

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 945 994**

51 Int. Cl.:

C07K 16/00 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 19160282 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.03.2023** **EP 3524618**

54 Título: **Dominios 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:
11.07.2023

73 Titular/es:

GLADIATOR BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
305 East Strawberry Drive
Mill Valley CA 94941, US

72 Inventor/es:

HERMISTON, TERRY y
BAUZON, MAXINE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

Observaciones:

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

ES 2 945 994 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 Gla como agentes de direccionamiento

FONDO

[0001] Esta solicitud reivindica el beneficio de la prioridad a la Solicitud Provisional de EE.UU. Nº. de Serie 61/787,753, depositada el 15 de marzo de 2013, y a la Solicitud Provisional de EE.UU. Nº. de Serie 61/791,537, depositada el 15 de marzo de 2013.

1. Campo

[0002] La presente divulgación se refiere al direccionamiento de fosfatidilserina (PtdS) en membranas celulares utilizando péptidos y polipéptidos de dominio Gla. Se divulga el uso de estos péptidos y polipéptidos como agentes diagnósticos y terapéuticos.

2. Técnica relacionada

[0003] La fosfatidilserina (PtdS) es un componente fosfolipídico cargado negativamente que suele localizarse en la parte interna (el lado citoplasmático) de la membrana celular. Sin embargo, la PtdS puede ser transportada por la escramblasa (un miembro de la familia de las flipasa) desde el folículo interno al externo y quedar expuesta en la superficie celular. 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, las lesiones tisulares hacen que las plaquetas, los leucocitos y las células endoteliales redistribuyan rápida y reversiblemente la PtdS, lo que favorece la coagulación y la activación del complemento en las superficies celulares. De forma similar, las señales apoptóticas provocan la externalización de PtdS, aunque de forma 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 de los tejidos y en un entorno "sano" es extremadamente eficaz. De hecho, a pesar de la pérdida de $>10^9$ células al día, la detección histológica de células apoptóticas es un evento raro en tejidos normales (Elliot y Ravichandran, 2010; Elliot *et al.*, 2009). Sin embargo, existen pruebas de que en muchas condiciones 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 elevado se asocia a tumores de mayor grado, una mayor tasa de metástasis y un mal pronóstico 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 potente marcador de enfermedad (Elliot y Ravichandran, 2010).

[0004] Existen varias proteínas con una alta afinidad por las superficies de fosfolípidos aniónicos, siendo la Anexina-V la más utilizada como sonda de direccionamiento PtdS (Lahorte *et al.*, 2004). Con una alta afinidad por las vesículas que contienen PtdS ($K_d = 0,5-7$ nM) y un peso molecular (37 kDa) que cae por debajo del umbral de filtración renal (aprox. 60 kDa), la anexina-V ha demostrado ser prometedora en la clínica como sonda de apoptosis (Lin *et al.*, 2010; Tait y Gibson, 1992). Además, se ha utilizado para una amplia gama de indicaciones, incluidas las de oncología, neurología y cardiología (Lahorte *et al.*, 2004; Boersma *et al.*, 2005; Reutelingsperger *et al.*, 2002). El uso de sondas biológicas dirigidas a la expresión de PtdS en la superficie celular se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*: Blankenberg, 2009 imaging the molecular signatures of apoptosis injury with radiolabeled annexin V. Si bien su utilidad en la clínica es prometedora, en su mayor parte aún no han sido explotadas.

[0005] Okada *et al.*, 2010 discute una nueva mutación del sitio de empalme en el intrón C de PROS1 que conduce a una marcada reducción del nivel de ARNm mutante, la ausencia de la región sensible a la trombina, y la secreción alterada y la actividad cofactor de la proteína S mutante.

[0006] Wijnen *et al.*, 1998 discute la caracterización de la mini-proteína S que es una variante recombinante de la proteína S que carece del dominio similar a la globulina fijadora de hormonas sexuales.

[0007] Schutters y Reutelingsperger, 2010 discute el direccionamiento de la fosfatidilserina para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades humanas.

[0008] El documento US6,312,694 describe métodos de tratamiento del cáncer que utilizan conjugados terapéuticos que se unen a aminofosfolípidos.

