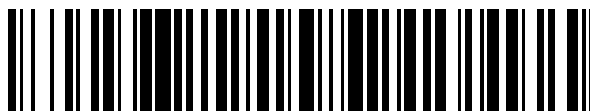


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 863**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/US2014/026237**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014** **WO14151683**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14769812 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2970442**

54 Título: **Dominios de Gla como agentes terapéuticos**

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361787753 P

15.03.2013 US 201361791537 P

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

29.10.2019

73 Titular/es:

GLADIATOR BIOSCIENCES, INC. (100.0%)

305 East Strawberry Drive

Mill Valley CA 94941, US

72 Inventor/es:

BAUZON, MAXINE y

HERMISTON, TERRY

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 728 863 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

Dominios de Gla como agentes terapéuticos

Antecedentes

Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los EE. UU. No. de serie 61/791.537 presentada el 15 de marzo de 2013 y la Solicitud Provisional de los EE. UU. No. de serie 61/787.753, presentada el 15 de marzo de 2013, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria por referencia.

1. Campo

Esta descripción se refiere a la toma como diana de fosfatidilserina (PtdS) en las membranas celulares usando péptidos y polipéptidos del dominio Gla. Se describe el uso de estos péptidos y polipéptidos como agentes terapéuticos.

2. Técnica relacionada

La fosfatidilserina (PtdS) es un componente de fosfolípido con carga negativa que suele localizarse en el lado interno (el lado citoplasmático) de la membrana celular. Sin embargo, la PtdS pueden ser transportadas por escramblasa (un miembro de la familia de flipasas) desde el lado interno al lado externo exponiéndose en la superficie de la célula. Con muy pocas excepciones, esta externalización activa de PtdS es una respuesta al daño celular (van den Eijnde et al., 2001; Erwig y Henson, 2008). Por ejemplo, estos daños tisulares incitan la señalización a plaquetas, leucocitos y células endoteliales para que se redistribuyan rápida y reversiblemente la PtdS, lo que da lugar a la promoción de la coagulación y la activación del complemento en las superficies celulares. De manera similar, las señales apoptóticas dan como resultado la externalización de PtdS, sin embargo, de una manera más gradual y sostenida. Esta PtdS externa proporciona un marcador de reconocimiento clave que permite a los macrófagos ingerir células moribundas del tejido circundante al tiempo que suprime una respuesta inmunitaria completa y perjudicial (Erwig y Henson, 2008). Este proceso de eliminación es esencial para la homeostasis tisular y en un entorno "saludable" es extremadamente eficiente. De hecho, a pesar de la pérdida de >109 células por día, la detección histológica de células apoptóticas es un evento raro en tejidos normales (Elliot y Ravichandran, 2010; Elliot et al., 2009). Sin embargo, existe evidencia de que en muchas afecciones patológicas el proceso de eliminación de células apoptóticas se ve sobrepasado, demorado o está ausente (Elliot y Ravichandran, 2010; Lahorte et al., 2004). Por ejemplo, varios estudios oncológicos sugieren que un índice apoptótico alto se asocia con tumores de mayor grado, mayor tasa de metástasis y un pronóstico desfavorable para el paciente (Naresh et al., 2001; Loose et al., 2007; Kurihara et al., 2008; Kietselaer et al., 2002). Estos estudios, y otros similares, sugieren que la apoptosis y la expresión externa de PtdS pueden ser un poderoso marcador de enfermedad (Elliot y Ravichandran, 2010).

Existen varias proteínas con una alta afinidad por las superficies de los fosfolípidos aniónicos, siendo la Anexina-V la más utilizada como sonda de detección de PtdS (Lahorte et al., 2004). Con una alta afinidad por vesículas que contienen PtdS ($K_d = 0,5-7$ nM) y un peso molecular (37 kDa) que se encuentra por debajo del umbral para la filtración renal (aproximadamente 60 kDa), se ha mostrado que la Anexina-V es prometedora en la clínica como una sonda de apoptosis (Lin et al., 2010; Tait y Gibson, 1992). Además, se ha utilizado para una amplia gama de indicaciones que incluyen aquellas en oncología, neurología y cardiología (Lahorte et al., 2004; Boersma et al., 2005; Blankenberg, 2009; Reutelingsperger et al., 2002). El uso de sondas biológicas que tienen como diana la expresión en la superficie celular de PtdS se ha demostrado tanto in vitro como in vivo. Si bien su utilidad en la clínica es prometedora, en su mayor parte aún no han sido explotadas. Kristof Schutters et al discuten la toma como diana de fosfatidilserina para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas (Apoptosis; An International Journal on Programmed Cell Death, vol. 12, no. 9, 4 de mayo de 2010, páginas 1072-1082. Mingdong Huang et al discuten las bases estructurales de la unión a la membrana por los dominios Gla de las proteínas dependientes de la vitamina K, Nature Structural Biology, vol. 10, no.9, 1 de septiembre de 2003, páginas 751-756.

El documento US2003/220490 describe ciertos péptidos que tienen afinidad específica para ciertos fosfolípidos.

Resumen

Por lo tanto, según la presente descripción, se proporciona un método para tomar como diana la fosfatidilserina (PtdS) de la membrana celular que comprende (a) proporcionar un polipéptido aislado de 4,5 a 30 kD de tamaño que comprende un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), un dominio de proteína S EGF y que carece de un dominio de proteasa o de unión a hormona; y (b) poner en contacto el péptido con una superficie celular in vitro o ex vivo, en donde el polipéptido se une a PtdS en la membrana celular.

La membrana celular puede ser una membrana de células cardíacas, una membrana de células neuronales, una membrana de células endoteliales, una membrana de células infectadas por virus, una membrana de células apoptóticas, una membrana de plaquetas, un versículo derivado de la membrana plasmática (PMV) o una membrana de células cancerosas. El polipéptido puede comprender además un dominio de unión a EGF, un dominio de Kringle y/o un dominio de apilamiento de aminoácidos aromáticos. El dominio Gla puede ser del Factor II, Factor VII, Factor IX, Factor X, proteína S o proteína C. El polipéptido puede comprender además una etiqueta detectable, tal como una

etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, una etiqueta radioactiva, una enzima, un colorante o un ligando.

5 El polipéptido puede tener 300 residuos o menos, 200 residuos o menos, o 100 residuos o menos, incluyendo los rangos de 100-200 y 100-300 residuos. El polipéptido comprende 5-15 residuos de Gla, tal como 9-13 residuos de Gla, incluyendo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 residuos de Gla. El polipéptido puede comprender más de 13 residuos de Gla, pero menos del 30% de residuos de Gla en total.

10 El polipéptido puede comprender al menos un enlace disulfuro, o 2-5 enlaces disulfuro. El polipéptido puede comprender un dominio Gla de la proteína S. El polipéptido puede comprender un dominio Gla de la proteína S, un dominio EGF de la proteína S, un dominio Gla de la de protrombina, un dominio Gla de la protrombina más un dominio Kringle de la protrombina, un dominio Gla de la proteína Z, un dominio Gla de la proteína Z más un dominio Kringle de la protrombina, un dominio Gla del Factor VII, o un dominio Gla del Factor VII más dominio Kringle de la protrombina.

El polipéptido puede comprender además una región Fc de anticuerpo. Cualquiera de los anteriores puede contener sustituciones conservativas de las secuencias nativas para las proteínas anteriores y/o exhibir un porcentaje de homología con los dominios nativos expuestos.

15 Otros objetos, características y ventajas de la presente descripción se harán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Sin embargo, debe entenderse que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican realizaciones específicas de la descripción, se proporcionan solo a modo de ilustración.

Breve descripción de las figuras

20 Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente descripción. La descripción puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con el detalle.

FIG. 1 Construcción de un panel de proteínas con dominio Gla y Gla-EGF/Kringle.

FIG. 2 Ensayo de construcciones de proteína con dominio Gla para la expresión. Transfección transitoria en células 293 usando 293cellFectin. Geles al 10% con muestras reducidas, 23,3 µl de medio cargados.

25 FIG. 3 Ensayo de construcciones de proteína con dominio Gla para la expresión. Transfección transitoria en células BHK21. Geles al 10% con muestras reducidas, 20 µl (1/100 de sedimento celular total) cargados.

FIG. 4 El cambio de la secuencia señal altera la secreción. Transfección transitoria en células BHK21. Geles al 10% con muestras reducidas, 13,3 µl cargados.

FIG. 5 Secuencia de la proteína S con Gla + EGF.

30 FIG. 6 Purificación de la proteína S con Gla + EGF. F1-F4 son fracciones de cromatografía en columna. Geles al 10%, condiciones no reductoras.

FIG. 7 Ensayos de apoptosis para la proteína S con Gla + EGF. Los paneles superior e inferior representan procedimientos duplicados idénticos, excepto que se redujeron las cantidades de Proteína S con Gla + EGF y se redujo la cantidad de anticuerpo anti-dominio His.

35 FIG. 8 Ensayos de apoptosis para la proteína S con Gla + EGF. Los paneles superior e inferior representan procedimientos duplicados idénticos, excepto las cantidades de Anexina V usadas, que son el doble en los paneles inferiores.

Descripción detallada

40 Al igual que la anexina, las proteínas con dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla), tales como los Factores II, VII, IX, X, proteína C y proteína S se unen a las membranas aniónicas. De hecho, el dominio Gla se ha usado como un modelo para una molécula pequeña que fue diseñada racionalmente para ser una sonda específica para apoptosis (Cohen et al., 2009). Aquí, los inventores proponen la utilización de las porciones dirigidas a la membrana de estas proteínas con dominio Gla como una nueva clase de sondas biológicas específicas para la apoptosis y la enfermedad.

45 El uso de estas proteínas de origen natural y dirigidas puede dar lugar a una mayor especificidad en relación con las sondas actuales con la ventaja adicional de un tamaño más pequeño (<30 kDa). Incluso en realizaciones mayores, que incluirían los dominios EGF y/o Kringle, estas proteínas pueden ser aún más pequeñas que la Anexina V (37 kDa) y potencialmente tan pequeñas como <5 kDa. Estas sondas biológicas pueden dirigirse a la expresión en la superficie celular de PtdS tanto in vitro como in vivo. Por lo tanto, es posible desarrollar una sonda de direccionamiento de apoptosis/enfermedad que sea superior a la Anexina V en su afinidad, especificidad y tamaño, con el potencial añadido

50 para su uso como un agente terapéutico. Esto se describe con mayor detalle a continuación.

Cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación esté en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento,

la definición establecida a continuación siempre prevalecerá para los fines de interpretar esta memoria descriptiva y sus reivindicaciones asociadas, a no ser que se pretenda claramente un significado contrario (por ejemplo, en el documento donde originalmente se usa el término). El uso de "o" significa "y/o" a no ser que se indique otra cosa. El uso de "un" en la presente memoria significa "uno o más" a no ser que se indique otra cosa o cuando el uso de "uno o más" sea claramente inapropiado. El uso de "comprenden", "comprende", "que comprende", "incluyen", "incluye" y "que incluye" son intercambiables y no son limitantes. Por ejemplo, el término "que incluye" significará "que incluye, pero no limitado a". La palabra "aproximadamente" significa más o menos el 5% del número indicado.

Un "péptido o polipéptido aislado", tal y como se usa en la presente memoria, pretende referirse a un péptido o polipéptido que carece sustancialmente de otras moléculas biológicas, incluyendo péptidos o polipéptidos que tienen secuencias distintas. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido aislado es al menos aproximadamente el 75%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, aproximadamente el 95%, aproximadamente el 97%, aproximadamente el 99%, aproximadamente el 99,9% o aproximadamente el 100% puro en peso seco. En algunas realizaciones, la pureza puede medirse mediante un método tal como cromatografía en columna, electroforesis en gel de poli(acrilamida) o análisis por HPLC.

Tal y como se usa en la presente memoria, "sustituciones conservativas" se refiere a modificaciones de un polipéptido que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por aminoácidos que tienen propiedades bioquímicas similares que no dan como resultado la pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "sustitución conservativa de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se reemplaza por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales con ramificación β (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los anticuerpos de la presente descripción pueden tener una o más sustituciones de aminoácidos conservativas, pero retener la actividad de unión al antígeno.

Para ácidos nucleicos y polipéptidos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando están alineados y comparados de manera óptima, son idénticos, con inserciones o deleciones de nucleótidos o aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80 % de los nucleótidos o aminoácidos, generalmente al menos aproximadamente el 85%, en algunas realizaciones aproximadamente el 90%, el 91%, el 92%, el 93%, el 94% o el 95%, en al menos una realización al menos aproximadamente el 96%, el 97%, el 98%, el 99%, el 99,1%, el 99,2%, el 99,3%, el 99,4%, o el 99,5% de los nucleótidos o aminoácidos. Alternativamente, existe una homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos hibridarán en condiciones de hibridación selectivas al complemento de la cadena. También se incluyen secuencias de ácido nucleico y secuencias polipeptídicas que tienen una homología sustancial con las secuencias de ácido nucleico específicas y las secuencias de aminoácidos específicas enumeradas en la presente memoria.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = no. de posiciones idénticas/no. total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos y la longitud de cada hueco, que deben introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de las secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias se puede lograr usando un algoritmo matemático, tal como, sin limitación, el módulo AlignX™ de VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para AlignX™, los parámetros predeterminados de alineación múltiple son: penalización por apertura de hueco: 10; penalización por extensión de hueco: 0,05; rango de penalización por separación de huecos: 8; % de identidad por retraso de alineación: 40. (Más detalles en la red de redes en <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/VectorNTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html>).

Otro método para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente descripción) y una secuencia objeto, también referida como alineación de secuencia global, se puede determinar usando el programa informático CLUSTALW (Thompson et al., Nucleic Acids Res, 1994, 2 (22): 4673-4680), que se basa en el algoritmo de Higgins et al., Computer Applications in the Biosciences (CABIOS), 1992, 8 (2): 189-191). En una alineación de secuencia, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. El resultado de la alineación de secuencia global es en porcentaje de identidad. Los parámetros que se pueden usar en una alineación CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad a través de alineaciones en pares son: Matriz = IUB, tupla k = 1, Número de diagonales superiores = 5, Penalización por hueco = 3, Penalización por apertura de hueco = 10, Penalización por extensión de hueco = 0,1. Para alineaciones múltiples, se pueden usar los siguientes parámetros de CLUSTALW: Penalización por apertura de hueco = 10, Parámetro de extensión de hueco = 0,05; Rango de penalización por separación de hueco = 8; % de identidad para el retardo de alineación = 40.

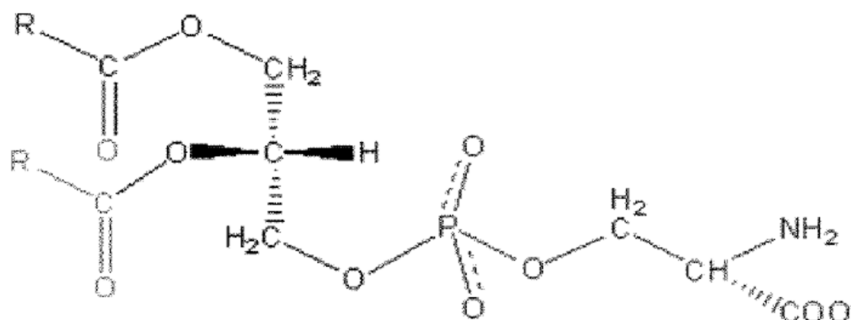
Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células enteras, en un lisado celular o en una forma parcialmente purificada o sustancialmente pura. Un ácido nucleico se "aisla" o "se vuelve sustancialmente puro" cuando se purifica de otros componentes celulares con los que normalmente está asociado en el ambiente natural. Para aislar un ácido nucleico, se pueden usar técnicas estándar como las siguientes: tratamiento alcalino/SDS, bandeado de CsCl,

cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en la técnica.

I. Fosfatidilserina (PtdS)

A. Estructura y síntesis

- 5 La fosfatidilserina (abreviada PtdS, Ptd-L-Ser o PS) es un componente fosfolípido, que generalmente se mantiene en el lado interno (el lado citosólico) de las membranas celulares por una enzima denominada flipasa. Cuando una célula experimenta apoptosis, la fosfatidilserina ya no está restringida a la parte citosólica de la membrana, sino que se expone en la superficie de la célula. La fórmula química de PtdS es $C_{13}H_{24}NO_{10}P$ y tiene una masa molecular de 385,304. La estructura se muestra a continuación:



- 10 La fosfatidilserina se biosintetiza en bacterias por condensación del aminoácido serina con ácido fosfatídico activado con CDP (difosfato de citidina). En los mamíferos, la fosfatidilserina se produce por reacciones de intercambio de bases con fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina. A la inversa, la fosfatidilserina también puede dar lugar a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, aunque en animales la vía para generar fosfatidilcolina a partir de fosfatidilserina solo funciona en el hígado.

15 B. Función

- Los primeros estudios de fosfatidilserina destilaron la forma química del cerebro bovino. Los estudios modernos y los productos disponibles comercialmente están hechos de soja, debido a las preocupaciones sobre la enfermedad de las vacas locas. Los ácidos grasos unidos a la serina en el producto de soja no son idénticos a los del producto bovino y también son impuros. Los estudios preliminares en ratas indican que el producto de soja es al menos tan potente como el de origen bovino.

- La FDA de los EE. UU. ha otorgado a la fosfatidilserina el estado de "declaración de salud cualificada", al afirmar que "el consumo de fosfatidilserina puede reducir el riesgo de demencia en los ancianos" y "el consumo de fosfatidilserina puede reducir el riesgo de disfunción cognitiva en los ancianos".

