

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 756 532**

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/US2014/025940**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.09.2014 WO14151535**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14770639 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 2970429**

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

30 Prioridad:

15.03.2013 US 201361791537 P

15.03.2013 US 201361787753 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
27.04.2020

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 2 756 532 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 de direccionamiento

Antecedentes

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º de serie 61/787.753, presentada el 15 de marzo de 2013 y de la Solicitud Provisional de los EE. UU. N.º de serie 61/791.537, presentada el 15 de marzo de 2013.

1. Campo

10 Esta descripción se refiere al direccionamiento 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 de diagnóstico y terapéuticos.

2. Técnica relacionada

15 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 (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).

30 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 (Kd = 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 analizan la toma como diana de fosfatidilserina para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas (Apoptosis; An International Journal on Programmed Cell Death, vol. 12, N.º 9, 4 de mayo de 2010, páginas 1072-1082. Mingdong Huang et al analizan 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.

45 Schutters et al (Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death Vol. 15, N.º 9, 4 de mayo 2010 (2010-05-04), páginas 1072-1082) discute la toma como diana de fosfatidilserina para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas.

Huang et al (Nature Structural Biology Vol. 10, N.º 9, 1 de septiembre de 2003, páginas 751-756) discute la base estructural de la unión a membrana de dominios Gla de proteínas dependientes de la vitamina K.

El documento US2003/220490 describe ciertos fármacos que están dirigidos a membranas celulares. El documento US2009/098103 describe polipéptidos del factor VII modificados y usos de los mismos.

50 Compendio

Por lo tanto, según la presente descripción, se proporciona un polipéptido aislado de 4,5 a 30 kD de tamaño que comprende:

un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) de la proteína S con 5-15 residuos de Gla,

un dominio EGF de proteína S, y

que carece de un dominio de proteasa o de unión a hormona,

en donde dicho polipéptido está unido a una carga útil de agente terapéutico para uso en el tratamiento del cáncer.

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. El polipéptido puede comprender además un agente terapéutico, tal como un agente anticancerígeno, incluyendo un quimioterapéutico, un radioterapéutico, una citoquina, una hormona, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o una toxina, o un agente antiviral. El agente terapéutico puede ser una enzima, tal como una enzima conversora de profármaco, una citoquina, factor de crecimiento, factor de coagulación, o anticoagulante. 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 puede comprender 5-15 residuos de Gla, 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. El polipéptido puede comprender al menos un enlace disulfuro, o 2-5 enlaces disulfuro. El polipéptido puede comprender una región Fc de anticuerpo.

El tratamiento del cáncer en un sujeto comprende administrar al sujeto un polipéptido aislado que comprende un dominio de ácido carboxiglutámico (Gla) y que carece de un dominio de proteasa o de unión a hormonas, en donde el polipéptido está unido a una carga útil de agente terapéutico. La carga útil de agente terapéutico puede ser un quimioterapéutico, un radioterapéutico o una toxina. El cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer rectal, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de hígado, cáncer pancreático, cáncer de cabeza y cuello o cáncer esofágico.

Se contempla que cualquier método o composición descrito en la presente memoria puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición escrito en la presente memoria.

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

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.

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 Gla + EGF.

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.

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 de realizaciones ilustrativas

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.

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 para su uso como un agente terapéutico. Estos y otros aspectos de la descripción se describen 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, incluyendo cualquier 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 poliacrilamida 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 empleados en 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 = $N.^{\circ}$ 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 invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-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):

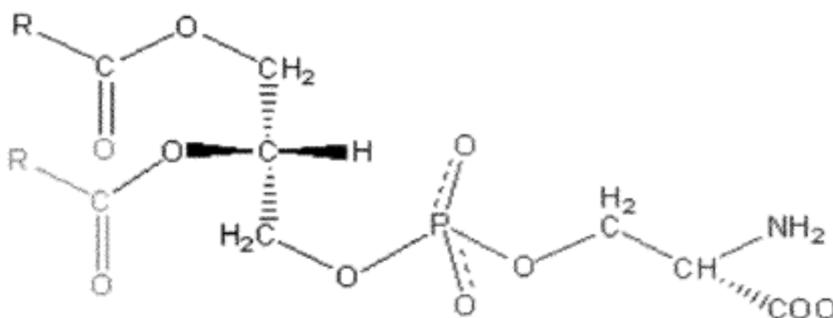
189-191). En una alineación de secuencia, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. El resultado de la alineación de secuencia global es en porcentaje de identidad. Los parámetros que se pueden usar en una alineación CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de 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

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 C₁₃H₂₄NO₁₀P y tiene una masa molecular de 385,304. La estructura se muestra a continuación:



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.

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".

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.

Tradicionalmente, los suplementos de PtdS derivaban de la corteza bovina (BC-PS); sin embargo, debido a la transferencia potencial de enfermedades infecciosas, la PS derivada de soja (SPS) 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.

5 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.

10 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

A. Dominios Gla

15 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.

30 B. Proteínas que contienen el dominio Gla

1. Factor II

35 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.

40 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-glutamil 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 plasmáticas.

45 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.

50 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.

55 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

5 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).

10 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, Xlla 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.

20 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

30 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 Ca²⁺, 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.

40 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 Ca(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.

45 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

55 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 rinde la trombina activa. Este proceso se optimiza cuando el factor Xa forma un complejo con el co-factor 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.

- 5 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.

- 10 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.
- 15 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.

- 20 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.

- 25 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.
- 30 Este gran estallido de trombina es responsable de la polimerización de la fibrina para formar un trombo.
- 35

- 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.
- 40

- 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.
- 45

5. Proteína S

- 50 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.

- 55 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.

5 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 10 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.

15 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.

20 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.

35 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 40 20.000 individuos. No se han detectado sesgos raciales ni étnicos.

45 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 inactive 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.

50 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.

55 C. Péptidos y polipéptido con dominio Gla

La presente descripción contempla el diseño, la producción y el uso de diversos péptidos y 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 pueden contener residuos de dominio no Gla adicionales, tales como dominios EGF, dominios Kringle, dominios Fc, etc.

5 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.

10 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 péptidoglicano 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 dextrorrotario; el L-gliceraldehído es levorrotario).

15 Una forma de un péptido "todo D" es un péptido retroinverso. 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 US6.261.569.

D. Síntesis

25 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.

