, ictus o lesión por reperusión. Preferiblemente, el tratamiento se inicia en aproximadamente 12 horas después del infarto, ictus o lesión de reperusión, más preferiblemente el tratamiento se inicia en aproximadamente 6 horas después del infarto, ictus o lesión de reperusión, incluso más preferiblemente el tratamiento se inicia en
40 aproximadamente 3 horas después del infarto, ictus o lesión por reperusión, mucho más preferiblemente el tratamiento se inicia aproximadamente en el momento del infarto, ictus o lesión por reperusión.

En una forma de realización, la proteína FXYD se selecciona del grupo que consiste en FXYD1, FXYD3, FXYD4, FXYD6 y FXYD7.

45 En una forma de realización, el fragmento o variante comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXYD1.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso de una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma para la fabricación de un medicamento para la modulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ en un
50 sujeto.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso de una proteína FXYD o un fragmento o variante de la misma para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del infarto de miocardio, ictus o lesión por isquemia-reperusión.

55 En una forma de realización, la proteína FXYD se selecciona del grupo que consiste en FXYD1, FXYD3, FXYD4, FXYD6 y FXYD7.

En una forma de realización, el fragmento o variante comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de

FXVD1.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una proteína FXVD o un fragmento o variante de la misma junto con al menos un adyuvante, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona un método para tratar el cáncer mediante la modulación de la actividad de la bomba de Na⁺/K⁺ en un sujeto, comprendiendo el método administrar a dicho individuo una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína FXVD de pérdida de función en el que dicha proteína FXVD de pérdida de función aumenta o mantiene la glutatiónilación de dicha bomba de Na⁺/K⁺, modulando de este modo la actividad de la bomba de Na⁺/K⁺.

Una proteína FXVD de pérdida de función o un fragmento o variante de la misma para su uso en un método para tratar el cáncer.

En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función es una proteína FXVD o un fragmento o variante de la misma que no comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXVD1.

En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función no comprende aminoácidos básicos adyacentes a la cisteína correspondiente a Cys62 de FXVD1.

En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función es FXVD2 o FXVD5 o un fragmento o variante de FXVD2 o FXVD5. En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función es un fragmento o variante de FXVD3.

En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función se administra en un tratamiento de combinación con radioterapia o quimioterapia.

En una forma de realización, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer de intestino.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona el uso de una proteína FXVD de pérdida de función para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer.

En un aspecto de la presente divulgación, se proporciona una proteína FXVD de pérdida de función aislada que no comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXVD1.

En una forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función no comprende una cisteína correspondiente a Cys62 de FXVD1. En otra forma de realización, la proteína FXVD de pérdida de función no comprende al menos un aminoácido básico adyacente a una cisteína correspondiente a Cys62 de FXVD1.

En una forma de realización, la pérdida aislada de la proteína FXVD de pérdida de función aislada es una variante de FXVD1, FXVD3, FXVD4, FXVD5, FXVD6 o FXVD7.

45 Breve descripción de los dibujos

Una forma de realización preferida de la presente invención se describirá ahora, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos en los que:

La **Figura 1** ilustra la glutatiónilación de FXVD1 en el miocardio. **A.** FXVD1 se detecta en el lisado celular, así como la subfracción glutatiónilada marcada con biotina de lisado celular en miocitos cardíacos. Esto tiene lugar en el valor inicial (control: C), y aumenta con la exposición al oxidante químico ONOO⁻. El control negativo se realizó usando miocitos no cargados con biotina-GSH. No se detectó FXVD1 si se añadió DTT (1 mmol) al lisado antes de la precipitación con estreptavidina. **B.** Histograma que muestra la densitometría media de las inmunotransferencias de FXVD1 en la extracción por pull-down con estreptavidina de los miocitos cargados con biotina-GSH expuestos a ONOO⁻ o control (n = 3). **C.** Efecto de Ang II (100 y 500 nM) en la glutatiónilación de FXVD1 detectada por inmunotransferencia (IB) con el anticuerpo GSH contra el inmunoprecitado de FXVD1 (IP). **D.** Efecto de la Forskolina (Fsk) (100 nM) sobre la glutatiónilación de FXVD1 detectada por la técnica del anticuerpo GSH en miocitos con y sin incubación en SOD pegilada. **E.**

Glutacionilación de FXYD1 en miocardio a partir de un modelo ovino de infarto. Se tomaron muestras del miocardio alejado del infarto; la zona peri-infarto, y la zona de infarto. Los histogramas resumen la densitometría de las inmunotransferencias normalizadas frente al control ($n = 3$ para cada experimento). * $p < 0,05$.

5 La **Figura 2** ilustra la glutacionilación de FXYD1 y los efectos funcionales. **A.** Inmunotransferencia de FXYD1 (panel superior) y la subunidad β_1 (panel inferior) de microsomas de ovocitos que se cargaron directamente en geles (carriles 7-12) o se sometieron a inmunoprecipitación con perlas de estreptavidina (carriles 1-6). Los experimentos se realizaron 2 días después de la inyección de ARNc de subunidad α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con ARNc de FXYD1. Todos los ovocitos se inyectaron con biotina-GSH como se describe en los métodos, y con ONOO⁻ como se indica. cg, núcleo glucosilado; fg, subunidad β totalmente glucosilada. **B.** Cuantificación de la glutacionilación de la subunidad β de Na,K-ATPasa. Se muestran las unidades arbitrarias obtenidas mediante el escaneo densitométrico de los datos mostrados en A, normalizados por la cantidad total de proteínas expresadas. Los datos de ovocitos que expresan $\alpha_1\beta_1$ se establecieron arbitrariamente en 1. Se muestran medias \pm SE de 5 experimentos independientes. * $p < 0,005$. **C.** FXYD1 revierte la inhibición de la bomba de Na,K en presencia de ONOO⁻. La corriente máxima de Na,K-ATPasa ($I_{m\acute{a}x}$) se midió mediante la técnica de pinza de tensión de dos electrodos. Se muestran las medias \pm SE de 20 ovocitos de 2 lotes diferentes. * $p < 0,05$ frente a control. Las corrientes medidas en ovocitos no inyectados representaron $51 \text{ nA} \pm 3,5$ y $40 \text{ nA} \pm 2,7$ en ausencia y presencia de ONOO⁻, respectivamente, y no se restaron. **D.** Efecto de FXYD1 sobre la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ inducida por forskolina en miocitos cardíacos. El histograma muestra la corriente de la bomba de Na⁺-K⁺ (I_p) de los miocitos expuestos a forskolina con o sin FXYD1 recombinante (500 nM) que se incluye en la solución de pipeta de parche. El número de miocitos en cada grupo experimental varió de 6 a 10. * indica $p < 0,05$ en todos los paneles.

25 La **Figura 3** ilustra el efecto de FXYD3 recombinante en la regulación de la bomba de Na⁺-K⁺ en los miocitos cardíacos. **A.** La proteína FXYD3 recombinante co-inmunoprecipita con la subunidad α_1 nativa en los miocitos cardíacos. Inmunotransferencia de FXYD3 (IB) de FXYD3; subunidad α_1 ; GSH; e inmunoprecipitado de control no inmune (IP) de los miocitos incubados en FXYD3 recombinante (500 nM) y expuestos a ONOO⁻ o control durante 10 minutos, según se indique. **B.** La exposición de los miocitos cardíacos a FXYD3 recombinante disminuye la co-inmunoprecipitación de FXYD1 nativo con la subunidad α_1 de la bomba de Na⁺-K⁺. Inmunotransferencia de FXYD1 y subunidad α_1 de inmunoprecipitado de subunidad α_1 de miocitos cardíacos aislados expuestos a FXYD3 o FXYD3 cysless mutado. **C.** Efecto de FXYD3 recombinante o FXYD3 cysless en la glutacionilación inducida por ONOO⁻ de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ (GSS- β_1). Los miocitos se expusieron a FXYD3 recombinante 500 nM (o mutante cysless) durante 15 minutos antes de la exposición a ONOO⁻ o control (C) durante 10 minutos. **D.** Efecto de FXYD3 recombinante o FXYD3 cysless en la glutacionilación inducida por Ang II de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ (GSS- β_1). Los miocitos se expusieron a FXYD3 recombinante 500 nM (o mutante cysless) durante 15 minutos antes de la exposición a Ang II 100 nM o control (C) durante 10 minutos. **E.** Efecto de FXYD3 recombinante o FXYD3 cysless en la disminución inducida por Ang II en la corriente de la bomba de Na⁺-K⁺ (I_p) medida en miocitos cardíacos aislados. Las proteínas recombinantes se incluyeron en la solución de pipeta de parche a una concentración de 500 nM. El número de miocitos en cada grupo experimental varió de 5 a 10. **F.** Efecto de FXYD3 o FXYD3 cysless en una disminución inducida por el agonista adrenérgico β_3 (CL316.243: CL) en la glutacionilación de la subunidad de la bomba de Na⁺-K⁺ β_1 . Los histogramas resumen la densitometría de las inmunotransferencias normalizadas frente al control ($n = 3$ para cada experimento). * indica $p < 0,05$ en todos los paneles.

45 La **Figura 4** ilustra la identificación del residuo de cisteína implicado en la glutacionilación de FXYD 1 y la regulación de la bomba de Na⁺-K⁺ a través de estudios mutacionales. Los ovocitos de *Xenopus* que expresan subunidades α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con FXYD1 de tipo salvaje o mutado (FXYDC1, FXYDC2 o FXYDC1C2) se inyectaron con biotina-GSH para la detección de glutacionilación y ONOO⁻, según se indique. **A.** Inmunotransferencia de FXYD1 de microsomas de ovocitos que se cargaron directamente en geles (panel superior) o inmunoprecipitados con perlas de estreptavidina (panel inferior). **B.** Histograma que muestra la densitometría media de la inmunotransferencia de GSS-FXYD1 normalizada frente al control (GSS-FXYD1 en ovocitos que expresan subunidades nativas FXYD1/ $\alpha_1\beta_1$ y se exponen a ONOO⁻). **A.** Inmunotransferencia de la subunidad β_1 de microsomas de ovocitos que se cargaron directamente en geles (panel superior) o inmunoprecipitados con perlas de estreptavidina (panel inferior). **D.** Histograma que muestra la densitometría media de la inmunotransferencia de GSS- β_1 normalizada por la cantidad total de proteínas expresadas. Por razones técnicas, no fue posible comparar la glutacionilación de FXYD1 y las subunidades β para todas las condiciones en el mismo experimento. Por lo tanto, las cuantificaciones no incluyen la glutacionilación de subunidades β en ovocitos que expresan subunidades $\alpha_1\beta_1$ sin FXYD1. Los datos de ovocitos que expresan subunidades α , β y FXYD1

o α , β y FXYD1C1C2 se ajustaron arbitrariamente a 1. Se muestran medias \pm SE de 4 experimentos independientes. * $p < 0,05$. **E.** Identificación de la cisteína FXYD implicada en la reversión de la inhibición máxima de la corriente de la bomba. Las corrientes medidas en ovocitos no inyectados representaron $69,5 \text{ nA} \pm 2,5$ y $62,5 \text{ nA} \pm 1,9$ en ausencia y presencia de ONOO⁻, respectivamente, y no se restaron. Se muestran las medias \pm SE de 20 ovocitos de 4 lotes diferentes. * $p < 0,05$ frente a control. C1 = C60/A; C2 = C62/A; C1C2 = C60/A,C62/A.

La **Figura 5** ilustra los aminoácidos que rodean a la cisteína candidata que desempeñan un papel en la glutationilación de la proteína FXYD. Los ovocitos de *Xenopus* que expresan subunidades α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con FXYD1, FXYD2, FXYD7, FXYD1 mutante (K63/G) o FXYD2 mutante (G49/K) se inyectaron con biotina-GSH y ONOO⁻ como se indica. **A.** Papel funcional de la lisina adyacente a la cisteína candidata en la reversión de la inhibición máxima de la corriente de la bomba. Se muestran las medias \pm SE de 15 ovocitos de 3 lotes diferentes. * $p < 0,02$ frente a control. Las corrientes medidas en ovocitos no inyectados representaron $59,5 \text{ nA} \pm 4$ y $51 \text{ nA} \pm 3,7$ en ausencia y presencia de ONOO⁻, respectivamente, y no se restaron. La mutación Lys/Gly suprime la glutationilación de FXYD1 (**B**) y promueve un aumento en la glutationilación de la subunidad β_1 de Na,K-ATPasa (**C**). La mutación Gly/Lys en FXYD2 conduce a una disminución en la glutationilación de la subunidad β_1 de Na,K-ATPasa (**C**). Los microsomas de ovocitos se cargaron directamente en geles (**B**, **C** paneles superiores) o se inmunoprecipitaron con perlas de estreptavidina (**B**, **C**, paneles inferiores) y se analizaron transferencias de Western con un anticuerpo FXYD1 (**B**). Después de la separación de la membrana de nitrocelulosa mostrada en **B**, la transferencia se analizó con un anticuerpo de subunidad β de Na,K-ATPasa (**C**). **D.** Cuantificación de la glutationilación de la subunidad β de Na,K-ATPasa. Se muestran las unidades arbitrarias obtenidas mediante el escaneo densitométrico de los datos mostrados en **C**, normalizados por la cantidad total de proteínas expresadas. Los datos de ovocitos que expresan α , β y FXYD1 KG se ajustaron arbitrariamente a 1. Se muestran medias \pm SE de 3 experimentos independientes. * $p < 0,05$.

La **Figura 6** ilustra que los estímulos oxidativos disminuyen la interacción de FXYD1 con α_1 y aumentan la interacción con las subunidades β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ en el miocardio. **A.** Efecto de Ang II (100 nM y 500 nM) en la densitometría de la inmunotransferencia de subunidad α_1 (IB) frente al inmunoprecipitado de FXYD1 (IP) en miocitos cardíacos de conejo. **B.** Efecto de Ang II (100 nM y 500 nM) en la densitometría de la inmunotransferencia de subunidad β_1 (IB) en el inmunoprecipitado de FXYD1 (IP) en miocitos cardíacos de conejo. **C.** Inmunotransferencia de la subunidad α_1 (C) y la subunidad β_1 (D) del inmunoprecipitado FXYD1 del lisado de miocardio de un modelo de infarto de oveja. Se usó miocardio de región alejada del infarto; así como la zona peri-infarto y de infarto. En todos los experimentos, se muestra la inmunotransferencia de FXYD1 frente al inmunoprecipitado de FXYD1. Los histogramas resumen la densitometría de las inmunotransferencias normalizadas frente al control ($n = 3$ para cada experimento). * $p < 0,05$.

La **Figura 7** ilustra que la glutationilación de la subunidad β de Na,K-ATPasa promueve una disminución en la asociación de la subunidad α y β de Na,K-ATPasa. **A.** Interacción α_1/β_1 en ovocitos de *Xenopus*. Dos días después de la inyección de los ARNc de las subunidades α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con los ARNc de FXYD1 o FXYD1 mutante (FXYD1C2), los ovocitos se inyectaron con biotina-GSH y ONOO⁻ como se indica. Los microsomas de ovocitos se cargaron directamente en geles (paneles a, b) o se inmunoprecipitaron con un anticuerpo α (paneles c, d) o con perlas de estreptavidina (paneles e) y las transferencias Western se analizaron con un anticuerpo de la subunidad β de Na,K-ATPasa (paneles b, d y e). Después de la separación de la membrana de nitrocelulosa, la transferencia se analizó con un anticuerpo de subunidad α de Na,K-ATPasa (paneles a, c). **B.** Cuantificación de la cantidad de subunidad β_1 de Na,K-ATPasa asociada con la subunidad α_1 de Na,K-ATPasa. Se muestran las unidades arbitrarias obtenidas mediante el escaneo densitométrico de los datos mostrados en **A**, normalizados por la cantidad total de proteínas expresadas y por la cantidad de subunidad α de Na,K-ATPasa inmunoprecipitada. Los datos de ovocitos que expresan subunidades α y β , α y β \square y FXYD1 de tipo salvaje o mutante sin inyección de ONOO⁻ se ajustaron arbitrariamente a 1. Se muestran medias \pm SE de 3-4 experimentos independientes. * $p < 0,05$. **C.** Efecto de FXYD3 recombinante o FXYD3 cysless en la disminución inducida por ONOO⁻ en la co-inmunoprecipitación de subunidad α_1/β_1 . Los miocitos cardíacos de conejo se expusieron a ONOO⁻ como se indica. Los histogramas resumen la densitometría de las inmunotransferencias normalizadas frente al control ($n = 3$). * $p < 0,05$. **D.** El efecto del estrés oxidante asociado con el infarto de miocardio en la interacción de la subunidad α_1/β_1 . Su co-inmunoprecipitación se redujo en las zonas de infarto y peri-infarto del miocardio. Los histogramas resumen la densitometría de las inmunotransferencias normalizadas frente al control ($n = 3$). * Indica una diferencia significativa frente al control ($p < 0,05$).

La **Figura 8** ilustra el impacto de las cisteínas mutadas en FXYD1, también conocido como "phospholemman" (PLM) en la modificación dependiente de ONOO⁻ de la actividad de Na,K-ATPasa. Los

ovocitos de *Xenopus* que expresan subunidades α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con PLM (FXYD1) de tipo salvaje o mutado se inyectaron o no con ONOO⁻, según se indica. **A.** Unión de [³H]ouabaína a ovocitos intactos. Los valores obtenidos en ovocitos no inyectados fueron 370 dpm \pm 27, respectivamente y no se restaron. Los datos son medias \pm SE de 14 ovocitos de 2 lotes diferentes. **B.** Número de recambios de Na,K-ATPasa. El número de recambios (cargas transportadas/s/molécula) se calculó como la relación entre la corriente máxima de la bomba de Na,K y el número de sitios de unión de ouabaína. * $p < 0,03$ frente a control.

La **Figura 9** ilustra el impacto de diferentes proteínas FXYD en la modificación dependiente de ONOO⁻ de la actividad de Na,K-ATPasa. Los ovocitos de *Xenopus* que expresan subunidades α_1 y β_1 de Na,K-ATPasa de *Xenopus* en solitario o junto con PLM de tipo salvaje o mutado, FXYD2 o FXYD7 se inyectaron o no con ONOO⁻, según se indica. **A.** Unión de [³H]ouabaína a ovocitos intactos. Los valores obtenidos en ovocitos no inyectados 378 dpm \pm 23 y 364 dpm \pm 24 y no se restaron. Los datos son medias \pm SE de 14 ovocitos de 2 lotes diferentes. **B.** Número de recambios de Na,K-ATPasa. * $p < 0,05$ frente a control.

La **Figura 10** es un alineamiento de secuencia de secuencias parciales de proteínas FXYD humanas 1-7 que indican la posición de las cisteínas en la posición 60 y 62 de FXYD1 (sombreado claro) y los aminoácidos básicos en las posiciones 61 y 63 de FXYD1 (sombreado oscuro).

Definiciones

El término "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en el presente documento incluye en su significado una cantidad suficiente de un compuesto o composición para proporcionar un efecto terapéutico deseado. La cantidad exacta requerida variará de un sujeto a otro dependiendo de factores tales como la especie que se está tratando, la edad y el estado general del sujeto, las comorbilidades, la gravedad de la afección que se trata, el agente particular que se administra y el modo de administración. Por lo tanto, para cualquier caso dado, un experto en la técnica puede determinar una "cantidad terapéuticamente eficaz" apropiada utilizando solo métodos de rutina.

Los términos "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en el presente documento e incluyen seres humanos e individuos de cualquier especie de importancia social, económica o de investigación, incluyendo, pero sin limitación, miembros del género ovino, bovino, equino, porcino, felino, canino, primates, roedores.

Los términos "tratar" y "tratamiento", como se usan en el presente documento, incluyen administrar una terapia para prevenir, curar, aliviar, mejorar o prevenir los síntomas asociados con un trastorno, enfermedad, lesión o afección.

El término "combinado con" y términos similares, tal como "junto con" como se usa en el presente documento, en relación con un régimen terapéutico, significa que cada uno de los fármacos y otro agente o agentes terapéuticos, tales como agonistas y antagonistas o sustancias adicionales usadas en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección, se utiliza en el tratamiento de un sujeto, y que cada uno de los fármacos y otros agentes terapéuticos en el régimen terapéutico "combinado" pueden administrarse al sujeto simultáneamente con uno o más de los otros agentes en el régimen terapéutico, o pueden administrarse al sujeto en un momento diferente a uno o más de los otros agentes en el régimen terapéutico. Se entenderá que el término "combinado con" y términos similares tal como "junto con" como se usa en el presente documento en relación con un régimen terapéutico incluye dentro de su significado la administración de cada uno de los fármacos y otros agentes terapéuticos a través de diferentes modos (por ejemplo, uno puede administrarse por vía oral y otro por inyección). El término "combinado con" y términos similares, tales como "junto con", cuando se usan en relación con un régimen terapéutico pueden significar que uno cualquiera o más de los fármacos u otros agentes pueden combinarse físicamente antes de la administración al sujeto, y se entenderá que el término también incluye la administración de uno o más fármacos y otros agentes terapéuticos como agentes separados que no están en una combinación física anterior.

El término "que comprende" como se usa en el presente documento, significa que incluye principalmente, pero no necesariamente únicamente. Además, las variaciones de la palabra "que comprende", tales como "comprender" y "comprende", tienen significados correspondientemente variados.