RESUMEN

[0009] Así, de acuerdo con la presente divulgación, se proporciona un polipéptido adecuado para dirigir la expresión de la superficie celular de la fosfatidilserina tanto *in vitro* como *in vivo*, comprendiendo dicho polipéptido:

un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) de la proteína S,
un dominio EGF, y

un agente terapéutico;
en el que el polipéptido carece de un dominio de proteasa y también carece de un dominio de unión a hormona.

5 **[0010]** El polipéptido puede comprender además un marcador detectable, como un marcador fluorescente, un marcador quimioluminiscente, un radiomarcador, una enzima, un colorante o un ligando. El polipéptido comprende un agente terapéutico, como un agente anticanceroso, 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, como una enzima convertidora de profármacos, una citocina, un factor de crecimiento, un factor de coagulación o un anticoagulante. El polipéptido puede tener 300 residuos o menos, 200 residuos o menos, o 100 residuos o menos, incluyendo ragnes de 100-200 y 100-300 residuos.

15 **[0011]** El polipéptido puede comprender 5-15 residuos Gla, 9-13 residuos Gla, incluyendo 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 residuos Gla. El polipéptido puede contener más de 13 residuos Gla, pero menos del 30% de residuos Gla en total. El polipéptido puede tener un tamaño de entre 4,5 y 30 kD. El polipéptido puede comprender al menos un enlace disulfuro, o de 2 a 5 enlaces disulfuro.

[0012] El polipéptido puede comprender un dominio Gla de proteína S más un dominio EGF de proteína S.

20 **[0013]** El polipéptido puede comprender además una región Fc de anticuerpo.

[0014] Cualquiera de los anteriores puede contener sustituciones conservadoras de las secuencias nativas para las proteínas anteriores, y/o exhibir un porcentaje de homología con los dominios nativos establecidos.

25 **[0015]** El polipéptido aquí descrito es útil en el tratamiento del cáncer.

[0016] La carga terapéutica puede ser un quimioterápico, un radioterápico o una toxina.

30 **[0017]** El cáncer puede ser cáncer de mama, cáncer cerebral, cáncer de estómago, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de ovario, cáncer testicular, cáncer de colon, cáncer de piel, cáncer rectal, cáncer cervical, cáncer uterino, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de esófago.

35 **[0018]** El polipéptido aquí descrito es útil en el tratamiento de una enfermedad vírica... La enfermedad vírica puede ser la gripe, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la viruela, el virus respiratorio sincitial, el virus de la fiebre hemorrágica coreana, la varicela, el virus de la varicela zoster, el virus del herpes simple 2 o 1 virus de Epstein-Barr, virus de Marburgo, hantavirus, virus de la fiebre amarilla, hepatitis A, B, C o E, virus del Ébola, virus del papiloma humano, rinovirus, virus Cocksackie, virus de la poliomielitis, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Newcastle, rotavirus, HTLV-2 y -2.

40 **[0019]** Se contempla que cualquier método o composición descrito en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro método o composición descrito en el presente documento.

45 **[0020]** Otros objetos, características y ventajas de la presente divulgación resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, aunque indican formas de realización específicas de la divulgación, se dan únicamente a título ilustrativo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

50 **[0021]** Los siguientes dibujos forman parte de la presente especificación y se incluyen para demostrar ciertos aspectos de la presente divulgación. La divulgación puede entenderse mejor por referencia a uno o más de estos dibujos en combinación con los detallados.

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

55 FIG. 2 **Pruebas de expresión de constructos de proteína de dominio Gla.** Transfección transitoria en células 293 utilizando 293cellFectin. Geles al 10% con muestras reducidas, 23,3 µl de medios cargados.

FIG. 3 **Pruebas de expresión de constructos de proteína de dominio Gla.** 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.

60 FIG. 5 **Secuencia de Gla + EGF de proteína S.**

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

FIG. 7 **Ensayos de Apoptosis para la Gla + EGF de Proteína S.** Los paneles superior e inferior representan procedimientos idénticos por duplicado, salvo que se redujeron las cantidades de Gla + EGF de Proteína S y la cantidad de anticuerpo anti-dominio His.

65 FIG. 8 **Ensayos de Apoptosis para la Gla + EGF de Proteína S.** Los paneles superior e inferior representan

procedimientos duplicados idénticos, excepto por las cantidades de Anexina V utilizadas, que son el doble en los paneles inferiores.