35 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.

45 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 US5.889.155. 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 WO06096515A2), albúmina, hormona del crecimiento (Publicación de Patente de los EE. UU. 2003104578AA); 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, WO06096515A2, y WO07047504A2).

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 Scallon, 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 Scallon, 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, así como 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 péptidos y polipéptidos de la presente descripción pueden conjugarse con marcadores para fines de diagnóstico, tal como para identificar células cancerosas o células infectadas por virus, incluyendo su uso en histoquímica. 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}Tc y/o el ¹¹¹In 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}Tc mediante un proceso de intercambio de ligandos, por ejemplo, reduciendo el pertecnato con una disolución estañosa, quelando el ^{99m}Tc 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 ftalato 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 etilen diaminotetracético (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 US3.817.837, US3.850.752, US3.939.350, US3.996.345, US4.277.437, US4.275.149 y US4.366.241.

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 α -difenilglicoril-3 unido al anticuerpo (US4.472.509 y US4.938.948). 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.

IV. Diagnóstico y terapias

A. Formulaciones farmacéuticas y rutas de administración

Cuando se contemplan aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto conllevará preparar composiciones que carecen esencialmente de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para los seres humanos o los animales.

Generalmente, se deseará emplear sales y tampones apropiados para hacer que los vectores de administración sean estables y para permitir la captación por las células diana. Los tampones también se emplearán cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente descripción comprenden una cantidad efectiva del vector para las células, disuelto o dispersado en un vehículo o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones también se refieren como inóculos. La expresión "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas, u otras no deseadas cuando se administran a un animal o a un ser humano. Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es muy conocido en la técnica. Excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente descripción, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios.

Las composiciones activas de la presente descripción pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones según la presente descripción será a través de cualquier ruta común, siempre que el tejido diana esté disponible a través de esa ruta. Dichas rutas incluyen la ruta oral, nasal, bucal, rectal, vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal o intravenosa. Dichas composiciones se administrarán normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas *supra*.

Los compuestos activos también pueden administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las disoluciones de los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua mezclados adecuadamente con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilen glicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. Bajo condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en el que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse frente a la acción contaminante de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilen glicol, y polietilen glicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión o por el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede llevarse a cabo con diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de

sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo por el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros ingredientes como se ha enumerado anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando los diversos ingredientes activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación preferidos son técnicas de secado en vacío y liofilización que rinden un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una disolución del mismo esterilizada por filtración previamente.

Tal y como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticas activas es muy conocido en la técnica. Excepto cuando cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el ingrediente activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse ingredientes activos suplementarios.

Para la administración oral, los péptidos y polipéptidos de la presente descripción pueden incorporarse con excipientes y usarse en la forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Un enjuague bucal puede prepararse incorporando el ingrediente activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado, tal como una disolución de borato de sodio (Disolución de Dobell). Alternativamente, el ingrediente activo puede incorporarse en un enjuague antiséptico que contiene borato de sodio, glicerina y bicarbonato de potasio. El ingrediente activo también puede dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y suspensiones de sólidos. El ingrediente activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente efectiva a una pasta dentífrica que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes saporíferos, agentes espumantes, y humectantes.

Las composiciones de la presente descripción pueden formularse en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico y fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico, y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio, o férrico, y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Después de la formulación, las disoluciones se administrarán de una manera compatible con la formulación de la dosificación y en una cantidad tal que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosificación tales como disoluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármaco y similares. Para la administración parenteral en una disolución acuosa, por ejemplo, la disolución debería estar tamponada adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse isotónico en primer lugar con suficiente disolución salina o glucosa. Estas disoluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea o intraperitoneal. A este respecto, los medios acuosos estériles que pueden empujarse serán conocidos para los expertos en la técnica a la vista de la presente descripción. Por ejemplo, una dosificación podría disolverse en 1 ml de disolución de NaCl isotónica y añadirse a 1.000 ml de fluido de hipodermoclasia o inyectarse en el sitio de infusión propuesto, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª Edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiere la Oficina de la FDA de Estándares biológicos.

B. Estados de enfermedad y afecciones

1. Cáncer

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.

El cáncer se puede detectar de varias maneras, incluida la presencia de ciertos signos y síntomas, ensayos de cribado o imaginología 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.

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.

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.

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.

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.

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.

C. Métodos de tratamiento

Los polipéptidos pueden administrarse a sujetos mamíferos (p. ej., pacientes humanos) solos o conjuntamente con otros fármacos que tratan las enfermedades mostradas anteriormente. La dosificación requerida depende de la elección de la ruta de administración; de la naturaleza de la formulación, incluyendo agentes adicionales unidos al polipéptido; de la naturaleza de la enfermedad del paciente; del tamaño, peso, área superficial, edad y sexo del sujeto; de las terapias de combinación adicionales; y del criterio del médico responsable. Las dosificaciones adecuadas están en el rango de 0,0001-100 mg/kg. Se esperan amplias variaciones en la dosificación necesaria a la vista de la variedad de compuestos disponibles y de las diferentes eficacias de las diversas rutas de administración. Por ejemplo, se esperaría que la administración oral requiera dosificaciones más altas que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse usando rutinas empíricas estándar para la optimización, como se entiende bien en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (p. ej., 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150, o más veces). La encapsulación del polipéptido en un vehículo de administración adecuado (p. ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede incrementar la eficiencia de la administración, particularmente para la administración oral.