- 25 Se ha demostrado que la fosfatidilserina acelera la recuperación, previene el dolor muscular, mejora el bienestar y puede tener propiedades ergogénicas en atletas involucrados en el ciclismo, el entrenamiento con pesas y la carrera de resistencia. Se ha informado que la PtdS de soja, de una manera dependiente de la dosis (400 mg), es un suplemento efectivo para combatir el estrés inducido por el ejercicio mediante la mitigación del aumento inducido por el ejercicio en los niveles de cortisol. La suplementación con PtdS promueve un equilibrio hormonal deseable para los atletas y podría atenuar el deterioro fisiológico que acompaña al sobre entrenamiento y/o el estiramiento excesivo. En estudios recientes, se ha mostrado que la PtdS mejora el estado de ánimo en una cohorte de gente joven durante el estrés mental y mejora la precisión durante el primer golpe al aumentar la resistencia al estrés de los golfistas. Los primeros estudios piloto indican que la suplementación con PtdS podría ser beneficiosa para los niños con trastorno de déficit de atención con hiperactividad.

- 35 Tradicionalmente, los suplementos de PtdS derivaban de la corteza bovina (BCPS); sin embargo, debido a la transferencia potencial de enfermedades infecciosas, la PS derivada de soja (S-PS) se ha establecido como una alternativa segura potencial. La PS derivada de soja se reconoce generalmente como segura (GRAS) y es un suplemento nutricional seguro para las personas mayores si se toma hasta una dosificación de 200 mg tres veces al día. Se ha mostrado que la fosfatidilserina reduce la respuesta inmune específica en ratones.

- 40 La PtdS se puede encontrar en la carne, pero es más abundante en el cerebro y en las entrañas como el hígado y el riñón. Solo se pueden encontrar pequeñas cantidades de PS en productos lácteos o en vegetales, con la excepción de las judías blancas.

La anexina-A5 es una proteína natural con una afinidad de unión ávida por PtdS. La anexina-A5 marcada permite la visualización de células en el estado apoptótico temprano a medio in vitro o in vivo. Otra proteína de unión a PtdS es

Mfge8. La anexina-A5 marcada con tecnecio permite distinguir entre tumores malignos y benignos cuya patología incluye una alta tasa de división celular y apoptosis en tumores malignos en comparación con una baja tasa de apoptosis en tumores benignos.

II. Proteínas con dominio Gla

5 A. Dominios Gla

La estructura general de las proteínas con dominio Gla es la de un dominio Gla seguido por los dominios EGF y luego un dominio C terminal serina proteasa. Las excepciones son la protrombina, que contiene dominios Kringle en lugar de los dominios EGF, y la proteína S, que no tiene un dominio de serina proteasa, sino dominios de tipo globulina de unión a hormonas sexuales (SHBG) (Hansson y Stenflo, 2005). Las afinidades de las proteínas con dominio Gla a las membranas aniónicas varían. Básicamente, se encuentran en 3 categorías 1) aglutinantes de afinidad alta con una Kd de 30-50 nM, 2) aglutinantes de afinidad media con una Kd de 100-200 nM y 3) aglutinantes de afinidad baja con una Kd de 1.000-2.000 nM. Se ha mostrado que las proteínas con dominio Gla de afinidad alta se unen a las membranas aniónicas con la Proteína S demostrando específicamente la unión a las células apoptóticas a través de su interacción con PtdS (Webb et al., 2002). Las proteínas con dominio Gla de afinidad baja usan un receptor secundario para unirse a la membrana celular. Por ejemplo, FVII utiliza el Factor Tisular (TF). Se cree que el dominio Gla/1er dominio EGF constituye el dominio de unión a TF de alta afinidad de FVII. Es importante para este enfoque que hay muchos estudios que han mostrado una regulación al alza del TF en la superficie de las células cancerosas, incluyendo el cáncer colorrectal, el carcinoma NSCL y el cáncer de mama, y estos niveles altos de TF se han asociado con un pronóstico desfavorable (Yu et al., 2004). Aunque la afinidad por las membranas aniónicas es relativamente baja para el FVII, la adición de la interacción de alta afinidad del TF junto con la regulación al alza documentada del TF en el cáncer hace que sea una sonda específica para el cáncer potencialmente interesante.

B. Proteínas que contienen el dominio Gla

1. Factor II

La protrombina, también conocida como factor de coagulación II, se escinde proteolíticamente para formar trombina en la cascada de la coagulación, lo que en última instancia da lugar a la detención de la pérdida de sangre. La trombina, a su vez, actúa como una serina proteasa que convierte el fibrinógeno soluble en cadenas insolubles de fibrina, además de catalizar muchas otras reacciones relacionadas con la coagulación. Se expresa principalmente en el hígado.

El gen que codifica la protrombina se encuentra en el cromosoma 11 en la región del centrómero. Está compuesto por 14 exones y contiene 24 kilobases de ADN. El gen codifica una región señal, una región propeptídica, un dominio de ácido glutámico, 2 regiones de Kringle y un dominio catalítico. La enzima gamma-glutamyl carboxilasa, en presencia de vitamina K, convierte los residuos de ácido glutámico N-terminales en residuos de ácido gamma-carboxiglutámico. Estos residuos de ácido gamma-carboxiglutámico son necesarios para la unión de la protrombina a los fosfolípidos en las membranas plaquetarias.

La deficiencia hereditaria del factor II es un trastorno autosómico recesivo que se puede manifestar como hipoprotrombinemia, una disminución de la síntesis general de protrombina o como disprotrombinemia, la síntesis de protrombina disfuncional. Los individuos homocigotos son generalmente asintomáticos y tienen niveles de protrombina funcional del 2-25%. Sin embargo, los individuos sintomáticos pueden experimentar fácilmente hematomas, epistaxis, hemorragia de tejidos blandos, sangrado postoperatorio excesivo y/o menorragia.

La protrombina desempeña un papel en la urticaria crónica, una enfermedad autoinmune y varios trastornos vasculares. La vasculopatía de Livedo está asociada con el anticuerpo de inmunoglobulina (Ig)M frente al complejo fosfatidilserina-protrombina. La presencia de anticuerpos frente al complejo fosfatidilserina-protrombina y vasculitis necrotizante histopatológica en la dermis superior a media indica angitis leucocitoclástica cutánea en lugar de poliarteritis nodosa cutánea.

Aparte de las deficiencias de protrombina, otro trastorno de la protrombina es la mutación 20210a en la protrombina. Una causa familiar de tromboembolismo venoso, la mutación 20210a en la protrombina, da lugar a un aumento de los niveles de protrombina en plasma y un riesgo incrementado simultáneo para el desarrollo de trombosis. Aunque el mecanismo exacto de este trastorno no se ha dilucidado, la mutación 20210a en la protrombina implica la sustitución de una adenina por una guanina en la posición 20210 dentro de la región 3' no traducida del gen de protrombina. Esta mutación altera el sitio de poliadenilación del gen y da lugar a un aumento de la síntesis de ARNm, con un aumento posterior en la expresión de proteínas.

2. Factor VII

El factor VII (anteriormente conocido como proconvertina) es una de las proteínas que hace que la sangre se coagule en la cascada de la coagulación. El gen del factor VII se encuentra en el cromosoma 13 (13q34). Es una enzima de la clase de serina proteasa, y la forma recombinante del factor VIIa humano (NovoSeven) tiene la aprobación de la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. para la hemorragia incontrolada en pacientes con

hemofilia. A veces se usa sin licencia en hemorragias graves e incontrolables, aunque ha habido problemas de seguridad. AryoGen Biopharma fabrica una forma biosimilar de factor VII activado recombinante (AryoSeven).

La función principal del factor VII (FVII) es iniciar el proceso de la coagulación junto con el factor tisular (TF/factor III). El factor tisular se encuentra en el exterior de los vasos sanguíneos, normalmente no está expuesto a la corriente sanguínea. En el caso de daños en los vasos, el factor tisular se expone a la sangre y al factor circulante VII. Una vez unido al TF, el FVII se activa al FVIIa por diferentes proteasas, entre las que se encuentran la trombina (factor IIa), el factor Xa, IXa, XIIa y el propio complejo FVIIa-TF. Los sustratos más importantes para FVIIa-TF son Factor X y Factor IX. Se ha mostrado que el factor VII interacciona con el factor tisular (TF).

La acción del factor se ve impedida por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI), que se libera casi inmediatamente después del inicio de la coagulación. El factor VII es dependiente de la vitamina K; se produce en el hígado. El uso de warfarina o anticoagulantes similares disminuye la síntesis hepática de FVII.

La deficiencia es rara (deficiencia de proconvertina congénita) y se hereda de forma recesiva. La deficiencia del factor VII se presenta como un trastorno hemorrágico similar a la hemofilia. Se trata con factor VIIa recombinante (NovoSeven o AryoSeven). El factor VIIa recombinante también se usa para las personas con hemofilia (con deficiencia de Factor VIII o IX) que han desarrollado inhibidores frente al factor de coagulación de reemplazo. También se ha usado en el contexto de hemorragia incontrolable, pero su papel en este contexto es controvertido y no hay pruebas suficientes para apoyar su uso fuera de los ensayos clínicos. El primer informe de su uso en hemorragia fue en un soldado israelí con hemorragia incontrolable en 1999. Los riesgos de su uso incluyen un aumento de la trombosis arterial.

3. Factor IX

El factor IX (o factor Christmas) es una de las serina proteasas del sistema de la coagulación; pertenece a la familia peptidasa S1. El gen del factor IX se encuentra en el cromosoma X (Xq27.1-q27.2) y, por lo tanto, es recesivo ligado a X: las mutaciones en este gen afectan a los varones con mucha más frecuencia que a las mujeres. La deficiencia de esta proteína causa hemofilia B. El factor IX se produce como un zimógeno, un precursor inactivo. Se procesa para eliminar el péptido señal, se glicosila y luego se escinde por el factor XIa (de la vía de contacto) o el factor VIIa (de la vía del factor tisular) para producir una forma de dos cadenas donde las cadenas están unidas por un puente disulfuro. Cuando se activa en factor IXa, en presencia de Ca^{2+} , fosfolípidos de membrana y un cofactor de Factor VIII, hidroliza un enlace arginina-isoleucina en el factor X para formar el factor Xa. El factor IX se inhibe por la antitrombina.

Los factores VII, IX y X juegan un papel clave en la coagulación de la sangre y también comparten una arquitectura de dominios común. La proteína del factor IX se compone de cuatro dominios de proteínas. Estos son el dominio Gla, dos copias en tándem del dominio EGF y un dominio peptidasa similar a la tripsina C-terminal que lleva a cabo la escisión catalítica. Se ha mostrado que el dominio EGF N-terminal es responsable, al menos en parte, de la unión del factor tisular. Wilkinson et al. Se concluyen que los residuos 88 a 109 del segundo dominio EGF median la unión a las plaquetas y el ensamblaje del complejo activador del Factor X. Las estructuras de los cuatro dominios han sido resueltas. Se determinó una estructura de los dos dominios EGF y del dominio de tipo tripsina para la proteína de cerdo. La estructura del dominio Gla, que es responsable de la unión a fosfolípidos dependiente de $\text{Ca}(\text{II})$, también se determinó mediante RMN. Se han resuelto varias estructuras de mutantes "superactivos" que revelan la naturaleza de la activación del Factor IX por otras proteínas en la cascada de la coagulación.

La deficiencia del factor IX causa la enfermedad de Christmas (hemofilia B). Se han descrito más de 100 mutaciones del factor IX; algunas no causan síntomas, pero muchas dan lugar a un trastorno hemorrágico importante. El factor IX recombinante se usa para tratar la enfermedad de Christmas, y está disponible comercialmente como BeneFIX. Algunas mutaciones raras del factor IX dan lugar a una actividad de coagulación elevada y pueden dar lugar a enfermedades de la coagulación, tales como la trombosis venosa profunda.

4. Factor X

El factor X (factor de Stuart-Prower; protrombinasa) es una enzima de la cascada de la coagulación. El gen del factor X humano se encuentra en el decimotercer cromosoma (13q34). Es una serina endopeptidasa (grupo proteasa S1). El factor X se sintetiza en el hígado y requiere vitamina K para su síntesis. El factor X se activa en el factor Xa tanto por el factor IX (con su cofactor, el factor VIII en un complejo conocido como Xasa intrínseca) como por el factor VII con su cofactor, factor tisular (un complejo conocido como Xasa extrínseca). La semivida del factor X es de 40-45 horas. Por lo tanto, es el primer miembro de la vía final común o la vía de la trombina. Actúa escindiendo la protrombina en dos lugares (un enlace arg-thr y luego un enlace arg-ile), lo que proporciona la trombina activa. Este proceso se optimiza cuando el factor Xa forma un complejo con el cofactor V activado en el complejo de protrombinasa. El factor X es parte del plasma fresco congelado y del complejo protrombinasa. El único concentrado disponible comercialmente es "Factor XP Behring" fabricado por CSL Behring.

El factor Xa es inactivado por el inhibidor de la proteasa dependiente de la proteína Z (ZPI), un inhibidor de la serina proteasa (serpina). La afinidad de esta proteína por el factor Xa se incrementa 1.000 veces por la presencia de la proteína Z, mientras que no requiere proteína Z para la inactivación del factor XI. Los defectos en la proteína Z dan lugar a una mayor actividad del factor Xa y a una propensión a la trombosis.

La deficiencia innata del factor X es muy rara (1: 500.000) y puede presentarse con epistaxis (hemorragias nasales), hemartrosis (hemorragia en las articulaciones) y pérdida de sangre gastrointestinal. Además de la deficiencia congénita, pueden ocurrir niveles bajos de factor X ocasionalmente en varios estados de enfermedad. Por ejemplo, la deficiencia del factor X puede verse en la amiloidosis, donde el factor X se adsorbe a las fibrillas amiloides en la vasculatura. Además, la deficiencia de la vitamina K o el antagonismo de la warfarina (o medicamentos similares) dan lugar a la producción de un factor X inactivo. En la terapia con warfarina, esto es deseable para prevenir la trombosis. A finales de 2007, cuatro de cada cinco terapias anti-coagulación emergentes se dirigieron a esta enzima. Los inhibidores directos de Xa son anticoagulantes populares.

Los modelos tradicionales de coagulación desarrollados en la década de 1960 contemplaron dos cascadas separadas, la vía extrínseca (factor tisular (TF)) y la vía intrínseca. Estas vías convergen en un punto común, la formación del complejo Factor Xa/Va, que junto con el calcio y unido a una superficie de fosfolípidos genera trombina (Factor IIa) a partir de la protrombina (Factor II). Un nuevo modelo, el modelo de anticoagulación basado en células, parece explicar más completamente las etapas en la coagulación. Este modelo tiene tres etapas: 1) inicio de la coagulación en células portadoras de TF, 2) amplificación de la señal procoagulante por trombina generada en la célula portadora de TF y 3) propagación de la generación de trombina en la superficie plaquetaria. El factor Xa desempeña un papel clave en las tres etapas.

En la etapa 1, el factor VII se une a la proteína transmembrana TF en la superficie de las células y se convierte en el Factor VIIa. El resultado es un complejo de Factor VIIa/TF que cataliza la activación de Factor X y Factor IX. El Factor Xa formado en la superficie de la célula portadora de TF interacciona con el Factor Va para formar el complejo de protrombinasa que genera pequeñas cantidades de trombina en la superficie de las células portadoras de TF. En la etapa 2, la etapa de amplificación, si se ha generado suficiente trombina, se produce entonces la activación de las plaquetas y cofactores asociados a las plaquetas. En la etapa 3, generación de trombina, el Factor XIa activa el Factor IX libre en la superficie de las plaquetas activadas. El Factor IXa activado con Factor VIIIa forma el complejo "tenasa". Este complejo activa más el Factor X, que a su vez forma nuevos complejos de protrombinasa con el Factor Va. El Factor Xa es el componente principal del complejo de protrombinasa que convierte grandes cantidades de protrombina, el "estallido de la trombina". Cada molécula de Factor Xa puede generar 1.000 moléculas de trombina. Este gran estallido de trombina es responsable de la polimerización de la fibrina para formar un trombo.

La inhibición de la síntesis o actividad del Factor X es el mecanismo de acción para muchos anticoagulantes usados hoy en día. La warfarina, un derivado sintético de la cumarina, es el anticoagulante oral más ampliamente usado en los EE.UU. En algunos países europeos, se usan otros derivados de la cumarina (fenprocoumón y acenocumarol). Estos agentes son antagonistas de la vitamina K (VKA). La vitamina K es esencial para la síntesis hepática de los Factores II (protrombina), VII, IX y X. La heparina (heparina no fraccionada) y sus derivados, la heparina de bajo peso molecular (HBPM) se unen a un cofactor de plasma, antitrombina (AT) para inactivar varios factores de la coagulación IIa, Xa, XIa y XIIa.

Recientemente, se ha desarrollado una nueva serie de inhibidores específicos de acción directa del Factor Xa. Estos incluyen los medicamentos rivaroxabán, apixabán, betrixabán, LY517717, darexabán (YM150), edoxabán y 813893. Estos agentes tienen varias ventajas teóricas sobre la terapia actual. Se pueden administrar por vía oral. Tienen un inicio rápido de acción. Y pueden ser más efectivos frente al Factor Xa ya que inhiben tanto el Factor Xa libre como el Factor Xa en el complejo de protrombinasa.

5. Proteína S

La Proteína S es una glicoproteína plasmática dependiente de la vitamina K sintetizada en el endotelio. En la circulación, la Proteína S existe en dos formas: una forma libre y una forma en complejo unida para complementar a la proteína de unión a la proteína C4b (C4BP). En los seres humanos, la Proteína S está codificada por el gen PROS1. La función mejor caracterizada de la Proteína S es su papel en la vía de la anticoagulación, donde funciona como un cofactor de la proteína C en la inactivación de los Factores Va y VIIIa. Sólo la forma libre tiene actividad de cofactor.