DESCRIPCIÓN DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

[0022] Al igual que la anexina, las proteínas con dominio gamma-carboxiglutámico (Gla), como los factores II, VII, IX, X, la proteína C y la proteína S, se unen a membranas aniónicas. De hecho, el dominio Gla se ha utilizado como modelo para una pequeña molécula diseñada racionalmente para ser una sonda específica de la apoptosis (Cohen *et al.*, 2009). Aquí, los inventores proponen la utilización de las porciones de direccionamiento de membrana de estas proteínas Gla-dominio como una nueva clase de sondas biológicas específicas para la apoptosis y la enfermedad. El uso de estas proteínas naturales y específicas puede aumentar la especificidad con respecto a las sondas actuales, con la ventaja añadida de su menor tamaño (<30 kDa). Incluso en las formas de realización más grandes, que incluirían dominios EGF y/o Kringle, estas proteínas pueden seguir siendo más pequeñas que la anexina V (37 kDa), y potencialmente tan pequeñas como <5 kDa. Estas sondas biológicas pueden dirigirse a la expresión de PtdS en la superficie celular tanto *in vitro* como *in vivo*. Así pues, es posible desarrollar una sonda de direccionamiento a la apoptosis/enfermedad que sea superior a la anexina V en afinidad, especificidad y tamaño, con el potencial añadido de su uso como terapéutica. Estos y otros aspectos de la divulgación se describen con más detalle a continuación.

[0023] Cuando proceda, los términos utilizados en singular incluirán también el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento, la definición establecida a continuación siempre prevalecerá a efectos de interpretación de esta especificación y sus reivindicaciones asociadas, a menos que se pretenda claramente un significado contrario (por ejemplo, en el documento en el que se utiliza originalmente el término). El uso de "o" significa "y/o" a menos que se indique lo contrario. El uso de "un" en este documento significa "uno o más" a menos que se indique lo contrario o cuando el uso de "uno o más" sea claramente inadecuado. Los términos "comprender", "comprende", "que comprende", "incluir", "incluye" e "incluyendo" son intercambiables y no tienen carácter limitativo. Por ejemplo, el término "incluido" significará "incluido, pero no limitado a". La palabra "aproximadamente" significa más o menos un 5% de la cifra indicada.

[0024] Un "péptido o polipéptido aislado", tal y como se utiliza aquí, pretende referirse a un péptido o polipéptido que está sustancialmente libre de otras moléculas biológicas, incluyendo péptidos o polipéptidos que tienen secuencias distintas. En algunas formas de realización, el péptido o polipéptido aislado tiene al menos aproximadamente 75%, 80%, 90%, 95%, 97%, 99%, 99,9% o 100% de pureza en peso seco. En algunas formas de realización, la pureza puede medirse mediante un método como la cromatografía en columna, la electroforesis en gel de poliacrilamida o el análisis por HPLC.

[0025] Tal como se utiliza en el presente documento, "sustituciones conservadoras" 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 lugar a la pérdida de una función biológica o bioquímica del polipéptido. Una "sustitución conservadora de aminoácidos" es aquella en la que el residuo de aminoácido se sustituye por un residuo de aminoácido con una cadena lateral similar. En la técnica se han definido familias de residuos de aminoácidos con cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (*por ej.*, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (*por ej.*, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (*por ej.*, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (*por ej.*, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales β -ramificadas (*por ej.*, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (*por ej.* tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Los anticuerpos de la presente divulgación pueden tener una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos y, sin embargo, conservar la actividad de unión al antígeno.

[0026] En el caso de los ácidos nucleicos y los polipéptidos, el término "homología sustancial" indica que dos ácidos nucleicos o dos polipéptidos, o secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y comparan óptimamente, son idénticos, con las inserciones o supresiones de nucleótidos o aminoácidos apropiadas, en al menos aproximadamente el 80% de los nucleótidos o aminoácidos, normalmente al menos aproximadamente el 85%, en algunas formas de realización aproximadamente el 90%, 91%, 92%, 93%, 94% o 95%, en al menos una realización al menos aproximadamente el 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.2%, 99.3%, 99.4% o 99.5% de los nucleótidos o aminoácidos. Alternativamente, existe homología sustancial para los ácidos nucleicos cuando los segmentos se hibridarán en condiciones de hibridación selectiva con el complemento de la cadena. También se incluyen secuencias de ácido nucleico y secuencias polipeptídicas que tienen homología sustancial con las secuencias específicas de ácido nucleico y secuencias de aminoácidos aquí mencionadas.