Las proteínas con dominio Gla preparado por ingeniería pueden usarse como agentes de direccionamiento para administrar cargas útiles de agente terapéutico a las células cancerosas, tales como radionúclidos, agentes quimioterapéuticos o toxinas. Los quimioterapéuticos específicos incluyen temozolomida, epotilonas, melfalán, carmustina, busulfán, lomustina, ciclofosfamida, dacarbazina, polifeprosán, ifosfamida, clorambucilo, mecloretamina, busulfán, ciclofosfamida, carboplatino, cisplatino, tiotepa, capecitabina, estreptozocina, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de leuprolido, hidroclicloruro doxorubicina, sulfato de bleomicina, hidroclicloruro de daunorrubicina, dactinomicina, citrato de daunorrubicina liposomal, hidroclicloruro de doxorubicina liposomal, hidroclicloruro de epirubicina, hidroclicloruro de idarrubicina, mitomicina, doxorubicina, valrubicina, anastrozol, citrato de toremifeno,

5 citarabina, fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, interferón α -2b, plicamicina, mercaptopurina, metotrexato, interferón α -2a, acetato de medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, estradiol, acetato de leuprolidol, acetato de megestrol, acetato de octreótido, difosfato de deitilestilbestrol, testolactona, acetato de goserelina, fosfato de etopósido, sulfato de vincristina, etopósido, vinblastina, etopósido, sulfato de vincristina, tenipósido, trastuzumab, gemtuzumab ozogamicina, rituximab, exemestano, hidroclicloruro de irinotecán, asparaginasa, hidroclicloruro de gemcitabina, altretamina, hidroclicloruro de topotecán, hidroxiourea, cladribina, mitotán, hidroclicloruro de procarbazona, tartrato de vinorelbina, pentostatina sódica, mitoxantrona, pegaspargasa, denileuquina difitix, altretinoína, porfimer, bexaroteno, paclitaxel, docetaxel, trióxido de arsénico, o tretinoína. Las toxinas incluyen exotoxina de *Pseudomonas* (PE38), cadena A de ricina, toxina de la difteria, además de PE y RT, Proteína antiviral fitolaca (PAP), saporina y gelonina. Los radionúclidos para la terapia del cáncer incluyen Y-90, P-32, I-131, In-111, Sr-89, Re-186, Sm-153, y Sn-117m.

15 Los agentes o factores adecuados para la terapia frente a las infecciones virales incluyen Abacavir, Aciclovir, Aciclovir, Adefovir, Amantadina, Amprenavir, Ampligen, Arbidol, Atazanavir, Atripla, Bocepreviret, Cidofovir, Combivir, Darunavir, Delavirdina, Didanosina, Docosanol, Edoxudina, Efavirenz, Emtricitabina, Enfuvirtida, Entecavir, inhibidores de la entrada, Famciclovir, Fomivirsén, Fosamprenavir, Fosarnet, Fosfonet, Ganciclovir, Ibacitabina, Imunovir, Idoxuridina, Imiquimod, Indinavir, Inosina, Inhibidor de la Integrasa, Interferón tipo III, Interferón tipo II, Interferón tipo I, Interferón, Lamivudina, Lopinavir, Lovirida, Maraviroc, Moroxidina, Metisazona, Nelfinavir, Nevirapina, Nexavir, Análogos de nucleósidos, Oseltamivir, Peginterferón alfa-2a, Penciclovir, Peramivir, Pleconaril, Podofilotoxina, Inhibidor de proteasa, Raltegravir, Inhibidor de la transcriptasa inversa, Ribavirina, Rimantadina, Ritonavir, Piramidina, Saquinavir, Estavudina, Potenciador sinérgico (antiretroviral), Aceite del árbol del té, Telaprevir, Tenofovir, Tenofovir disoproxil, Tipranavir, Trifluridina, Trizivir, Tromantadina, Truvada, Valaciclovir, Valganciclovir, Vicriviroc, Vidarabina, Viramidina, Zalcitabina, Zanamivir y Zidovudina.

25 Se deriva al experto en la técnica a "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª Edición, capítulo 33, en particular a las páginas 624-652. Se producirá necesariamente alguna variación en la dosificación dependiendo de la afección del sujeto que se está tratando. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis apropiada para el sujeto individual. Además, para la administración a seres humanos, las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según requiere la Oficina de la FDA de Estándares biológicos.

V. Ejemplos

30 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar las realizaciones particulares 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 sin apartarse del espíritu y alcance de la descripción.

Ejemplo 1

40 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.

45 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.

55 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:

- 5 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.
- 10 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
- 15 (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.

- 20 Todas las composiciones y/o métodos descritos y reivindicados en la presente memoria pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente descripción. Aunque las composiciones y métodos de esta descripción se han descrito en términos de realizaciones preferidas, será evidente para los expertos en la técnica que pueden aplicarse variaciones a las composiciones y/o métodos y en las etapas o en la secuencia de etapas del método descrito en la presente memoria sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la descripción. Más específicamente,
- 25 será evidente que ciertos agentes que están relacionados tanto químicamente como fisiológicamente pueden sustituirse por los agentes descritos en la presente memoria mientras se consiguen resultados iguales o similares. Se considera que todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica están dentro del espíritu, alcance y concepto de la descripción como se define por las reivindicaciones adjuntas.