La Proteína S puede unirse a fosfolípidos cargados negativamente a través del dominio GLA carboxilado. Esta propiedad permite que la Proteína S funcione en la eliminación de las células que experimentan apoptosis. La apoptosis es una forma de muerte celular que el cuerpo usa para eliminar las células no deseadas o dañadas de los tejidos. Las células que son apoptóticas (es decir, en el proceso de apoptosis) ya no gestionan activamente la distribución de fosfolípidos en su membrana externa y, por lo tanto, comienzan a mostrar fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidil serina, en la superficie celular. En las células sanas, una enzima dependiente de ATP (trifosfato de adenosina) los elimina del lado externo de la membrana celular. Estos fosfolípidos cargados negativamente son reconocidos por fagocitos tales como los macrófagos. La Proteína S puede unirse a los fosfolípidos cargados negativamente y funcionar como una molécula puente entre la célula apoptótica y el fagocito. La propiedad de puente de la Proteína S mejora la fagocitosis de la célula apoptótica, lo que permite que se elimine "limpiamente" sin que se produzcan síntomas de daño tisular, tales como la inflamación.

Las mutaciones en el gen PROS1 pueden dar lugar a una deficiencia de la Proteína S, que es un trastorno de la sangre raro que puede dar lugar a un riesgo incrementado de trombosis. Se ha mostrado que la Proteína S interacciona con el Factor V.

6. Proteína C

La proteína C, también conocida como autoprotrombina IIA y factor de coagulación sanguínea XIV, es una proteína zimogénica (inactiva) cuya forma activada desempeña un papel importante en la regulación de la coagulación sanguínea, la inflamación, la muerte celular y el mantenimiento de la permeabilidad de las paredes de los vasos sanguíneos en los seres humanos y otros animales. La proteína C activada (APC) realiza estas operaciones principalmente al inactivar proteolíticamente las proteínas Factor Va y Factor VIIIa. La APC se clasifica como una serina proteasa ya que contiene un residuo de serina en su sitio activo. En los seres humanos, la proteína C está codificada por el gen PROC, que se encuentra en el cromosoma 2.

La forma zimogénica de la proteína C es una glicoproteína dependiente de la vitamina K que circula en el plasma sanguíneo. Su estructura es la de un polipéptido de dos cadenas que consiste en una cadena ligera y una cadena pesada conectadas por un enlace disulfuro. El zimógeno de la proteína C se activa cuando se une a la trombina, otra proteína muy involucrada en la coagulación, y la activación de la proteína C se promueve en gran medida por la presencia de trombomodulina y receptores endoteliales de la proteína C (EPCR). Debido a la función del EPCR, la proteína C activada se encuentra principalmente cerca de las células endoteliales (es decir, las que forman las paredes de los vasos sanguíneos), y son estas células y los leucocitos (glóbulos blancos) los afectados por la APC. Debido al papel crucial que desempeña la proteína C como anticoagulante, las personas con deficiencias en la proteína C, o algún tipo de resistencia a la APC, tienen un riesgo significativamente mayor de formar coágulos sanguíneos peligrosos (trombosis).

La investigación sobre el uso clínico de la proteína C activada, también conocida como drotrecogina alfa activada (marca Xigris) ha estado rodeada de controversia. El fabricante Eli Lilly and Company realizó una agresiva campaña de mercadotecnia para promover su uso en personas con sepsis grave y choque séptico, incluyendo el patrocinio de las Surviving Sepsis Campaign Guidelines de 2004. Sin embargo, una revisión Cochrane de 2011 encontró que su uso no se puede recomendar ya que no mejora la supervivencia (y aumenta el riesgo de hemorragia).

La proteína C humana es una glicoproteína dependiente de la vitamina K estructuralmente similar a otras proteínas dependientes de la vitamina K que afectan la coagulación de la sangre, tales como la protrombina, el Factor VII, el Factor IX y el Factor X. La síntesis de la proteína C se produce en el hígado y comienza con una molécula precursora de cadena única: un péptido señal en el extremo N de 32 aminoácidos que precede a un propéptido. La proteína C se forma cuando se elimina un dipéptido de Lys198 y Arg199; esto causa la transformación en un heterodímero con carbohidratos unidos a N en cada cadena. La proteína tiene una cadena ligera (21 kDa) y una cadena pesada (41 kDa) conectadas por un enlace disulfuro entre Cys183 y Cys319.

La proteína C inactiva comprende 419 aminoácidos en múltiples dominios: un dominio Gla (residuos 43-88); un segmento aromático helicoidal (89-96); dos dominios similares al factor de crecimiento epidérmico (EGF) (97-132 y 136-176); un péptido de activación (200-211); y un dominio de serina proteasa similar a la tripsina (212-450). La cadena ligera contiene los dominios similares a Gla y EGF y el segmento aromático. La cadena pesada contiene el dominio de proteasa y el péptido de activación. Es en esta forma en la que circula el 85-90% de la proteína C en el plasma como un zimógeno, esperando ser activada. El zimógeno de la proteína C remanente comprende formas ligeramente modificadas de la proteína. La activación de la enzima ocurre cuando una molécula de trombina elimina por escisión el péptido de activación del extremo N de la cadena pesada. El sitio activo contiene una tríada catalítica típica de las serina proteasas (His253, Asp299 y Ser402).

La activación de la proteína C está fuertemente promovida por la trombomodulina y el receptor endotelial de la proteína C (EPCR), el último de los cuales se encuentra principalmente en las células endoteliales (células en el interior de los vasos sanguíneos). La presencia de trombomodulina acelera la activación en varios órdenes de magnitud, y el EPCR acelera la activación en un factor de 20. Si cualquiera de estas dos proteínas está ausente en las muestras murinas, el ratón muere por exceso de coagulación sanguínea mientras aún está en estado embrionario. En el endotelio, la APC desempeña un papel importante en la regulación de la coagulación sanguínea, la inflamación y la muerte celular (apoptosis). Debido al efecto acelerador de la trombomodulina sobre la activación de la proteína C, se puede decir que la proteína está activada no por la trombina sino por el complejo de trombina-trombomodulina (o incluso trombina-trombomodulina-EPCR). Una vez en forma activa, la APC puede o no permanecer unida a EPCR, con el que tiene aproximadamente la misma afinidad que la proteína zimógeno.

El dominio Gla es particularmente útil para unirse a fosfolípidos cargados negativamente para la anticoagulación y al EPCR para la citoprotección. Un exosito particular aumenta la capacidad de la proteína C para inactivar el Factor Va de manera eficiente. Otro es necesario para interactuar con la trombomodulina.

La proteína C en forma de zimógeno está presente en el plasma sanguíneo humano adulto normal en concentraciones entre 65-135 UI/dL. La proteína C activada se encuentra en niveles aproximadamente 2.000 veces más bajos que esto. La deficiencia leve de proteína C corresponde a niveles en plasma superiores a 20 UI/dL, pero por debajo del rango normal. Las deficiencias moderadamente graves describen concentraciones en sangre entre 1 y 20 UI/dL; las deficiencias graves producen niveles de proteína C que están por debajo de 1 UI/dL o son indetectables. Los niveles de proteína C en un infante a término sano promedian 40 UI/dL. La concentración de proteína C aumenta hasta los seis meses, cuando el nivel medio es de 60 UI/dL; el nivel se mantiene bajo durante la infancia hasta que alcanza los

niveles de adultos después de la adolescencia. La semivida de la proteína C activada es de alrededor de 15 minutos.

Las vías de la proteína C son las reacciones químicas específicas que controlan el nivel de expresión de APC y su actividad en el cuerpo. La proteína C es pleiotrópica, con dos clases principales de funciones: anticoagulación y citoprotección (su efecto directo en las células). La función que desempeña la proteína C depende de si la APC permanece o no unida al EPCR después de activarse; los efectos anticoagulantes de la APC se producen cuando no es así. En este caso, la proteína C funciona como un anticoagulante al inactivar proteolíticamente de manera irreversible el Factor Va y el Factor VIIIa, convirtiéndolos en Factor Vi y Factor VIIIi, respectivamente. Cuando aún está unida a EPCR, la proteína C activada realiza sus efectos citoprotectores, actuando sobre el sustrato efector PAR-1, el receptor-1 activado por proteasa. Hasta cierto punto, las propiedades anticoagulantes de la APC son independientes de sus propiedades citoprotectoras, ya que la expresión de una vía no se ve afectada por la existencia de la otra.

La actividad de la proteína C se puede regular a la baja reduciendo la cantidad de trombomodulina disponible o de EPCR. Esto se puede hacer mediante citoquinas inflamatorias, tales como la interleuquina-1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α). Los leucocitos activados liberan estos mediadores inflamatorios durante la inflamación, inhibiendo la creación de trombomodulina y EPCR, e induciendo su desprendimiento de la superficie endotelial. Ambas acciones regulan a la baja la activación de la proteína C. La trombina en sí misma también puede tener un efecto en los niveles de EPCR. Además, las proteínas liberadas de las células pueden impedir la activación de la proteína C, por ejemplo, el eosinófilo, lo que puede explicar la trombosis en la enfermedad cardíaca hipereosinofílica. La proteína C puede estar regulada al alza por el factor plaquetario 4. Se conjetura que esta citoquina mejora la activación de la proteína C mediante la formación de un puente electrostático desde el dominio Gla de la proteína C al dominio glicosaminoglicano (GAG) de la trombomodulina, reduciendo la constante de Michaelis (KM) para su reacción. Además, la Proteína C se inhibe por el inhibidor de la proteína C.

Una deficiencia de proteína C genética, en su forma leve asociada con heterocigosidad simple, provoca un riesgo significativamente incrementado de trombosis venosa en adultos. Si un feto es homocigoto o heterocigoto compuesto para la deficiencia, puede haber una presentación de púrpura fulminante, coagulación intravascular grave diseminada y tromboembolismo venoso simultáneo en el útero; esto es muy grave y generalmente mortal. La delección del gen de la proteína C en ratones causa la muerte fetal aproximadamente en el momento del nacimiento. Los ratones fetales sin proteína C se desarrollan normalmente al principio, pero experimentan hemorragia severa, coagulopatía, deposición de fibrina y necrosis del hígado. La frecuencia de la deficiencia de proteína C entre individuos asintomáticos es entre 1 en 200 y 1 en 500. En contraste, los síntomas significativos de la deficiencia son detectables en 1 de cada 20.000 individuos. No se han detectado sesgos raciales ni étnicos.

La resistencia a la proteína C activada ocurre cuando la APC no puede realizar sus funciones. Esta enfermedad tiene síntomas similares a la deficiencia de proteína C. La mutación más común que da lugar a la resistencia de la proteína C activada entre los caucásicos se encuentra en el sitio de escisión en el Factor V para APC. Allí, la Arg506 está reemplazada por Gln, produciendo Factor V Leiden. Esta mutación también se llama R506Q. La mutación que da lugar a la pérdida de este sitio de escisión en realidad impide que la APC inactíve efectivamente tanto el Factor Va como el Factor VIIIa. Por lo tanto, la sangre de la persona se coagula con demasiada facilidad, y presenta perpetuamente un riesgo incrementado de trombosis. Los individuos heterocigotos para la mutación del Factor V_{Leiden} tienen un riesgo de trombosis venosa 5-7 veces mayor que en la población general. Los sujetos homocigotos tienen un riesgo 80 veces mayor. Esta mutación es también el riesgo hereditario más común de trombosis venosa entre los caucásicos.

Alrededor del 5% de la resistencia a la APC no está asociado con la mutación anterior y el Factor V_{Leiden}. Otras mutaciones genéticas causan resistencia a la APC, pero ninguna en la medida en que lo hace el Factor V_{Leiden}. Estas mutaciones incluyen varias otras versiones del Factor V, la generación espontánea de autoanticuerpos dirigidos al Factor V y la disfunción de cualquiera de los cofactores de APC. Además, algunas afecciones adquiridas pueden reducir la eficacia de la APC en el desempeño de sus funciones anticoagulantes. Los estudios sugieren que entre el 20% y el 60% de los pacientes trombofílicos sufren alguna forma de resistencia a la APC.

C. Péptidos y polipéptido con dominio Gla

La presente descripción contempla el diseño, la producción y el uso de diversos polipéptidos que contienen el dominio Gla. Las características estructurales de estas moléculas son las siguientes. En primer lugar, los péptidos o polipéptidos tienen un dominio Gla que contiene aproximadamente 30-45 residuos consecutivos que comprenden un dominio Gla. Por lo tanto, el término "un péptido que no tiene más de" X "residuos consecutivos", incluso cuando se incluye el término "que comprende", no puede entenderse que comprende un mayor número de residuos consecutivos. En segundo lugar, los péptidos y polipéptidos contienen un dominio EGF de la proteína S y pueden contener residuos de dominio no Gla adicionales, tales como dominios EGF, dominios Kringle, dominios Fc, etc.

En general, los péptidos y polipéptidos tendrán 300 residuos o menos, de nuevo, comprendiendo 30-45 residuos consecutivos del dominio Gla. La longitud total puede ser de 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 y hasta 300 residuos. Se contemplan rangos de longitud de péptido de 50-300 residuos, 100-300 residuos, 150-300 residuos 200-300, residuos, 50-200 residuos, 100-200 residuos y 150-300 residuos, y 150-200 residuos. El número de residuos de Gla consecutivos puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

La presente descripción puede utilizar aminoácidos de configuración L, aminoácidos de configuración D, o una mezcla de los mismos. Mientras que los L-aminoácidos representan la gran mayoría de los aminoácidos que se encuentran en las proteínas, los D-aminoácidos se encuentran en algunas proteínas producidas por organismos marinos exóticos, tales como los caracoles cónicos. También son componentes abundantes de las paredes celulares de peptidoglicano de las bacterias. La D-serina puede actuar como un neurotransmisor en el cerebro. La convención L y D para la configuración de aminoácidos no se refiere a la actividad óptica del aminoácido en sí, sino a la actividad óptica del isómero del gliceraldehído a partir del cual ese aminoácido se puede sintetizar teóricamente (el D-gliceraldehído es dextrorrotatorio; el L-gliceraldehído es levorrotatorio).

Una forma de un péptido "todo D" es un péptido retro-inverso. La modificación retroinversa de los polipéptidos naturales implica el ensamblaje sintético de aminoácidos con estereoquímica del carbono α opuesta a la de los L-aminoácidos correspondientes, es decir, D-aminoácidos en orden inverso con respecto a la secuencia peptídica nativa. Por lo tanto, un análogo retroinverso tiene extremos invertidos y dirección invertida de los enlaces peptídicos (NH-CO en lugar de CO-NH) mientras mantiene aproximadamente la topología de las cadenas laterales como en la secuencia peptídica nativa. Véase la Patente de EE.UU. 6.261.569.

D. Síntesis

Será ventajoso producir péptidos y polipéptidos usando las técnicas sintéticas en fase sólida (Merrifield, 1963). Los expertos en la técnica conocen bien otras técnicas de síntesis de péptidos (Bodanszky et al., 1976; Peptide Synthesis, 1985; Solid Phase Peptide Synthesis, 1984). Los grupos protectores apropiados para su uso en dichas síntesis se encontrarán en los textos anteriores, así como en Protective Groups in Organic Chemistry (1973). Estos métodos sintéticos implican la adición secuencial de uno o más residuos de aminoácidos o residuos de aminoácidos protegidos adecuados a una cadena peptídica en crecimiento. Normalmente, el grupo amino o carboxilo del primer residuo de aminoácido está protegido por un grupo protector adecuado, que puede eliminarse selectivamente. Se utiliza un grupo protector diferente, que puede eliminarse selectivamente, para los aminoácidos que contienen un grupo lateral reactivo, tal como la lisina.

Usando la síntesis en fase sólida como un ejemplo, el aminoácido protegido o derivatizado está unido a un soporte sólido inerte a través de su grupo carboxilo o amino no protegido. El grupo protector del grupo amino o carboxilo se elimina luego selectivamente y el siguiente aminoácido en la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) adecuadamente protegido se mezcla y reacciona con el residuo ya unido al soporte sólido. El grupo protector del grupo amino o carboxilo se elimina luego de este residuo de aminoácido recién añadido, y luego se añade el siguiente aminoácido (adecuadamente protegido), y así sucesivamente. Después de que todos los aminoácidos deseados se hayan unido en la secuencia apropiada, cualquier grupo protector remanente de los grupos terminal y lateral (y el soporte sólido) se eliminan de forma secuencial o concurrente, para proporcionar el péptido final. Los péptidos y polipéptidos de la descripción están preferiblemente desprovistos de aminoácidos bencilados o metilbencilados. Dichos restos de grupos protectores se pueden usar en el curso de la síntesis, pero se eliminan antes de que se usen los péptidos y polipéptidos. Pueden ser necesarias reacciones adicionales, tal como se describe en otra parte, para formar enlaces intramoleculares para restringir la conformación.

Aparte de los veinte aminoácidos estándar que se pueden usar, hay una gran cantidad de aminoácidos "no estándar". Dos de estos pueden ser especificados por el código genético, pero son bastante raros en proteínas. La selenocisteína se incorpora a algunas proteínas en un codón UGA, que normalmente es un codón de parada. La pirrolisina es usada por algunas arqueas metanogénicas en las enzimas que usan para producir metano. Está codificada por el codón UAG. Los ejemplos de aminoácidos no estándar que no se encuentran en proteínas incluyen lantionina, ácido 2-aminoisobutírico, dehidroalanina y el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico. Los aminoácidos no estándar a menudo aparecen como intermedios en las vías metabólicas para los aminoácidos estándar; por ejemplo, la ornitina y la citrulina aparecen en el ciclo de la urea, parte del catabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos no estándar se forman generalmente mediante modificaciones de los aminoácidos estándar. Por ejemplo, la homocisteína se forma a través de la vía de transulfuración o mediante la desmetilación de la metionina a través del metabolito intermedio S-adenosil metionina, mientras que la hidroxiprolina se produce mediante una modificación posterior a la traducción de la prolina.