El término, "I_p", como se usa en el presente documento, es una abreviatura de la corriente transmembranosa celular medible generada por la bomba de Na⁺-K⁺ en situaciones experimentales usando una técnica de pinza de parche.

El término "derivado" cuando se usa en relación con una proteína FXYD de la presente invención, incluye cualquier proteína FXYD funcionalmente equivalente que incluya cualquier molécula de fusión producida integralmente (por ejemplo, por medios recombinantes) o añadida después de la síntesis (por ejemplo, por medios químicos). Dichas fusiones pueden comprender proteínas FXYD de la invención conjugadas con un polipéptido (por ejemplo,

puromicina u otro polipéptido), una molécula pequeña (por ejemplo, psoraleno) o un anticuerpo.

El término "modulador", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier entidad que pueda aumentar o disminuir la glutacionilación de la bomba de Na^+/K^+ . Los moduladores pueden ser "activadores", que disminuyen el nivel de glutacionilación y, por lo tanto, facilitan el aumento de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ . En algunas formas de realización, los moduladores son "inhibidores" que son entidades que no afectan al nivel de glutacionilación de la bomba de Na^+/K^+ , pero inhiben los moduladores endógenos para que lo hagan. En formas de realización preferidas, los moduladores son proteínas FXYD o derivados de las mismas.

10 Los términos "proteína FXYD" y "proteínas FXYD" como se usan en el presente documento, se refieren a cualquier proteína, polipéptido u oligopéptido que comprende al menos una porción de una proteína FXYD, variante u homólogo de la misma, y que conserva la capacidad de asociarse con la bomba de Na^+/K^+ .

En el contexto de esta memoria descriptiva, el término "polipéptido" significa un polímero formado por aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. El polipéptido puede ser de cualquier longitud. Excepto cuando el contexto indique lo contrario, se entenderá que el término polipéptido también incluye péptidos y proteínas.

El término "contacto", como se usa en el presente documento, se refiere a la exposición de tejidos, órganos o células a una o más proteínas FXYD o profármacos de la divulgación para que puedan modular la actividad de la bomba de Na^+/K^+ . El contacto puede ser *in vitro*, por ejemplo, añadiendo la proteína FXYD o profármaco a tejidos cultivados o células con fines de diagnóstico o investigación o para probar la susceptibilidad del tejido o las células a la proteína FXYD o profármaco. El contacto puede ser *in vivo*, por ejemplo, administrar la proteína FXYD o el profármaco a un sujeto, tal como para el tratamiento o la prevención de una afección no deseada.

25 El término "al menos uno" cuando se usa en el contexto de un grupo de elementos seleccionables incluye uno cualquiera, dos o más, hasta todos los miembros del grupo, seleccionados individualmente e incluye cualquier combinación de los miembros del grupo. De manera similar, el término "al menos dos" cuando se usa en el contexto de un grupo de elementos seleccionables incluye cualquier selección de dos o más miembros del grupo en cualquier combinación.

30 En el contexto de esta memoria descriptiva, los términos " Na^+/K^+ ATPasa", bomba de Na^+/K^+ , bomba de Na^+/K^+ y Na^+/K^+ ATPasa se usan indistintamente.

En el contexto de esta memoria descriptiva, los términos "PLM", "phospholemman" y "FXYD1" se usan indistintamente.

Descripción detallada

La invención se describirá ahora con más detalle, incluyendo, solo a modo de ilustración, con respecto a los siguientes ejemplos.

En el presente documento se divulgan composiciones y métodos para la modulación de la glutacionilación de la bomba de Na^+/K^+ , particularmente en el tratamiento de afecciones tales como infarto de miocardio, cáncer e ictus. Los métodos generalmente comprenden el uso de composiciones que comprenden una proteína FXYD o una proteína FXYD sola para el tratamiento de una afección en la que la modulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ por la alteración de la glutacionilación de Na^+/K^+ puede ser beneficiosa.

Modulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+

50 Todas las células se caracterizan por una diferencia en el potencial eléctrico entre el interior de la célula y el exterior, separados por la membrana celular. El gradiente eléctrico y químico generado a través de la membrana celular por la función de la bomba de Na^+/K^+ es crítico para una serie de procesos que incluyen el acoplamiento de excitación-contracción en las células musculares y el transporte facilitado de metabolitos, por ejemplo, glucosa y aminoácidos a la célula. Por consiguiente, la modulación de la actividad de la bomba de Na^+/K^+ desempeña un papel crítico en la función celular.

Proteínas FXYD

Las proteínas FXYD son una familia de proteínas de membrana de tipo I pequeñas que reciben su nombre por una

secuencia de firma FXYD invariable en el dominio extracelular. Las proteínas FXYD ("fixit") de mamífero, expresadas de manera específica de tejido (Sweadner y Rael, 2000), se numeran cronológicamente según las fechas en que se clonaron y consisten en phospholemman (FXD1) (Palmer et al., 1991 y por ejemplo, FXYD1 humana UniProtKB/Swiss-Prot N.º de acceso 000168 (SEQ ID NO. 1)) la subunidad γ de Na,K-ATPasa (FXD2) (Mercer et al., 1993 y, por ejemplo, FXYD2 humana UniProtKB/Swiss-Prot N.º de acceso P54710 (SEQ ID No. 2)), marcador tumoral mamario 8, Mat-8 (FXD3) (Morrison et al., 1995 y, por ejemplo, FXYD3 humana N.º de acceso de Genbank CAG46994 (SEQ ID No.3)), factor inducido por la hormona corticosteroide CHIF (FXD4) (Attali et al., 1995 y, por ejemplo, FXYD4 humana N.º de acceso de Genbank CAI17065 (SEQ ID No. 4)), proteína "relacionada con el canal iónico" Ric (FXD5) (Fu y Kamps, 1997 y, por ejemplo, FXYD5 humana N.º de acceso de Genbank AAQ89350 (SEQ ID No. 5)), fosfohipolina (FXD6) (Yamaguchi et al., 2001 y, por ejemplo, FXYD6 humana N.º de acceso de Genbank CAG38488 (SEQ ID No. 6)) y FXYD7 (Béguin et al., 2002 y, por ejemplo, FXYD7 humana N.º de acceso de Genbank NP_071289 (SEQ ID No. 7)).

Los ejemplos de secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas FXYD son FXYD1 humana EMBL-EBI N.º de acceso U72245 (SEQ ID No. 8), FXYD2 humana EMBL-EBI N.º de acceso U50743 (SEQ ID No. 9), FXYD3 humana N.º de acceso de Genbank CR542197 (SEQ ID No. 10), FXYD4 humana N.º de acceso de Genbank NM_173160 (SEQ ID No. 11), FXYD5 humana N.º de acceso de Genbank NM_001164605 (SEQ ID No. 12), FXYD6 humana N.º de acceso de Genbank NM_022003 (SEQ ID No. 13) y FXYD7 humana N.º de acceso de Genbank NM_022006 (SEQ ID No. 14).

La Figura 10 ilustra parte de un alineamiento de secuencia múltiple realizado utilizando las secuencias completas de las SEQ ID No's 1-7 (FXD1 humana con respecto a FXYD7). La Figura 10 indica la posición de las cisteínas en la posición 60 y 62 de FXYD1 (sombreado claro) y los aminoácidos básicos en las posiciones 61 y 63 de FXYD1 (sombreado oscuro). Se entenderá que la numeración de aminoácidos como se indica en la Figura 10 y la Lista de secuencias se deriva de las secuencias asociadas con los números de acceso mencionados anteriormente. La numeración de aminoácidos en variantes u homólogos de FXYD puede variar debido a la presencia de, por ejemplo, un péptido líder; sin embargo, se entenderá que los residuos correspondientes a las cisteínas en las posiciones 60 y 62 de FXYD1 se ubicarán en el dominio citoplásmico cerca del segmento transmembrana.

Se entenderá que la divulgación incluye variantes de proteínas FXYD descritas en el presente documento. Típicamente, una variante es una variante de secuencia o una variante de origen natural, como una variante de corte y empalme o un homólogo de secuencia. Típicamente, la variante conserva la capacidad de interactuar con la bomba de Na-K. Las variantes incluyen las preparadas por métodos recombinantes o sintéticos conocidos en la técnica.

Las variantes u homólogos pueden tener una o más sustituciones, deleciones, adiciones y/o inserciones de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos. Las variantes u homólogos de las proteínas FXYD divulgadas en el presente documento presentan preferiblemente al menos aproximadamente un 70 %, al menos aproximadamente un 80 %, al menos aproximadamente un 85 %, o al menos aproximadamente un 90 % de identidad con una proteína FXYD nativa, más preferiblemente al menos aproximadamente un 92 %, o al menos aproximadamente un 97 % de identidad, y mucho más preferiblemente al menos aproximadamente un 97 % de identidad a lo largo de la variante u homólogo de una proteína FXYD nativa.

Algunas proteínas FXYD nativas o fragmentos de las mismas pueden ser incapaces de promover la desglutinationilación de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. Por ejemplo, el Ejemplo 6 muestra que FXYD2 no altera la función de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. En la Figura 10 se puede observar que FXYD2, FXYD5 y FXYD6 nativas carecen de al menos una de una cisteína reactiva correspondiente a cys62 de FXYD1 y aminoácidos básicos adyacentes a esa cisteína reactiva. Por lo tanto, se contempla que FXYD5 y FXYD6 carecerían de la capacidad de promover la desglutinationilación de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$.

Por consiguiente, se puede crear, por lo tanto, una variante de la proteína FXYD de pérdida de función por mutación de uno o más de los aminoácidos básicos adyacentes a la cisteína reactiva a un aminoácido no básico o por mutación de una cisteína reactiva correspondiente a cys62 de FXYD1. Se puede crear una variante de la proteína FXYD con ganancia de función a partir de FXYD2, FXYD5 o FXYD6 mediante la mutación de uno o más aminoácidos adyacentes a la cisteína reactiva a un aminoácido básico o, en el caso de FXYD5, la inserción de una cisteína en una posición correspondiente a cys62 de FXYD1. En algunas formas de realización, se puede crear una variante de FXYD5 con ganancia de función mediante la inserción de una cisteína en una posición correspondiente a cys62 de FXYD1 y la inserción de un aminoácido básico en una posición correspondiente a lys63 de FXYD1.

Las variantes pueden modificarse, por ejemplo, mediante la eliminación o adición de aminoácidos que influyen en la capacidad de la variante para modular la bomba de Na-K, la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido.

5 Las sustituciones de aminoácidos incluyen, pero no están necesariamente limitadas a, sustituciones de aminoácidos conocidas en la técnica como "conservativas". Una sustitución "conservativa" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de tal manera que un experto en la técnica de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido se mantuvieran sustancialmente inalteradas. Las sustituciones de aminoácidos se pueden hacer generalmente en base
10 a la similitud en polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o la naturaleza anfipática de los residuos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios
15 conservativos incluyen: (1) ala, pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his. Una variante puede contener también, o como alternativa, cambios no conservativos.

Típicamente, una proteína FXYP de variante se diferencia de una proteína FXYP nativa por sustitución, eliminación
20 o adición de cinco aminoácidos o menos, tal como por cuatro, o tres, o dos, o un aminoácido.

Típicamente, una proteína FXYP de la invención es una proteína aislada. Se entenderá que el término "aislado" en este contexto significa que la proteína se ha eliminado o no está asociada con alguno o ninguno de los demás componentes con los que se encontraría en el sistema natural. Por ejemplo, un péptido "aislado" puede eliminarse
25 de otras secuencias de aminoácidos dentro de una secuencia polipeptídica FXYP, o puede eliminarse de componentes naturales, tales como proteínas no relacionadas. Por motivos de claridad, una proteína FXYP "aislada" incluye una proteína FXYP que se ha sintetizado químicamente e incluye un polipéptido u oligopéptido que se ha preparado mediante métodos recombinantes. Como se describe en el presente documento, la proteína FXYP aislada de la invención puede incluirse como parte componente de un polipéptido o proteína de fusión de mayor
30 longitud.

Por consiguiente, una proteína FXYP de la invención puede comprender de al menos aproximadamente 6 aminoácidos al menos a aproximadamente 65 aminoácidos. Preferiblemente, una proteína FXYP de la invención puede comprender aproximadamente 7- 10, 11- 15, 16- 20, 21- 25, 26- 30, 31-35, 36-40, 41-45, 46-50, 51-55, 56-60
35 o 61-65 aminoácidos.

Una proteína FXYP de la invención puede incluirse como parte componente de una secuencia de aminoácidos más larga. Por ejemplo, una proteína FXYP de la invención puede estar presente en forma de una proteína de fusión o polipéptido donde la proteína FXYP está unida con una o más secuencias de aminoácidos a las que no estaría unida
40 en la naturaleza.

En este contexto, se entenderá que una proteína de fusión o polipéptido puede comprender una pluralidad de proteínas FXYP de la invención, tal como un polipéptido donde dos o más proteínas FXYP están presentes en un único polipéptido.
45

Una proteína de fusión o polipéptido que comprende una o más proteínas FXYP de la invención puede comprender adicionalmente una o más secuencias no relacionadas. Tal secuencia se denominará generalmente en el presente documento, en el contexto de una proteína de fusión o polipéptido, como un "compañero de fusión". Típicamente, un compañero de fusión es una secuencia de aminoácidos, y puede ser un polipéptido. Un compañero de fusión puede
50 seleccionarse, por ejemplo, para facilitar la producción del péptido o péptidos. Los ejemplos de dichos compañeros de fusión incluyen aquellos capaces de mejorar la expresión recombinante del péptido o de un polipéptido que comprende el péptido; aquellos capaces de facilitar o ayudar a la purificación del péptido o un polipéptido que comprende el péptido tal como una etiqueta de afinidad. Como alternativa, o además, se puede seleccionar un compañero de fusión para aumentar la solubilidad del péptido o de un polipéptido que comprende el péptido, para
55 aumentar la inmunogenicidad del péptido, para permitir que el péptido o polipéptido que comprende el péptido se dirija a un compartimento intracelular específico o deseado.

Los métodos para la preparación de proteínas de fusión son conocidos en la técnica. Típicamente, una proteína de fusión puede prepararse mediante técnicas estándar tales como conjugación química, síntesis de péptidos o medios

recombinantes. Una proteína de fusión puede incluir uno o más enlazadores, tal como uno o más enlazadores peptídicos, entre las partes componentes de la proteína, tal como entre uno o más péptidos componentes, y/o entre uno o más compañeros de fusión y/o péptidos componentes. Tales enlazadores peptídicos pueden elegirse para permitir que las partes componentes de la proteína de fusión mantengan o alcancen una estructura secundaria y terciaria apropiada.

Las proteínas FXYD de la invención se pueden preparar por cualquier medio adecuado, tal como por aislamiento de una forma natural, por síntesis química o por medios recombinantes. El experto en la técnica conocerá los métodos estándar para dicha preparación, tal como mediante el aislamiento de una secuencia de aminoácidos más larga de origen natural mediante escisión enzimática, tal como mediante síntesis química, tal como mediante tecnología de ADN recombinante.

Una proteína FXYD sintetizada se puede purificar por cromatografía líquida preparativa de alto rendimiento u otras técnicas comparables disponibles en la técnica. Si se desea, la composición de las proteínas FXYD sintéticas se puede confirmar mediante análisis de aminoácidos o secuenciación. Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos de un polipéptido, o cualquier parte del mismo, puede alterarse durante la síntesis directa y/o combinarse usando métodos químicos con secuencias de otras proteínas, o cualquier parte de la misma, para producir un polipéptido variante.

La proteína FXYD de la invención, o una proteína de fusión o polipéptido que comprende una proteína FXYD de la invención como una parte componente de la misma puede ser un péptido soluble, una proteína de fusión o un polipéptido.

En el presente documento también se divulgan polinucleótidos que codifican una o más proteínas FXYD de la invención y polinucleótidos que codifican una o más proteínas de fusión o polipéptidos que comprenden proteínas FXYD de la invención, como se describe en el presente documento. En ciertas formas de realización, pueden usarse secuencias de polinucleótidos o fragmentos de las mismas que codifican péptidos de la invención, o proteínas de fusión o equivalentes funcionales de las mismas, en moléculas de ADN recombinante para dirigir la expresión de un polipéptido en células huésped apropiadas. Debido a la degeneración inherente del código genético, pueden producirse otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos funcionalmente equivalente y estas secuencias pueden usarse para clonar y expresar un polipéptido dado.

Como reconocerán los expertos en la técnica, los polinucleótidos pueden ser monocatenarios (codificantes o antisentido) o bicatenarios, y pueden ser moléculas de ADN (genómicas, ADNc o sintéticas) o de ARN. Las moléculas de ARN incluyen moléculas de ARNHn, que contienen intrones y se corresponden con una molécula de ADN de manera individual, y moléculas de ARNm, que no contienen intrones. Las secuencias codificantes o no codificantes adicionales pueden, pero no es necesario, estar presentes dentro de un polinucleótido de la presente divulgación, y un polinucleótido puede estar unido, pero no es necesario, a otras moléculas y/o materiales de soporte. Los polinucleótidos pueden comprender una secuencia nativa (es decir, una secuencia endógena que codifica una proteína FXYD o una porción de la misma) o pueden comprender una variante, o un equivalente funcional biológico o antigénico de dicha secuencia. Las variantes de polinucleótidos pueden contener una o más sustituciones, adiciones, deleciones y/o inserciones, como se describe adicionalmente a continuación, preferiblemente de manera que la inmunogenicidad del polipéptido codificado no disminuya, en relación con una proteína FXYD nativa. El efecto sobre la inmunogenicidad del polipéptido codificado puede evaluarse generalmente como se describe en el presente documento. El término "variantes" también incluye genes homólogos de origen xenogénico.

Para expresar un polipéptido deseado, las secuencias de nucleótidos que codifican el péptido, la proteína de fusión o el polipéptido, o equivalentes funcionales, se pueden insertar en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de la secuencia codificante insertada. Los métodos que son bien conocidos por los expertos en la técnica pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican un polipéptido de interés y elementos de control de la transcripción y la traducción apropiados. Estos métodos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Dichas técnicas se describen en Sambrook, J. et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., y Ausubel, F. M. et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y.

Por lo tanto, la divulgación proporciona vectores que comprenden una secuencia de polinucleótidos divulgada en el presente documento. En una forma de realización, el vector puede ser un vector de expresión. La divulgación

también proporciona una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector divulgado en el presente documento. También se divulgan métodos para la preparación de un péptido de la invención, comprendiendo tal método cultivar una célula huésped que comprende un polinucleótido o vector de expresión divulgado en el presente documento en condiciones que conducen a la expresión del péptido codificado. En una forma de realización, el método comprende además purificar el péptido expresado.

Las proteínas FXYD son importantes en los procesos de enfermedad. Una mutación de FXYD2 se ha relacionado con hipomagnesemia renal humana dominante (Meij et al., 2000), mientras que la sobreexpresión de FXYD1 cerebral está implicada en el síndrome de Rett (Deng et al., 2007), y la sobreexpresión de FXYD5 desempeña un papel en la cancerogénesis. FXYD3 se sobreexpresa en tumores de órganos, incluyendo de mama, páncreas y próstata, y se sobreexpresa en tumores de otros órganos, incluyendo de riñón y colon, y en células Caco-2 no diferenciadas, lo que sugiere un papel específico de tejido de FXYD3 en la tumorigénesis y la diferenciación celular. El nivel de expresión de FXYD3 en los tumores del colon se correlaciona inversamente con la respuesta a la radioterapia, es decir, la respuesta es más peor con niveles más altos de expresión.

Las proteínas FXYD se han implicado en la regulación de la función de la bomba de Na/K. El mayor interés en la bibliografía publicada, en términos de una función reguladora, se ha centrado en FXYD1, que es única entre las proteínas FXYD al tener residuos de aminoácidos de serina en su terminal citoplasmático que son dianas de las proteínas cinasas, es decir, pueden fosforilarse. En este esquema, se cree que las proteínas FXYD inhiben la actividad de la bomba y que esta inhibición se alivia con la fosforilación de FXYD1.

Sorprendentemente, como se describe en el presente documento, el presente inventor ha demostrado que la inclusión de FXYD1 en soluciones de pipeta de parche está asociada con un aumento de la corriente de la bomba de Na/K, lo que está en desacuerdo con la opinión predominante de que FXYD1 inhibe la bomba en los miocitos cardíacos. El inventor planteó la hipótesis de que una cisteína conservada en las proteínas FXYD puede ser "reactiva" (la mayoría de las cisteínas no lo son) y por tanto incluía FXYD1 en soluciones de pipetas de parche y activaba un estímulo oxidativo dependiente de la cinasa. Como se demuestra en el presente documento, la FXYD1 exógena suprimió la disminución dependiente de cinasa en la actividad de la bomba.

Una investigación adicional realizada por el inventor como se describe en el presente documento demostró que la inversión de la inhibición de la bomba inducida por oxidación está mediada por la interacción exógena de FXYD con la glutatiónilación, que se ha demostrado que está causalmente relacionada con la inhibición de la bomba. Por lo tanto, la FXYD3 exógena suprimió la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na/K inducida por el estímulo oxidante (exposición de los miocitos a la angiotensina II). El uso de un mutante de FXYD3 en el que las cuatro cisteínas de FXYD3 habían mutado a serina no logró el mismo efecto (abolición). En estudios funcionales sobre miocitos sujetos a tensión, una disminución inducida por la angiotensina II en la corriente de la bomba de Na/K electrógena se suprimió por la FXYD3 de tipo salvaje incluida en las soluciones de pipetas. Nuevamente, este efecto no fue evidente cuando se usó el mutante de FXYD3 libre de cisteína.