VI. Referencias

- 30 Las siguientes referencias, en la medida en la que proporcionan detalles ejemplares del procedimiento u otros suplementarios a los mostrados en la presente memoria, son específicamente
- US5.440.013, US5.446.128, US5.475,085, US5.597,457, US5.618.914, US5.670.155, US5.672.681, US5.674.976, US5.710,245, US5.790.421, US5.840,833, US5.859,184, US5.889.155, US5.929.237, US6.093.573, US6.261.569, US2005/0015232, US2004/001827A1, US2003/104578A2, US2003/104578A1, WO06096515A2, WO07047504A2,
- 35 WO06096515A2
- Aaronson y Horvath, Science, 296 (5573): 1653-5, 2002.
- Abe y Kufe, Cancer Res., 49 (11): 2834-2839, 1989.
- Agata et al., Cancer Res., 68: 6136-44, 2008.
- Ahmad et al., Cancer Res., 68: 2920-2926, 2008.
- 40 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.
- Alvarez et al., Cancer Res., 66 (6): 3162-8, 2006.
- Anderson et al., Trends Immunol 27, 343-348, 2006.
- 45 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.
- 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.
- 5 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.
- 10 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.
- 15 Elliott y Ravichandran, *J. Cell Biol*, 189 (7) p1059-1070, 2010.
- Erwig y Henson, *Cell Death Differentiation* 15, p243-250, 2008.
- 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.
- 20 Germain y Frank, *Clin. Cancer Res.*, 13 (19): 5665-9, 2007.
- Gerondakis et al., *Oncogene* 25 (51): 6781-99, 2006.
- 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.
- 25 Grillot et al., *J. Immunol.*, 158: 4750-7, 1997.
- Gronenborn et al., *Anal. Chem.*, 62 (1): 2-15, 1990.
- 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.
- 30 Hodel et al., *Mol. Cell*, 10 (2): 347-58, 2002.
- Hoffman et al., *Oncogene*, 25: 6706-16, 2006.
- 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.
- 35 Jackson, *Seminars in Oncology*, 24: L164-172, 1997.
- Jacobs et al., *Cell*, 95: 749-58, 1998.
- 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.
- 5 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, (002.
- Kinlough et al., J. Biol. Chem., 279 (51): 53071-53077, 2004.
- Kufe et al., Hybridoma, 3: 223-232, 1984.
- 10 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.
- 15 Levitan et al., J. Biol. Chem., 280: 33374-33386, 2005.
- Levy y Shoseyov, Biotechnol Advances 20, 191-213, 2002.
- 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.
- 20 Li et al., Mol. Cancer Res., 1: 765-775, 2003c.
- Li et al., Mol. Cell Biol., 18: 7216-7224, 1998.
- 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.
- 25 Loose et al., Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2007.
- Macao, Nat. Struct. Mol. Biol., 13, 71-76, 2006.
- 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.
- 30 Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85: 2149-2154, 1963.
- Micheau y Tschopp, Cell, 114: 181-90, 2003.
- 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.
- 35 Natoli et al., Nat. Immunol., 6: 439-45, 2005.
- Navia et al., Curr. Opin. Struct. Biol., 2: 202-210, 1992.
- 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
- 5 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.
- 10 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.
- 15 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.
- 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.
- 20 Ramasamy et al., *Mol. Cell*, 27: 992-1004, 2007.
- Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., 1035-1038 y 1570-1580, 1990.
- 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.
- 25 Reutelingsperger et al., *J. Immunol Methods* 265, 123-132, 2002.
- Ryan y Wentz, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12 (3): 361-71, 2000.
- 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.
- 30 Shah et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA* 95, p4229-4234, 1998.
- Shuai, *Oncogene*, 19 (21): 2638-44, 2000.
- 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.
- 35 Solid Phase Peptide Synthesis, 1984
- Song et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 102 (13): 4700-5, 2005.
- 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.
- 5 Umana et al., *Nat Biotechnol* 17, 176-180, 1999.
- Vaccaro et al., *Nature Biotechnol* 23, 1283-1288, 2005.
- van den Eijnde 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.
- 10 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.
- 15 Wei et al., *Mol. Cell.*, 21: 295-305, 2006.
- Weis, *Cell*, 112 (4): 441-51, 2003.
- 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.
- 20 Yeh et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89, 1904-1908, 1992.
- Yin et al., *J. Biol. Chem.*, 278: 35458-35464, 2003.
- 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.
- 25 Yu et al., *Seminars Thrombosis Hemostasis*, 30 (1), p21-30, 2004.
- Yu y Jove, *Nat. Rev. Cancer*, 4 (2): 97-105, 2004.
- Zhang et al., *Mol. Cell. Biol.*, 19: 7138-7146, 1999.

Listado de secuencias

- 30 <110> Bayer Healthcare, LLC BAUZON, Maxine HERMISTON, Terry
- <120> DOMINIOS DE GLA COMO AGENTES DE DIRECCIONAMIENTO
- 35 <130> BAYR.P0003WO
- <140> DESCONOCIDO
- <141> 13-03-2014
- 40 <150> 61/787.753
- <151> 15-03-2013

<150> 61/791.537
 <151> 15-03-2013

 <160> 6
 5
 <170> PatentIn versión 3.5

 <210> 1
 <211> 45
 10 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Péptido sintético
 15
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (6) .. (7)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 20
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (14) .. (14)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 25
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (16) .. (16)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 30
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (19) .. (20)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 35
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (25) .. (26)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 40
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (29) .. (29)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 45
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (32) .. (32)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 50
 <220>
 <221> característica miscelánea
 <222> (36)..(36)
 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
 55
 <400> 1

ES 2 756 532 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
 35 40 45

- <210> 2
- <211> 46
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> Péptido sintético
- 10
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (7) .. (8)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 15
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (11) .. (11)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 20
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (15) .. (15)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 25
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (17) .. (17)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 30
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (20) .. (21)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 35
- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (26) ..(27)
- (27)
- 40 <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (30) .. (30)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 45

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (33) .. (33)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 50

- <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (35) .. (35)

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

<220>

<221> característica miscelánea

5 <222> (40) .. (40)

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

<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

10

<210> 3

<211> 45

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido sintético

20

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (6) .. (7)

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

25

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (14) .. (14)

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

30

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (16) .. (16)

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

35

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (19) .. (20)

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

40

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (25) .. (26)

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

45

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (29) ..(29)

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

50

<220>

<221> característica miscelánea

<222> (32) .. (32)

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

<400> 3

ES 2 756 532 T3

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

- 5 <210> 4
- <211> 45
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Péptido sintético
- 15 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (6) .. (7)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 20 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (14) .. (14)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 25 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (16) .. (16)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 30 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (19) .. (20)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 35 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (25) .. (26)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 40 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (35) ..(35)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 45 <400> 4

ES 2 756 532 T3

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

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

- 10 <220>
- <223> Péptido sintético

- 15 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (6) .. (7)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 20 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (14) .. (14)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 25 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (16) .. (16)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 30 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (19) .. (20)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 35 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (25) .. (26)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 40 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (29) .. (29)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 45 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (32) .. (32)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- 50 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (35) .. (35)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico

- <400> 5

ES 2 756 532 T3

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

- 5 <210> 6
- <211> 250
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- 10 <220>
- <223> Péptido sintético
- 15 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (6) .. (7)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 20 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (14) .. (14)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 25 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (16) .. (16)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 30 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (19) .. (20)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 35 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (25) .. (26)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 40 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (29) .. (29)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 45 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (32) .. (32)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- 50 <220>
- <221> característica miscelánea
- <222> (36) .. (36)
- <223> X es un residuo de ácido gamma-carboxiglutámico
- <400> 6

ES 2 756 532 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

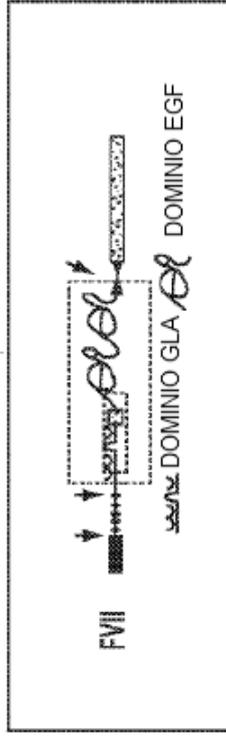
Cys Glu Ser Arg His His His His His His
245 250