E. Enlazadores

Se pueden usar enlazadores o agentes de reticulación para fusionar los péptidos o polipéptidos con dominio Gla con otras secuencias proteínicas (p. ej., dominios Fc de anticuerpos). Los reactivos de reticulación bifuncionales se han usado ampliamente para una variedad de propósitos que incluyen la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de los sitios de unión de ligandos y receptores, y estudios estructurales. Los reactivos homobifuncionales que portan dos grupos funcionales idénticos demostraron ser altamente eficientes para inducir la reticulación entre macromoléculas o subunidades de una macromolécula idénticas y diferentes, y para unir los ligandos polipeptídicos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Al aprovechar las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales diferentes, la reticulación se puede controlar de forma selectiva y secuencial. Los reactivos de reticulación bifuncionales pueden dividirse según la especificidad de sus grupos funcionales, p. ej., grupos específicos de amino, sulfhidrilo, guanidino, indol o carboxilo. De estos, los reactivos dirigidos a grupos amino libres se han vuelto

especialmente populares debido a su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y las condiciones de reacción suaves bajo las cuales se pueden aplicar. La mayoría de los reactivos de reticulación heterobifuncionales contiene un grupo reactivo con amina primaria y un grupo reactivo con tiol.

En otro ejemplo, los reactivos de reticulación heterobifuncionales y los métodos de uso de los reactivos de reticulación se describen en la Patente de EE.UU. 5.889.155. Los reactivos de reticulación combinan un residuo de hidrazida nucleófila con un residuo de maleimida electrófila, que permite el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos a tioles libres. El reactivo de reticulación se puede modificar para reticular varios grupos funcionales y, por lo tanto, es útil para la reticulación de polipéptidos. En los casos en los que un péptido particular no contiene un residuo susceptible de un reactivo de reticulación dado en su secuencia nativa, pueden utilizarse cambios genéticos conservativos o de aminoácidos sintéticos en la secuencia primaria.

F. Secuencias de Péptido/Polipéptido Adicionales

Un factor en el desarrollo de fármacos es lograr semividas circulantes adecuadas, que tengan un impacto en la dosificación, la administración y la eficacia del fármaco, y esto es especialmente importante para los productos bioterapéuticos. Las proteínas pequeñas por debajo de 60 kD son eliminadas rápidamente por el riñón y, por lo tanto, no alcanzan su diana. Esto significa que se necesitan altas dosis para alcanzar la eficacia. Las modificaciones usadas actualmente para incrementar la semivida de las proteínas en la circulación incluyen: PEGilación; conjugación o fusión genética con proteínas, p. ej., transferrina (documento WO2006/096515A2), albúmina, hormona del crecimiento (US2003/104578AA); conjugación con celulosa (Levy y Shoseyov, 2002); conjugación o fusión con fragmentos Fc; estrategias de glicosilación y mutagénesis (Carter, 2006).

En el caso de la PEGilación, el polietilenglicol (PEG) se conjuga con la proteína, que puede ser, por ejemplo, una proteína plasmática, anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Los primeros estudios sobre el efecto de la PEGilación de anticuerpos se realizaron en la década de 1980. La conjugación se puede hacer enzimáticamente o químicamente y está bien establecida en la técnica (Chapman, 2002; Veronese y Pasut, 2005). Con la PEGilación, se puede aumentar el tamaño total, lo que reduce la posibilidad de filtración renal. La PEGilación además protege de la degradación proteolítica y ralentiza el aclaramiento de la sangre. Además, se ha reportado que la PEGilación puede reducir la inmunogenicidad e incrementar la solubilidad. La farmacocinética mejorada mediante la adición de PEG se debe a varios mecanismos diferentes: incremento del tamaño de la molécula, protección frente a la proteólisis, antigenicidad reducida y el enmascaramiento de secuencias específicas de receptores celulares. En el caso de los fragmentos de anticuerpos (Fab), se logró un aumento de 20 veces en la semivida plasmática por PEGilación (Chapman, 2002).

Hasta la fecha, hay varios medicamentos PEGilados aprobados, p. ej., PEG-interferón alfa2b (PEG-INTRON) comercializado en 2000 y alfa2a (Pegasys) comercializado en 2002. Un fragmento de anticuerpo PEGilado frente a TNF alfa, llamado Cimzia o Certolizumab Pegol, se presentó para la aprobación por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Crohn en 2007 y se aprobó el 22 de abril de 2008. Una limitación de la PEGilación es la dificultad para sintetizar largas especies monodispersas, especialmente cuando se necesitan cadenas de PEG de más de 1.000 kD. Para muchas aplicaciones, se usa PEG polidisperso con una longitud de cadena de más de 10.000 kD, lo que da lugar a una población de conjugados que tienen cadenas de PEG de diferente longitud, que necesitan un análisis extenso para garantizar lotes equivalentes entre las producciones. La diferente longitud de las cadenas de PEG puede dar lugar a diferentes actividades biológicas y, por lo tanto, a diferentes farmacocinéticas. Otra limitación de la PEGilación es una disminución en la afinidad o actividad como se ha observado con el alfa-interferón Pegasys, que tiene solo el 7% de la actividad antiviral de la proteína nativa, pero tiene una farmacocinética mejorada debido a la mayor semivida plasmática.

Otra estrategia es conjugar el fármaco con una proteína de larga duración, p. ej., albúmina, que tiene 67 kD y tiene una semivida plasmática de 19 días en el ser humano. La albúmina es la proteína más abundante en plasma y está implicada en la regulación del pH del plasma, pero también sirve como vehículo de sustancias en el plasma. En el caso de CD4, se ha logrado una mayor semivida en plasma después de fusionarla con albúmina de suero humano (Yeh et al., 1992). Otros ejemplos de proteínas de fusión son la insulina, la hormona de crecimiento humana, la transferrina y las citoquinas (Duttaroy et al., 2005; Melder et al., 2005; Osborn et al., 2002a; Osborn et al., 2002b; Sung et al., 2003) y véanse (US2003/104578A1, WO2006/096515A2, y WO2007/047504A2).

El efecto de la glicosilación en la semivida plasmática y en la actividad de la proteína también se ha estudiado ampliamente. En el caso del activador del plasminógeno tisular (tPA), la adición de nuevos sitios de glicosilación disminuyó el aclaramiento plasmático y mejoró la potencia (Keyt et al., 1994). La glicoingeniería se ha aplicado con éxito para una serie de proteínas recombinantes e inmunoglobulinas (Elliott et al., 2003; Raju y Scallan, 2007; Sinclair y Elliott, 2005; Umana et al., 1999). Además, la glicosilación influye en la estabilidad de las inmunoglobulinas (Mimura et al., 2000; Raju y Scallan, 2006).

Otra molécula usada para las proteínas de fusión es el fragmento Fc de una IgG (Ashkenazi y Chamow, 1997). La estrategia de la fusión de Fc se ha utilizado, por ejemplo, en la tecnología Trap desarrollada por Regeneron (p. ej., trampa de IL1 y trampa de VEGF). El uso de albúmina para prolongar la semivida de los péptidos se ha descrito en el documento US2004/001827A1. También se han reportado efectos positivos de la albúmina para los fragmentos Fab y la proteína de fusión scFv-HSA. Se ha demostrado que la semivida sérica prolongada de la albúmina se debe a un

proceso de reciclado mediado por el FcRn (Anderson et al., 2006; Chaudhury et al., 2003).

Otra estrategia es usar técnicas de mutagénesis dirigida dirigidas a la interacción de las inmunoglobulinas con su receptor para mejorar las propiedades de unión, es decir, la maduración de la afinidad en la región Fc. Con una mayor afinidad por FcRn se puede lograr una semivida prolongada in vivo (Ghetie et al., 1997; Hinton et al., 2006; Jain et al., 2007; Petkova et al., 2006a; Vaccaro et al., 2005). Sin embargo, las estrategias de maduración de afinidad requieren varias rondas de mutagénesis y ensayo. Esto lleva tiempo, es costoso y está limitado por el número de aminoácidos que, cuando se mutan, dan lugar a semividas prolongadas. Por lo tanto, se necesitan estrategias alternativas simples para mejorar la semivida in vivo de los productos bioterapéuticos. Los agentes terapéuticos con semividas prolongadas in vivo son especialmente importantes para el tratamiento de enfermedades crónicas, trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, metabólicas, infecciosas y oculares, y cáncer, especialmente cuando se requiere terapia durante un período de tiempo prolongado. Por consiguiente, todavía existe la necesidad de desarrollar agentes terapéuticos (p. ej., anticuerpos y proteínas de fusión Fc) con persistencia y semividas en circulación aumentadas, con el fin de reducir la dosificación y/o la frecuencia de inyecciones de una variedad de agentes terapéuticos.

G. Marcadores

Los polipéptidos de la presente descripción pueden conjugarse con marcadores para fines de diagnóstico. Un marcador según la presente descripción se define como cualquier resto que puede detectarse usando un ensayo. Los ejemplos no limitantes de moléculas informadoras incluyen enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas de fotoafinidad, partículas coloreadas o ligandos, tales como la biotina.

Los conjugados de etiqueta se prefieren generalmente para uso como agentes de diagnóstico. Los agentes de diagnóstico generalmente se encuentran dentro de dos clases, aquellos para uso en diagnósticos in vitro y aquellos para uso en protocolos de diagnóstico in vivo, generalmente conocidos como "imagería dirigida". Muchos agentes de imagería apropiados son conocidos en la técnica, como lo son los métodos para su unión a péptidos y polipéptidos (véanse, por ej., US5.021.236, US4.938.948, y US4.472.509). Los restos de imagería usados pueden ser iones paramagnéticos, isótopos radiactivos, fluorocromos, sustancias detectables por RMN y agentes de imagería de rayos X.

En el caso de los iones paramagnéticos, se pueden mencionar, por ejemplo, iones como el cromo (III), el manganeso (II), el hierro (III), el hierro (II), el cobalto (II), el níquel (II) y el cobre (II), el neodimio (III), el samario (III), el iterbio (III), el gadolinio (III), el vanadio (II), el terbio (III), el disprosio (III), el holmio (III) y/o el erbio (III), con el gadolinio como particularmente preferido. Los iones útiles en otros contextos, tales como imagería de rayos X, incluyen, pero no están limitados a, lantano (III), oro (III), plomo (II) y, especialmente, bismuto (III).

En el caso de los isótopos radiactivos para aplicación terapéutica y/o diagnóstica, se pueden mencionar astatina²¹¹, ¹⁴carbono, ⁵¹cromo, ³⁶cloro, ⁵⁷cobalto, ⁵⁸cobalto, ⁶⁷cobre, ¹⁵²Eu, ⁶⁷galio, ³hidrógeno, ¹²³yodo, ¹²⁵yodo, ¹³¹yodo, ¹¹¹indio, ⁵⁹hierro, ³²fósforo, ¹⁸⁶renio, ¹⁸⁸renio, ⁷⁵selenio, ³⁵azufre, ^{99m}tecnecio y/o ⁹⁰itrio. A menudo se prefiere el ¹²⁵I para su uso en ciertas realizaciones, y el ^{99m}tecnecio y/o el ¹¹¹indio también se prefieren a menudo debido a su baja energía y su idoneidad para la detección a largo rango. Los péptidos y polipéptidos marcados radiactivamente pueden producirse según métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los péptidos y polipéptidos pueden yodarse por contacto con yoduro de sodio y/o potasio y un agente oxidante químico tal como el hipoclorito de sodio o un agente oxidante enzimático, tal como la lactoperoxidasa. Los péptidos pueden marcarse con ^{99m}tecnecio mediante un proceso de intercambio de ligandos, por ejemplo, reduciendo el pertecnato con una disolución estañosa, quelando el tecnecio reducido en una columna Sephadex y aplicando el péptido a esta columna. Alternativamente, se pueden usar técnicas de marcaje directo, p. ej., incubando pertecnato, un agente reductor tal como SnCl₂, una disolución tampón tal como disolución de sodio-potasio fitalato y el péptido. Los grupos funcionales intermedios que se usan a menudo para unir los radioisótopos que existen como iones metálicos al péptido son el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilentriaminotetracético (EDTA).

Entre los marcadores fluorescentes contemplados para su uso como conjugados se incluyen Alexa 350, Alexa 430, AMCA, BODIPY 630/650, BODIPY 650/665, BODIPY-FL, BODIPY-R6G, BODIPY-TMR, BODIPY-TRX, Azul cascada, Cy3, Cy5, 6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, Verde Oregón 488, Verde Oregón 500, Verde Oregón 514, Azul Pacífico, REG, Verde Rodamina, Rojo Rodamina, Renografina, ROX, TAMRA, TET, Tetrametilrodamina, y/o Rojo Texas. Otro tipo de conjugado contemplado es el destinado principalmente para uso in vitro, donde el péptido está unido a un ligando de unión secundario y/o a una enzima (una etiqueta de enzima) que generará un producto coloreado en contacto con un sustrato cromogénico. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen ureasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de hidrógeno (de rábano) o glucosa oxidasa. Los ligandos de unión secundarios preferidos son biotina y avidina y compuestos de estreptavidina. El uso de dichos marcadores es bien conocido por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en las Patentes de EE.UU. 3.817.837, 3.850.752, 3.939.350, 3.996.345, 4.277.437, 4.275.149 y 4.366.241.

Se conocen otros métodos en la técnica para la unión o conjugación de un péptido a su resto conjugado. Algunos métodos de unión implican el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico tal como anhídrido de ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); ácido etilentriaminotetraacético; N-cloro-p-

toluensulfonamida; y/o tetracloro-3 α -6 β -difenilglicoril-3 unido al anticuerpo (Patentes de EE.UU. 4.472.509 y 4.938.948). Los péptidos o polipéptidos también pueden reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento tal como glutaraldehído o peryodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o por reacción con un isotiocianato.

5 IV. Terapias

A. Estados de enfermedad y afecciones

1. Cáncer

10 Antecedentes. El cáncer es una consecuencia del crecimiento de una población clonal de células de tejido. El desarrollo del cáncer, denominado carcinogénesis, se puede modelar y caracterizar de varias maneras. Desde hace tiempo se aprecia una asociación entre el desarrollo del cáncer y la inflamación. La respuesta inflamatoria está implicada en la defensa del huésped frente a la infección microbiana, y también dirige la reparación y regeneración de los tejidos. Una evidencia considerable apunta a una conexión entre la inflamación y el riesgo de desarrollar cáncer, es decir, la inflamación crónica puede dar lugar a displasia. Hay cientos de formas diferentes de cánceres humanos, y con una comprensión cada vez mayor de la genética y la biología subyacentes del cáncer, estas formas se subdividen y reclasifican adicionalmente.

Determinar qué causa el cáncer es complejo. Se sabe que muchas cosas aumentan el riesgo de cáncer, incluido el consumo de tabaco, ciertas infecciones, radiación, falta de actividad física, obesidad y contaminantes ambientales. Estos pueden dañar directamente los genes o combinarse con fallas genéticas existentes dentro de las células para causar la enfermedad. Aproximadamente del cinco al diez por ciento de los cánceres son enteramente hereditarios.

20 El cáncer se puede detectar de varias maneras, incluida la presencia de ciertos signos y síntomas, ensayos de cribado o imagenología médica. Una vez que se detecta un posible cáncer, se diagnostica mediante un examen microscópico de una muestra de tejido. El cáncer generalmente se trata con quimioterapia, radioterapia y cirugía. Las posibilidades de sobrevivir a la enfermedad varían mucho según el tipo y la ubicación del cáncer y el grado de la enfermedad al inicio del tratamiento. Si bien el cáncer puede afectar a personas de todas las edades, y algunos tipos de cáncer son más comunes en los niños, el riesgo de desarrollar cáncer generalmente aumenta con la edad. En 2007, el cáncer causó aproximadamente el 13% de todas las muertes humanas en todo el mundo (7,9 millones). Las tasas aumentan a medida que más personas viven hasta la vejez y cuando ocurren cambios masivos en el estilo de vida en el mundo en desarrollo.

30 Los tratamientos se dividen en cinco categorías generales: cirugía, quimioterapia, radiación, medicina alternativa y cuidados paliativos. La cirugía es el método primario de tratamiento de la mayoría de los cánceres sólidos aislados y puede desempeñar un papel en la paliación y la prolongación de la supervivencia. Por lo general, es una parte importante para hacer el diagnóstico definitivo y la estadificación del tumor ya que generalmente se requieren biopsias. En la cirugía localizada del cáncer, se intenta típicamente extirpar toda la masa junto con, en ciertos casos, los ganglios linfáticos en el área. Para algunos tipos de cáncer, esto es todo lo que se necesita para eliminar el cáncer.

35 La quimioterapia, además de la cirugía, ha demostrado ser útil en varios tipos diferentes de cáncer, incluyendo: cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, sarcoma osteogénico, cáncer de testículo, cáncer de ovario y ciertos cánceres de pulmón. La efectividad de la quimioterapia a menudo está limitada por la toxicidad para otros tejidos del cuerpo.