[0027] El porcentaje de identidad entre dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias (es decir, % de homología = # de posiciones idénticas / # total de posiciones x 100), teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que es necesario introducir para una alineación óptima de las dos secuencias. La comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias puede llevarse a cabo utilizando un algoritmo matemático, como, por ejemplo, sin limitación, el módulo AlignX™ de VectorNTI™ (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA). Para AlignX™, los parámetros por defecto de la 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 información en invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/VectorNTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html).

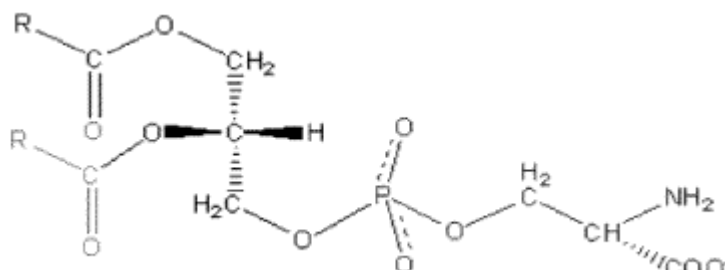
[0028] Otro método para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de consulta (una secuencia de la presente divulgación) y una secuencia objeto, también denominada alineación global de secuencias, puede determinarse utilizando el programa informático CLUSTALW (Thompson et al., Nucleic 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 un alineamiento de secuencias, las secuencias de la consulta y del sujeto son secuencias de ADN. El resultado de la alineación global de secuencias está en porcentaje de identidad. Los parámetros que pueden utilizarse en una alineación CLUSTALW de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad mediante alineaciones por 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 utilizar los siguientes parámetros 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 Retraso de Alineación = 40.

[0029] 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 hace sustancialmente puro" cuando se purifica separándolo de otros componentes celulares con los que normalmente está asociado en el medio natural. Para aislar un ácido nucleico, se pueden utilizar técnicas estándar como las siguientes: tratamiento alcalino/SDS, bandedo CsCl, cromatografía en columna, electroforesis en gel de agarosa y otras bien conocidas en el arte.

I. Fosfatidilserina (PtdS)

A. Estructura y Síntesis

[0030] La fosfatidilserina (abreviada PtdS, Ptd-L-Ser o PS) es un componente fosfolipídico, normalmente mantenido en el folículo interno (el lado citosólico) de las membranas celulares por una enzima llamada flipasa. Cuando una célula sufre apoptosis, la fosfatidilserina deja de estar restringida a la parte citosólica de la membrana y queda expuesta en la superficie de la célula. La fórmula química de la PtdS es $C_{13}H_{24}NO_{10}P$ y tiene una masa molecular de 385,304. La estructura se muestra a continuación:



[0031] La fosfatidilserina se biosintetiza en bacterias mediante la condensación del aminoácido serina con ácido fosfatídico activado por CDP (difosfato de citidina). En los mamíferos, la fosfatidilserina se produce por reacciones de intercambio de bases con la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina. A la inversa, la fosfatidilserina también puede dar lugar a fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, aunque en los animales la vía para generar fosfatidilcolina a partir de fosfatidilserina sólo funciona en el hígado.

B. Función

[0032] Los primeros estudios sobre la fosfatidilserina destilaron la sustancia química del cerebro bovino. Los estudios modernos y los productos comercializados se elaboran con soja, debido a la preocupación por 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 es impuro. Estudios preliminares en ratas indican que el producto de soja es al menos tan potente como el de origen bovino.

[0033] La FDA de los EE.UU. ha concedido el estatus de "declaración de propiedades saludables cualificada" a la fosfatidilserina, afirmando que "El consumo de fosfatidilserina puede reducir el riesgo de demencia en ancianos" y "El consumo de fosfatidilserina puede reducir el riesgo de disfunción cognitiva en ancianos".