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido aislado de 4,5 a 30 kD de tamaño que comprende:
 - un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) de la proteína S con 5-15 residuos de Gla,
 - un dominio de unión a EGF de la proteína S, y
- 5 que carece de un dominio de proteasa o de unión a hormona,
 - en donde dicho polipéptido está unido a una carga útil de agente terapéutico para uso en el tratamiento del cáncer.
2. El polipéptido aislado para uso según la reivindicación 2, en donde el dominio Gla comprende una secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1.
3. El polipéptido aislado para uso según la reivindicación 1, en donde el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 6.
- 10 4. El polipéptido aislado para uso según la reivindicación 1, en donde dicha carga útil de agente terapéutico es un quimioterapéutico, un radioterapéutico o una toxina.
5. El polipéptido aislado para uso según la reivindicación 1, en donde dicho cáncer es cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer rectal, cáncer de cuello uterino, cáncer uterino, cáncer de hígado, cáncer pancreático,
- 15 cáncer de cabeza y cuello o cáncer esofágico.



MODIFICADO DE HANSSON Y STENNO, JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS



PROTEÍNA Gla	AFINIDAD DE MEMBRANA	RESIDUOS Gla	DOMINIO(S) ADICIONAL(ES)	TAMAÑO** (kD)
PROTEÍNA S	ALTA	11	DOMINIOS EGF	4.95, 26.7
PROTEÍNA Z	MEDIA	13	DOMINIOS EGF	5.06, 13.9
PROTROMBINA	MEDIA	10	DOMINIOS KRINGLE	5.06, 27.3
FVII	BAJA	10	DOMINIO EGF ASOCIADO CON UNIÓN A TF	4.95, 14.1
B0178	MEDIA*	11	DOMINIO EGF ASOCIADO CON UNIÓN A TF	4.95, 14.1

*SEGÚN SE DETERMINA POR FACs EN PLAQUETAS ACTIVADAS EN COMPARACIÓN CON FVII

**SIN ETIQUETA

FIG. 1

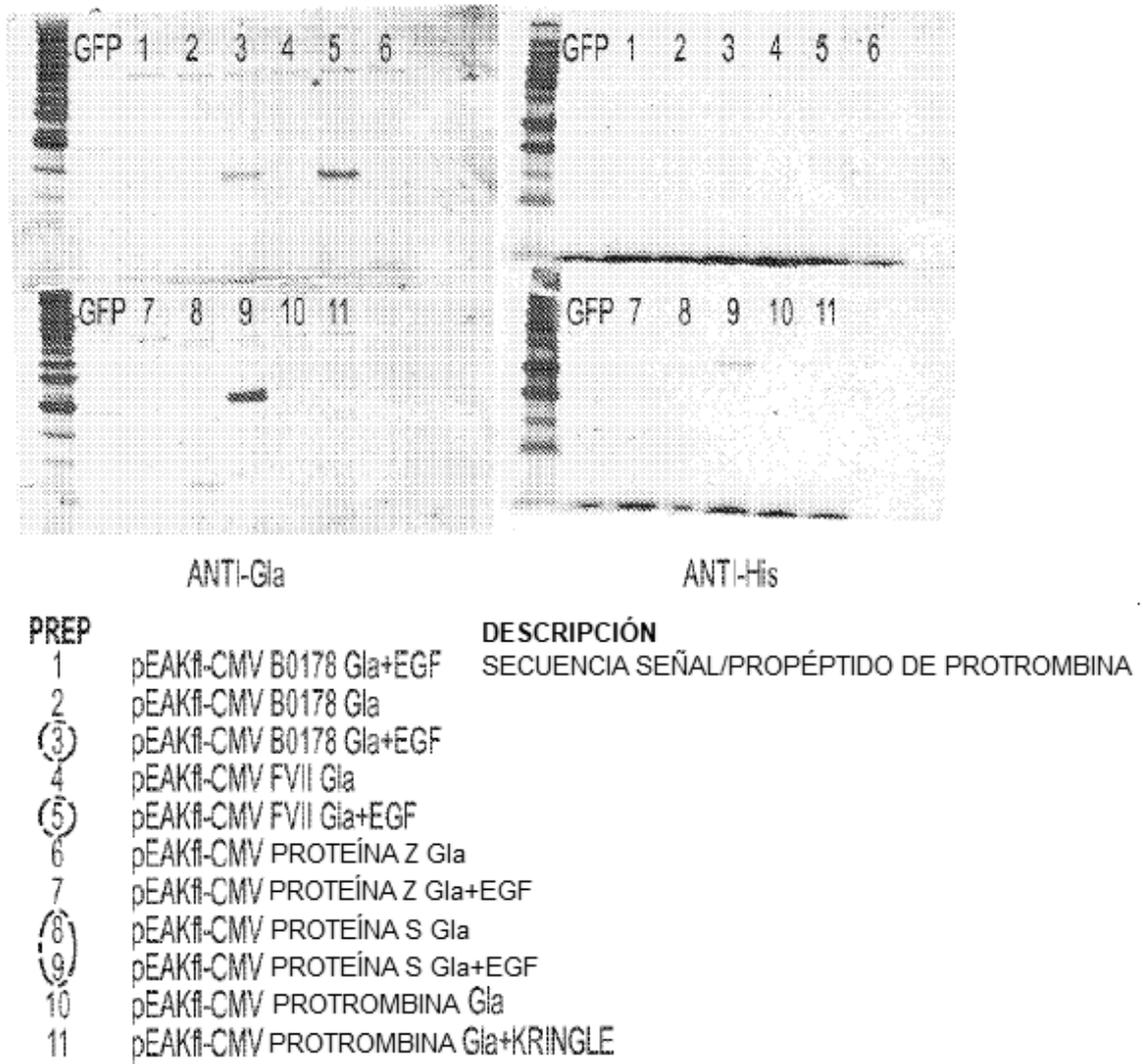
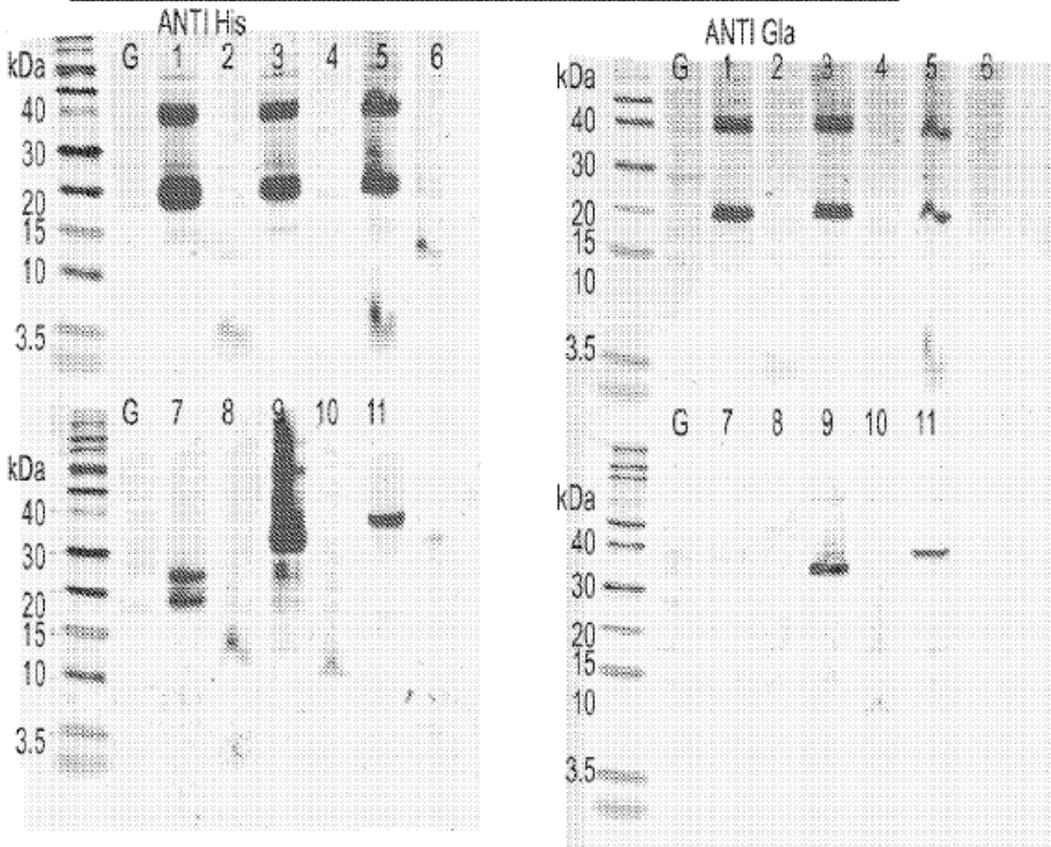