40 La radioterapia implica el uso de radiación ionizante en un intento de curar o mejorar los síntomas del cáncer. Se usa en aproximadamente la mitad de todos los casos y la radiación puede provenir de fuentes internas en forma de braquiterapia o de fuentes externas. La radiación se usa típicamente además de la cirugía y/o la quimioterapia, pero para ciertos tipos de cáncer, tal como el cáncer temprano de cabeza y cuello, se puede usar sola. Para las metástasis óseas dolorosas se ha encontrado que es efectiva en aproximadamente el 70% de las personas.

45 Los tratamientos alternativos y complementarios incluyen un grupo diverso de sistemas de atención de la salud, prácticas y productos que no forman parte de la medicina convencional. "Medicina complementaria" se refiere a los métodos y sustancias usados junto con la medicina convencional, mientras que "medicina alternativa" se refiere a los compuestos usados en lugar de medicina convencional. La mayoría de las medicinas complementarias y alternativas para el cáncer no se han estudiado ni ensayado rigurosamente. Algunos tratamientos alternativos han sido investigados y han mostrado ser ineficaces, pero aún se siguen comercializando y promoviendo.

50 Finalmente, los cuidados paliativos se refieren al tratamiento que intenta hacer que el paciente se sienta mejor y pueden o no combinarse con un intento de atacar el cáncer. Los cuidados paliativos incluyen acciones para reducir la angustia física, emocional, espiritual y psicosocial experimentada por las personas con cáncer. A diferencia del tratamiento que tiene como objetivo matar directamente las células cancerosas, el objetivo principal de los cuidados paliativos es mejorar la calidad de vida del paciente.

55 Actividad del dominio Gla. Las proteínas Gla modificadas por ingeniería también se pueden usar como agentes anticancerosos de varias maneras diferentes. Primero, los pacientes con cáncer a menudo padecen un estado

hipercoagulable que puede dar lugar a embolia y muerte. Las proteínas con dominio Gla (opcionalmente unidas a una región Fc) pueden administrarse en la vasculatura del sujeto en cantidades suficientes como para reducir la formación de embolias y la coagulación patológica. Dichas proteínas con dominio Gla son útiles para reducir, bloquear y/o inhibir la coagulación patológica en dichos pacientes.

- 5 Además, se sabe que PtdS desempeña un papel en la supresión de la respuesta inmune frente al cáncer. Por lo tanto, las proteínas con dominio Gla también pueden ser útiles para unirse y bloquear/enmascarar la PtdS en células cancerosas. Esto sirve para prevenir la señalización tolerogénica a través de PtdS que induce citoquinas antiinflamatorias y suprime las citoquinas proinflamatorias, lo que facilita el escape inmune de las células cancerosas. Esto puede dar lugar a una estrategia particularmente útil cuando se combina con otros agentes terapéuticos
- 10 "estándar" para el cáncer, como se explica con detalle a continuación.

2. Enfermedad autoinmune/inflamatoria

- Antecedentes. Los polipéptidos con dominio Gla también pueden ser útiles en el tratamiento de una variedad de estados de enfermedades autoinmunes y/o inflamatorias tales como espondiloartropatía, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reactiva, artritis enteropática, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, enfermedad de intestino
- 15 irritable, enfermedad del intestino inflamado, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, fiebre mediterránea familiar, esclerosis lateral amiotrófica, síndrome de Sjogren, artritis temprana, artritis viral, esclerosis múltiple, lupus sistémico eritematoso, psoriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Addison, alopecia, síndrome antifosfolípidos, enfermedad de Behcet, enfermedad celíaca, síndrome de fatiga crónica, colitis ulcerosa, diabetes tipo I, fibromialgia, gastritis autoinmune, síndrome de Goodpasture, enfermedad de Graves, púrpura trombocitopénica idiopática (PTI), miastenia gravis, pénfigo vulgar, cirrosis biliar primaria, fiebre reumática, sarcoidosis, escleroderma,
- 20 vitiligo, vasculitis, vasculitis de vasos pequeños, hepatitis, cirrosis biliar primaria, sarcoidosis, esclerodermia, enfermedad de injerto contra huésped (aguda y crónica), anemia aplásica o neutropenia cíclica. El diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades están bien documentados en la bibliografía.

- Actividad del dominio Gla. Se sabe que ciertos trastornos inmunitarios se caracterizan por una fagocitosis deficiente de las células apoptóticas, lo que da lugar a necrosis secundaria, señalización proinflamatoria y producción de autoanticuerpos. Además, las vesículas derivadas de la membrana plasmática (PMV) que contienen PtdS en su superficie se desprenden de las células apoptóticas y se cree que se unen a las células inmunes, tales como los
- 25 macrófagos (DeRose et al., 2011). Las proteínas con dominio Gla se pueden usar para enmascarar la PtdS que se encuentra en la superficie de los PMV, lo que reduce el efecto "señuelo" de los PMV y permite la fagocitosis de las células apoptóticas. Esto debería romper el ciclo de señalización inflamatoria continua y reducir la hiperactivación inmune.
- 30

3. Trastornos de hipercoagulación

- Antecedentes. Los trastornos de hipercoagulación dan lugar a una mayor tendencia a la coagulación de la sangre, lo que pone al paciente en riesgo de obstrucción de las venas y las arterias. En la hemostasia normal, o la detención de
- 35 la hemorragia, se forman coágulos en el sitio de la lesión del vaso sanguíneo. En la hipercoagulación, los coágulos se desarrollan en la sangre circulante. Cuando esto ocurre en todos los vasos sanguíneos del cuerpo, puede surgir una afección conocida como trombosis. La trombosis puede dar lugar a un infarto o la muerte del tejido. Los trastornos de hipercoagulación incluyen hiperhomocistinemia, deficiencia de antitrombina III, factor V leyden y deficiencia de proteína C o proteína S.

- 40 El diagnóstico de los trastornos de hipercoagulación se completa con una combinación de examen físico, historial médico y análisis de sangre. Cuando se encuentra, se pueden administrar los anticoagulantes coumadina y heparina para reducir los efectos de la coagulación y mantener la fluidez en la sangre. El pronóstico para los pacientes con trastornos de hipercoagulación varía según la gravedad de la coagulación y la trombosis, pero si no se detecta y no se trata, la trombosis podría dar lugar a embolia pulmonar y la muerte.

- 45 La enfermedad de células falciformes (SCD), aunque no es un trastorno de la coagulación, tiene algunas de las mismas manifestaciones. Curiosamente, un aumento del nivel de PtdS expresada en la superficie en una subpoblación de eritrocitos es una característica universal de esta enfermedad (Wood et al., Blood, Vol. 88, No 5 (1 de septiembre), 1996). La SCD es un trastorno sanguíneo genético autosómico recesivo con sobredominancia, caracterizado por glóbulos rojos que asumen una forma anormal, rígida y falciforme. La enfermedad disminuye la flexibilidad de las
- 50 células y da como resultado un riesgo de diversas complicaciones. La enfermedad se produce debido a una mutación en el gen de la hemoglobina. La esperanza de vida se acorta. La enfermedad de células falciformes ocurre más comúnmente en personas (o sus descendientes) de partes de regiones subsaharianas tropicales y subtropicales donde la malaria es o era común. En las áreas donde la malaria es común, existe un beneficio de aptitud física al portar un solo gen de células falciformes (rasgo de células falciformes). Aquellos con solo uno de los dos alelos de la enfermedad de células falciformes, aunque no son totalmente resistentes, son más tolerantes a la infección y, por lo tanto, muestran síntomas menos graves cuando están infectados.
- 55

La anemia de células falciformes es el nombre de una forma específica de enfermedad de células falciformes en la que existe homocigosidad para la mutación que causa la HbS. La anemia de células falciformes también se conoce

como "HbSS", "enfermedad de las SS", "hemoglobina S" o permutaciones de la misma. En las personas heterocigotas, que tienen un solo gen falciforme y un gen de hemoglobina adulta normal, se le conoce como "HbAS" o "rasgo de células falciformes". Otras formas más raras de la enfermedad de células falciformes incluyen la enfermedad de hemoglobina C (HbSC), la beta-más-talasemia falciforme (HbS/β+) y la beta-cero-talasemia falciforme (HbS/β0). Estas otras formas de la enfermedad de células falciformes son estados heterocigotos compuestos en los que la persona tiene solo una copia de la mutación que causa HbS y una copia de otro alelo de hemoglobina anormal.

En aspectos particulares, la SCD puede relacionarse con el flujo sanguíneo. La crisis vaso-oclusiva está causada por glóbulos rojos con forma falciforme que obstruyen los capilares y restringen el flujo de sangre a un órgano, lo que da lugar a isquemia, dolor, necrosis y, a menudo, daño orgánico. La frecuencia, gravedad y duración de estas crisis varían considerablemente. Las crisis dolorosas se tratan con hidratación, analgésicos y transfusión de sangre; el manejo del dolor requiere la administración de opioides a intervalos regulares hasta que la crisis se haya resuelto. Para las crisis más leves, se administra a un subgrupo de pacientes AINE (como el diclofenaco o el naproxeno). Para las crisis más graves, la mayoría de los pacientes requieren tratamiento hospitalario para los opioides intravenosos; los dispositivos de analgesia controlada por el paciente (PCA) se usan comúnmente en este contexto. Las crisis vaso-oclusivas que afectan a órganos tales como el pene o los pulmones se consideran una emergencia y se tratan con transfusiones de glóbulos rojos. La difenhidramina a veces es efectiva para el picor asociado con el uso de opioides. Se recomienda la espirometría de incentivo, una técnica para estimular la respiración profunda para minimizar el desarrollo de atelectasia.

Actividad del dominio Gla. Los dominios Gla también se pueden usar para controlar o modular las acciones procoagulantes de PtdS en la hipercoagulación. La expresión en la superficie de PtdS es un potente estimulador de la cascada de la coagulación. El enmascarar las PtdS expuestas mediante el uso de polipéptidos con dominio Gla podría inhibir o amortiguar esta cascada. Este tratamiento podría ser particularmente beneficioso para los individuos con SCA en los que se cree que solo una pequeña población de RBC puede ser responsable de la hipercoagulabilidad asociada con la enfermedad

4. Infección viral

Antecedentes. Un virus es un pequeño agente infeccioso que puede replicarse solo en el interior de las células vivas de un organismo. Los virus pueden infectar todo tipo de organismos, desde animales y plantas hasta bacterias y arqueas. Se han descrito en detalle unos 5.000 virus, aunque existen millones de tipos diferentes. Los virus se encuentran en casi todos los ecosistemas de la Tierra y son el tipo más abundante de entidad biológica.

Las partículas de virus (conocidas como viriones) consisten en dos o tres partes: i) el material genético formado por ADN o ARN, moléculas largas que portan la información genética; ii) una cubierta proteica que protege a estos genes; y en algunos casos iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta de la proteína cuando están fuera de una célula. Las formas de los virus van desde formas helicoidales e icosaédricas simples hasta estructuras más complejas. El virus promedio es aproximadamente una centésima parte del tamaño de la bacteria promedio. La mayoría de los virus son demasiado pequeños como para ser vistos directamente con un microscopio óptico.

Los virus se propagan de muchas maneras; los virus en las plantas a menudo se transmiten de una planta a otra por insectos que se alimentan de la savia de la planta, tales como los áfidos; los virus en los animales pueden ser transportados por insectos chupadores de sangre. Estos organismos portadores de enfermedades son conocidos como vectores. Los virus de la gripe se propagan al toser y estornudar. El norovirus y el rotavirus, causas comunes de gastroenteritis viral, se transmiten por vía fecal-oral y se transmiten de persona a persona por contacto, entrando en el cuerpo en los alimentos o el agua. El VIH es uno de varios virus transmitidos por contacto sexual y por exposición a sangre infectada. El rango de células huésped que un virus puede infectar se llama su "rango de huéspedes". Este puede ser estrecho o, como cuando un virus es capaz de infectar muchas especies, amplio.

Las infecciones virales en animales provocan una respuesta inmune que generalmente elimina el virus infeccioso. Las vacunas también pueden producir respuestas inmunitarias que confieren una inmunidad artificialmente adquirida a la infección viral específica. Sin embargo, algunos virus, incluidos los que causan el SIDA y la hepatitis viral, evaden estas respuestas inmunitarias y producen infecciones crónicas. Los antibióticos no tienen efecto sobre los virus, pero se han desarrollado varios fármacos antivirales.

Una variedad de enfermedades son fomentadas por infecciones de virus, incluyendo influenza, el virus de inmunodeficiencia humana, el virus del dengue, el virus del Nilo occidental, el virus de la viruela, el virus sincitial respiratorio, el virus de la fiebre hemorrágica coreana, la varicela, el virus de la varicela zoster, el virus del herpes simple 1 o 2, el virus de Epstein-Barr, el virus de Marburg, el hantavirus, el virus de la fiebre amarilla, el virus de la hepatitis A, B, C o E, el virus del Ébola, el virus del papiloma humano, rinovirus, el virus Coxsackie, el virus de la polio, el virus del sarampión, el virus de la rubéola, el virus de la rabia, el virus de la enfermedad de Newcastle, rotavirus, HTLV-1 y 2.

Actividad del dominio Gla. La PtdS se segrega al lado interno de la membrana plasmática de las células de mamíferos en reposo. La pérdida de la asimetría de fosfatidilserina ocurre durante la apoptosis, la lesión celular y la activación celular, tal como se observa durante la infección viral. Esto se debe a la inhibición de las translocasas o a la activación

de exportadores de fosfatidilserina, o a enzimas que alteran la distribución de los lípidos, tales como las escramblasas (Soares et al., 2008). Los virus activan las células huésped para replicarse de manera eficiente, y la activación celular inducida por virus puede provocar aumentos en el Ca^{2+} intracelular que, a su vez, provocan la externalización de fosfatidilserina al activar los exportadores de fosfatidilserina e inhibir la importación de fosfatidilserina por las translocasas. Además, la translocación de fosfatidilserina a la superficie externa de la célula huésped podría ser un evento temprano asociado con la apoptosis inducida por virus (Soares et al., 2008).

La PtdS en la superficie de las células infectadas, los viriones en ciernes o las microvesículas derivadas de células preapoptóticas producen una evasión inmunológica. Usando los polipéptidos con dominio Gla de la presente descripción para enmascarar la PtdS en estas membranas, la función inmunitaria normal puede abordar el desafío viral de manera más efectiva, reduciendo así la carga viral, limitando la infección y destruyendo los viriones y las células infectadas.

5. Sepsis

Antecedentes. En la sepsis, la inflamación y la trombosis son tanto causa como resultado de las interacciones entre las células circulantes (por ejemplo, leucocitos y plaquetas), endoteliales y de músculo liso. Las micropartículas son fragmentos proinflamatorios y procoagulantes que se originan de la membrana plasmática generadas después de la activación celular y liberadas en los fluidos corporales. En el recipiente, constituyen un conjunto de efectores bioactivos combinados de diversos orígenes celulares y pueden actuar como mensajeros intercelulares. Las micropartículas exponen fosfatidilserina, un fosfolípido procoagulante al que se puede acceder después de la remodelación de la membrana, y al factor tisular (TF), el iniciador de la coagulación sanguínea en la superficie endotelial y leucocitaria. Constituyen una vía de secreción para $\text{IL-1}\beta$ y regulan al alza la respuesta proinflamatoria de las células diana. Las micropartículas circulan a niveles bajos en individuos sanos, pero experimentan cambios fenotípicos y cuantitativos que podrían desempeñar un papel patofisiológico en las enfermedades inflamatorias. Las micropartículas (MP) pueden participar en la patogénesis de la sepsis a través de múltiples vías. Son capaces de regular el tono vascular y son potentes mediadores proinflamatorios y coagulantes vasculares. Las capacidades de las micropartículas presentan un interés creciente en descifrar los mecanismos subyacentes a la disfunción de múltiples órganos del choque séptico.

La membrana plasmática de las células endoteliales y los monocitos se reorganiza con la externalización de la fosfatidilserina y la expresión del factor tisular TF cifrado, lo que permite la activación del factor VII (FVIIa) y la generación de trombina (FIIa) en la superficie celular. Se produce hemorragia, con la liberación de micropartículas que portan TF, lo que da como resultado una mayor superficie para las reacciones procoagulantes. La adherencia y agregación de las plaquetas también se producen con la liberación de las MP; las plaquetas y las MP portan GPIIb/IIIa, un cofactor para la activación del factor XI por la trombina, que da lugar a la fase de propagación con altos niveles de generación de trombina y formación de fibrina. Las MP endoteliales que portan TF permiten la transferencia de TF a PMN, aumentando la diseminación de TF y la microangiopatía trombótica o la coagulopatía intravascular diseminada. El inicio de la coagulación de la sangre por TF se regula rápidamente a la baja por el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) en las superficies de las células endoteliales y monocíticas, como en las MP. La proteína C unida al receptor endotelial de proteína C (EPCR) se activa por el complejo trombina-trombomodulina y la proteína C activada (APC) inhibe el factor Va y el factor VIIIa, limitando la fase de propagación de la generación de trombina. La APC unida a EPCR también regula NF- κ B, con efectos citoprotectores en las células endoteliales y los monocitos. La APC induce ampollas, con la emisión de MP que portan EPCR capaces de activar la proteína C, lo que da lugar a la diseminación de actividades anticoagulantes y antiapoptóticas.

Actividad del dominio Gla. La presente invención contempla el uso de dominios Gla para controlar o modular las acciones procoagulantes de micropartículas que contienen PtdS y TF en su superficie. También pueden regular a la baja la señalización proinflamatoria relacionada que se produce en la sepsis, por ejemplo, a través de $\text{IL-1}\beta$, así como modular los efectos de las micropartículas portadoras de PtdS en el tono vascular.

V. Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones preferidas de la descripción. Los expertos en la técnica deberían apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos que siguen representan técnicas descubiertas por el inventor que funcionan bien en la práctica de la descripción, y que, por lo tanto, se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberían apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden realizarse muchos cambios en las realizaciones específicas que se describen y todavía obtener un resultado semejante o similar.