Por consiguiente, a partir de estos estudios, se proporciona en el presente documento un método para modular la actividad de la bomba de Na/K poniendo en contacto la bomba con una proteína FXYD para influir en la glutatiónilación de la bomba. Dependiendo de la influencia deseada en la glutatiónilación de la bomba, la proteína FXYD que entra en contacto con la bomba puede estar destinada a reducir la glutatiónilación de la bomba, eliminando o reduciendo de este modo el grado de inhibición de la bomba para aumentar la actividad de la bomba, o puede ser para contrarrestar la desglutinationilación de la bomba, manteniendo o exacerbando así la inhibición de la actividad de la bomba. Por lo tanto, se indica brevemente, cuando se desea que la actividad de la bomba se aumente (tal como al disminuir la inhibición de la bomba inducida por glutatiónilación), esto se puede lograr, por ejemplo, al poner en contacto la bomba con una proteína FXYD capaz de promover la desglutinationilación de la bomba. Los ejemplos de tales situaciones en un contexto terapéutico incluyen infarto de miocardio, ictus u otras afecciones de lesión tisular que surgen de isquemia o reperusión. Alternativamente, cuando se desea inhibir la actividad de la bomba (tal como manteniendo la bomba en un estado de inhibición inducida por el glutatión), esto se puede lograr poniendo en contacto la bomba con una proteína FXYD incapaz de promover la desglutinationilación de la bomba y desplazando la proteína FXYD nativa de tipo salvaje funcional. Como se explica en el presente documento, una proteína FXYD incapaz de (o con capacidad reducida para) la desglutinationilación de la bomba de Na/K se conoce como una proteína FXYD de pérdida de función. Los ejemplos de tales situaciones en un contexto terapéutico incluyen el tratamiento del cáncer, y en particular el tratamiento del cáncer de mama, próstata o páncreas donde las proteínas FXYD se expresan en exceso y, como se describe en el presente documento, pueden ayudar a las células cancerosas a superar los efectos inhibitorios de otro modo de la glutatiónilación inducida por estrés oxidativo.

En una forma de realización, se puede administrar un derivado de proteína FXYD sin cisteína reactiva o residuos de aminoácidos básicos adyacentes críticos para desplazar una proteína FXYD de tipo salvaje y eliminar su protección de la función de la bomba de Na⁺-K⁺ de una carga oxidativa aumentada en las células cancerosas. Esto puede 5 facilitarse mediante el acoplamiento de la proteína FXYD a un péptido para dirigir selectivamente compuestos solubles en membrana a células cancerosas. Esto puede mejorar la eficacia y reducir los efectos no deseados en tejidos no diana. En una forma de realización adicional, el direccionamiento de las células cancerosas de la proteína FXYD puede mejorar la eficacia de los tratamientos convencionales administrados en combinación o junto con la proteína FXYD, tal como la radioterapia o los enfoques quimioterapéuticos que también aumentan las cargas 10 oxidativas en las células.

Cada una de estas aplicaciones generales proporcionadas por la presente invención, concretamente, la promoción de la desglutacionilación por proteínas FXYD y la inhibición de la desglutacionilación por proteínas FXYD de pérdida de función, se describirán ahora con más detalle.

15

Proteínas FXYD en el tratamiento del infarto - reversión de la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ oxidativa

Como se describe en el presente documento, el infarto de miocardio está asociado con un aumento marcado en la glutacionilación de FXYD1 (véase la Figura 1), una disminución de su asociación "normal" con la subunidad α de la bomba de Na-K y un aumento en la asociación de la subunidad β_1 (véase la Figura 6), consistente con un papel de 20 FXYD1 en la desglutacionilación de la subunidad β_1 . El inventor también ha descrito previamente que el infarto de miocardio está asociado con la glutacionilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na-K y que esta glutacionilación está relacionada causalmente con la inhibición de la bomba.

Por consiguiente, la proteína FXYD administrada de forma exógena facilita la desglutacionilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺, la activación de función y la reversión de los efectos adversos de la sobrecarga celular de Na⁺ y Ca²⁺. El suministro de antioxidantes exógenos o los intentos por aumentar GSH intracelular (como se ha estudiado ampliamente) puede no haber sido útil ya que las tasas espontáneas de desglutacionilación, impulsadas por un potencial redox favorable solo, son muy lentas. Un efecto de tipo oxidorreductasa, basado en el residuo de 30 cisteína reactiva que cataliza la desglutacionilación identificada en la presente invención, es más eficaz.

En un aspecto, la divulgación proporciona en este documento un método para el tratamiento o prevención de una afección asociada con la inhibición inducida por glutacionilación de una bomba de Na/K, comprendiendo el método poner en contacto una bomba de Na/K con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína FXYD. De esta 35 manera, la proteína FXYD facilita la desglutacionilación de la bomba de Na⁺-K⁺.

Se puede usar cualquier proteína FXYD adecuada. En el contexto de la restauración de la actividad de la bomba o la disminución de la inhibición de la bomba inducida por glutación, una proteína FXYD adecuada es cualquier proteína FXYD o derivado de la misma que tenga la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K. 40 Como se describe en el presente documento, actualmente se conocen siete proteínas FXYD humanas, cuyos ejemplos se representan por las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos en las SEQ ID Nos:1-14. Se contempla cualquier proteína FXYD humana o proteínas homólogas de especies no humanas, tales como otras especies de mamíferos, así como cualquiera de sus isoformas funcionales, capaces de realizar la desglutacionilación de la bomba de Na/K para su uso en este aspecto de la divulgación. Preferiblemente, la proteína FXYD es FXYD1, 45 FXYD3, FXYD4, o FXYD7.

La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique otra cosa, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, y bioquímica, que están dentro de las habilidades de la técnica. Dichas técnicas se ilustran completamente en la bibliografía, tal como, 50 "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 3ª edición (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Handbook of Experimental Immunology", 4.ª edición (D. M. Weir & C. C. Blackwell, eds., Blackwell Science Inc., 1987); "Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells" (J. M. Miller & M. P. Calos, eds., 1987); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds.); y "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., eds., 1994). 55

La proteína FXYD puede aislarse de una fuente natural o puede producirse por medios sintéticos. Los métodos para el aislamiento de proteínas y sus precursores de fuentes de origen natural se conocen en la técnica e incluyen métodos y referencias citadas anteriormente. Los métodos para la producción de proteínas y sus precursores por medios sintéticos también se conocen en la técnica e incluyen la síntesis de péptidos, tal como por síntesis química,

y la expresión recombinante de proteínas y polipéptidos, tal como se describe en las referencias citadas anteriormente.

Como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 5), los estudios mutacionales sobre proteínas FXYD expresadas en ovocitos de *Xenopus* identificaron una cisteína específica "reactiva" (es decir, susceptible a la glutationilación), implicada en la desglutinationilación de la bomba de Na^+/K^+ y la inversión de la inhibición de la bomba como la cisteína correspondiente a Cys62 de FXYD1. Una proteína FXYD útil en los métodos divulgados en el presente documento para promover la desglutinationilación de la bomba de Na^+/K^+ típicamente comprende una cisteína reactiva en una posición correspondiente a Cys62 de FXYD1. Se incluyen en la divulgación derivados y variantes de proteínas FXYD que mantienen o han impartido sobre ellos la capacidad de promover la desglutinationilación de una bomba de Na^+/K^+ . Los ejemplos de derivados y variantes incluyen fragmentos de proteínas FXYD. Por ejemplo, la FXYD1 humana tiene una longitud de 92 aminoácidos, que comprende una región extracelular, una región transmembrana y una región citoplásmica. Como apreciarán los expertos en la técnica, los fragmentos de muchas proteínas conservan las propiedades funcionales de la proteína de longitud completa o de origen natural. En las circunstancias actuales, se prevé que un fragmento de una proteína FXYD que es capaz de promover la desglutinationilación de una bomba de Na^+/K^+ , donde el fragmento conserva una cisteína reactiva, tal como Cys62 de FXYD1, o una cisteína correspondiente a la misma, también será funcional en los métodos divulgados en el presente documento. De manera similar, los fragmentos de otras proteínas FXYD en las que se conserva una cisteína reactiva también están dentro del alcance de la divulgación. La reducción del tamaño de la proteína FXYD de tal manera puede ser beneficiosa, por ejemplo, debido a una mayor facilidad de fabricación en comparación con una entidad terapéutica más larga. En un ejemplo, la proteína FXYD puede ser un fragmento de FXYD resultante de la eliminación de algunos, la mayoría o la totalidad del dominio extracelular de la proteína de tipo salvaje. En otro ejemplo, la proteína FXYD puede ser un fragmento de FXYD resultante de la eliminación de parte del dominio citoplásmico entre la cisteína reactiva cerca del segmento transmembrana identificado en el presente documento y el extremo carboxilo terminal.

Las proteínas FXYD útiles también incluyen aquellas que son derivados de proteínas de tipo salvaje e incluyen derivados que les han impartido una capacidad o una capacidad aumentada para promover la desglutinationilación de una bomba de Na^+/K^+ . Un ejemplo de tal derivado se ilustra a continuación.

Los estudios mutacionales sobre proteínas FXYD indican que los aminoácidos básicos adyacentes a la cisteína reactiva, en particular los aminoácidos básicos en las posiciones correspondientes a Arg61 y Lys63 de FXYD1, incluyen en la glutationilación de las proteínas FXYD y, por lo tanto, en la capacidad de una proteína FXYD para promover la desglutinationilación de una bomba de Na^+/K^+ . Se demuestra en el presente documento que la proteína FXYD2 de tipo salvaje, por ejemplo, es incapaz de promover la desglutinationilación de una bomba de Na^+/K^+ . Se cree que esta incapacidad se debe, al menos en parte, a la ausencia de aminoácidos básicos adyacentes a la cisteína, que en presencia de aminoácidos básicos, será una cisteína reactiva. FXYD2 incluye el aminoácido no básico glicina en una posición correspondiente a Lys63 de FXYD1. Se prevé que la mutación de esa glicina en un aminoácido básico, tal como lisina o arginina, imparta a la proteína FXYD2 variante resultante una capacidad de promover la desglutinationilación de la bomba de Na^+/K^+ .

Las proteínas FXYD son lipídicas y, por lo tanto, solubles en membrana. Por lo tanto, se puede usar la administración de proteínas FXYD en el contexto de la lesión isquémica aguda, por ejemplo, FXYD1 en el tratamiento de, por ejemplo, infarto y lesión por isquemia-reperfusión. Las proteínas pueden administrarse por vía intravenosa, o infundirse directamente en una arteria relacionada con el infarto, por ejemplo, en el contexto de una intervención aguda con procedimientos de angioplastia. En otras formas de realización, se puede administrar una infusión de una proteína FXYD en una escala de tiempo de minutos a horas.

En algunas formas de realización, los fragmentos de proteínas FXYD que conservan la capacidad de asociarse con la bomba de Na^+/K^+ pueden ser útiles. Dichas proteínas FXYD tendrían preferiblemente propiedades óptimas en términos de modulación del estado de glutationilación de la bomba de Na^+/K^+ , así como la capacidad para insertarse en membranas y asociarse con proteínas diana que se anticipa que son útiles en los métodos divulgados en el presente documento. Además, el tamaño de la proteína FXYD puede reducirse eliminando una porción sustancial del dominio extracelular, así como una porción sustancial del dominio citoplásmico.

En algunas formas de realización, las proteínas FXYD de la presente invención pueden producirse o conjugarse con proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, partículas radiactivas, nanopartículas o micropartículas.

Proteínas FXYD en el tratamiento del cáncer - inhibición oxidativa de la bomba de Na⁺-K⁺

Se sabe que muchos tejidos cancerosos, tales como tejidos de cáncer de mama y cáncer de próstata, tienen altos niveles de estrés oxidativo y han desarrollado defensas antioxidantes aumentadas, específicamente del sistema de oxidorreductasa citosólica. Estos son dianas establecidas en el tratamiento del cáncer. A través de la identificación en el presente documento de la capacidad de las proteínas FXYD para promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K, reduciendo de este modo la inhibición de la actividad de la bomba en condiciones de estrés oxidativo, el presente inventor ha identificado un vínculo entre las defensas antioxidantes de las células cancerosas y la sobreexpresión aparente de proteínas FXYD. La interrupción de ese sistema de defensa antioxidante en la célula cancerosa, al interrumpir la capacidad de la proteína FXYD para promover la desglutacionilación de la bomba, se propone en el presente documento como un método para inhibir el crecimiento, la diseminación o la metástasis de las células cancerosas.

Como se divulga en el presente documento, la demostración de que un residuo de cisteína en particular es "reactivo" y desempeña un papel en la reversión de la inhibición de la bomba de Na-K oxidativa indica una ventaja de supervivencia para las células cancerosas para sobreexpresar proteínas FXYD y permite el direccionamiento específico de ese papel dentro de las defensas antioxidantes de las células.

Por consiguiente, también se divulga en el presente documento un método para tratar el cáncer, comprendiendo el método poner en contacto una bomba de Na/K de una célula cancerosa con una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína FXYD de pérdida de función. De esta manera, la proteína FXYD de pérdida de función facilita el reemplazo de una proteína FXYD endógena que se considera que permite la desglutacionilación de la bomba de Na⁺-K⁺, permitiendo de este modo que la bomba de Na/K conserve la actividad a pesar del estrés oxidativo típico de las células cancerosas.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína FXYD de pérdida de función" se refiere a cualquier proteína FXYD que no tenga la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K o en la que esa capacidad se reduce en comparación con una proteína FXYD de tipo salvaje. Esa incapacidad o incapacidad relativa puede ser una incapacidad natural de la proteína FXYD para promover la desglutacionilación, tal como se ilustra en el presente documento por FXYD2, o puede deberse a una o más mutaciones producidas en la proteína FXYD.

Como ejemplo, se demuestra en el presente documento que una cisteína reactiva, correspondiente a cys62 de FXYD1, está implicada en la capacidad de una proteína FXYD para estar glutacionilada y, por lo tanto, en la capacidad de la proteína FXYD para promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K.

Como otro ejemplo, se demuestra en el presente documento que los aminoácidos básicos adyacentes a una cisteína reactiva correspondiente a cys62 de FXYD1, tales como Arg61 y Lys63 en FXYD1, son influyentes en la reactividad de la cisteína y por lo tanto, en la capacidad de una proteína FXYD para estar glutacionilada y, por tanto, en la capacidad de la proteína FXYD para promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K.

Con referencia a la Figura 10, se puede observar que FXYD2, FXYD5 y FXYD6 nativas carecen de al menos una de una cisteína reactiva correspondiente a cys62 de FXYD1 y aminoácidos básicos adyacentes a esa cisteína reactiva. Como se muestra en el Ejemplo 6, FXYD2 no tiene efecto en la función de la bomba de Na⁺-K⁺. Por lo tanto, se contempla que FXYD5 y FXYD6 carecerían de la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na⁺-K⁺.

Se puede crear, por lo tanto, una proteína FXYD de pérdida de función por mutación de uno o más de los aminoácidos básicos adyacentes para la cisteína reactiva a un aminoácido no básico.

La proteína FXYD de pérdida de función puede o no conservar otras funciones biológicas o características de una proteína FXYD.

Las proteínas FXYD generalmente se describen en el presente documento, tal como en la sección que describe las proteínas útiles en el método divulgado en el presente documento para la prevención o tratamiento de infarto de miocardio, ictus y reperusión. Se entenderá que las proteínas FXYD de pérdida de función previstas como útiles para inhibir la desglutacionilación de la bomba de Na/K, tal como en el tratamiento del cáncer, incluyen proteínas FXYD, derivados y variantes de las mismas que se describen en la sección que detalla las proteínas FXYD funcionales (es decir, aquellas capaces de promover la desglutacionilación de una bomba de Na/K) con la condición de que las proteínas FXYD de pérdida de función no tengan la capacidad de promover la desglutacionilación de la

bomba de Na/K o en las que esa capacidad se reduce en comparación con una proteína FXYP de tipo salvaje.

En el caso de una proteína FXYP de pérdida de función mutante, cualquier reducción de la capacidad para promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K en comparación con la proteína FXYP de tipo salvaje está
5 incluida en el término, aunque preferiblemente habrá una reducción de esa capacidad mayor de aproximadamente el 50 %. Más preferiblemente, la reducción será mayor de aproximadamente el 60 %, o mayor de aproximadamente el 70 % o mayor de aproximadamente el 80 %. En las formas de realización más preferidas, la reducción de la capacidad es sustancialmente completa, tal como mayor de aproximadamente el 90 %. Aún más preferiblemente, la proteína FXYP de pérdida de función presentará una ausencia completa de la capacidad para promover la
10 desglutacionilación de la bomba de Na/K, que para fines prácticos se considera una reducción mayor de aproximadamente el 95 % en comparación con una proteína FXYP de tipo salvaje.

La identificación del sitio FXYP reactivo permite un enfoque utilizando una proteína FXYP de "pérdida de función", tal como las proteínas FXYP que carecen de una cisteína reactiva o uno o más aminoácidos básicos adyacentes a
15 la cisteína que, cuando se administran, reemplazan las FXYP nativas. Se anticipa que una proteína de "pérdida de función" será más eficaz que un efecto que se desarrolla a lo largo de los días con técnicas convencionales, como el silenciamiento de genes, que puede dar tiempo a que se desarrollen mecanismos compensatorios.

Se propone que una aplicación de "pérdida de función" sea útil en el tratamiento del cáncer mediante el desarrollo de
20 una molécula de "pérdida de función" terapéutica, tal como una molécula con el sitio activo eliminado por mutación de la cisteína o residuos de aminoácidos básicos adyacentes críticos (véanse los Ejemplos 5 y 6). Tal molécula puede desplazar la FXYP3 de tipo salvaje y reducir o eliminar su efecto "tipo oxidorreductasa". Como consecuencia, se esperará que el estrés oxidativo intrínseco en una célula cancerosa pueda causar la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ y disminuir la viabilidad celular. Los datos presentados en el presente documento (véanse el Ejemplo 5 y la
25 Figura 4) indican que es posible tal desplazamiento y pérdida de función.

En general, los estudios en animales indican que la desactivación de los genes FXYP no es fatal y solo se observan pequeñas anomalías fenotípicas. Esto sugiere que las proteínas FXYP son de particular importancia en condiciones de estrés oxidativo y puede no ser perjudicial administrar un mutante FXYP de "pérdida de función" incluso si al
30 hacerlo la función de FXYP en tejidos no diana se elimina de forma transitoria. Por otro lado, los efectos agudos de administrar un mutante de FXYP de "pérdida de función" pueden compensarse con menos facilidad que los efectos a largo plazo con adaptaciones que se han desarrollado antes del nacimiento, y se debe considerar un direccionamiento selectivo de los tejidos y/o la protección del tejido diana.

35 Como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 5), los estudios mutacionales sobre proteínas FXYP expresadas en ovocitos de *Xenopus* identificaron una cisteína específica "reactiva" (es decir, susceptible a la glutacionilación), implicada en la desglutacionilación de la bomba de Na⁺/K⁺ y la inversión de la inhibición de la bomba como la cisteína correspondiente a Cys62 de FXYP1.

40 Por consiguiente, en algunas formas de realización, la cisteína correspondiente a Cys62 de FXYP1 en proteínas FXYP de la presente invención puede mutarse a cualquier otro residuo, de modo que la proteína FXYP no afecte a la glutacionilación de la bomba de Na⁺/K⁺. En formas de realización preferidas, la cisteína reactiva puede mutarse a cualquiera de alanina, arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano o valina.

45 Como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 6), los estudios de mutación en las proteínas FXYP indican que los aminoácidos básicos adyacentes a la cisteína reactiva, en particular los aminoácidos básicos en las posiciones correspondientes a Arg61 y Lys63 de FXYP1 también son influyentes en la glutacionilación de proteínas FXYP.

50 Por consiguiente, en algunas formas de realización, al menos uno de los aminoácidos básicos correspondientes a Arg61 y Lys63 de FXYP1 en las proteínas FXYP de la presente invención puede mutar a cualquier aminoácido no básico. El aminoácido no básico puede ser uno cualquiera de alanina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano o valina.

55 En algunas formas de realización, las proteínas FXYP de la presente invención pueden producirse o conjugarse con proteínas, polipéptidos, oligopéptidos, anticuerpos o fragmentos de los mismos, partículas radiactivas, nanopartículas o micropartículas.

También se prevé que una proteína FXYD pueda asociarse con un compuesto que se dirige específicamente a los tejidos cancerosos, basándose en las propiedades específicas del tumor, pero no en los tejidos no diana. Por ejemplo, un enfoque desarrollado para dirigirse al cáncer de próstata con un compuesto que se espera que sea tóxico para todas las células del cuerpo (tapsigargina) puede adaptarse para su uso con los mutantes de FXYD de "pérdida de función". Con este enfoque, la proteína FXYD se acopla a un péptido soluble en agua (y, por lo tanto, impermeable a la membrana (por ejemplo, HSSKLQ) para crear un profármaco FXYD que está inactivo porque no puede cruzar las membranas celulares. El péptido está diseñado para ser un sustrato selectivo para las proteasas específicas del cáncer de próstata (por ejemplo, la serina proteasa de tipo quimotripsina, el antígeno específico de próstata (ampliamente conocido de la "prueba de PSA") secretado por las células cancerosas y solo enzimáticamente activo es el líquido tisular que rodea las células. Cuando el péptido HSSKLQ se escinde del profármaco FXYD, la molécula lipófila activa puede entrar en la membrana celular y luego modular la actividad de la bomba de Na⁺-K⁺. Si el mutante activo de FXYD es un sustrato importante para las propias proteasas relevantes, puede ser posible modificar el mutante de FXYD con sustituciones de aminoácidos (por ejemplo, de serinas) para que sea resistente a la proteasa.