FIG. 2

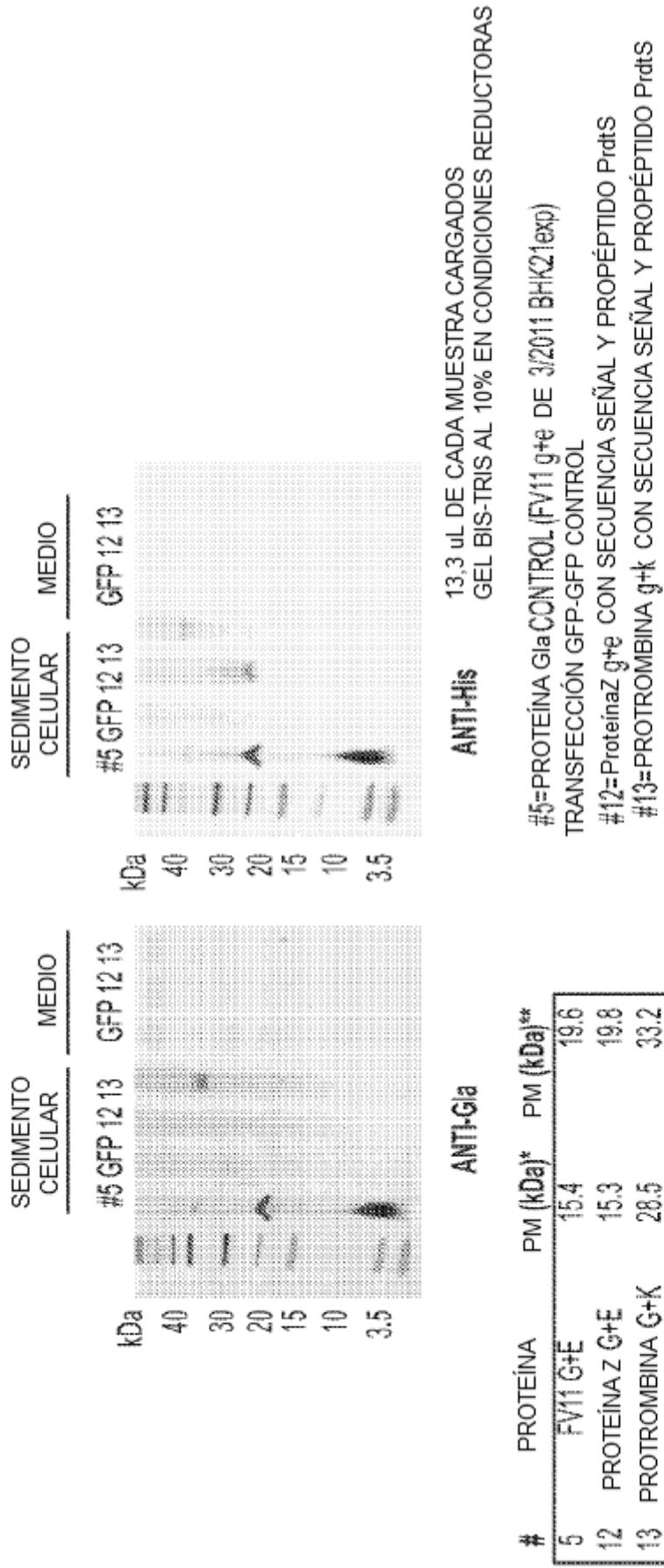
PROTEÍNA Gla	DOMINIO Gla SOLO (kDa)	Gla+EGF/KRINGLE (kDa)
B0178	6.5	15.4
FVII	6.5	15.4
PROTEÍNA Z	6.7	15.3
PROTEÍNA S	6.4	28
PROTROMBINA	6.3	28.5