Ejemplo 1

Las afinidades de las proteínas con dominio Gla para las membranas celulares se han determinado in vitro mediante el uso de vesículas de fosfolípidos preparadas (Shah et al., 1998; Nelsestuen, 1999). Cómo estos valores in vitro se traducen a un contexto in vivo, sin embargo, no se ha elucidado completamente. La interacción de FVII con TF, por ejemplo, subraya el hecho de que, aunque los dominios Gla de estas proteínas son muy homólogos, las diferencias adicionales en su especificidad y afinidad de unión a la membrana celular pueden estar mediadas a través de sus dominios EGF y/o Kringle. Desafortunadamente, estas interacciones no pueden recapitularse mediante estudios

basados únicamente en vesículas de fosfolípidos y pueden permanecer sin identificar.

Por lo tanto, los inventores propusieron preparar y ensayar los dominios Gla+EGF/Kringle, así como el dominio Gla solo a partir del siguiente panel de proteínas: hS (aglutinante de alta afinidad), hZ (aglutinante de afinidad media), hPT (que contiene kringle de afinidad media), hFVII (baja afinidad-utiliza un "receptor" secundario que también está regulado al alza en el cáncer) y B0178 (hFVII con afinidad por fosfolípidos incrementada). Estas proteínas tienen potencialmente diferentes características de unión in vivo que pueden ser beneficiosas para su uso como sondas (y, si están validadas y son selectivas, potencialmente como agentes terapéuticos) y hasta la fecha no han sido reconocidas.

La estrategia general fue construir proteínas recombinantes y ensayarlas para determinar su expresión. Entonces, se desarrollarían ensayos para evaluar la unión. Después, se optimizarían los métodos de expresión y purificación, seguidos del control de calidad de gamma-carboxilación.

La FIG. 1 muestra secuencias de una variedad de proteínas con dominio Gla que incluyen sitios de carboxilación. La FIG. 2 muestra la expresión de una variedad de diferentes proteínas con dominio Gla que se prepararon por ingeniería y expresaron de forma transitoria en células 293. La FIG. 3 muestra un estudio similar en células BHK21. Dado que una de las mejores construcciones de expresión era una construcción de Proteína S + EGF, la secuencia señal de la Proteína S se utilizó con Protrombina Gla + Kringle y Proteína Z + EGF. Sin embargo, la expresión solo se observó intracelularmente (FIG. 4).

La proteína S Gla + EGF se seleccionó para un estudio adicional. La secuencia se muestra en la FIG. 5. La proteína se produjo en células BHK21 usando medio RF286. Se recogieron 600 ml y se concentraron 4X. La purificación utilizó tres etapas:

1. Columna de Ni-NTA, 10 ml, recién empaquetada. Los medios se cargan en la columna y se eluyen con gradiente de imidazol. Todas las fracciones se someten a transferencia Western de Gla para identificar la proteína S G + E etiquetada con His.

2. Hitrap Q con etapa de elución con CaCl₂. Las fracciones positivas para Gla se agrupan y se someten a 1 ml de Hitrap Q con elución con CaCl₂ 10 mM.

3. Hitrap Q con gradiente de CaCl₂ (gradiente de sombra 0-10 mM). Las proteínas Gla purificadas en la etapa se aplicaron a Q y se eluyeron con un gradiente de CaCl₂ (hasta 10 mM). Se produjeron un total de 0,9 mg de proteína con un nivel de pureza del 95%. La FIG. 6 muestra las fracciones de purificación tanto en condiciones reductoras como no reductoras. Las FIG. 7 y 8 muestran diferentes ensayos de apoptosis basados en FACs. Ambas muestran que la construcción de Proteína S Gla + EGF es específica para las células que experimentan apoptosis como la Anexina V (FIG. 7), y que la Anexina V puede competir con la unión de Proteína S Gla + EGF.

En resumen, la Proteína S Gla + EGF se expresó y se purificó. El análisis del material purificado sugirió que estaba altamente gamma-carboxilado. Los ensayos de apoptosis basados en FACS demostraron que la Proteína S G + E (11 Gla) podía unirse a las células "apoptóticas", y que esta unión era a las células mediante la toma como diana de la fosfatidilserina, como lo demuestran los ensayos de competición con Anexina V.

Todos los métodos descritos y reivindicados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción.

VI. Referencias

Patente de EE.UU. 5.440.013

Patente de EE.UU. 5.446.128

Patente de EE.UU. 5.475.085

Patente de EE.UU. 5.597.457

Patente de EE.UU. 5.618.914

Patente de EE.UU. 5.670.155

Patente de EE.UU. 5.672.681

Patente de EE.UU. 5.674.976

Patente de EE.UU. 5.710.245

Patente de EE.UU. 5.790.421

Patente de EE.UU. 5.840.833

- Patente de EE.UU. 5.859.184
- Patente de EE.UU. 5.889.155
- Patente de EE.UU. 5.929.237
- Patente de EE.UU. 6.093.573
- 5 Patente de EE.UU. 6.261.569
- Solicitud de Patente de EE.UU. 2005/0015232
- Solicitud de Patente de EE.UU. 2004/001827A1
- Solicitud de Patente de EE.UU. 2003/104578A2
- Solicitud de Patente de EE.UU. 2003/104578A1
- 10 WO06096515A2
- WO07047504A2
- WO06096515A2
- Aaronson y Horvath, Science, 296 (5573): 1653-5, 2002.
- Abe y Kufe, Cancer Res., 49 (11): 2834-2839, 1989.
- 15 Agata et al., Cancer Res., 68: 6136-44, 2008.
- Ahmad et al., Cancer Res., 68: 2920-2926, 2008.
- Ahmad et al., J. Biol. Chem., 281: 35764-9, 2006.
- Ahmad et al., Nat. Cell Biol., 9: 1419-1427, 2007.
- Alvarez et al., Cancer Res., 65 (12): 5054-62, 2005.
- 20 Alvarez et al., Cancer Res., 66 (6): 3162-8, 2006.
- Anderson et al., Trends Immunol 27, 343-348, 2006.
- Ashkenazi y Chamow, Curr Op Immunol 9, 195-200, 1997.
- Baldus et al., Clin. Cancer Res., 10 (8): 2790-2796, 2004.
- Blankenberg, Proc Am Thorac Soc, 6, p 469-476, 2009.
- 25 Bodanszky et al., J. Antibiot., 29 (5): 549-53, 1976.
- Boersma et al., J Nuclear Med, 46 (12), p2035-2050, 2005.
- Bowman et al., Oncogene, 19 (21): 2474-88, 2000.
- Bromberg et al., Cell, 98 (3): 295-303, 1999.
- Buerger et al., J. Biol. Chem., 278 (39): 37610-21, 2003.
- 30 Carter, Nature Reviews Immunol 6, 343-357, 2006.
- Chapman, Advanced Drug Delivery Reviews 54, 531-545, 2002.
- Chaudhury et al., J Exper Med 197, 315-322, 2003.
- Chen y Greene, Mol. Cell. Biol. 5: 392-401, 2004.
- Cohen et al., J. Med. Chem., 33: 883-894, 1990.
- 35 Cohen et al., Cell Res, 19 p625-637, 2009.
- Duraisamy et al., Gene, 373: 28-34, 2006.
- Duttaroy et al., Diabetes 54, 251-258, 2005.

- Elliott et al., Nat Biotechnol 21, 414-421, 2003.
- Elliott et al., Nature, 461, p2-286, 2009.
- Elliott y Ravichandran, J. Cell Biol, 189 (7) p1059-1070, 2010.
- Erwig y Henson, Cell Death Differentiation 15, p243-250, 2008.
- 5 Fischer, Med. Res. Rev., 27 (6): 755-796, 2007.
- Gaemers et al., J. Biol. Chem., 276: 6191-6199, 2001.
- Gendler et al., J. Biol. Chem., 263: 12820-12823, 1988.
- Germain y Frank, Clin. Cancer Res., 13 (19): 5665-9, 2007.
- Gerondakis et al., Oncogene 25 (51): 6781-99, 2006.
- 10 Ghetie et al., Nature Biotechnol 15, 637-640, 1997.
- Ghosh et al., Annu. Rev. Cell. Dev. Biol., 16: 225-60, 1998.
- Gilmore, disponible en NF-kB.org, 2008.
- Grillot et al., J. Immunol., 158: 4750-7, 1997.
- Gronenborn et al., Anal. Chem., 62 (1): 2-15, 1990.
- 15 Hansson y Stenflo. J Thrombosis Hemostasis, 3, P2633-2648, 2005.
- Hayden y Ghosh, Cell, 132: 344-62, 2008.
- Hinton et al., J Immunol 176, 346-356, 2006.
- Hodel et al., Mol. Cell, 10 (2): 347-58, 2002.
- Hoffman et al., Oncogene, 25: 6706-16, 2006.
- 20 Huang et al., Cancer Biol Ther., 2: 702-706, 2003.
- Huang et al., Cancer Res., 65: 10413-10422, 2005.
- Huxford et al., Cell 95 (6): 759-70, 1998.
- Jackson, Seminars in Oncology, 24: L164-172, 1997.
- Jacobs et al., Cell, 95: 749-58, 1998.
- 25 Jain et al., Trends Biotechnol 25, 307-316, 2007.
- Johnson et al., En: Biotechnology And Pharmacy, Pezzuto et al. (Eds.), Chapman y Hall, NY, 1993.
- Jones et al., J. Med. Chem., 39: 904-917, 1996.
- Karin y Lin, Nat. Immunol., 3: 221-7, 2002.
- Kau et al., Nat. Rev. Cancer, 4 (2): 106-17, 2004.
- 30 Kawano et al., Cancer Res., 67: 11576-84, 2007.
- Keyt et al., Proc Natl Acad Sci USA 91, 3670-3674, 1994.
- Kietselaer et al., Netherlands Heart J, 10 (7/8), p313-317, (2002).
- Kinlough et al., J. Biol. Chem., 279 (51): 53071-53077, 2004.
- Kufe et al., Hybridoma, 3: 223-232, 1984.
- 35 Kurihara y otros, Appl Radiat Isot, 66 (9); p1175-1182, 2008.
- Lagow y Carson, J. Cell. Biochem., 86: 759-72, 2002.
- Lahorte et al., Eur J Nuclear Medicine Mol Imaging, 31 (6), p887-919, 2004.

- Lee et al., *Cancer Cell*, 15 (4): 283-293, 2009.
- Leng et al., *J. Biol. Chem.*, 282: 19321-19330, 2007.
- Levitan et al., *J. Biol. Chem.*, 280: 33374-33386, 2005.
- Levy y Shoseyov, *Biotechnol Advances* 20, 191-213, 2002.
- 5 Li et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2: 187-193, 2003b.
- Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276: 35239-35242, 2001.
- Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276: 6061-6064, 2001.
- Li et al., *Mol. Cancer Res.*, 1: 765-775, 2003c.
- Li et al., *Mol. Cell Biol.*, 18: 7216-7224, 1998.
- 10 Li et al., *Oncogene*, 22: 6107-6110, 2003a.
- Ligtenberg et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 6171-6177, 1992.
- Lin et al., *Amino Acids*, Publicado en Internet el 17 de marzo de 2010.
- Loose et al., *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007.
- Macao, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 71-76, 2006.
- 15 McPherson, *J. Biol. Chem.*, 251: 6300-6306, 1976.
- Melder et al., *Cancer Immunol Immunother* 54, 535-5475, 2005.
- Merlo et al., *Cancer Res.*, 49, 6966-6971, 1989.
- Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85: 2149-2154, 1963.
- Micheau y Tschopp, *Cell*, 114: 181-90, 2003.
- 20 Mimura et al., *Mol Immunol* 37, 697-706, 2000.
- Muthuswamy, *Nat. Cell Biol.*, 3 (9): 785-92, 2001.
- Naresh et al., *Cancer*, 91 (3), p578-548, 2001.
- Natoli et al., *Nat. Immunol.*, 6: 439-45, 2005.
- Navia et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2: 202-210, 1992.
- 25 Nelsestuen, *Trends Cardiovasc Med*, 9 (6), p162-167, 1999.
- Osborn et al., *J Pharmacol Experimental Therapeutics* 303, 540-548, 2002a.
- Osborn et al., *Eur J Pharmacol* 456, 149-158, 2002b.
- Pasparakis et al., *Cell Death Differ.* 13: 861-72, 2006.
- Solicitud PCT. PCT/US00/03745
- 30 Solicitud PCT, PCT/US00/14667
- Solicitud PCT, PCT/US99/11913
- Solicitud PCT, PCT/US99/18441
- Peptide Synthesis, 1985
- Percipalle et al., *J. Mol. Biol.*, (4): 722-32, 1997.
- 35 Perey et al., *Cancer Res.*, 52 (22): 6365-6370, 1992.
- Petkova et al., *International Immunol* 18, 1759-1769, 2006a.
- Protective Groups in Organic Chemistry, 1973

- Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, J. Cavanagh et al., Academic Press, San Diego, 1996.
- Raina et al., Direct targeting of the GLA DOMAIN oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.*, 2009 (EN PRENSA).
- Raina et al., *EMBO J.*, 25: 3774-3783, 2006.
- 5 Raina et al., *J. Biol. Chem.*, 279: 20607-20612, 2004.
- Raju y Scallon, *Biotechnol Prog* 23, 964-971, 2007.
- Raju y Scallon, *Biochem Biophys Res Commun* 341, 797-803, 2006.
- Ramasamy et al., *Mol. Cell*, 27: 992-1004, 2007.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., 1035-1038 y 1570-1580, 1990.
- 10 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., 3: 624-652, 1990.
- Ren et al., *Cancer Cell*, 5: 163-175, 2004.
- Ren et al., *J. Biol. Chem.*, 277: 17616-17622, 2002.
- Reutelingsperger et al., *J. Immunol Methods* 265, 123-132, 2002.
- Ryan y Wente, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 (3): 361-71, 2000.
- 15 Schneider-Brachert et al., *Immunity*, 21: 415-28, 2004.
- Schroeder et al., *J. Biol. Chem.*, 276 (16): 13057-13064 2001.
- Schroeder et al., *Oncogene*, 23: 5739-5747, 2004.
- Shah et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 95, p4229-4234, 1998.
- Shuai, *Oncogene*, 19 (21): 2638-44, 2000.
- 20 Siddiquee et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 104 (18): 7391-6, 2007.
- Siddiqui et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 85: 2320-2323, 1988.
- Sinclair y Elliott, *J Pharmaceutical Sci* 94, 1626-1635, 2005.
- Solid Phase Peptide Synthelia, 1984
- Song et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 102 (13): 4700-5, 2005.
- 25 Soule et al., *Cancer Res.*, 50 (18): 6075-6086, 1990.
- Suh y Gumbiner, *Exp. Cell Res.*, 290 (2): 447-56, 2003.
- Sung et al., *J Interferon Cytokine Res* 23, 25-36, 2003.
- Tait y Gibson. *Arch Biochem Biophys*. 298 (1), p187-191, 1992.
- Truscott et al., *J Cell Biol.*, 163 (4): 707-713, 2003.
- 30 Umana et al., *Nat Biotechnol* 17, 176-180, 1999.
- Vaccaro et al., *Nature Biotechnol* 23, 1283-1288, 2005.
- van den Eijnnde et al., *J Cell Science*, 114, p3631-3642, 2001.
- Vermeer et al., *Nature*, 422 (6929): 322-6, 2003.
- Veronese y Pasut, *Drug Discovery Today* 10, 1451-1458, 2005.
- 35 Webb et al., *J Immunol*, 169 p2580-2586, 2002.
- Weber, *Advances Protein Chem.*, 41: 1-36, 1991.
- Wegenka et al., *Mol. Cell Biol.*, 14 (5): 3186-96, 1994.

- Wei et al., Cancer Cell, 7: 167-178, 2005.
- Wei et al., Cancer Res., 67 (4): 1853-8, 2007.
- Wei et al., Mol. Cell., 21: 295-305, 2006.
- Weis, Cell, 112 (4): 441-51, 2003.
- 5 Wen et al., J. Biol. Chem., 278: 38029-38039, 2003.
- Wider, BioTechniques, 29: 1278-1294, 2000.
- Yamamoto et al., J. Biol. Chem., 272: 12492-12494, 1997.
- Yeh et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89, 1904-1908, 1992.
- Yin et al., J. Biol. Chem., 278: 35458-35464, 2003.
- 10 Yin et al., J. Biol. Chem., 279: 45721-45727, 2004.
- Yin et al., J. Biol. Chem., 282: 257-266, 2007.
- Young et al., Cell. 112 (1): 41-50, 2003.
- Yu et al., Seminars Thrombosis Hemostasis, 30 (1), p21-30, 2004.
- Yu y Jove, Nat. Rev. Cancer, 4 (2): 97-105, 2004.
- 15 Zhang et al., Mol. Cell. Biol., 19: 7138-7146, 1999.