En otra forma de realización, la inhibición de los efectos de FXYD endógenos puede lograrse dirigiéndose a la cisteína reactiva en el dominio citosólico de una proteína FXYD. Las mutaciones de pérdida de función mencionadas anteriormente pueden introducirse o sintetizarse en un fragmento peptídico del dominio citosólico de una proteína FXYD para generar un bloqueador peptídico. Estos bloqueadores de péptidos pueden ser capaces de atravesar la membrana cuando se unen al péptido tat, conocido en la técnica para administrar otros compuestos bloqueadores en las células.

Como se describe en el presente documento, el estrés oxidativo y el papel de FXYD3 como una "membrana-oxidoreductasa" parece ser el enlace común entre FXYD3 y la bomba de Na⁺-K⁺ como dianas terapéuticas en el tratamiento del cáncer. Sobre esa base, se espera que una intervención terapéutica que mejore el estrés oxidativo pueda aumentarse con la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺. De acuerdo con esto, la ouabaína aumenta el daño por irradiación a líneas celulares de tumores humanos, pero no las líneas celulares normales, y se ha sugerido que los glucósidos cardíacos podrían mejorar el índice terapéutico de la radioterapia (Mijatovic et al., 2007). Dado que gran parte del efecto de la radioterapia está mediado por el aumento del estrés oxidativo que induce, una molécula de "pérdida de función" diseñada para eliminar el FXYD3 podría ser particularmente eficaz para mejorar el beneficio de la radioterapia. Sin embargo, una molécula de "pérdida de función" también podría ser un adyuvante útil para los agentes quimioterapéuticos, ya que muchos de ellos también aumentan el estrés oxidativo.

Régimen de tratamiento

El médico tratante puede determinar el régimen de tratamiento más adecuado para cualquier paciente en particular y dependerá de una diversidad de factores incluyendo: el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto o agente empleado; la composición empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro del agente o compuesto; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina.

Los presentes inventores prevén que puede experimentarse una alteración clínicamente significativa de la glutatiónilación de la bomba de Na⁺-K⁺ si se administraran proteínas FXYD a pacientes con una afección asociada con la inhibición oxidativa de la bomba de Na⁺/K⁺.

En un aspecto de la presente invención, la administración de una o más proteínas FXYD puede ser como un "complemento", en el que un paciente puede tratarse con un fármaco convencional. Por ejemplo, una proteína FXYD puede administrarse antes, durante o después de un tratamiento con, por ejemplo, con un agente quimioterapéutico o radioterapia. En consecuencia, se apreciará que en este contexto el término "complemento" se refiere a un entero terapéutico adicional (la proteína FXYD); no significa que la proteína FXYD deba añadirse como el último medicamento. El orden y la composición de los fármacos específicos y las clases de fármacos en la terapia de combinación pueden ser determinados por el experto en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, cuando el régimen terapéutico implica la administración de múltiples clases de fármacos, las proteínas FXYD pueden administrarse en cualquier etapa durante el régimen.

Como un ejemplo adicional de un régimen de tratamiento del método divulgado en el presente documento, el estado de un paciente que sufre un infarto de miocardio puede estabilizarse, al menos parcialmente, antes de la administración de una o más proteínas FXYD. Además, el estado de un paciente se puede estabilizar, al menos

parcialmente, antes del comienzo de un método divulgado en el presente documento. Cualquiera de estos regímenes de tratamiento puede hacer referencia al primer estabilizador de un paciente.

5 Como un ejemplo adicional de un régimen de tratamiento, una proteína FXYD puede ser el primer fármaco que se administra en el tratamiento del infarto de miocardio sin ninguna medicación o estabilización previa. Las proteínas FXYD propuestas para la presente invención pueden administrarse como composiciones terapéutica o preventivamente. En una aplicación terapéutica, las composiciones se administran a un paciente que ya tiene una afección asociada con la inhibición oxidativa de la bomba de Na^+/K^+ , en una cantidad suficiente para tratar al paciente de manera eficaz.

10

El nivel de dosis terapéuticamente eficaz para cualquier paciente en particular dependerá de una diversidad de factores incluyendo: el trastorno que se trata y la gravedad del trastorno; actividad del compuesto o agente empleado; la composición empleada; la edad, el peso corporal, la salud general, el sexo y la dieta del paciente; el tiempo de administración; la vía de administración; la tasa de secuestro del agente o compuesto; la duración del tratamiento; fármacos usados en combinación o coincidentes con el tratamiento, junto con otros factores relacionados bien conocidos en medicina. Un experto en la técnica podría determinar, mediante experimentación rutinaria, una cantidad eficaz de la proteína FYXD, y otros agentes cuando sea apropiado, que se requerirán para tratar la afección. Generalmente, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 0,00001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, en el intervalo de aproximadamente 0,0001 mg a aproximadamente 1000 mg por kg de peso corporal por 24 horas; típicamente, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 750 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 500 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 250 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Más típicamente, se espera que una dosis eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 200 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 100 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 1,0 mg a aproximadamente 25 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 50 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 20 mg por kg de peso corporal por 24 horas; de aproximadamente 5,0 mg a aproximadamente 15 mg por kg de peso corporal por 24 horas. Como alternativa, la dosificación eficaz puede ser de hasta aproximadamente 500 mg/m^2 . Generalmente, se espera que una dosificación eficaz esté en el intervalo de aproximadamente 25 a aproximadamente 500 mg/m^2 , preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 350 mg/m^2 , más preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m^2 , 35 aproximadamente 300 mg/m^2 , aún más preferiblemente de aproximadamente 25 a aproximadamente 250 mg/m^2 , incluso más preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 250 mg/m^2 , y todavía incluso más preferiblemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 mg/m^2 .

En algunas formas de realización, el tratamiento comenzará tan pronto como sea posible después de un infarto o un ictus o aproximadamente al mismo tiempo que la reperfusión. Por ejemplo, el tratamiento puede iniciarse junto con una terapia convencional para facilitar la reperfusión, tal como la angioplastia. En otras formas de realización, el tratamiento comenzará en aproximadamente 15 minutos a una hora, o de aproximadamente una hora a aproximadamente tres horas, o de aproximadamente tres horas a aproximadamente seis horas, o de aproximadamente seis horas a aproximadamente nueve horas, o de aproximadamente nueve horas a 45 aproximadamente 12 horas, o de aproximadamente 12 horas a aproximadamente 15 horas, o de aproximadamente 15 horas a aproximadamente 18 horas, o de aproximadamente 18 horas a aproximadamente 21 horas, o de aproximadamente 21 horas a aproximadamente 24 horas después de un infarto, ictus o lesión por reperfusión.

Además, será evidente para un experto en la técnica que la cantidad y el espaciado óptimos de las dosificaciones individuales y, cuando se usa la terapia de combinación, la cantidad y el espaciado óptimos de administración de los diversos agentes de la terapia de combinación, se determinarán por la naturaleza y extensión de la enfermedad o patología que se trata, la forma, la ruta y el sitio de administración, y la naturaleza del individuo en particular que se trata. Además, dichas condiciones óptimas pueden determinarse mediante técnicas convencionales.

55 También será evidente para un experto en la técnica que el transcurso óptimo de tratamiento, tal como el número de dosis de la composición o composiciones administradas al día durante un número definido de días, puede determinarse por los expertos en la técnica usando el transcurso convencional de las pruebas de determinación de tratamiento.

Composiciones farmacéuticas

En general, las composiciones adecuadas pueden prepararse de acuerdo con métodos que son conocidos por los expertos en la técnica y, por consiguiente, pueden incluir un vehículo, diluyente, excipiente y/o adyuvante farmacéuticamente aceptable.

Estas composiciones se pueden administrar por rutas estándar. En general, las composiciones pueden administrarse por vía parenteral (por ejemplo, intravenosa, intraespinal, subcutánea o intramuscular). Preferiblemente la administración es por vía parenteral.

Los vehículos, diluyentes, excipientes y adyuvantes deben ser "aceptables" en términos de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición, y no ser perjudiciales para el receptor de los mismos. Los ejemplos de vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables son agua desmineralizada o destilada; solución salina; aceites de origen vegetal tales como aceite de cacahuete, aceite de cártamo, aceite de oliva, aceite de semilla de algodón, aceite de maíz, aceite de sésamo, aceite de maní o aceite de coco; aceites de silicona, incluyendo polisiloxanos, tales como metil polisiloxano, fenil polisiloxano y metilfenil polisiloxano; siliconas volátiles; aceites minerales tales como parafina líquida, parafina blanda o escualano; derivados de celulosa tales como metilcelulosa, etilcelulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica o hidroxipropilmetilcelulosa; DMSO, N,N-dimetilacetamida (DMA), alcoholes inferiores, por ejemplo, etanol o isopropanol; aralcoholes inferiores; polialquilenglicoles inferiores o alquilenglicoles inferiores, por ejemplo polietilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, propilenglicol, 1,3-butilenglicol o glicerina; ésteres de ácidos grasos tales como palmitato de isopropilo, miristato de isopropilo u oleato de etilo; polivinilpirrona; agar; carragenina; goma de tragacanto o goma de acacia y vaselina. Típicamente, el vehículo o vehículos formarán del 10 % al 99,9 % en peso de las composiciones.

La composición puede incluir agentes que aumentan la biodisponibilidad o la duración terapéutica del compuesto o compuestos activos.

Las composiciones de la invención pueden estar en una forma adecuada para administración parenteral, tal como inyección o infusión subcutánea, intramuscular o intravenosa.

Para la administración como solución o suspensión inyectable, los diluyentes o vehículos no tóxicos parenteralmente aceptables pueden incluir solución de Ringer, solución salina isotónica, solución salina tamponada con fosfato, etanol y 1,2 propilenglicol.

Los adyuvantes típicamente incluyen emolientes, emulsionantes, agentes espesantes, conservantes, bactericidas y agentes tamponantes.

Dado que las proteínas FXD1 son solubles en lípidos, las composiciones también pueden administrarse en forma de liposomas. Los liposomas generalmente se derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas, y están formados por cristales líquidos hidratados mono o multilamelares que se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas. Las composiciones en forma de liposomas pueden contener estabilizantes, conservantes, excipientes y similares. Los lípidos preferidos son los fosfolípidos y las fosfatidilcolinas (lecitinas), tanto naturales como sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica, y en relación con esto, se hace referencia específica a: Prescott, Ed., *Methods in Cell Biology*, Volume XIV, Academic Press, Nueva York, N. Y. (1976), pág. 33 y posteriores.

La presente invención se describirá ahora con mayor detalle con referencia a los siguientes ejemplos específicos, que no deben interpretarse como limitantes de ningún modo del alcance de la invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1: FXD1 se somete a glutationilación por estímulos oxidativos acoplados al receptor y en condiciones fisiopatológicas

Para determinar si FXD1 tiene residuos de cisteína reactivos susceptibles a la glutationilación, los miocitos se cargaron con GSH marcado con biotina (biotina-GSH). Se lisaron y las proteínas glutationiladas marcadas con biotina se precipitaron usando perlas de estreptavidina. El inmunoprecipitado se inmunotransfirió con un anticuerpo FXD1. La Figura 1A muestra que FXD1 fue fácilmente detectable en el lisado celular total, consistente con su expresión abundante en los miocitos cardíacos. También se detectó en la subfracción glutationilada marcada con

biotina, pero no en el control de inmunoprecipitado de IgG no inmune (negativo). La exposición de los miocitos a peroxinitrito 100 μM (ONOO^-) durante 10 minutos antes de la lisis aumentó sustancialmente la cantidad de FXYD1 en la subfracción de la proteína glutationilada (Figura 1B), pero no tuvo efecto en la detección de FXYD1 en el lisado celular total. La Figura 1A muestra que la FXYD1 glutationilada marcada con biotina no se detectó cuando el lisado se incubó con 1 mmol/l de DTT antes de la precipitación con estreptavidina. Esta sensibilidad a 1 mmol/l de DTT es compatible con un enlace disulfuro mixto entre FXYD1 y GSH (Chow et al., 1992).

Para examinar si una señal oxidativa acoplada al receptor podría aumentar la glutationilación de FXYD1 desde la glutationilación inicial se detectó mediante inmunoprecipitación FXYD1 e inmunotransferencia con un anticuerpo contra un epítipo de cisteína glutationilada (anticuerpo GSH). La exposición de los miocitos a Ang II, que se sabe que activa la NADPH oxidasa cardíaca (White et al., 2009), aumentó la glutationilación de FXYD1 (Figura 1C). De manera similar, el activador directo de la adenil ciclasa forskolina, que recientemente se ha demostrado que activa la NADPH oxidasa cardíaca y aumenta la glutationilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Figtree et al. 2009; White et al, 2010), aumentó la glutationilación de FXYD1. Esto se suprimió cuando los miocitos se incubaron con superóxido dismutasa pegilada permeable a la membrana (SOD; Figura 1D) para disolver el superóxido.

Para determinar si las afecciones fisiopatológicas conocidas por estar asociadas con un aumento del estrés oxidativo pueden inducir la glutationilación de FXYD1, se examinó el miocardio de un modelo de infarto de oveja (Figtree et al., 2009). Como se muestra en la Figura 1E, FXYD1 del miocardio en la zona de infarto y peri-infarto mostró un aumento de glutationilación en comparación con el miocardio normal.

Ejemplo 2: FXYD1 reduce la modificación oxidativa de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, y suprime la inhibición de la bomba inducida por oxidante

Las subunidades α_1 y β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de *Xenopus* se sobreexpresaron con FXYD1 de perro en ovocitos de *Xenopus*. Los ovocitos se inyectaron con biotina-GSH para permitir la detección de la glutationilación. La Figura 2A muestra transferencias Western de microsomas cargados directamente en geles en los carriles 7-12 y/o inmunoprecipitados con perlas de estreptavidina en los carriles 1-6. La oxidación se había inducido por inyección de ovocitos con ONOO^- como se indica. Los carriles 7-12 muestran que FXYD1 se detectó en microsomas de ovocitos inyectados con ARNc, pero no se detectó en microsomas de ovocitos no inyectados. Como se muestra en las inmunotransferencias en los carriles 7-12 en los paneles inferiores, la mayoría de las subunidades β_1 se glucosilaron en el núcleo después de 2 días de expresión, lo que refleja la síntesis continua del ARNc inyectado. Sin embargo, también apareció una población de subunidades totalmente glucosiladas. Consistente con una baja expresión endógena de subunidades de ovocitos (Geering, 1991), apenas fue detectable una señal para subunidades β_1 en microsomas de ovocitos no inyectados.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los miocitos cardíacos, la inmunotransferencia de la subfracción glutationilada en los carriles 1-6 muestra que ONOO^- indujo la glutationilación de la FXYD1 expresada (Figura 2A, 2B). Dado que la glutationilación de la subunidad β_1 causa inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Figtree et al., 2009), se examinó el efecto de FXYD1 en la glutationilación de la subunidad β_1 sobre la función. Se midió la corriente máxima de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ electrogénica ($I_{\text{máx}}$) en los ovocitos de *Xenopus* que sobreexpresan las subunidades α_1 y β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ con o sin expresión de FXYD1. ONOO^- indujo una disminución en $I_{\text{máx}}$ como se muestra en la Figura 2C. La coexpresión de FXYD1 no tuvo efecto en $I_{\text{máx}}$. Sin embargo, como se muestra en la Figura 2C, suprimió la disminución inducida por ONOO^- , en paralelo con el efecto de la coexpresión de FXYD1 en la glutationilación de la subunidad β_1 mostrada en los paneles A y B.

FXYD1 se inserta fácilmente en las bicapas de lípidos de una composición que imita las membranas sarcolémicas y se alinea en la orientación correcta (Crowell et al., 2003). Para examinar si FXYD1 exógena tiene un efecto funcional sobre la inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ inducida por una señal de oxidante en los miocitos cardíacos, la corriente de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ electrogénica (I_p , identificada como la corriente de la membrana sensible a la ouabaina) se midió en los miocitos ventriculares en pinzamiento de tensión con pipetas de parche de punta ancha para facilitar la perfusión del compartimento intracelular. Las soluciones de pipetas de parche incluían Na^+ 10 mM, una concentración cercana a los niveles intracelulares fisiológicos e incluían FXYD1 recombinante 500 nM o estaban libres de FXYD1. La forskolina, incluida en el superfusado después del establecimiento de la configuración de células completas, se usó para inducir una señal de oxidante (Figtree et al, 2009). Como se muestra en la Figura 2D, la inclusión de FXYD1 en las soluciones de pipeta de parche suprimió una disminución inducida por forskolina en I_p .

Ejemplo 3: FXYD3 recombinante se asocia con la subunidad α_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y desplaza FXYD1 nativa en los miocitos cardíacos

La asociación de FXYD1 exógeno con subunidades de bomba de Na⁺-K⁺ puede mediar el efecto de FXYD1 que se muestra en la Figura 2D. Sin embargo, esto es difícil de verificar mediante técnicas de inmunodetección ya que la FXYD1 exógena no se puede distinguir de la FXYD1 nativa. Los aminoácidos conservados en todos los dominios transmembrana de FXYD, incluidas dos glicinas, median su interacción con la bomba de Na⁺-K⁺ (Morth et al, 2007, Shinoda, 2009). Una proteína FXYD que no es nativa de los miocitos cardíacos se probó para determinar la asociación con bombas de Na⁺-K⁺ sarcolémicas. Los miocitos se expusieron a 500 nMol/l de FXYD3 humana recombinante durante 15 min. La Figura 3A muestra que se coimmunoprecipitó con la subunidad α_1 de la bomba nativa. También se examinó si la FXYD3 exógena podría estar glutatiónilada. Los miocitos incubados con FXYD3 durante 15 minutos se expusieron a soluciones de control o soluciones que contenían ONOO⁻. Como se muestra en la Figura 3A, FXYD3 se sometió a glutatiónilación al inicio, como se indica por la detección de FXYD3 en el lisado celular extraído por pull-down con un anticuerpo contra GSH. La glutatiónilación se aumentó por ONOO⁻. A continuación, se probó si la FXYD3 exógena desplaza a la FXYD1 nativa. La Figura 3B muestra que la exposición de los miocitos a FXYD3 disminuyó notablemente la co-inmunoprecipitación de FXYD1 con la subunidad α_1 de la bomba de Na⁺-K⁺.

Ejemplo 4: FXYD3 reduce la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ en los miocitos cardíacos y suprime la inhibición de la bomba inducida por Ang II

Las 4 cisteínas en FXYD3 se mutaron a serina. Dos de estas cisteínas están en el segmento transmembrana y dos están en el dominio citoplásmico. La mutación de las cisteínas FXYD3 en el dominio de la membrana no afecta a la asociación con la subunidad α_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ que está mediada por Gly41 transmembrana, conservada en todas las proteínas FXYD (Arimochi et al., 2007). La Figura 3B muestra que la exposición de los miocitos a FXYD3 libre de Cys indujo una disminución en la co-inmunoprecipitación de FXYD1 endógena con la subunidad α_1 de la bomba de Na⁺-K⁺, similar a la inducida por FXYD3 de tipo salvaje, lo que indica que FXYD3 libre de Cys desplaza la FXYD1 nativa.

Para examinar si las proteínas FXYD3 afectan a la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺, los miocitos incubados con FXYD3 no tuvieron un efecto significativo en la glutatiónilación inicial de la subunidad β_1 . Como se muestra en la Figura 3C, la incubación de miocitos con FXYD3 no tuvo un efecto significativo en la glutatiónilación inicial de la subunidad β_1 . Sin embargo, suprimió el aumento de la glutatiónilación inducida por ONOO⁻. En contraste, la preincubación con la proteína recombinante mutante FXYD3 Cysless no tuvo ningún efecto sobre la glutatiónilación inducida por ONOO⁻. Se realizaron experimentos similares utilizando Ang II para inducir una señal de oxidante. De nuevo, como se muestra en la Figura 3D, la preincubación con FXYD3 suprimió un aumento inducido por Ang II en la glutatiónilación, mientras que la proteína mutante Cysless en realidad aumentó la glutatiónilación, consistente con el reemplazo de la proteína FXYD1 nativa (que contenía Cys) indicada en la Figura 3B.

En estudios de la bomba de Na⁺-K⁺ funcionales paralelos, se midió la I_p en miocitos con pinzamiento de parche. Como se muestra en la Figura 3E, Ang II indujo una disminución en I_p que se suprimió por la inclusión de FXYD3 en la solución de pipeta de parche. En contraste, FXYD3 Cysless no tuvo efecto en la disminución inducida por Ang II. También se examinó lo contrario y se encontró que FXYD3 afecta a la desglutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ por asociación con una señal acoplada al receptor que induce la estimulación de la bomba de Na⁺-K⁺. El efecto de FXYD3 sobre la desglutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ se midió a partir del valor inicial inducido por los agonistas del receptor adrenérgico β_3 CL316.243 (García et al., 2008; Bundgaard et al, 2010). La Figura 3E muestra que CL316.243 indujo una disminución en la glutatiónilación de la subunidad β_1 cuando los miocitos se habían preincubado con FXYD3, pero un aumento cuando los miocitos se habían preincubado con FXYD3 Cysless.