[0034] Se ha demostrado que la fosfatidilserina acelera la recuperación, previene las agujetas, mejora el bienestar y podría poseer propiedades ergogénicas en atletas que practican ciclismo, entrenamiento con pesas y carreras de resistencia. Se ha informado de que la soja-PtdS, en función de la dosis (400 mg), es un suplemento eficaz para

combatir el estrés inducido por el ejercicio, ya que atenúa el aumento de los niveles de cortisol inducido por el ejercicio. La suplementación con PtdS promueve un equilibrio hormonal deseable para los atletas y podría atenuar el deterioro fisiológico que acompaña al sobreentrenamiento y/o al sobreestiramiento. En estudios recientes, se ha demostrado que la PtdS mejora el estado de ánimo en una cohorte de jóvenes durante situaciones de estrés mental y mejora la precisión durante el golpe de salida 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 por déficit de atención con hiperactividad.

[0035] Tradicionalmente, los suplementos de PtdS se derivaban de la corteza bovina (BC-PS); sin embargo, debido a la potencial transferencia de enfermedades infecciosas, la PS derivada de la soja (S-PS) se ha establecido como una alternativa potencialmente segura. La PS derivada de la soja está generalmente reconocida como segura (GRAS) y es un suplemento nutricional seguro para las personas mayores si se toma hasta una dosis de 200 mg tres veces al día. Se ha demostrado que la fosfatidilserina reduce la respuesta inmunitaria específica en ratones.

[0036] La PtdS puede encontrarse en la carne, pero es más abundante en el cerebro y en vísceras como el hígado y el riñón. Sólo se encuentran pequeñas cantidades de PS en los productos lácteos o en las verduras, a excepción de las judías blancas.

[0037] Anexina-A5 es una proteína natural con una afinidad de unión ávida por PtdS. La anexina-A5 marcada permite visualizar células en estado apoptótico temprano o 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 los malignos en comparación con una baja tasa de apoptosis en los tumores benignos.

II. Proteínas de Dominio Gla

A. Dominios Gla

[0038] La estructura general de las proteínas con dominio Gla es la de un dominio Gla seguido de dominios EGF y, a continuación, un dominio de serina proteasa terminal C. Las excepciones son la protrombina, que contiene dominios Kringle en lugar de dominios EGF, y la proteína S, que no tiene un dominio de serina proteasa sino dominios similares a la globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) (Hansson y Stenflo, 2005). Las afinidades de las proteínas con dominio Gla a las membranas aniónicas varían. A grandes rasgos, se dividen en 3 categorías: 1) ligantes de alta afinidad con una K_d de 30-50 nM, 2) ligantes de afinidad media con una K_d de 100-200 nM y 3) ligantes de baja afinidad con una K_d de 1000-2000 nM. Se ha demostrado que las proteínas de dominio Gla de alta afinidad se unen a membranas aniónicas y que la proteína S se une específicamente a células apoptóticas a través de su interacción con PtdS (Webb *et al.*, 2002). Las proteínas de dominio Gla de baja afinidad utilizan un receptor secundario para unirse a la membrana celular. Por ejemplo, el FVII utiliza el Factor Tisular (TF). Se cree que el dominio Gla/1^{er} 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 demostrado la regulación al alza del FT en la superficie de las células cancerosas, incluyendo el cáncer colorrectal, el carcinoma NSCL y el cáncer de mama, y estos altos niveles de FT se han asociado con un mal pronóstico (Yu *et al.*, 2004). Aunque la afinidad por las membranas aniónicas es relativamente baja para el FVII, la adición de la interacción TF de alta afinidad junto con la regulación al alza documentada del TF en el cáncer lo convierte en una sonda específica del cáncer potencialmente interesante.

B. Proteínas que Contienen el Dominio Gla

1. Factor II

[0039] 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 provoca la detención de la pérdida de sangre.

2. Factor VII

[0040] El factor VII (anteriormente conocido como proconvertina) es una de las proteínas que provocan la coagulación de la sangre en la cascada de la coagulación.

3. Factor IX

[0041] El factor IX (o factor de Navidad) es una de las serinas proteasas del sistema de coagulación; pertenece a la familia de las peptidasas S1.