Listado de secuencias

- 20 <110> Bayer Healthcare, LLC BAUZON, Maxine HERMISTON, Terry
- <120> DOMINIOS GLA COMO AGENTES TERAPÉUTICOS
- <130> BAYR.P0005WO
- 25 <140> Desconocido
- <141> 13-03-2013
- <150> 61/791.537
- <151> 15-03-2013
- 30 <150> 61/787.753
- <151> 15-03-2013
- <160> 6
- 35 <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- <211> 45
- 40 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Péptido sintético
- 45 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (6) .. (7)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 50 <220>
- <221> característica_misc
- <222> (14) .. (14)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 5 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (25) .. (26)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (29) .. (29)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (32) .. (32)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (36)..(36)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<400> 1

Ala Asn Ser Leu Leu Xaa Xaa Thr Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa
1 5 10 15

Cys Ile Xaa Xaa Leu Cys Asn Lys Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
20 25 30

Asn Asp Pro Xaa Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu
35 40 45

35 <210> 2
 <211> 46
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (7) .. (8)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 50 <222> (11) .. (11)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> característica_misc
 <222> (15) .. (15)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

5

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (17) .. (17)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

10

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (20) .. (21)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

15

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (26) .. (27)
 (27)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

20

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (30) .. (30)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

25

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (33) .. (33)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

30

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (35) .. (35)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

35

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (40) .. (40)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

40

<400> 2

Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Xaa Xaa Leu Phe Xaa Gly Asn Leu Xaa Lys
1 5 10 15

Xaa Cys Tyr Xaa Xaa Ile Cys Val Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe
20 25 30

Xaa Asn Xaa Val Val Thr Asp Xaa Phe Trp Arg Arg Tyr Lys
35 40 45

<210> 3
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45

<220>
 <223> Péptido sintético

50

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (6) .. (7)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 5 <222> (14) .. (14)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 10 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 15 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 20 <222> (25) .. (26)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 25 <222> (29) ..(29)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 30 <222> (32) .. (32)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<400> 3

Ala	Asn	Thr	Phe	Leu	Xaa	Xaa	Val	Arg	Lys	Gly	Asn	Leu	Xaa	Arg	Xaa
1				5					10					15	

Cys	Val	Xaa	Xaa	Thr	Cys	Ser	Tyr	Xaa	Xaa	Ala	Phe	Xaa	Ala	Leu	Xaa
				20				25					30		

Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Asp	Val	Phe	Trp	Ala	Lys	Tyr	Thr
		35					40					45

35 <210> 4
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Péptido sintético

<220>
 <221> característica_misc
 45 <222> (6) .. (7)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 50 <222> (14) .. (14)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> característica_misc
 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

5 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

10 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25) .. (26)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

15 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (29) .. (29)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

20 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (35) .. (35)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

25 <400> 4

Ala	Asn	Ala	Phe	Leu	Xaa	Xaa	Leu	Arg	Pro	Gly	Ser	Leu	Xaa	Arg	Xaa	
1				5					10					15		
	Cys	Lys	Xaa	Xaa	Gln	Cys	Ser	Phe	Xaa	Xaa	Ala	Arg	Xaa	Ile	Phe	Lys
				20					25					30		
	Asp	Ala	Xaa	Arg	Thr	Lys	Leu	Phe	Trp	Ile	Ser	Tyr	Ser			
				35				40					45			

<210> 5
 <211> 45
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Péptido sintético

35 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (6) .. (7)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

40 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (14) .. (14)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

45 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

50 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>
 <221> característica_misc
 <222> (25) .. (26)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 5
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (29) .. (29)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 10
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (32) .. (32)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 15
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (35) .. (35)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 20
 <400> 5
 Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
 1 5 10 15
 Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Xaa
 20 25 30
 Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser
 35 40 45
 <210> 6
 <211> 250
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 25
 <220>
 <223> Péptido sintético
 30
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (6) .. (7)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 35
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (14) .. (14)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 40
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 45
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 50
 <220>
 <221> característica_misc
 <222> (25) .. (26)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> característica_misc

5 <222> (29) .. (29)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> característica_misc

10 <222> (32) .. (32)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

<220>

<221> característica_misc

15 <222> (36) .. (36)

<223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

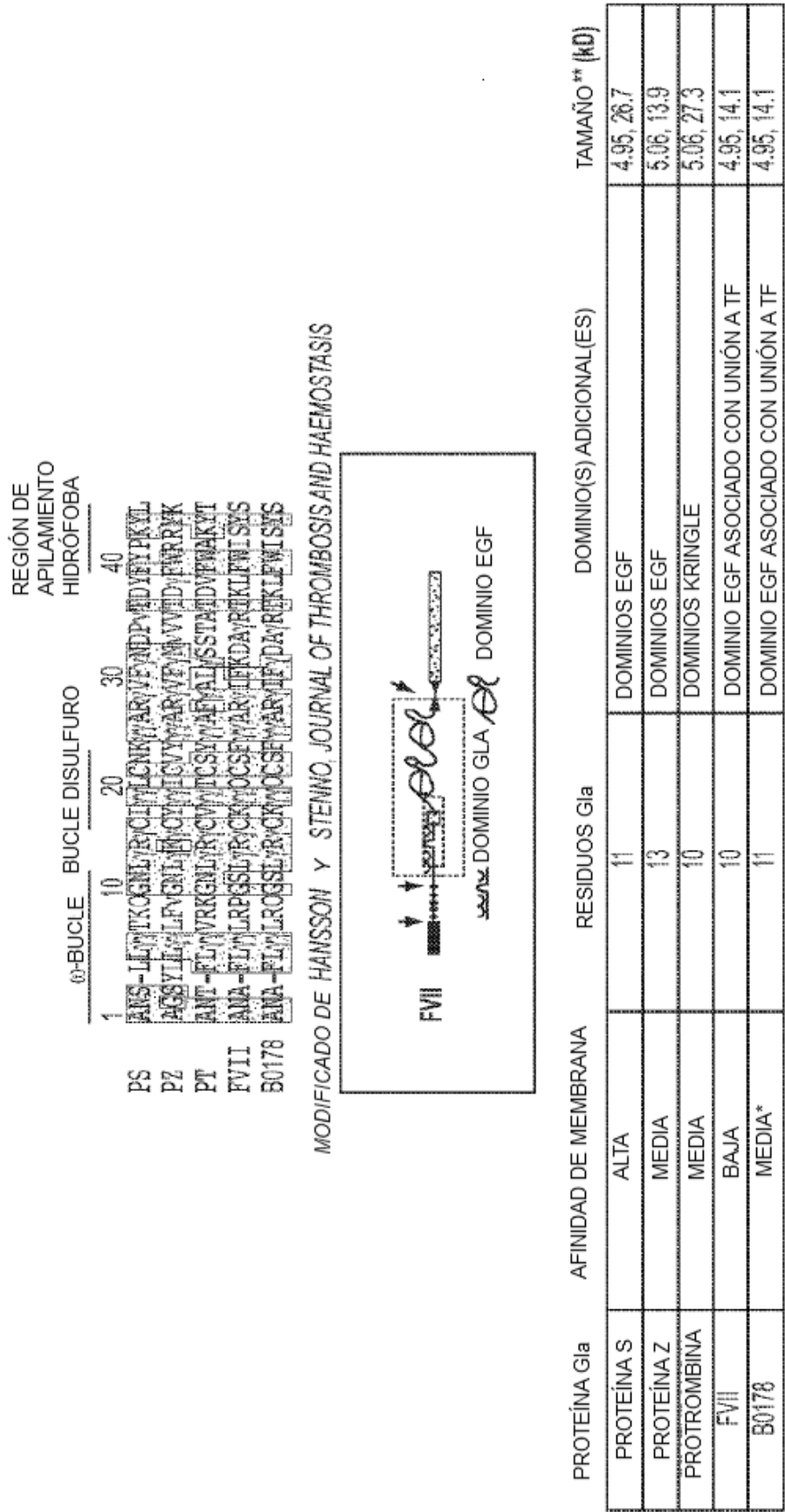
<400> 6

ES 2 728 863 T3

Ala	Asn	Ser	Leu	Leu	Xaa	Xaa	Thr	Lys	Gln	Gly	Asn	Leu	Xaa	Arg	Xaa
1				5					10						15
Cys	Ile	Xaa	Xaa	Leu	Cys	Asn	Lys	Xaa	Xaa	Ala	Arg	Xaa	Val	Phe	Xaa
			20					25					30		
Asn	Asp	Pro	Xaa	Thr	Asp	Tyr	Phe	Tyr	Pro	Lys	Tyr	Leu	Val	Cys	Leu
		35					40					45			
Arg	Ser	Phe	Gln	Thr	Gly	Leu	Phe	Thr	Ala	Ala	Arg	Gln	Ser	Thr	Asn
	50					55					60				
Ala	Tyr	Pro	Asp	Leu	Arg	Ser	Cys	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Asp	Gln	Cys
65					70					75					80
Ser	Pro	Leu	Pro	Cys	Asn	Glu	Asp	Gly	Tyr	Met	Ser	Cys	Lys	Asp	Gly
				85					90					95	
Lys	Ala	Ser	Phe	Thr	Cys	Thr	Cys	Lys	Pro	Gly	Trp	Gln	Gly	Glu	Lys
			100					105					110		
Cys	Glu	Phe	Asp	Ile	Asn	Glu	Cys	Lys	Asp	Pro	Ser	Asn	Ile	Asn	Gly
		115					120					125			
Gly	Cys	Ser	Gln	Ile	Cys	Asp	Asn	Thr	Pro	Gly	Ser	Tyr	His	Cys	Ser
	130					135					140				
Cys	Lys	Asn	Gly	Phe	Val	Met	Leu	Ser	Asn	Lys	Lys	Asp	Cys	Lys	Asp
145					150					155					160
Val	Asp	Glu	Cys	Ser	Leu	Lys	Pro	Ser	Ile	Cys	Gly	Thr	Ala	Val	Cys
				165					170					175	
Lys	Asn	Ile	Pro	Gly	Asp	Phe	Glu	Cys	Glu	Cys	Pro	Glu	Gly	Tyr	Arg
			180					185					190		
Tyr	Asn	Leu	Lys	Ser	Lys	Ser	Cys	Glu	Asp	Ile	Asp	Glu	Cys	Ser	Glu
		195					200					205			
Asn	Met	Cys	Ala	Gln	Leu	Cys	Val	Asn	Tyr	Pro	Gly	Gly	Tyr	Thr	Cys
	210					215					220				
Tyr	Cys	Asp	Gly	Lys	Lys	Gly	Phe	Lys	Leu	Ala	Gln	Asp	Gln	Lys	Ser
225					230					235					240
Cys	Glu	Ser	Arg	His	His	His	His	His	His						
				245					250						

REIVINDICACIONES

1. Un método para tomar como diana la fosfatidilserina de la membrana celular, que comprende:
 - a. proporcionar un polipéptido aislado de 4,5 a 30 kD de tamaño que comprende un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) con 5-15 residuos de Gla, un dominio EGF de proteína S y que carece de un dominio de proteasa o de unión a hormonas; y
 - b. poner en contacto dicho péptido con una superficie celular in vitro o ex vivo,en donde dicho polipéptido se une a la fosfatidilserina en dicha membrana celular.
2. El método de la reivindicación 1, en donde dicha membrana celular comprende una membrana celular cardíaca, una membrana celular neuronal, una membrana celular endotelial, una membrana celular infectada por virus, una membrana celular apoptótica, una membrana plaquetaria o una membrana celular cancerosa.
3. El método de las reivindicaciones 1 o 2, en donde dicho polipéptido comprende además un marcador detectable, en donde dicho marcador detectable comprende un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un radiomarcador, una enzima, un colorante o un ligando.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde dicho polipéptido comprende 300 residuos o menos.
5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido comprende de 1-5 enlaces disulfuro.
6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde dicho polipéptido comprende además una región Fc de anticuerpo.
7. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el dominio GLA es de la proteína S.
8. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el dominio GLA tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.
9. El método según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 6.



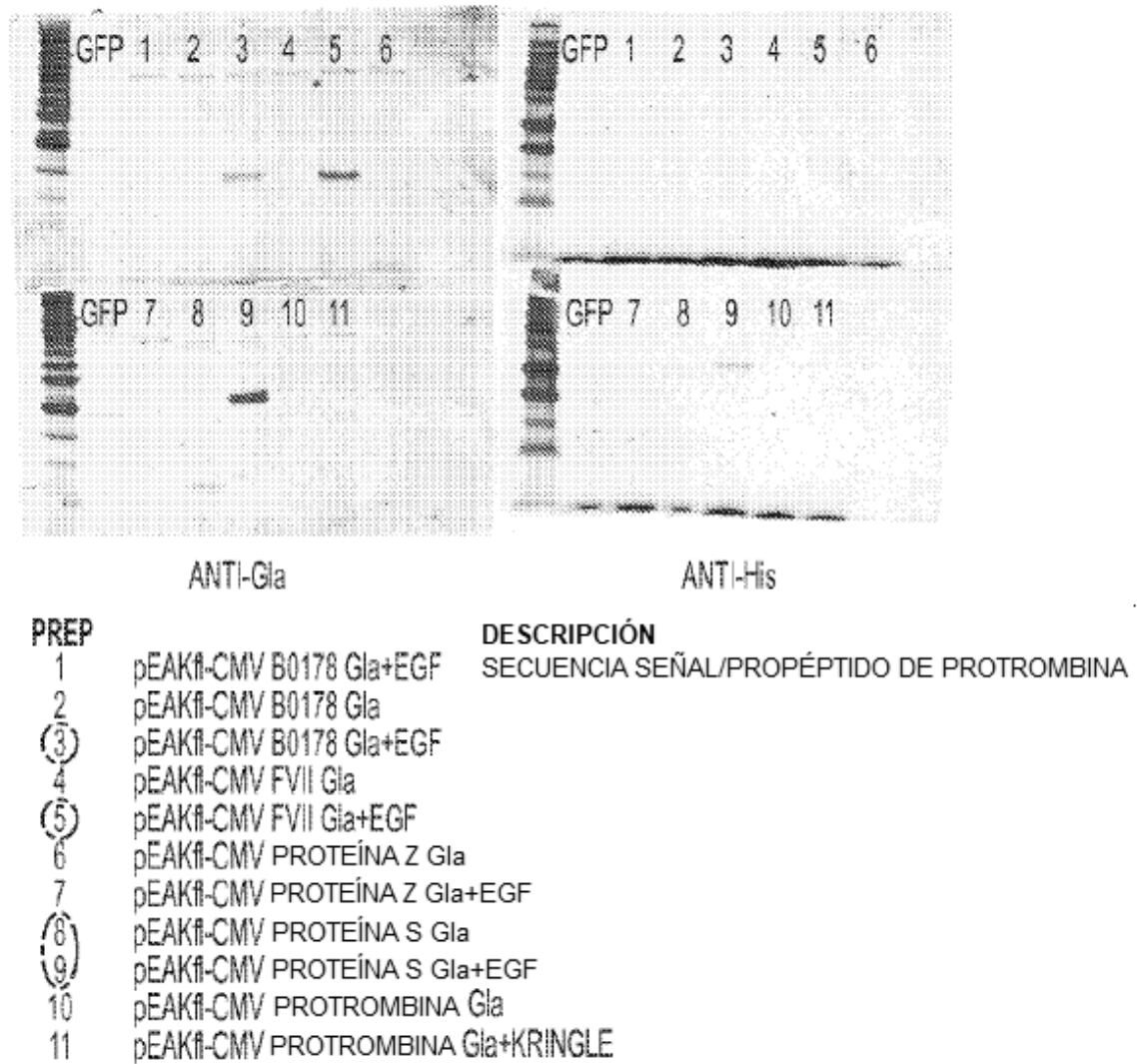
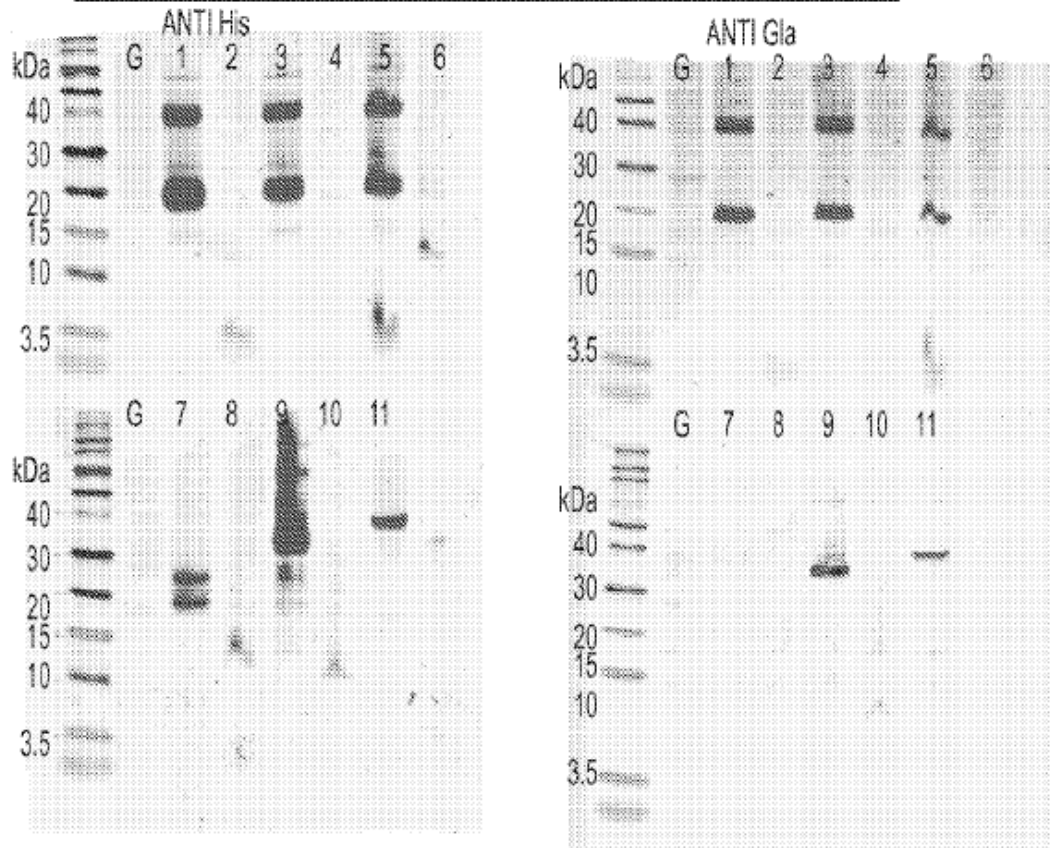