Ejemplo 5: Un residuo de cisteína FXYD1 reactiva específico modifica la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ y la actividad de la bomba

Hay dos residuos de cisteína en el dominio citoplásmico en FXYD con aminoácidos básicos adyacentes. Uno, correspondiente a Cys60 (C1) en FXYD1, se conserva parcialmente entre todas las proteínas FXYD, mientras que el otro, correspondiente a Cys62 (C2) se conserva por completo (Cornelius y Mahmoud, 2003). Estas cisteínas se examinaron para determinar su "reactividad", es decir, su susceptibilidad a la glutatiónilación. Los mutantes Cys60/Ala (FXYD1C1), Cys62/Ala (FXYD1C2) y Cys60/Ala, Cys62/Ala (FXYD1C1C2) se produjeron y se examinaron para determinar la reactividad cuando se expresaron en ovocitos de *Xenopus*. Las Figuras 4A y B muestran que FXYD1 de tipo salvaje y el mutante FXYD1C1 eran fácilmente detectables en la fracción glutatiónilada marcada con

biotina de microsomas de ovocitos inyectados con ONOO⁻, pero indetectables en microsomas de ovocitos que expresan los mutantes FXYD1C2 o FXYD1C1C2. También se examinó el efecto de la expresión de los mutantes de FXYD1 sobre la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ inducida por la exposición de ovocitos a ONOO⁻. Las Figuras 4C y D muestran que el efecto de coexpresar FXYD1 de tipo salvaje para reducir la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba (también se muestra en la Figura 2A) se conservó para el mutante FXYD1C1, pero se eliminó para los mutantes FXYD1C2 y FXYD1C1C2.

Dado que la glutatiónilación de la subunidad β_1 causa la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺, los efectos de los mutantes de FXYD sobre la glutatiónilación de la subunidad β_1 se examinaron y como se muestra en las Figuras 4C y D se reflejan por los efectos sobre la función. La Figura 4E muestra que el efecto de FXYD1 de tipo salvaje para suprimir una disminución en $I_{m\acute{a}x}$ inducida por ONOO⁻ cuando se coexpresó con las subunidades α_1/β_1 se conservó para el mutante FXYD1C1, pero se eliminó para el mutante FXYD1C2 y el mutante doble FXYD1C1C2. Como se ha descrito previamente (Figtree et al., 2009), los estudios de unión de ³H-ouabaina en ovocitos intactos indicaron que ONOO⁻ no tuvo efecto sobre el número de bombas funcionales de Na⁺-K⁺ en la superficie celular (Figura 8), lo que indica que la inhibición de la bomba inducida por ONOO⁻ cuando las subunidades α_1/β_1 se expresaron en solitario, o se expresaron conjuntamente con los mutantes FXYD1C2 o FXYD1C1C2, se debe a una disminución en el número de recambios de la bomba de Na⁺-K⁺ (Figura 8). Se concluye que una cisteína reactiva identificada específica, C62, en FXYD1 afecta a la glutatiónilación de la cisteína reactiva en la subunidad β_1 , Cys46, y que este efecto de FXYD1 se refleja en la función de la bomba.

Ejemplo 6: Los aminoácidos básicos adyacentes a las cisteínas candidatas son necesarios para la glutatiónilación de proteínas FXYD

Se cree que los aminoácidos básicos adyacentes, cargados positivamente a pH fisiológico, facilitan la formación del enlace disulfuro entre una proteína cisteína y el tripéptido glutatión cargado negativamente, es decir, la glutatiónilación (Ghezzi, 2005). De acuerdo con esto, Arg61 y Lys63 adyacentes a la Cys62 reactiva en FXYD1 son básicos. Sin embargo, la cisteína correspondiente en FXYD2 tiene un solo aminoácido básico adyacente. La Figura 5A muestra que, cuando se sobreexpresa en ovocitos de *Xenopus*, FXYD2 no tuvo ningún efecto funcional sobre la disminución de $I_{m\acute{a}x}$ inducida por la exposición de los ovocitos a ONOO⁻.

El equivalente de Cys62 en FXYD7 tiene los mismos aminoácidos adyacentes que Cys62 en FXYD1, pero en el orden inverso (Cornelius y Mahmoud, 2003). La Figura 5A muestra que, cuando se sobreexpresó en ovocitos de *Xenopus*, FXYD7 reprodujo la capacidad de FXYD1 para suprimir la disminución en $I_{m\acute{a}x}$ inducida por ONOO⁻, lo que sugiere que la carga, en lugar de la secuencia de aminoácidos adyacentes, es importante para facilitar la glutatiónilación de cisteínas reactivas. Se examinó el efecto de mutar Lys63 en FXYD1 a la Gly neutra. Cuando se sobreexpresó en ovocitos de *Xenopus*, el mutante FXYD1 KG no pudo reproducir el efecto de FXYD1 de tipo salvaje para eliminar una disminución en $I_{m\acute{a}x}$ inducida por ONOO⁻, la glutatiónilación del mutante como se muestra en la Figura 5B no se detectó y no hubo efecto de ésta para disminuir la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ como se muestra en las Figuras 5C y D. En contraste, cuando la Gly neutra adyacente al equivalente de Cys62 en FXYD2 se mutó a la Lys básica, el mutante FXYD2 GK reprodujo el efecto de FXYD1 para eliminar tanto la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ como se muestra en la Figura 5A, como la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba como se muestra en las Figuras 5C y D. Los anticuerpos contra FXYD2 de *Xenopus*, que son eficientes en la inmunoprecipitación (Béguin et al., 1997) pero no en transferencias Western, no permitieron establecer el estado de glutatiónilación de FXYD2.

Ejemplo 7: Los estímulos oxidativos disminuyen la interacción de FXYD1 con α_1 y aumentan la interacción con las subunidades β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺

Los efectos de las proteínas FXYD en la bomba de Na⁺-K⁺ normalmente se atribuyen a su asociación con las subunidades α , pero las imágenes de la estructura tridimensional indican que las proteínas FXYD también interactúan con las subunidades β . Se examinó el efecto de los estímulos oxidativos sobre la alteración de la interacción de FXYD1 con las subunidades de la bomba de Na⁺-K⁺ como se refleja en la coimmunoprecipitación. La Figura 6A muestra que la exposición de los miocitos a Ang II disminuyó la coimmunoprecipitación de FXYD1 con las subunidades α_1 de la bomba de Na⁺-K⁺. En contraste, su coimmunoprecipitación con las subunidades β_1 se aumentó como se muestra en la Figura 6B. También se examinó el efecto del aumento del estrés oxidativo asociado con el infarto de miocardio que afecta la interacción de FXYD1 con las subunidades de la bomba de Na⁺-K⁺. La Figura 6C muestra que la coimmunoprecipitación de FXYD1 con las subunidades α_1 disminuyó en las zonas de infarto y borde del miocardio, mientras que lo contrario fue el caso de su coimmunoprecipitación con las subunidades β_1 como se muestra en la Figura 6D.

Ejemplo 8: Las proteínas FXYP aumentan la interacción entre las subunidades α_1 y β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$

La glutationilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ disminuye su coimmunoprecipitación con la subunidad α_1 (Figtree et al., 2009). Dado que las proteínas FXYP afectan a la glutationilación de la subunidad β_1 (Figuras 2 y 3), se examinó su efecto sobre la interacción de las subunidades α_1/β_1 . Las subunidades α_1/β_1 se sobreexpresaron en ovocitos con o sin FXYP1 o un mutante de FXYP1 Cys62/Ala. El panel e en la Figura 7A muestra que ONOO⁻ indujo un aumento en la glutationilación de la subunidad β_1 cuando las subunidades α_1/β_1 se sobreexpresaron en solitario o se expresaron conjuntamente con el mutante de FXYP1. Sin embargo, la coexpresión con FXYP1 de tipo salvaje redujo notablemente la glutationilación de la subunidad β_1 . El panel d muestra que el aumento en la glutationilación de la subunidad β_1 inducida por ONOO⁻ cuando las subunidades α_1/β_1 se sobreexpresaron en solitario estaba asociado con una disminución en su coimmunoprecipitación con la subunidad α_1 . Esta disminución se revirtió cuando se coexpresó FXYP1 de tipo salvaje, mientras que la coexpresión del mutante FXYP1 no tuvo ningún efecto. El efecto de FXYP1 y el mutante de FXYP1 sobre la coimmunoprecipitación de β_1 - con las subunidades α_1 se resume en la Figura 7B. La Figura 7C muestra que el estrés oxidativo inducido por ONOO⁻ produjo una disminución en la co-inmunoprecipitación de las subunidades α_1/β_1 también en los miocitos cardíacos. La proteína Cysless FXYP3 recombinante no tuvo ningún efecto sobre la disminución de la coimmunoprecipitación inducida por ONOO⁻, sino que la FXYP3 de tipo salvaje lo impidió. La Figura 7D muestra el efecto del estrés oxidante asociado con el infarto de miocardio en la interacción de las subunidades α_1/β_1 . Su coimmunoprecipitación se redujo en las zonas de infarto y peri-infarto del miocardio.

Ejemplo 9: Métodos*9.1 Estudios sobre tejidos y células de mamíferos*

Se aislaron miocitos ventriculares de conejos blancos de Nueva Zelanda. Se usaron solo el día del aislamiento y se almacenaron a temperatura ambiente en solución tampón de Krebs-Henseleit hasta su uso. Se han descrito previamente detalles de la anestesia, escisión del corazón y técnicas de aislamiento celular.

El miocardio se obtuvo a partir de un modelo ovino de infarto de miocardio (infarto de miocardio) (Figtree et al, 2009). Los animales se anestesiaron con 20 mg/kg de tiopental sódico como inducción, se intubaron y se ventilaron con 1,5 l/min de oxígeno, 2 l/min de óxido nitroso e isoflurano (1,5 % al 1,8 %). Se proporcionó fluido de mantenimiento a través del acceso venoso periférico con solución de Hartmann (a una velocidad de 1 ml/kg de peso corporal por hora). El electrocardiograma se controló con electrodos conectados a las extremidades. Se indujo IM con perfusión a través de un procedimiento de cateterización cardíaca, e implicó una oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, inmediatamente distal al vaso diagonal dominante, utilizando un catéter de balón coaxial. La arteria se ocluyó durante 90 minutos y, posteriormente, el balón se desinfló para perfusión. Las ovejas se sometieron a eutanasia >24 horas después de la inducción de IM, y el tejido se recolectó inmediatamente para los estudios de proteínas.

9.2 Inmunodetección de proteínas S-glutationiladas en miocitos ventriculares de conejo

Para detectar la S-glutationilación de proteínas específicas relacionadas con la bomba, los miocitos aislados se cargaron con glutatión biotinilado (GSH) (500 $\mu\text{mol/l}$; 1 hora). El éster GSH biotinilado se hizo mezclando 25 mmol/l de sulfo-NHS-biotina con 25 mmol/l de éster etílico de GSH en 50 mmol/l de NaHCO_3 a pH 8,5 durante 2 h, seguido de la adición de 125 mmol/l de NH_4HCO_3 a pH 8,5 durante 1 h. Después de la incubación en éster de GSH biotinilado, las células se lavaron 3 veces con tampón de fosfato frío y se lisaron en tampón (50 mmol/l de Tris-HCl, pH 7,4, Nonidet P-40 al 1 %, 150 mmol/l de NaCl, 50 $\mu\text{mol/l}$ de ácido dietilentriaminapentaacético, 2 mmol/l de fluoruro de fenilmetilsulfonilo) que contenía 10 mmol/l de *N*-etilmaleimida para bloquear reacciones tiol adicionales. La etiqueta de biotina se utilizó para precipitar las proteínas S-glutationiladas utilizando modificaciones de los métodos descritos anteriormente. Se mezclaron aproximadamente 0,5 mg de proteína con perlas de estreptavidina-sepharose durante 1 h. Las perlas se lavaron cinco veces con tampón de lisis con SDS al 0,1 %, y el precipitado final se incubó durante 15 minutos con 40 μl de tampón de elución (tampón de lisis + 20 mmol/l de DTT) para liberar las proteínas S-glutationiladas. Después de añadir el tampón Laemmli, la proteína de GSS extraída por pull-down mediante esta técnica se separó por electroforesis en gel, se transfirió a una membrana y se analizó con los anticuerpos apropiados.

Se realizaron experimentos separados usando un anticuerpo contra la proteína glutationilada (anticuerpo anti-GSH). Los miocitos se trataron con tampón de lisis enfriado con hielo que contenía 150 mmol/l de NaCl, 50 mmol/l de Tris-

HCl (pH 8,0), Triton X-100 al 1 %, EDTA 2 mM e inhibidores de proteasas (sin EGTA completo, Roche Diagnostics). Después de 5 minutos a 4 C, el lisado se aclaró mediante centrifugación a 16.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante (0,25-1 mg de proteína) se preacclaró y se incubó con el anticuerpo apropiado y luego con proteína A/G más perlas de agarosa. Las proteínas unidas a las perlas recogidas se sometieron a SDS-PAGE y se analizaron con anticuerpos.

Los estudios descritos anteriormente se realizaron en miocitos de control, o miocitos expuestos a oxidantes químicos, o estímulos oxidativos activados por señalización celular. Los protocolos para la exposición a Ang II se diseñaron para estudios paralelos con pinza de parche (White et al, 2009) que tenían una duración limitada. Las concentraciones de Ang II se eligieron para asegurar la unión de saturación dentro de este período de tiempo.

9.3 Medición de la corriente eléctrica de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (I_p) en miocitos cardiacos de conejo

La corriente eléctrica de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (que surge de la relación de intercambio 3:2 de $\text{Na}^+\text{:K}^+$) se midió en miocitos individuales utilizando la técnica de pinzamiento de parche de células completas. Las soluciones se diseñaron para minimizar las corrientes de membrana sin bomba. Para los estudios que utilizan Ang II para activar la señalización oxidativa, se llenaron pipetas de parche de punta ancha (4-5 μm) con soluciones que contenían (en mmol/l): HEPES 5; MgATP 2; ácido etilenglicol-bis(β -aminoetil éter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA) 5; glutamato de potasio 70, glutamato sódico 10 y cloruro de tetrametilamonio (TMA-Cl) 80, y L-arginina 0,010. Se valoraron a un pH de 7,20 a 35 °C con KOH. Se usó un potencial de mantenimiento de -40 mV para inactivar canales de Na^+ sensibles a la tensión. Mientras se estableció la configuración de células completas, los miocitos se sobrefundieron con una solución que contenía (en mmol/l): NaCl 140; KCl 5,6; CaCl_2 2,16; MgCl_2 1; glucosa 10; NaH_2PO_4 0,44; ácido N-2-hidroxiethyl piperazin-N'-2-eteno-sulfónico (HEPES) 10. Se valoró a un pH de 7,40 a 35 °C con NaOH. Dos o tres minutos después de que se estableció la configuración de células completas, se cambió a un superfusado que fue diseñado para bloquear la corriente de membrana que surge de los gradientes transmembrana de K^+ y Ca^{2+} . Estaba nominalmente libre de Ca^{2+} y contenía 0,2 mmol/l de CdCl_2 y 2 mmol/l de BaCl_2 .

Para los estudios que usaron forskolina para activar la señalización oxidativa, se usaron superfusados idénticos a los descritos anteriormente mientras se establecía la configuración de células completas, pero se cambió a un superfusado libre de Na^+ (NaCl reemplazado con NMGCl) para medir el cambio inducido por ouabaína en la corriente de retención utilizada para identificar I_p , y se usó el potencial de equilibrio para Cl^- (-14 mV), calculado a partir de las concentraciones de Cl^- en superfusados y soluciones de pipeta, como potencial de ensayo. Se eligió para eliminar la corriente de Cl^- dependiente de cAMP que podría contaminar la medición de la corriente de la bomba relativamente pequeña.

Se usaron amplificadores de pinza de tensión Axoclamp 2A y 2B, soportados por pClamp versión 7 y Axotape versión 2 (Axon Instruments, Ca, USD) para registrar corrientes. La corriente de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (I_p) se identificó como la diferencia entre las corrientes de retención, muestreada a 1 Hz antes y después del bloqueo de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ con 100 $\mu\text{mol/l}$ de ouabaína. Dado que las corrientes de la bomba son pequeñas, su identificación es susceptible a la contaminación por corrientes de cualquier fuente, y es fundamental que solo se incluyan los experimentos con corrientes de retención estables. Se han informado los criterios para la identificación de corrientes estables y los cambios inducidos por la ouabaína en éstas de las muestras obtenidas con un cursor electrónico. El efecto de ouabaína no es reversible dentro del marco de tiempo. Las corrientes de retención estables pueden medirse de manera fiable y no se intentó eliminar el efecto de ouabaína. I_p se normalizó para determinar la capacitancia de membrana.

9.4 Síntesis y purificación de proteínas FXVD

Se usaron genes que codifican proteínas FXVD como se publicaron en GenBank. El vector de expresión de la proteína de fusión pMMHA de *E. coli* se usó para dirigir la síntesis de la proteína de fusión His₉-Trp Δ LE-FXVD. El compañero de fusión de Trp Δ LE, de la secuencia de aminoácidos líder de Trp, es muy eficaz para formar cuerpos de inclusión y, por lo tanto, está protegida de la proteólisis. La proteína de fusión se expresó en la cepa BL21 (DE3) de *E. coli* a niveles de hasta el 20 % de la proteína total. Después de la lisis de los cuerpos de inclusión de *E. coli*, se aislaron por centrifugación y se disolvieron. Entonces se precipitó la proteína de fusión. Las proteínas FXVD intactas se liberaron del compañero de fusión utilizando CNBr. El uso de la escisión química elimina dificultades, tales como la mala especificidad y la inactivación enzimática, que se encuentran a menudo con el tratamiento con proteasas de proteínas de membrana en detergentes. Se logra un alto grado de pureza de la proteína, como se indica por el análisis de aminoácidos N-terminales, la espectrometría de masas MALDI TOF y la espectroscopia de RMN de la solución (KJ Crowell et al., 2003).

9.4 Estudios de ovocitos de *Xenopus*

9.4.1 Mutagénesis y ADNc.

5 Se introdujeron mutaciones puntuales en ADNc de FXYD1 de perro (Crambert et al., 2002) y FXYD2 de *Xenopus* (Béguin et al., 1997) por el método basado en PCR con cebadores de oligonucleótidos sintéticos mutagénicos. Todos los productos se clonaron en un vector pSD5 y se secuenciaron. Los ADNc de Na,K-ATPasa α_1 y β_1 de *Xenopus*, FXYD1 de perro (Crambert et al., 2002), FXYD2 de *Xenopus* (Béguin et al., 1997) y FXYD7 de ratón
10 (Béguin et al., 2002) se subclonaron en un vector pSD5. Los ARNc se prepararon por traducción *in vitro*.

9.4.2 Expresión en ovocitos de *Xenopus*.

15 Los ovocitos en estadio V-VI se obtuvieron de *Xenopus laevis* como se describe (Geering et al., 1996). Los ovocitos se inyectaron con el ARNc de la subunidad α_1 de *Xenopus* (10 ng) y el ARNc de la subunidad β_1 (1 ng) en solitario o junto con ARNc de FXYD1 de tipo salvaje o mutante (2 ng) o con ARNc de FXYD2 de tipo salvaje o mutante (2 ng) o con ARNc de FXYD7 (2 ng). La expresión de proteínas y la asociación de proteínas FXYD mutantes se verificaron incubando ovocitos inyectados con ARNc en solución de Barth modificada en presencia de 1 mCi/ml de [³⁵S]metionina (PerkinElmer Life Sciences) durante 24 h. Los microsomas se prepararon y se sometieron a
20 inmunoprecipitaciones en condiciones no desnaturalizantes como se describe (Geering et al., 1996) con un anticuerpo contra la subunidad α de Na,K-ATPasa, y las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se revelaron mediante fluorografía.

9.4.3 Detección de S-glutationilación

25 Dos días después de la inyección, se estudió la S-glutationilación de la subunidad β_1 de la bomba de Na⁺-K⁺ y las proteínas FXYD como se ha descrito previamente (Figtree et al., 2009). Brevemente, después de la inyección de 50 nl de éster de GSH biotinilado 25 mM y la incubación durante 45 minutos a 19 °C, se activó la S-glutationilación por inyección de ovocitos con peroxinitrito 1 mM.

30 Después de 15 min a 19 °C, se prepararon microsomas de ovocitos con tampones que contenían N-etilmaleimida 10 mM. El contenido de proteína se determinó por el método de Lowry. Las proteínas microsomales (10 μ g) se sometieron a SDS-PAGE o se extrajeron por pull-down con perlas de estreptavidina-Sepharose (200 μ g) y luego se transfirieron durante una noche a 40 V a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con un 10 %
35 de leche deshidratada desnatada en solución salina tamponada con Tris que contenía un 0,1 % de Tween-20 y se incubaron con el anticuerpo primario *Xenopus* β_1 (1/1000), el anticuerpo FXYD1 de perro (1/1000) (Crambert et al., 2002), FXYD7 de ratón (1/1000) (Béguin et al., 2002) o FXYD2 de *Xenopus* (1/250) (Béguin et al., 1997). Después de la unión del anticuerpo primario, los anticuerpos secundarios acoplados a la peroxidasa (1/10.000, Amersham Biosciences) se unieron y el complejo se reveló con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham Biosciences) de
40 acuerdo con el protocolo del fabricante. Los anticuerpos de FXYD2 son eficientes en los experimentos de inmunoprecipitación (Béguin et al., 1997) pero resultaron no ser suficientes para reconocer FXYD2 de *Xenopus* en transferencias Western. En estos experimentos, la expresión de FXYD2 de *Xenopus* se confirmó mediante experimentos de inmunoprecipitación en ovocitos marcados con ³⁵S-metionina (datos no mostrados).