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



*FORMA PROCESADA INCLUYENDO ETIQUETA His
 **FORMA NO PROCESADA INCLUYENDO ETIQUETA His

FIG. 4

1 11 21 31 41 51 61 71
 ANSLLEKTKQ GNLREKCTEE LNKKEAREV FENDEPTDYF YPKYLVCLRS FQTGLFTAAR QSTNAYPDLR SCVNAIPDQC
 81 91 101 111 121 131 141 151
 SPLPCNEDGY MSCDGGKASF TCTCKPGMGG EKCEFDINEC KDPSPHINGGC SQICDNTPGS YHCSCKNGFV MLSNKKDKKD
 161 171 181 191 201 211 221 231
 VDECSLKPSI CGTAVCKNIP GDFECECEPEG YRYNLKSKSC EDIDECSENM CAQLCVNYPG GYTCYCDGKK GFKLAQDQKS
 241
 CESRHHHHHH

MPT:

γ-CARBOXILACIÓN: 11Gla

D95: HIDROXILACIÓN

ENLACE DISULFURO: POSIBLE 14, REPORTADOS 16

ETIQUETA: 6xHis

FIG. 5

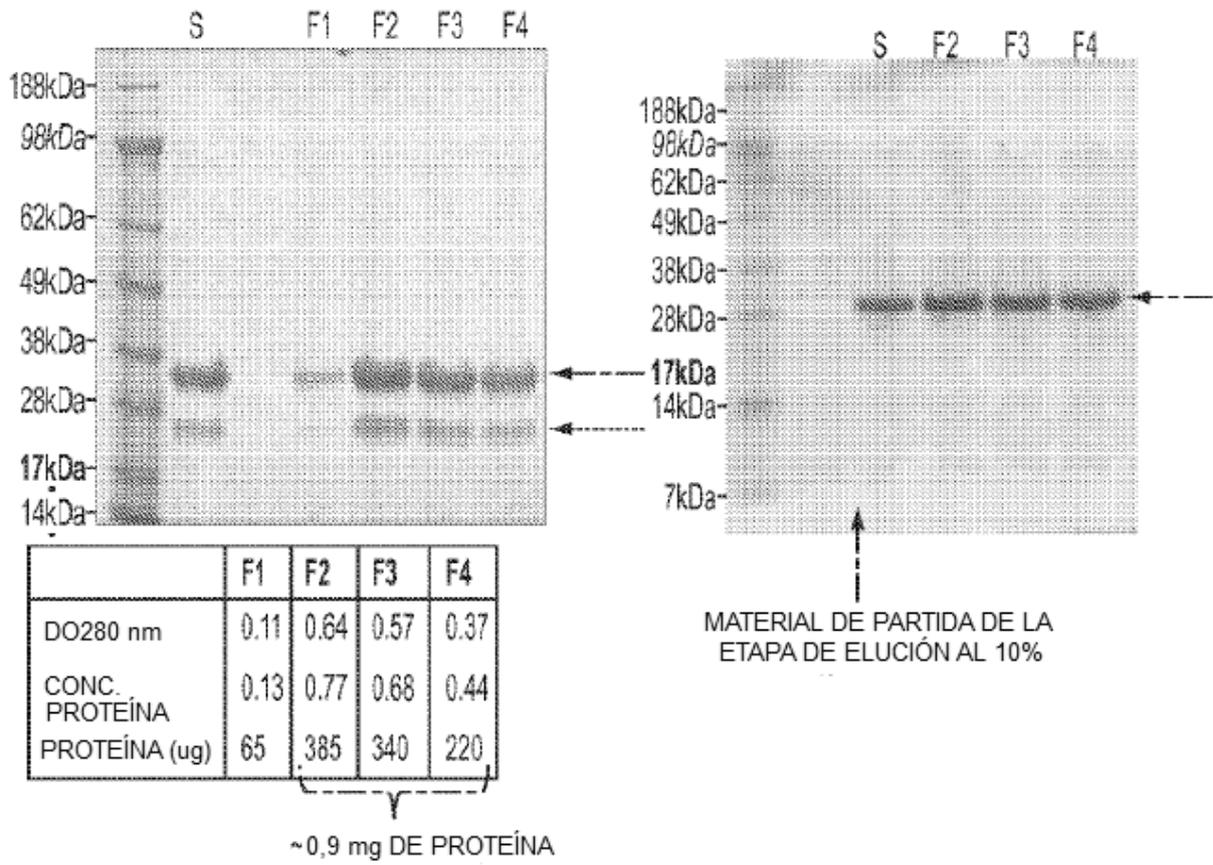
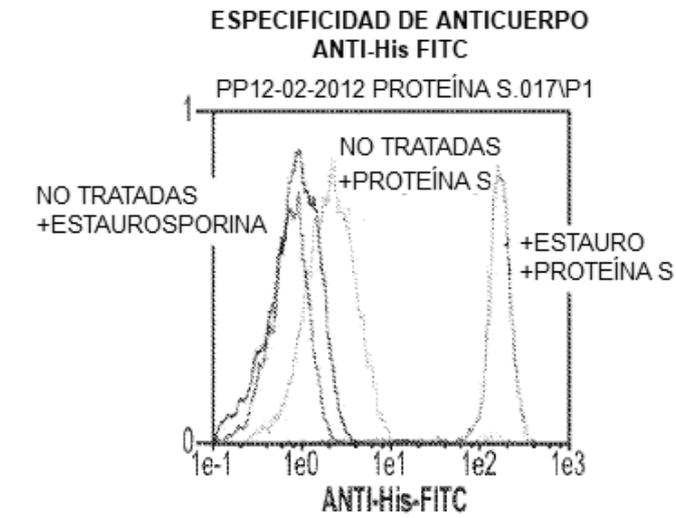
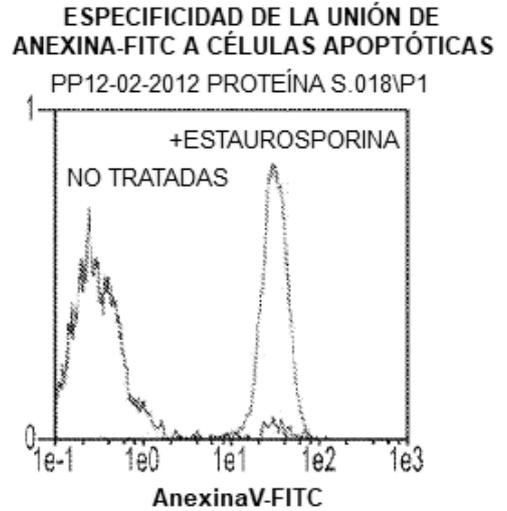