FIG. 2

PROTEÍNA Gla	DOMINIO Gla SOLO (kDa)	Gla+EGF/KRINGLE (kDa)
B0178	6.5	15.4
FVII	6.5	15.4
PROTEÍNA Z	6.7	15.3
PROTEÍNA S	6.4	28
PROTROMBINA	6.3	28.5



20 ul DE MUESTRA (1/100 DE SEDIMENTO CELULAR TOTAL) CARGADOS

PREP	DESCRIPCIÓN
1	pEAKfl-CMV B0178 Gla+EGF SECUENCIA SEÑAL/PROPÉPTIDO DE PROTROMBINA
2	pEAKfl-CMV B0178 Gla
3	pEAKfl-CMV B0178 Gla+EGF
4	pEAKfl-CMV FVII Gla
5	pEAKfl-CMV FVII Gla+EGF
6	pEAKfl-CMV PROTEÍNA Z Gla
7	pEAKfl-CMV PROTEÍNA Z Gla+EGF
8	pEAKfl-CMV PROTEÍNA S Gla
9	pEAKfl-CMV PROTEÍNA S Gla+EGF
10	pEAKfl-CMV PROTROMBINA Gla
11	pEAKfl-CMV PROTROMBINA Gla+KRINGLE

FIG. 3

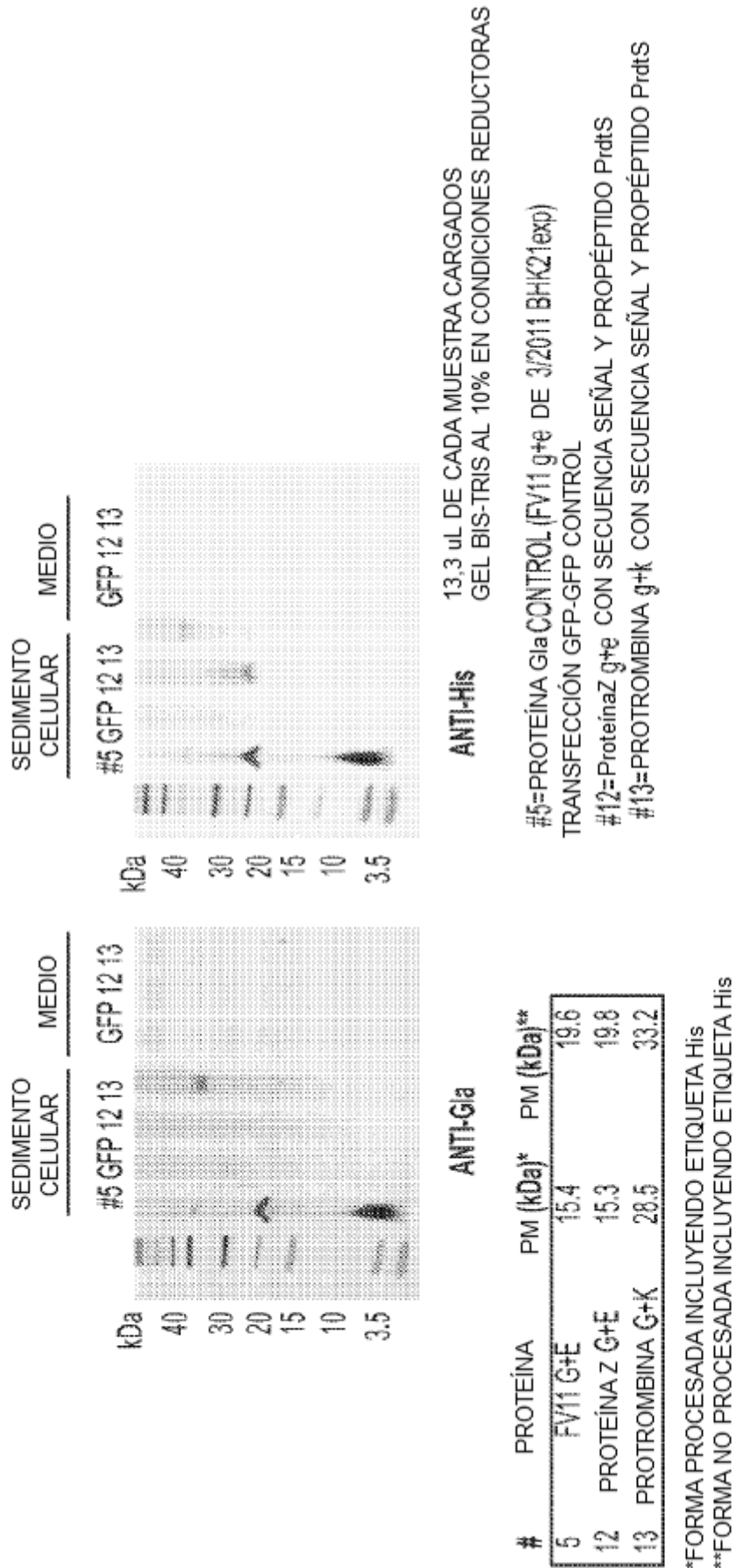


FIG. 4

1 11 21 31 41 51 61 71
 ANSLLEETKQ GNLRECTEE LONKEEAREV FENDEPTDYF YPKYLVCLRS FQTGLFTAAR QSTNAYPDLR SCVNAIPDQC
 81 91 101 111 121 131 141 151
 SPLPCNEDGY MSCDKGASF TCTCKPGWQG EKCEFDINEC KDPSNINGGC SQICDNTPGS YHSCCKNGFV MLSNKKDKCD
 161 171 181 191 201 211 221 231
 VDECSLKPSI CGTAVCKNIP GDFECECEPEG YRYNLKSKSC EDIDECSENM CAQLCVNYPG GYTCTYCDGKK GFKLAQDQKS

241

CESRHHHHHH

MPT:

γ-CARBOXILACIÓN: 11Gla

D95: HIDROXILACIÓN

ENLACE DISULFURO: POSIBLE 14, REPORTADOS 16

ETIQUETA: 6xHis

FIG. 5

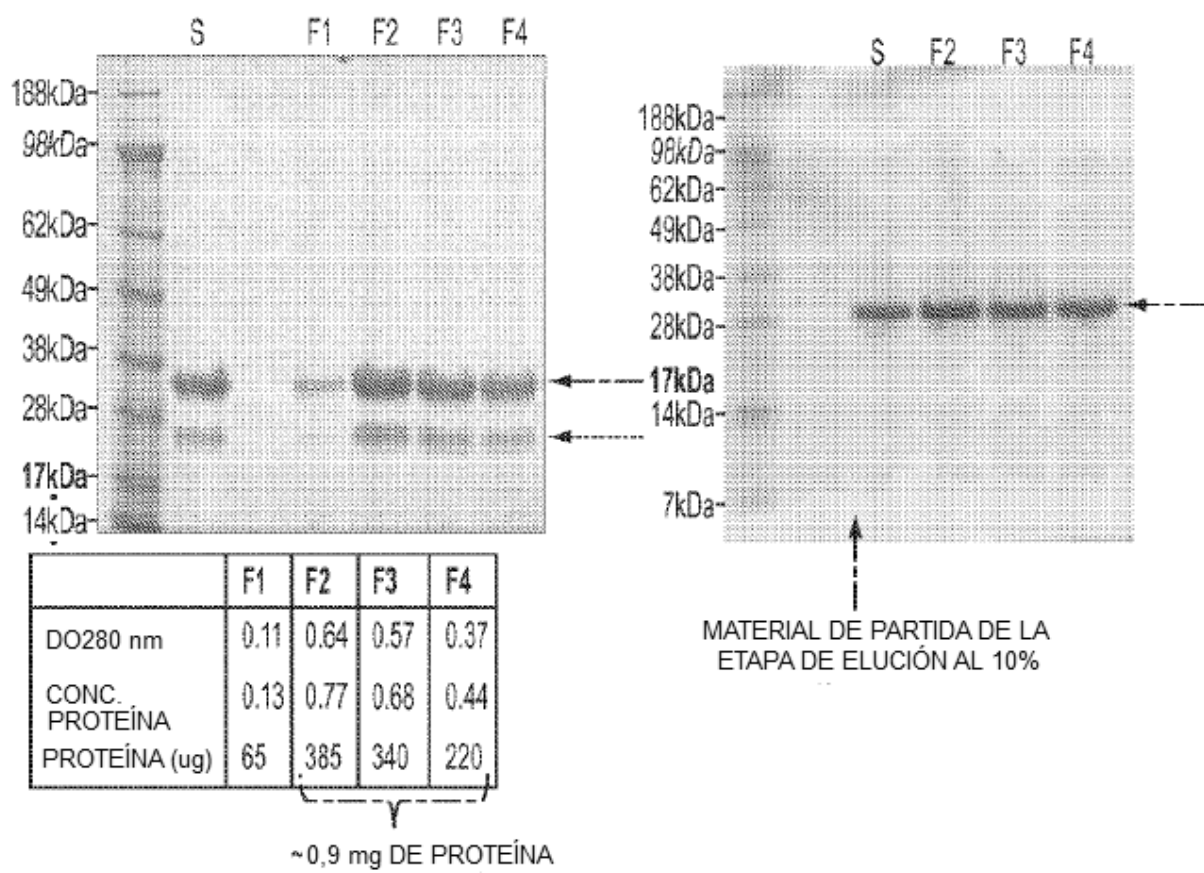


FIG. 6

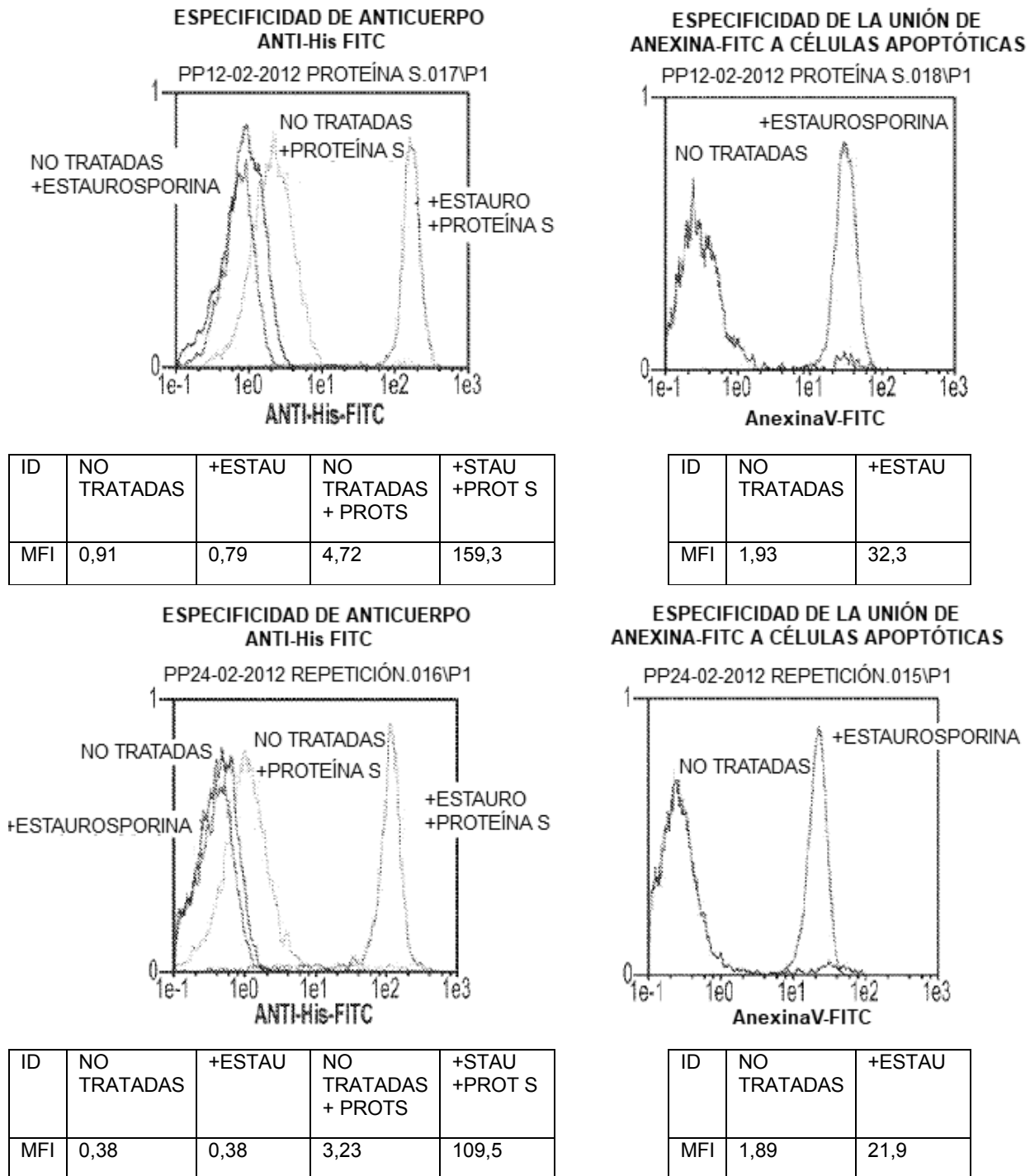
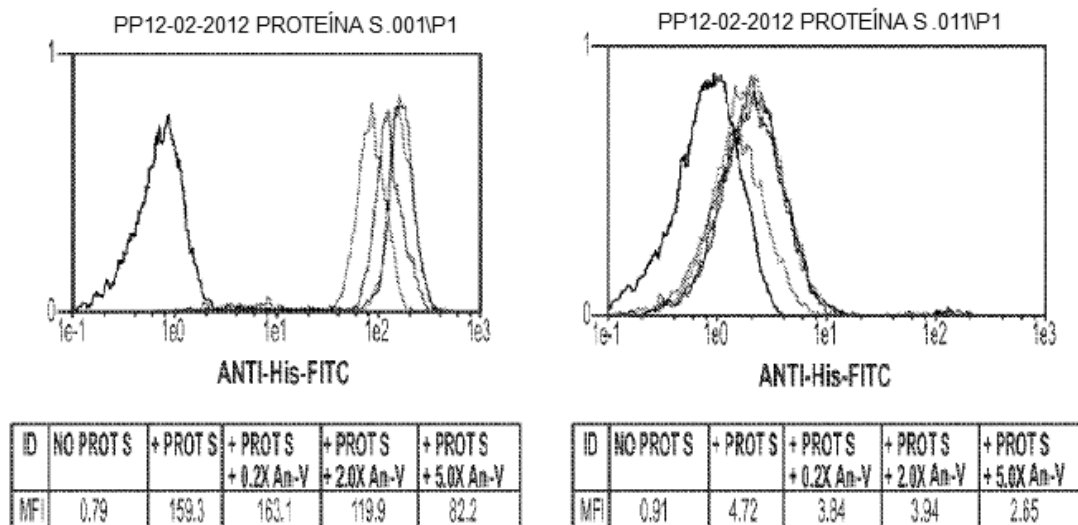


FIG. 7

LA ANEXINA V DESPLAZA LA UNIÓN DE LA PROTEÍNA S A CÉLULAS JURKAT TRATADAS CON ESTAUROSPORINA LA UNIÓN DÉBIL DE LA PROTEÍNA S A JURKAT NO TRATADAS TAMBIÉN ES DESPLAZADA POR LA ANEXINA V



LA ANEXINA V DESPLAZA LA UNIÓN DE LA PROTEÍNA S A CÉLULAS JURKAT TRATADAS CON ESTAUROSPORINA LA UNIÓN DÉBIL DE LA PROTEÍNA S A JURKAT NO TRATADAS TAMBIÉN ES DESPLAZADA POR LA ANEXINA V

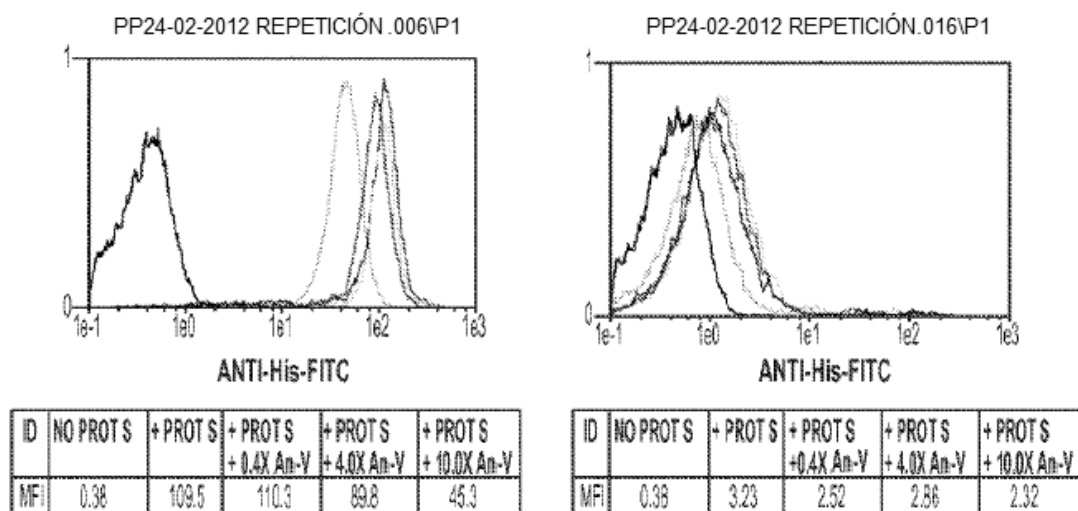


FIG. 8