45 9.5 Medición de la corriente máxima de la bomba de Na⁺-K⁺ ($I_{m\acute{a}x}$)

Las mediciones electrofisiológicas de $I_{m\acute{a}x}$ se realizaron 2 días después de la inyección de ovocitos utilizando la técnica de pinza de tensión de dos electrodos. Los ovocitos se cargaron con Na⁺ mediante incubación durante una
50 noche en un medio sin K⁺. El potencial de membrana se ajustó a -50 mV y la corriente de la bomba de Na,K se midió a temperatura ambiente como la corriente externa inducida por la adición de K⁺ 10 mM.

Para la determinación de los efectos del peroxinitrito (ONOO⁻) en $I_{m\acute{a}x}$, se inyectaron ovocitos con 50 nl de peroxinitrito 1 mM 15 min antes de las mediciones.

55 Como se ha descrito anteriormente (Figtree et al., 2009), el glutatión endógeno fue suficiente para ver el efecto del peroxinitrito en $I_{m\acute{a}x}$.

9.6 Unión de [³H]ouabaína sobre ovocitos intactos

El número total de Na,K-ATPasa expresada en la superficie celular se determinó mediante la unión de ^3H -ouabaína dos días después de la inyección de ovocitos como se ha descrito previamente (Figtree et al., 2009). Brevemente, los ovocitos se cargaron con Na^+ en una solución libre de K^+ que contenía NaCl 90 mM, CaCl_2 1 mM, MgCl_2 1 mM, Hepes 10 mM, pH 7,4 durante 2 horas a 19 °C. Luego se incubaron los ovocitos a 19 °C durante 2 h en la solución libre de K^+ que contenía éster de GSH biotinilado 1 mM. Después de la incubación, los ovocitos se inyectaron, o no, con 50 μl de peroxinitrito 1 mM, pH 7,4 a temperatura ambiente y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min. Después, los ovocitos se incubaron en una solución libre de K^+ que contenía $[21,22\text{-}^3\text{H}]$ ouabaína 0,3 μM (Amersham, actividad específica 15 Ci/mmol) y ouabaína fría 0,7 μM durante 30 min. La unión de ouabaína no específica se determinó en presencia de ouabaína fría 300 μM y representó aproximadamente el 5 % de la unión total. Los ovocitos se lavaron extensamente con un tampón que contenía NaCl 90 mM, imidazol 30 mM, pH 7,4, se transfirieron individualmente a tubos de centelleo y se solubilizaron con 100 μl de SDS al 5 %. Los ovocitos solubilizados se contaron después de la adición de 2 ml de Scintillator 299 (Packard).

9.7 Número de recambios de Na,K-ATPasa.

El número de recambios se calculó como la relación entre la corriente máxima de Na,K-ATPasa ($I_{\text{máx}}$) y el número del número de bomba determinado por la unión de ouabaína.

9.8 Análisis de datos

Cada inmunotransferencia presentada es representativa de al menos tres experimentos separados. Las densidades de banda se cuantificaron por densitometría (Fujifilm, LAS-3000). Los datos se expresan como la media \pm SE. Las comparaciones estadísticas se hicieron con una prueba t de Student o ANOVA unidireccional, según corresponda. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

Análisis de los Ejemplos

Se sabe que la actividad de la bomba de Na^+/K^+ está modulada por una serie de factores que incluyen glucósidos cardíacos, catecolaminas, hormonas y proteínas tales como FXD.

El papel de las proteínas FXD en la función de la membrana se atribuye en gran medida a su ubicación conjunta con la bomba de Na^+/K^+ de membrana y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. La estrecha asociación de las proteínas FXD con las subunidades α y β del heterodímero de la bomba de Na^+/K^+ se destaca por la reciente definición de la estructura tridimensional del complejo $\alpha/\beta/\text{FXD}$ en cristales de Na^+/K^+ -ATPasa de riñón (Morth et al., 2007) y de glándula rectal de tiburón (Shinoda et al., 2009). A pesar de esta estrecha asociación, las proteínas FXD no son una parte integral del heterodímero α/β de la bomba de Na^+/K^+ , ya que el heterodímero en solitario presenta tanto actividad catalítica como capacidad de transporte de iones.

La FXD1, expresada principalmente en el corazón y el músculo esquelético, es única entre las proteínas FXD por ser un sustrato importante para las proteínas cinasas A y C (Presti et al., 1985), y la fosforilación de los residuos de aminoácidos identificados en FXD1 se vio ampliamente implicada en el control de la función de la bomba de Na^+/K^+ . Sin embargo, estudios mutacionales no han confirmado una relación causal entre la fosforilación de estos residuos y los efectos sobre la función de la bomba de Na^+/K^+ . Además, los residuos no se conservan entre las otras 6 proteínas FXD de mamíferos que no tienen sitios de fosforilación funcional. Si bien la presencia de estas proteínas FXD puede modular la función de la bomba de Na^+/K^+ , por lo tanto, no pueden estar directamente implicadas en la regulación dependiente de la proteína cinasa, y, si existe un papel funcional generalmente aplicable de la localización conjunta de proteínas FXD con la bomba de Na^+/K^+ , tiene que ser independiente de cualquier fosforilación directa de las proteínas.

Se ha identificado un mecanismo que conserva el papel ampliamente aceptado de las proteínas cinasas en la regulación de la bomba de Na^+/K^+ , pero es independiente de la fosforilación de las proteínas FXD o de las subunidades de la bomba de Na^+/K^+ . La señal oxidativa de la activación dependiente de PKC, inducida por la angiotensina II (Ang II) de NADPH oxidasa en los miocitos cardíacos, o la exposición directa de los miocitos a oxidantes químicos indujo la glutatiónilación de la subunidad β_1 del heterodímero de la bomba (Figtree et al., 2009; White et al., 2009). La glutatiónilación es una modificación oxidativa reversible en la que el triptéptido citosólico glutatión (GSH) forma un enlace disulfuro mixto con un residuo de cisteína reactiva en una proteína candidata. La glutatiónilación confiere un aducto de 305 Da cargado negativamente a la proteína que recuerda a la fosforilación y se vio implicada en la señalización oxidativa. La glutatiónilación también se induce al exponer los ovocitos de *Xenopus* que sobreexpresan las subunidades α_1/β_1 de la bomba o los fragmentos de membrana de riñón de cerdo

enriquecidos con Na⁺-K⁺ ATPasa, a oxidantes. Los estudios mutacionales identificaron Cys46 en la subunidad β₁ como el residuo reactivo, y demostraron que la glutationilación estaba relacionada causalmente con la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ (Figtree et al., 2009).

5 La fosforilación de las proteínas FXYD, con la posible excepción de FXYD1, no puede justificar un papel en la regulación de la bomba de Na⁺-K⁺ dependiente de cinasa. Sin embargo, como se describe en el presente documento, el presente inventor examinó si alguno de sus residuos de cisteína es "reactivo", es decir, puede experimentar glutationilación, y si tales cisteínas reactivas interactúan con la glutationilación de las subunidades β₁ de la bomba y su equivalente funcional, la inhibición de la bomba.

10

En el presente documento se describe una función de las proteínas FXYD nunca sospechada previamente que es que las proteínas FXYD modulan la inhibición oxidativa de la bomba de Na⁺/K⁺ mediante la alteración de la glutationilación de la bomba de Na⁺/K⁺. Este descubrimiento, a diferencia del pensamiento existente, proporciona un papel modulador a los miembros de la familia de proteínas FXYD que no tienen sitios de fosforilación funcionales.

15 Ese papel es la reversión de la inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ inducida por una señal de oxidante. En circunstancias fisiológicas, esta señal puede ser dependiente de receptores de hormonas y dependiente de NADPH oxidasa. En condiciones fisiopatológicas, la señal puede surgir de la isquemia tisular con o sin reperfusión, por ejemplo, en el infarto de miocardio. Las proteínas FXYD también pueden desempeñar un papel en la protección de las células cancerosas ante los altos niveles de estrés oxidante.

20

Implicaciones del nuevo papel de las proteínas FXYD para la enfermedad

El papel de las proteínas FXYD en la reducción de la modificación oxidativa de la subunidad β₁ de la bomba de Na-K como se describe en el presente documento tiene implicaciones importantes para los procesos de enfermedad asociados con el aumento del estrés oxidativo. Se pueden desarrollar tratamientos para mejorar la función reductora de las proteínas FXYD o suprimirla.

25

Infarto de miocardio

30 El aumento del estrés oxidativo y los altos niveles de miocitos Na⁺ y Ca⁺ contribuyen al daño miocárdico y las anomalías contráctiles en la isquemia y la reperfusión. De acuerdo con el aumento del estrés oxidativo, la subunidad β₁ de la bomba de Na⁺-K⁺ se glutationila en el infarto (Figtree, 2009), y la inhibición de la bomba causada por esto puede contribuir a los niveles elevados de Na⁺ y Ca²⁺. Cabe destacar que, el infarto de miocardio también está asociado con un aumento marcado en la glutationilación de FXYD1 (Figura 1), una disminución de su asociación "normal" con la subunidad α de la bomba de Na-K y un aumento en la asociación de la subunidad β₁ (Figura 6), consistente con un papel de FXYD1 en la desglutinationilación de la subunidad β₁.

35

El tratamiento con antioxidantes, por ejemplo, las vitaminas A y E, tienen un potencial limitado de eficacia porque el citosol contiene un reductor abundante de todos modos. Las proteínas FXYD pueden ser el factor crítico que permite la reducción de las proteínas de membrana, incluida la bomba de Na-K, y por lo tanto, la restauración de la función. En la interfaz entre la membrana y el citosol, la cisteína reactiva en las proteínas FXYD puede proporcionar un enlace a la cascada de oxidorreductasas que, en última instancia, obtienen su poder reductor del abundante GSH citosólico.

40

45 *Ictus*

El estrés oxidativo se ha visto implicado en el daño isquémico cerebral con el ictus, y se han examinado estrategias antioxidantes. Podría ser factible un enfoque similar al propuesto para el infarto, usando proteínas FXYD exógenas.

50 *Cáncer*

Se sabe que muchos tejidos cancerosos tienen altos niveles de estrés oxidativo y han desarrollado defensas antioxidantes aumentadas, específicamente del sistema de oxidorreductasa citosólica.

55 FXYD3 es particularmente bien conocido por su posible papel en la biología del cáncer. FXYD3 (también conocida como proteína tumoral mamaria 8) se sobreexpresa en cánceres importantes, incluidos los cánceres de próstata, mama y páncreas. El nuevo papel de la "membrana oxidorreductasa" que se ha identificado sugiere que la sobreexpresión puede servir para proteger proteínas de membrana críticas, incluida la bomba de Na-K, ante el estrés oxidativo. En apoyo de esto, la regulación negativa de FXYD3 mediante el silenciamiento génico con técnicas

de ARNs o la inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ con glucósidos cardíacos altera el crecimiento de células de cáncer de próstata *in vitro*. También es notable que los datos clínicos de observación sugieren que los glucósidos cardíacos tienen un efecto beneficioso sustancial en la supervivencia del cáncer de mama. La función del transporte de iones, así como el papel de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en la señalización se han relacionado con la posible eficacia de los glucósidos cardíacos en el tratamiento del cáncer.

Reactividad de las cisteínas a la proteína FXYD

Una, pero no la otra de las dos proteínas FXYD mejor conocidas y más estudiadas fue susceptible a la glutatiónilación. La proteína susceptible, FXYD1 tiene dos residuos de cisteína en su terminal citoplásmico en un motivo C1XC2, mientras que FXYD2 tiene un solo residuo candidato de cisteína. La mutación de C2, pero no C1, suprimió la susceptibilidad a la glutatiónilación de FXYD1 identificando a C2 como el residuo reactivo y también indicando que el motivo C1XC2 no era crítico para la reactividad. La proximidad de las cargas positivas de los aminoácidos básicos es importante para que las cisteínas, en un sistema de modelo de proteína purificada, reaccionen con el GSH cargado negativamente, y en el presente documento, se describe que los aminoácidos básicos adyacentes también son importantes para la glutatiónilación de proteínas FXYD en el modelo celular descrito. Una mutación Gly \rightarrow Lys de FXYD2 para flanquear la cisteína candidata con aminoácidos básicos hizo que la proteína FXYD se volviera reactiva y, a la inversa, una mutación Lys \rightarrow Gly que eliminó uno de los aminoácidos básicos que flanqueaban la cisteína reactiva en FXYD1 eliminó su susceptibilidad a la glutatiónilación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que C1 en FXYD1 no era reactivo, a pesar de su motivo RC1R, lo que indica que los aminoácidos básicos adyacentes promueven, pero no necesariamente predicen, la reactividad como se ha reconocido previamente. Los efectos estéricos en la estructura tridimensional de FXYD1 y las proteínas adyacentes o su proximidad a la membrana también pueden ser importantes.

25 Glutatiónilación e interacción de proteínas FXYD con subunidades de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$

Las proteínas FXYD tienen enlaces múltiples con las subunidades α y β del heterodímero de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en el dominio transmembrana y extracelular respectivamente (Shinoda et al., 2009). Estas parecen haber sido afectadas por estímulos oxidativos y glutatiónilación como se indica por una disminución en la coimmunoprecipitación de FXYD1 con la subunidad α_1 y un aumento en su coimmunoprecipitación con la subunidad β_1 en los miocitos cardíacos. Esto no necesariamente refleja una interrupción *in situ* de todos los enlaces a alguna subunidad α_1 o la formación de nuevos enlaces a la subunidad β_1 . Es posible que se hayan producido alteraciones durante el procedimiento experimental de coimmunoprecipitación según lo analizado anteriormente para las subunidades α y β (Figtree 2009). Sin embargo, los cambios en la coimmunoprecipitación, no obstante, sugieren un cambio en la fuerza relativa *in situ* de las asociaciones, quizás mediada por un efecto estérico del aducto de GSH de 305 Da.

La asociación de las proteínas FXYD con la subunidad α catalítica puede modificar las propiedades funcionales de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y, en principio, un cambio en la asociación inducida por la glutatiónilación puede cambiar la función. Sin embargo, un papel funcional crítico de cualquier cambio en la interacción FXYD1/ α_1 no se admite en este estudio por los números de recambios idénticos que se muestran en la Figura 8 cuando las subunidades α_1/β_1 se expresaron con o sin FXYD1. Como se ha mostrado previamente (Figtree, 2009), la disminución en la función de la bomba inducida con estímulos oxidativos, se asocia con la glutatiónilación de la subunidad β_1 y se evita mediante la mutación de su única cisteína libre, Cys46, que indica una relación causal entre la glutatiónilación y la inhibición de la bomba. Los estímulos oxidativos en este estudio no se asociaron con la glutatiónilación de la subunidad β_1 o la inhibición de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ cuando las proteínas FXYD con cisteínas reactivas se expresaron en ovocitos de *Xenopus* o se administraron exógenamente a los miocitos cardíacos. La mutación de la cisteína reactiva en las proteínas FXYD eliminó estos efectos. Estos hallazgos sugieren que una interacción entre cisteínas reactivas en proteínas FXYD y la subunidad β_1 es importante para la función.

Las proteínas FXYD podrían prevenir la glutatiónilación de la subunidad β_1 y, por lo tanto, la inhibición de la bomba. Como alternativa, podrían facilitar la desglutatiónilación después de la glutatiónilación inicial de la subunidad β_1 . La velocidad espontánea de desglutatiónilación es muy lenta, pero puede acelerarse en muchos órdenes de magnitud mediante oxidorreductasas. De estos, la glutaredoxina 1 (GRx1) media la desglutatiónilación del disulfuro de proteína de GSS mixto con selectividad exclusiva contra otros disulfuros mixtos de proteína. Se ha encontrado que coimmunoprecipita con la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ en el lisado de miocitos cardíacos y que la administración intracelular de GRx1 recombinante elimina la inhibición de la bomba inducida por una señal de oxidante en los miocitos con pinzamiento de tensión (Figtree, 2009). Las proteínas FXYD pueden facilitar la desglutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ y quizás otras proteínas de membrana al proporcionar un enlace a las oxidorreductasas, incluyendo GRx1, que son citosólicas, y por lo tanto no se espera que tengan

acceso directo al medio de membrana. En ausencia de cualquier estímulo oxidante anterior, la desglutinationilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ desde el inicio, inducida por el agonista del receptor β_3 adrenérgico de activación de la bomba CL316.243, se bloqueó por FXVD3 Cysless y se facilitó por FXVD3 de tipo salvaje en este estudio, lo que sostiene un papel de las proteínas FXVD en la mediación de la desglutinationilación.

5

Aunque es plausible, la cisteína reactiva en el dominio citoplásmico, cerca del segmento transmembrana de las proteínas FXVD, puede interactuar con la cascada estrictamente citosólica de las oxidorreductasas, la estructura tridimensional determinada para el complejo $\alpha/\beta/\text{FXVD}$ indica que no está en la distancia de interacción con la Cys46 reactiva en la subunidad β_1 en el dominio transmembrana. Sin embargo, la $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa en los cristales utilizados para determinar la estructura se limitó estrictamente al estado conformacional E_2 . La subunidad β se mueve sustancialmente en relación con la subunidad α durante el cambio conformacional $E_2 \leftrightarrow E_1$ del ciclo de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (Shinoda et al., 2009), y como se ha analizado previamente, existe evidencia de que los compartimentos llenos de agua pueden tener acceso a la cisteína transmembrana en la subunidad β_1 (Figtree et al. 2009). Además, dado que GSH es estrictamente citosólico, la susceptibilidad de la subunidad β_1 a la glutatiónilación indica que se puede acceder a Cys46 desde el compartimento citosólico en alguna fase del ciclo de la bomba y, por lo tanto, tal vez en la distancia de interacción con las cisteínas reactivas de las proteínas FXVD.

Implicaciones fisiológicas

Una gran cantidad de evidencia indica que la presencia o ausencia de proteínas FXVD modifica las propiedades funcionales y puede ser importante para ajustar las propiedades de la bomba funcional estática de acuerdo con las necesidades de tejidos o células específicas que las expresan. El presente estudio indica que también tienen un papel más amplio, integrado en un esquema de regulación oxidativa que conserva los roles firmemente establecidos de las proteínas cinasas en la regulación de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ (White et al 2009; Figtree et al 2009) pero que invoca la glutatiónilación en lugar de la fosforilación como la modificación molecular aguas abajo que causa un cambio en la función. Si bien el esquema de modulación de la bomba divulgado en el presente documento se extiende a una función reguladora para la mayoría de las proteínas FXVD, no incluye FXVD2, expresada en el riñón que no es susceptible a la glutatiónilación, ni incluye heterodímeros de bomba con subunidades β_2 o β_3 , ya que estas subunidades relativamente poco expresadas no tienen una cisteína reactiva libre (Figtree et al 2009). Mecanismos alternativos pueden regular la función de la bomba cuando se expresan las subunidades β_2 o β_3 de FXVD2 o puede que no se requiera una respuesta rápida a una señal oxidativa.

Implicaciones terapéuticas

Una gran cantidad de afecciones patológicas están asociadas con un aumento en el estrés oxidativo y la reactividad de las proteínas cisteínas de FXVD puede ser importante para su fisiopatología y tratamiento. De particular relevancia para este estudio, el aumento del estrés oxidativo y los altos niveles de Na^+ y Ca^{2+} de los miocitos contribuyen al daño miocárdico y las anomalías contráctiles en la isquemia y la reperfusión. De acuerdo con el aumento del estrés oxidativo, la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ se glutatiónila en el infarto (Figtree et al., 2009), y la inhibición de la bomba causada por esto puede contribuir a los elevados niveles de Na^+ y los niveles de Ca^{2+} dependientes del intercambio de $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$. Una abundante capacidad de tampón redox celular hace que sea improbable que un cambio global en el estado redox sea crítico en el estrés oxidante y el tratamiento con antioxidantes, tales como vitaminas A y E, por lo tanto, tienen un potencial de eficacia limitado. La presente invención muestra que los estímulos oxidativos, incluido el infarto de miocardio, están asociados con la glutatiónilación de FXVD1. También demuestra la capacidad de las proteínas FXVD exógenas recombinantes para reemplazar FXVD1 nativa y disminuyen la glutatiónilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$. La administración *in vivo* de una proteína FXVD exógena, o un derivado más pequeño con una característica clave conservada, podría facilitar en gran medida la desglutinationilación de la subunidad β_1 de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$, la activación de la función y la reversión de los efectos adversos de la sobrecarga celular de Na^+ y Ca^{2+} en la fase aguda del infarto de miocardio.