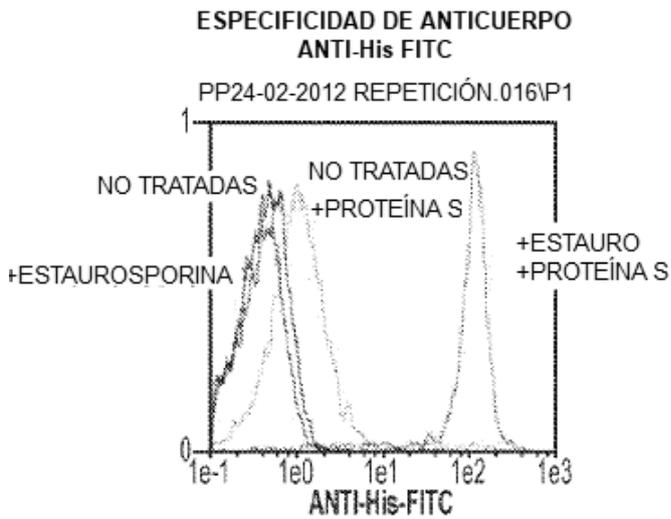
FIG. 6



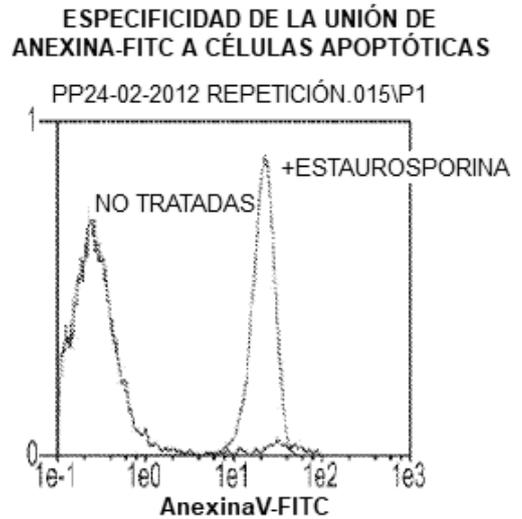
ID	NO TRATADAS	+ESTAU	NO TRATADAS + PROTS	+STAU +PROT S
MFI	0,91	0,79	4,72	159,3



ID	NO TRATADAS	+ESTAU
MFI	1,93	32,3



ID	NO TRATADAS	+ESTAU	NO TRATADAS + PROTS	+STAU +PROT S
MFI	0,38	0,38	3,23	109,5

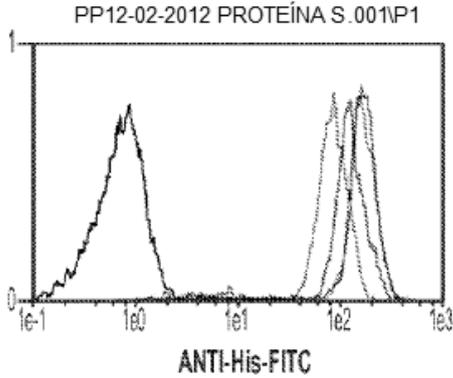


ID	NO TRATADAS	+ESTAU
MFI	1,89	21,9

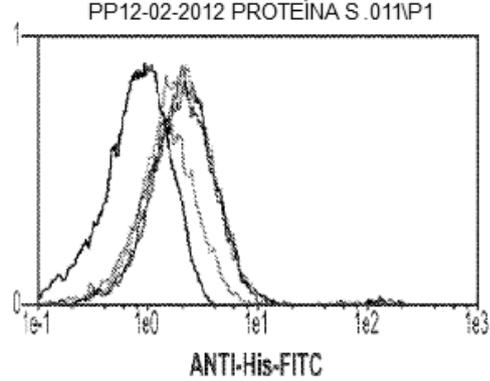
FIG. 7

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



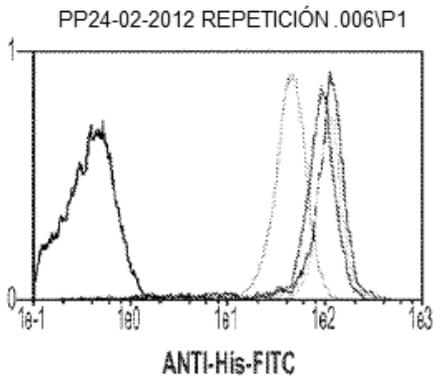
ID	NO PROT S	+ PROT S	+ PROT S + 0.2X An-V	+ PROT S + 2.0X An-V	+ PROT S + 5.0X An-V
MFI	0.79	159.3	163.1	119.9	82.2



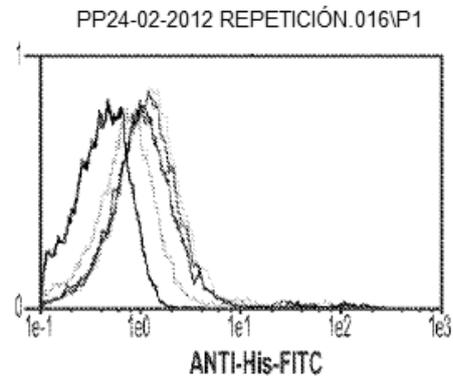
ID	NO PROT S	+ PROT S	+ PROT S + 0.2X An-V	+ PROT S + 2.0X An-V	+ PROT S + 5.0X An-V
MFI	0.91	4.72	3.84	3.94	2.65

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



ID	NO PROT S	+ PROT S	+ PROT S + 0.4X An-V	+ PROT S + 4.0X An-V	+ PROT S + 10.0X An-V
MFI	0.38	109.5	110.3	89.8	45.3



ID	NO PROT S	+ PROT S	+ PROT S + 0.4X An-V	+ PROT S + 4.0X An-V	+ PROT S + 10.0X An-V
MFI	0.38	3.23	2.52	2.86	2.32

FIG. 8