Una pérdida de función que depende de la cisteína reactiva en las proteínas FXVD puede tener aplicación en el tratamiento del cáncer. El papel de FXVD3 para facilitar la desglutinationilación de la subunidad β_1 puede ser crítico para tal aplicación. Los Ejemplos proporcionados en el presente documento ilustran que la proteína FXVD nativa puede ser desplazada por Cysless FXVD3 *in vitro*, al menos en miocitos cardíacos. Un derivado de la proteína FXVD administrado por vía intravenosa sin cisteína reactiva o residuos de aminoácidos básicos adyacentes críticos podría desplazar la FXVD3 de tipo salvaje y eliminar su protección de la función de la bomba de $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ante un aumento de la carga oxidativa en las células cancerosas. El acoplamiento de la proteína a un péptido que permite el direccionamiento selectivo de compuestos solubles en la membrana a las células cancerosas podría mejorar la

eficacia y reducir los efectos no deseados en los tejidos no diana. Dado que la inhibición de la bomba de Na⁺-K⁺ aumenta el daño por irradiación a líneas celulares de tumores humanos, pero no a líneas celulares normales (Mijatovic T, Kiss R, 2007), la eficacia de un compuesto terapéutico también puede mejorar cuando se usa en combinación con radioterapia o con enfoques quimioterapéuticos que también aumentan las cargas oxidativas en las 5 células.

Bibliografía

- 10 Arimochi, J., Ohashi-Kobayashi, A., and Maeda, M. (2007). Interaction of Mat-8 (FXYP-3) with Na⁺/K⁺-ATPase in colorectal cancer cells. *Biol Pharm Bull* 30, 648-654.
- Attali, B., Latter, H., Rachamim, N., and Garty, H. (1995). A corticosteroid-induced gene expressing an "IsK-like" K⁺ channel activity in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6092-6096.
- 15 Béguin, P., Crambert, G., Monnet-Tschudi, F., Uldry, M., Horisberger, J.-D., Garty, H., and Geering, K. (2002). FXYP7 is a brain-specific regulator of Na,K-ATPase {alpha} 1-{beta} isozymes. *EMBO J* 21, 3264-3273.
- Bundgaard, H, Liu C-C, Garcia A, Hamilton EJ, Huang Y, Chia KKM, Hunyor SN, Figtree GA, Rasmussen HH. β 3 adrenergic stimulation of the cardiac Na⁺-K⁺ pump by reversal of an inhibitory oxidative modification. *Circulation*. "In press". Accepted October 7, 2010.
- 20 Chow, D.C., Browning, C.M., and Forte, J.G. (1992). Gastric H⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited by reduction of disulfide bonds in beta-subunit. *Am J Physiol* 263, C39-46. Cornelius, F., and Mahmoud, Y.A. (2003). Functional modulation of the sodium pump: the regulatory proteins "Fixit". *News Physiol Sci* 18, 119-124.
- Crowell, K.J., Franzin, C.M., Koltay, A., Lee, S., Lucchese, A.M., Snyder, B.C., and Marassi, F.M. (2003). Expression and characterization of the FXYP ion transport regulators for NMR structural studies in lipid micelles and lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1645, 15-21.
- 25 Deng, V., Matagne, V., Banine, F., Frerking, M., Ohliger, P., Budden, S., Pevsner, J., Dissen, G.A., Sherman, L.S., and Ojeda, S.R. (2007). FXYP1 is an MeCP2 target gene overexpressed in the brains of Rett syndrome patients and *MeCP2*-null mice. *Hum Mol Genet* 16, 640-650.
- Figtree, G.A., Liu, C.C., Bibert, S., Hamilton, E.J., Garcia, A., White, C.N., Chia, K.K.M., Cornelius, F., Geering, K., and Rasmussen, H.H. (2009). Reversible oxidative modification: a key mechanism of Na⁺-K⁺ pump regulation. *Circ Res* 105, 185-193.
- 30 Fu, X., and Kamps, M. (1997). E2a-Pbx1 induces aberrant expression of tissue-specific and developmentally regulated genes when expressed in NIH 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol* 17, 1503-1512.
- Garcia A, Bundgaard, H, Hamilton E, Liu, C-C, Chia, KKM, Figtree GA, Rasmussen HH. β 3 adrenergic stimulation of the Na⁺-K⁺ pump is mediated by NO-dependent deglutathionylation of the β 1 pump subunit. Proceedings from the 12th International ATPase Conference, Aarhus, Denmark, 2008 (abstract).
- 35 Geering, K. (1991). The functional role of the beta-subunit in the maturation and intracellular transport of Na,K-ATPase. *FEBS Lett* 285, 189-193.
- Geering, K. (2006). FXYP proteins: new regulators of Na-K-ATPase. *Am J Physiol Renal Physiol* 290, F241-250.
- 40 Ghezzi, P. (2005). Regulation of protein function by glutathionylation. *Free Radic Res* 39, 573-580.
- Kayed, H., Kleeff, J., Kolb, A., Ketterer, K., Keleg, S., Felix, K., Giese, T., Penzel, R., Zentgraf, H., Buchler, M.W., et al. (2006). FXYP3 is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and influences pancreatic cancer cell growth. *Int J Cancer* 118, 43-54.
- 45 Meij, I.C., Koenderink, J.B., van Bokhoven, H., Assink, K.F., Groenestege, W.T., de Pont, J.J., Bindels, R.J., Monnens, L.A., van den Heuvel, L.P., and Knoers, N.V. (2000). Dominant isolated renal magnesium loss is caused by misrouting of the Na(+),K(+)-ATPase gamma-subunit. *Nat Genet* 26, 265-266.
- Mercer, R.W., Biemesderfer, D., Bliss, D.P., Collins, J.H., and Forbush, B. (1993). Molecular cloning and immunological characterization of the gamma-polypeptide, a small protein associated with the Na,K-ATPase. *J Cell Biol* 121, 579-586.
- 50 Mijatovic T, Van Quaquebeke E, Delest B, Debeir O, Darro F, Kiss R. Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1776(1):32-57, 2007
- Morrison, B.W., Moorman, J.R., Kowdley, G.C., Kobayashi, Y.M., Jones, L.R., and Leder, P. (1995). Mat-8, a novel phospholemmal-like protein expressed in human breast tumors, induces a chloride conductance in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 270, 2176-2182.
- 55 Morth, J.P., Pedersen, B.P., Toustrup-Jensen, M.S., Sorensen, T.L., Petersen, J., Andersen, J.P., Vilsen, B., and Nissen, P. (2007). Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature* 450, 1043-1049.
- Palmer, C.J., Scott, B.T., and Jones, L.R. (1991). Purification and complete sequence determination of the major plasma membrane substrate for cAMP-dependent protein kinase and protein kinase C in myocardium. *J Biol Chem* 266, 11126-11130.

5 Presti, C.F., Jones, L.R., and Lindemann, J.P. (1985). Isoproterenol-induced phosphorylation of a 15-kilodalton sarcolemmal protein in intact myocardium. *J Biol Chem* 260, 3860-3867.

Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F., and Toyoshima, C. (2009). Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature* 459, 446-450.

10 Sweadner, K.J., and Rael, E. (2000). The FXVD gene family of small ion transport regulators or channels: cDNA sequence, protein signature sequence, and expression. *Genomics* 68, 41-56.

White, C.N., Figtree, G.A., Liu, C.C., Garcia, A., Hamilton, E.J., Chia, K.K., and Rasmussen, H.H. (2009). Angiotensin II inhibits the Na⁺-K⁺ pump via PKC dependent activation of NADPH oxidase. *Am J Physiol Cell Physiol* 296, C693-700.

15 White CN. Liu CC. Garcia A. Hamilton EJ. Chia KK. Figtree GA. Rasmussen HH. (2010) Activation of cAMP-dependent signaling induces oxidative modification of the cardiac Na⁺-K⁺ pump and inhibits its activity. *J Biol Chem* 285, 13712-20.

Yamaguchi, F., Yamaguchi, K., Tai, Y., Sugimoto, K., and Tokuda, M. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel phospholemman-like protein from rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 86, 189-192.

LISTA DE SECUENCIAS

20 <110> Northern Sydney and Central Coast Area Health Service

<120> Modulaci3n de bomba de NA-K

<130> 923653C

25 <140> Solicitud PCT

<141> 15-10-2010

<160> 14

30 <170> PatentIn versi3n 3.2

<210> 1

<211> 92

<212> PRT

35 <213> Homo sapiens

<400> 1

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

40 <210> 2

<211> 66

<212> PRT

ES 2 694 240 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Thr Gly Leu Ser Met Asp Gly Gly Gly Ser Pro Lys Gly Asp Val
1 5 10 15

Asp Pro Phe Tyr Tyr Asp Tyr Glu Thr Val Arg Asn Gly Gly Leu Ile
20 25 30

Phe Ala Gly Leu Ala Phe Ile Val Gly Leu Leu Ile Leu Leu Ser Arg
35 40 45

Arg Phe Arg Cys Gly Gly Asn Lys Lys Arg Arg Gln Ile Asn Glu Asp
50 55 60

Glu Pro
65

<210> 3

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Lys Val Thr Leu Gly Leu Leu Val Phe Leu Ala Gly Phe Pro
1 5 10 15

Val Leu Asp Ala Asn Asp Leu Glu Asp Lys Asn Ser Pro Phe Tyr Tyr
20 25 30

Asp Trp His Ser Leu Gln Val Gly Gly Leu Ile Cys Ala Gly Val Leu
35 40 45

Cys Ala Met Gly Ile Ile Ile Val Met Ser Ala Lys Cys Lys Cys Lys
50 55 60

Phe Gly Gln Lys Ser Gly His His Pro Gly Glu Thr Pro Pro Leu Ile
65 70 75 80

Thr Pro Gly Ser Ala Gln Ser
85

<210> 4

<211> 89

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

5

10

15

20

ES 2 694 240 T3

```

Met Glu Arg Val Thr Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Gly Leu Thr Ala
1                               10                               15

Leu Glu Ala Asn Asp Pro Phe Ala Asn Lys Asp Asp Pro Phe Tyr Tyr
                20                25                30

Asp Trp Lys Asn Leu Gln Leu Ser Gly Leu Ile Cys Gly Gly Leu Leu
                35                40                45

Ala Ile Ala Gly Ile Ala Ala Val Leu Ser Gly Lys Cys Lys Cys Lys
50                55                60

Ser Ser Gln Lys Gln His Ser Pro Val Pro Glu Lys Ala Ile Pro Leu
65                70                75                80

Ile Thr Pro Gly Ser Ala Thr Thr Cys
                85

```

5 <210> 5
 <211> 178
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 5

ES 2 694 240 T3

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

Leu Pro Thr Arg Gly Gln Thr Leu Lys Asp Thr Thr Ser Ser Ser Ser
 20 25 30

Ala Asp Ser Thr Ile Met Asp Ile Gln Val Pro Thr Arg Ala Pro Asp
 35 40 45

Ala Val Tyr Thr Glu Leu Gln Pro Thr Ser Pro Thr Pro Thr Trp Pro
 50 55 60

Ala Asp Glu Thr Pro Gln Pro Gln Thr Gln Thr Gln Gln Leu Glu Gly
 65 70 75 80

Thr Asp Gly Pro Leu Val Thr Asp Pro Glu Thr His Lys Ser Thr Lys
 85 90 95

Ala Ala His Pro Thr Asp Asp Thr Thr Thr Leu Ser Glu Arg Pro Ser
 100 105 110

Pro Ser Thr Asp Val Gln Thr Asp Pro Gln Thr Leu Lys Pro Ser Gly
 115 120 125

Phe His Glu Asp Asp Pro Phe Phe Tyr Asp Glu His Thr Leu Arg Lys
 130 135 140

Arg Gly Leu Leu Val Ala Ala Val Leu Phe Ile Thr Gly Ile Ile Ile
 145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Lys Cys Arg Gln Leu Ser Arg Leu Cys Arg Asn Arg
 165 170 175

Cys Arg

<210> 6

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

5

ES 2 694 240 T3

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

<210> 7
 <211> 79
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7
 Met Ala Thr Pro Thr Gln Thr Pro Thr Lys Ala Pro Glu Glu Pro Asp
 1 5 10 15
 Pro Phe Tyr Tyr Asp Tyr Asn Thr Val Gln Thr Val Gly Met Thr Leu
 20 25 30
 Ala Thr Ile Leu Phe Leu Leu Gly Ile Leu Ile Val Ile Ser Lys Lys
 35 40 45
 Val Lys Cys Arg Lys Ala Asp Ser Arg Ser Glu Ser Pro Thr Cys Lys
 50 55 60
 Ser Cys Lys Ser Glu Pro Ser Ser Ala Pro Gly Gly Gly Gly Val
 65 70 75

10

<210> 8
 <211> 279
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens

15

<400> 8
 atggcacctc tccaccacat cttggttttc tgtgtgggtc tcctcaccat ggccaaggca
 60

ES 2 694 240 T3

gaaagtccaa aggaacacga cccgttcact tacgactacc agtcacctgca gatcggaggc
120

ctcgtcatcg ccgggatcct cttcatcctg ggcacacctca tcgtgctgag cagaagatgc
180

cggtgcaagt tcaaccagca gcagaggact ggggaaccgg atgaagagga gggaaacttc
240

cgagctcca tccgccgtct gtccaccggc aggcggtag
279

5
<210> 9
<211> 177
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 9
gtggcggcag ccaaggggga cgtggaccgg ttctactatg actatgagac cgttcgcaat
60

gggggcctga tcttcgctgg actggccttc atcgtggggc tctcatcct cctcagcaga
120

agattccgct gtgggggcaa taagaagcgc aggcaaatca atgaagatga gccgtaa
177

10

<210> 10
<211> 261
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15

<400> 10
atgcagaagg tgaccctggg cctgcttggt ttctggcag gctttcctgt cctggacgcc
60

aatgacctag aagataaaaa cagtcctttc tactatgact ggcacagcct ccaggttggc
120

gggctcatct gcgctggggg tctgtgcgcc atgggcatca tcacgtcat gaggcaaaa
180

tgcaaatgca agtttgcca gaagtccggc caccatccag gggagactcc acctctcatc
240

acccccggct cagcccaaag c
261

20

<210> 11
<211> 270
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 11

ES 2 694 240 T3

atggagagag tgaccctggc ccttctccta ctggcaggcc tgactgcctt ggaagccaat
60

gaccatttg ccaataaaga cgatcccttc tactatgact ggaaaaacct gcagctgagc
120

ggactgatct gcggagggct cctggccatt gctgggatcg cggcagttct gagtggcaaa
180

tgcaaatgca agagcagcca gaagcagcac agtcctgtac ctgagaaggc catcccactc
240

atcactccag gctctgccac tacttgetga
270

<210> 12

<211> 477

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<400> 12

ggacagacgt tgaagatac cacgtccagt tcttcagcag actcaactat catggacatt
60

caggtcccga cacgagcccc agatgcagtc tacacagaac tccagcccac ctctccaacc
120

ccaacctggc ctgctgatga aacaccacaa ccccagacct agaccagca actggaagga
180

acggatgggc ctctagtgac agatccagag acacacaaga gcaccaaagc agtcatccc
240

actgatgaca ccacgacgct ctctgagaga ccatcccacaa gcacagacgt ccagacagac
300

ccccagacct tcaagccatc tggttttcat gaggatgacc ccttctteta tgatgaacac
360

accctccgga aacgggggct gttggtcgca gctgtgctgt tcatcacagg catcatcatc
420

ctcaccagtg gcaagtgcag gcagctgtcc cggttatgcc ggaatcgttg cagggtga
477

10

<210> 13

<211> 288

<212> ADN

<213> Homo sapiens

15

<400> 13

ES 2 694 240 T3

atggagttgg tgctggtcct cctctgcagc ctgctggccc ccatggtcct ggccagtgca
60

gctgaaaagg agaaggaat ggaccctttt cattatgatt accagaccct gaggattggg
120

ggactggtgt tcgctgtggt cctcttctcg gttgggatcc tccttatcct aagtctgcagg
180

tgcaagtgca gtttcaatca gaagccccgg gccccaggag atgaggaagc ccagggtggag
240

aacctcatca cgc caatgc aacagagccc cagaaagcag agaactga
288

<210> 14
<211> 243
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5

<400> 14
atggcgaccc cgacccagac cccacaaaag gctcctgagg aacctgacct attttactat
60

gactacaaca cgggtgcagac tgtgggcatg actctggcaa ccatcttggt cctgctgggt
120

atcctcatcg tcatcagcaa gaaggtgaag tgcaggaagg cggactccag gtctgagagc
180

ccaacctgca aatcctgtaa gtctgagctt ccctcttcag cccctggtgg cggcggcgtg
240

taa
243

10

REIVINDICACIONES

1. Una proteína FXYD seleccionada del grupo que consiste en FXYD1 (SEQ ID NO: 1), FXYD3 (SEQ ID NO: 3), FXYD4 (SEQ ID NO: 4) y FXYD7 (SEQ ID NO: 7) o un fragmento o variante de la misma para su uso en el tratamiento del infarto de miocardio, en la que el fragmento o variante tiene la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K, en la que el fragmento o variante comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXYD1, y en la que la variante presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 7, respectivamente, a lo largo de la longitud de la variante.
2. Una proteína FXYD de pérdida de función para su uso en el tratamiento del cáncer que está **caracterizada por** la sobreexpresión de FXYD3, en la que la proteína FXYD de pérdida de función es un fragmento o variante de FXYD3 (SEQ ID NO: 3) que conserva la capacidad de asociarse con la bomba de Na/K pero no tiene la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K o tiene una capacidad que se reduce en comparación con la proteína FXYD3 de tipo salvaje, en la que dicho fragmento o variante de FXYD3 no comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXYD1, y en la que la variante presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 a lo largo de la longitud de la variante.
3. La proteína FXYD de pérdida de función para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha proteína FXYD de pérdida de función se administra en un tratamiento combinado con una o ambas de radioterapia o quimioterapia.
4. La proteína FXYD de pérdida de función para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el cáncer se selecciona del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de páncreas y cáncer de intestino.
5. Una composición farmacéutica que comprende una proteína FXYD de pérdida de función junto con al menos un adyuvante, excipiente o tampón farmacéuticamente aceptable, en la que la proteína FXYD de pérdida de función es una variante de FXYD3 (SEQ ID NO: 3) que conserva la capacidad de asociarse con la bomba de Na/K pero no tiene la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K o tiene una capacidad que se reduce en comparación con la proteína FXYD3 de tipo salvaje, en la que dicha variante de FXYD3 no comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXYD1, y en la que la variante presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 a lo largo de la longitud de la variante.
6. Una proteína FXYD de pérdida de función aislada que es una variante de FXYD3 (SEQ ID NO: 3) y conserva la capacidad de asociarse con la bomba de Na/K pero no tiene la capacidad de promover la desglutacionilación de la bomba de Na/K o tiene una capacidad que se reduce en comparación con la proteína FXYD3 de tipo salvaje y que no comprende una cisteína reactiva correspondiente a Cys62 de FXYD1, en la que la variante presenta al menos un 80 % de identidad de secuencia con la SEQ ID NO: 3 a lo largo de la longitud de la variante.

Figura 1

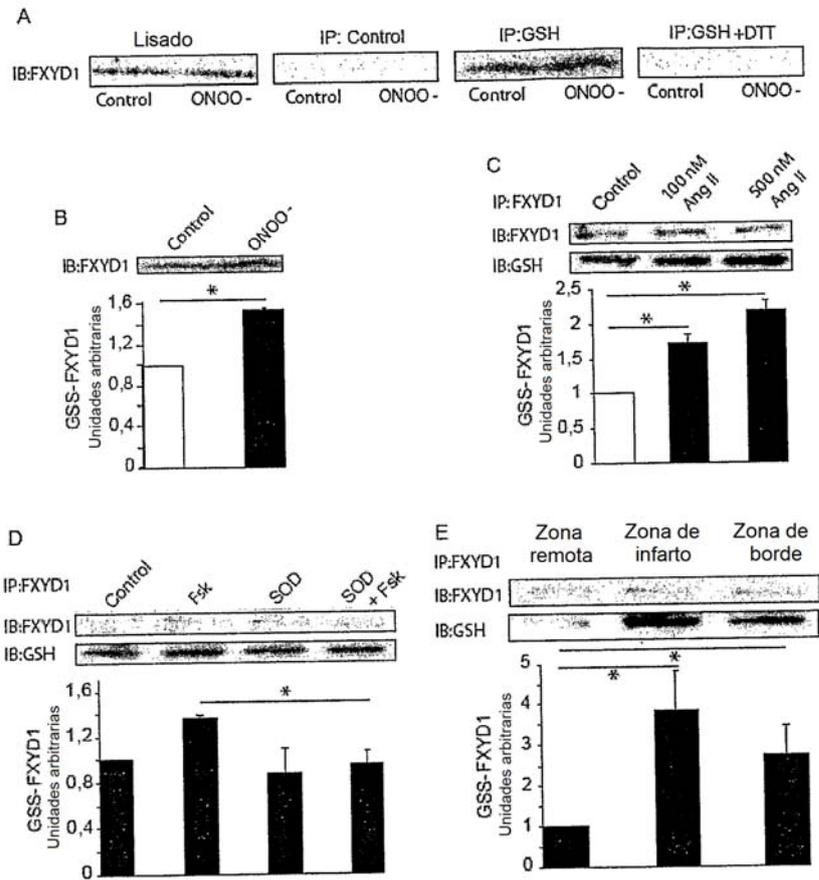


Figura 2

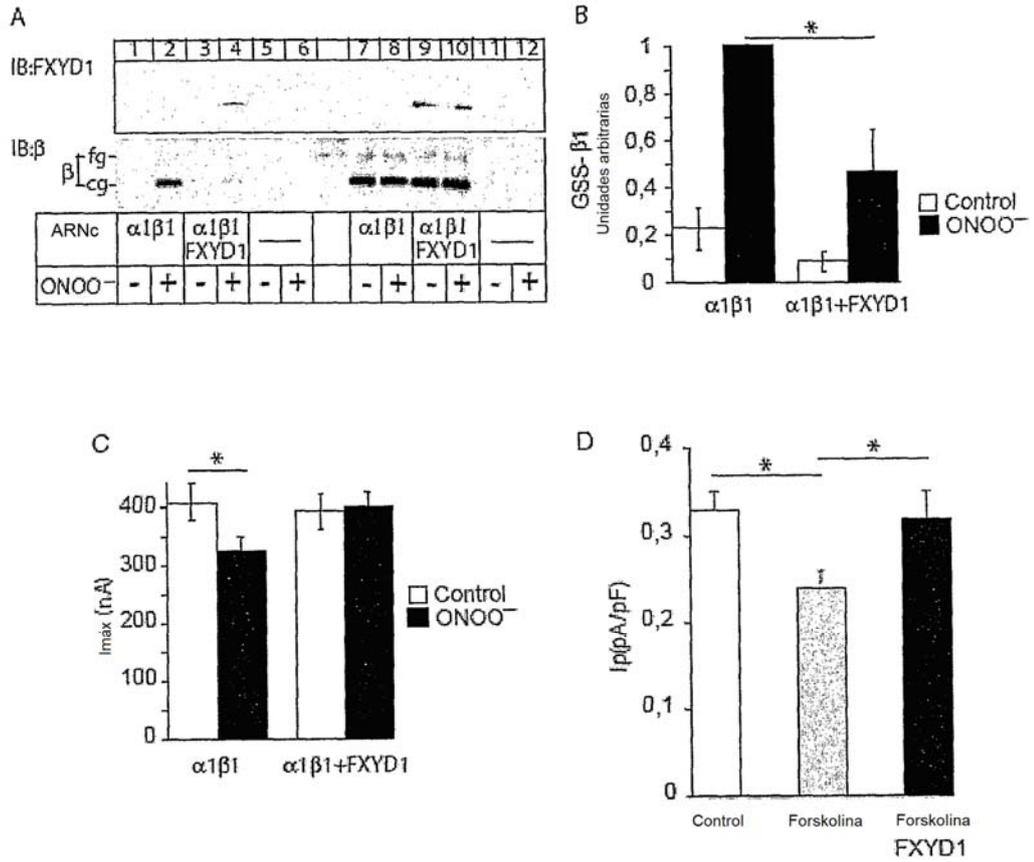


Figura 3

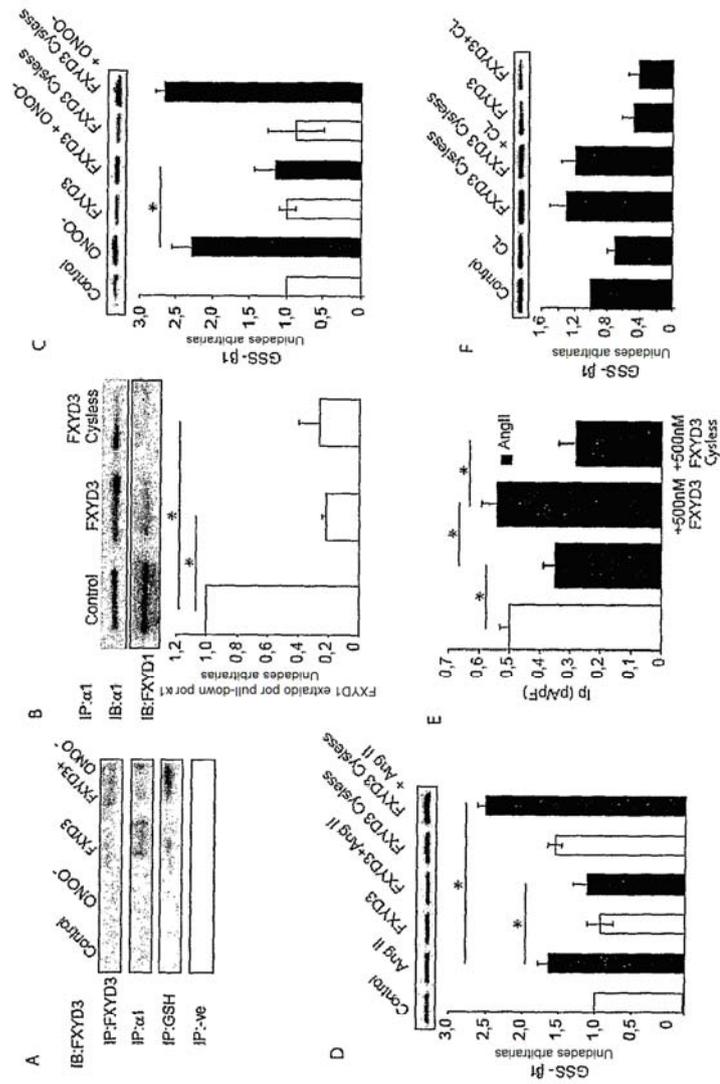


Figura 4

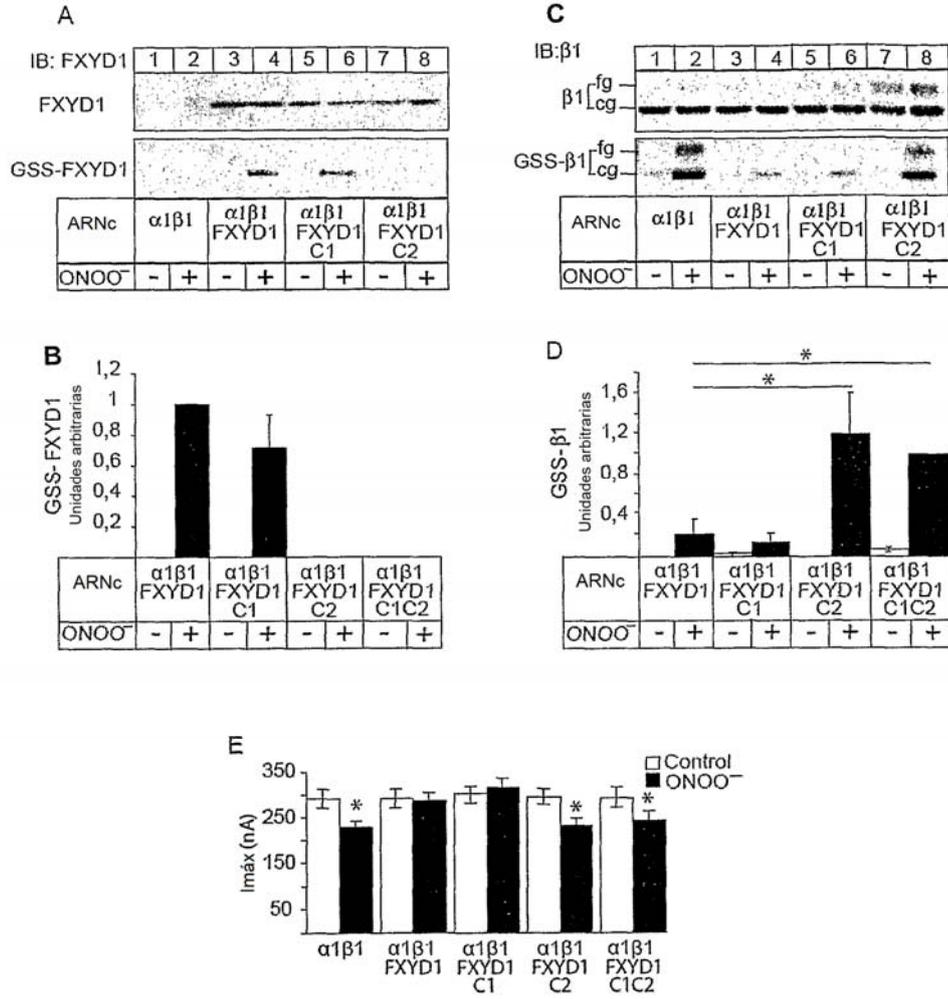


Figura 5

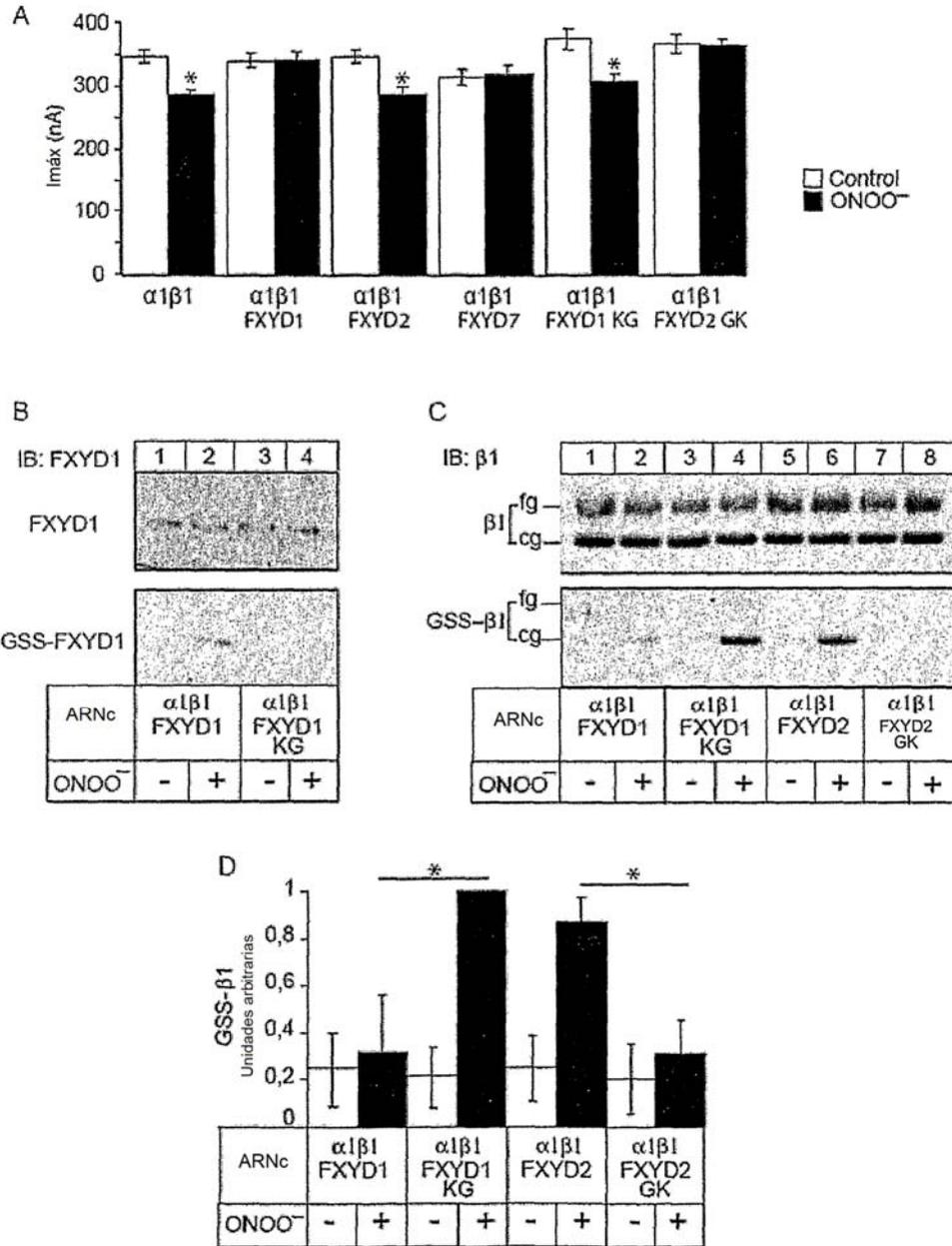


Figura 6

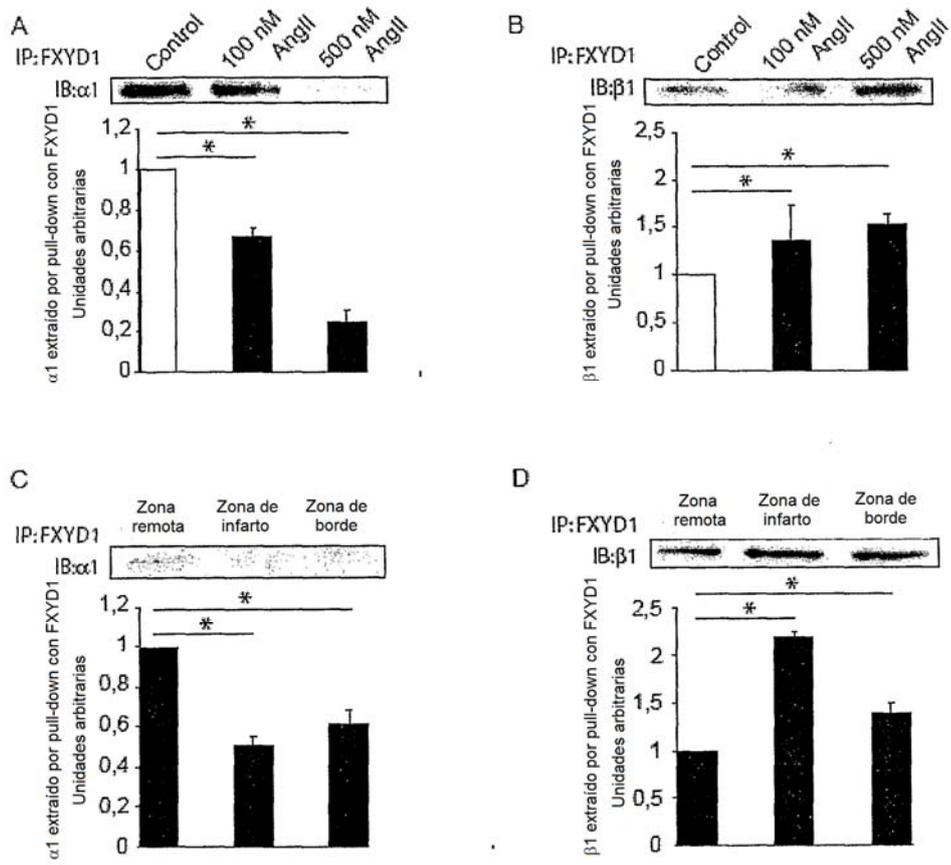


Figura 7

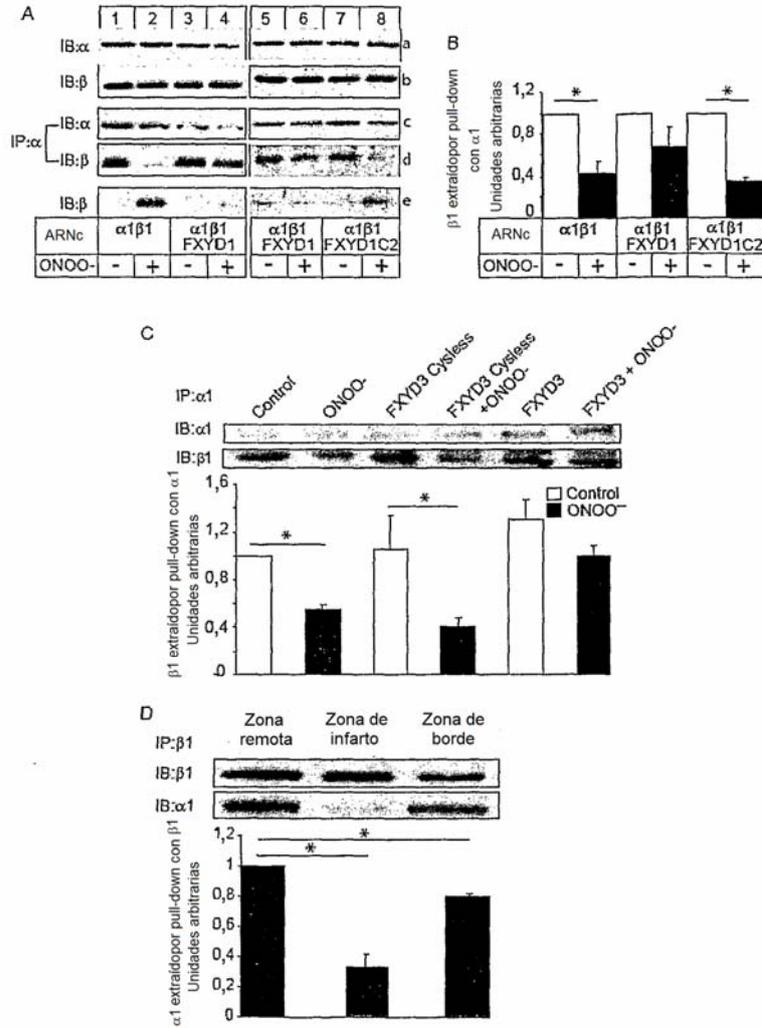
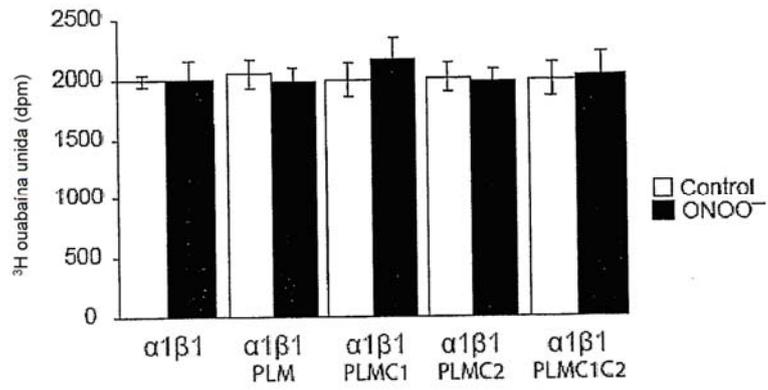


Figura 8

A



B

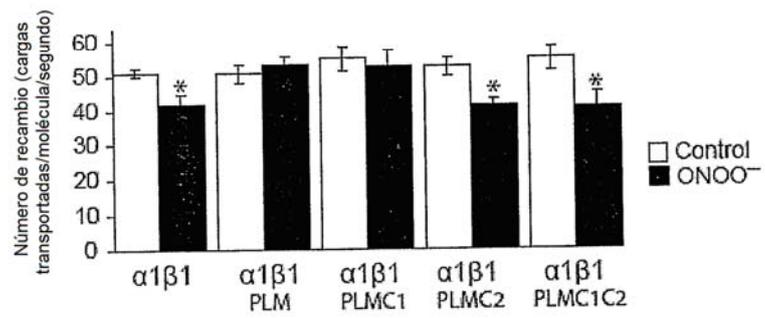


Figura 9

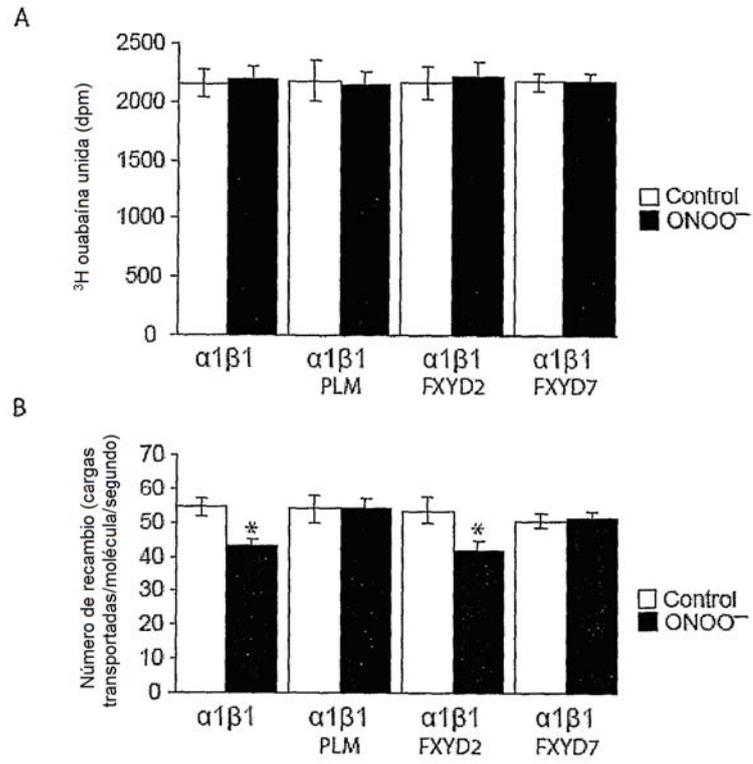


Figura 10

FXD1	(SEQ ID No 1)	51	GILIVLSRRRC	KFNQ-QQRTGEPDEE-----EGTFRSSIRRLSTRRR	92
FXD2	(SEQ ID No 2)	41	GLLILLSRRRC	CGNK-KRRQINEDEP-----	66
FXD3	(SEQ ID No 3)	52	GIIIVMSAKC	KFGQ-KSGHHPGETP-----PLITPGSAQS-----	87
FXD4	(SEQ ID No 4)	52	GIAAVLSGKCK	KSQKQHSVPPEKAI-----PLITPGSATC-----	89
FXD5	(SEQ ID No 5)	157	GIIILTSGKCR	-----QLSRLCRNRCR-----	178
FXD6	(SEQ ID No 6)	52	GILLILSRRRC	GFNQ--KPRAPGDEE-AQVENLITANATEPQKAEN--	95
FXD7	(SEQ ID No 7)	40	GILIVISKVKCR	KAD-SRSEPTCKS-CKSEPPSAPGGGV-----	79