[0042] Los factores VII, IX y X desempeñan funciones clave en la coagulación sanguínea y también comparten una arquitectura de dominio común. La proteína del factor IX está compuesta por cuatro dominios proteicos. Se trata del dominio Gla, dos copias en tándem del dominio EGF y un dominio C-terminal de peptidasa similar a la tripsina que lleva a cabo la escisión catalítica. Se ha demostrado que el dominio EGF N-terminal es responsable, al menos en

parte, de la unión al factor tisular. Wilkinson *et al.* 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. Se han resuelto las estructuras de los cuatro dominios. Se determinó una estructura de los dos dominios EGF y del dominio similar a la tripsina para la proteína porcina. También se determinó por RMN la estructura del dominio Gla, responsable de la unión a fosfolípidos dependiente de Ca(II). Se han resuelto varias estructuras de mutantes "superactivos" que revelan la naturaleza de la activación del Factor IX por otras proteínas de la cascada de coagulación.

4. Factor X

[0043] El factor X (factor de Stuart-Prower; protrombinasa) es una enzima de la cascada de la coagulación.

5. Proteína S

[0044] 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 anticoagulante, donde funciona como cofactor de la proteína C en la inactivación de los factores Va y Villa. Sólo la forma libre tiene actividad cofactor.

[0045] 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 células que están sufriendo apoptosis. La apoptosis es una forma de muerte celular que el organismo utiliza para eliminar de los tejidos las células no deseadas o dañadas. Las células apoptóticas (*es decir*, en proceso de apoptosis) ya no gestionan activamente la distribución de fosfolípidos en su membrana externa y, por tanto, empiezan a mostrar fosfolípidos cargados negativamente, como la fosfatidilserina, en la superficie celular. En las células sanas, una enzima dependiente del ATP (trifosfato de adenosina) las elimina de la lámina externa de la membrana celular. Estos fosfolípidos cargados negativamente son reconocidos por fagocitos como los macrófagos. La proteína S puede unirse a los fosfolípidos cargados negativamente y funcionar como molécula puente entre la célula apoptótica y el fagocito. La propiedad de puente de la proteína S potencia la fagocitosis de la célula apoptótica, lo que permite eliminarla "limpiamente" sin que se produzca ningún síntoma de daño tisular, como la inflamación.

[0046] Las mutaciones en el gen *PROS1* pueden conducir a la deficiencia de Proteína S, que es un trastorno sanguíneo raro que puede conducir a un mayor riesgo de trombosis. Se ha demostrado que la proteína S interactúa con el Factor V.

6. Proteína C

[0047] La proteína C, también conocida como autoprotrrombina IIA y factor XIV de coagulación sanguínea, 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 humanos y otros animales. La proteína C activada (APC) realiza estas operaciones principalmente inactivando 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.

[0048] Véase WO2014/151535.

C. Péptidos y Polipéptido con dominio Gla

[0049] La presente divulgación contempla el diseño, producción y uso de varios polipéptidos que contienen dominio Gla. Las características estructurales de estas moléculas son las siguientes. En primer lugar, los polipéptidos tienen un dominio Gla que contiene unos 30-45 residuos consecutivos que comprenden un dominio Gla. En segundo lugar, los polipéptidos pueden contener residuos adicionales no pertenecientes al dominio Gla, como dominios EGF, dominios Kringle, dominios Fc, *etc.*

[0050] En general, los péptidos y polipéptidos tendrán 300 residuos o menos, de nuevo, comprendiendo 30-45 residuos consecutivos de 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 del 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 Gla consecutivos puede ser 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15.

[0051] La presente divulgación 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 presentes en las proteínas, los D-aminoácidos se encuentran en algunas proteínas producidas por organismos marinos exóticos, como los caracoles cono. También son componentes abundantes de las paredes celulares de peptidoglicano de las bacterias. La D-serina puede actuar como neurotransmisor en el cerebro. La convención L y D para la configuración de los 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 puede sintetizarse teóricamente ese aminoácido (D-gliceraldehído es dextrógiro; L-gliceraldehído es levógiro).

[0052] Una forma de péptido "*all-D*" es un péptido retro-inverso. La modificación retroinversa de polipéptidos naturales implica el ensamblaje sintético de aminoácidos con estereoquímica de α -carbono opuesta a la de los correspondientes L-aminoácidos, es decir, D-aminoácidos en orden inverso con respecto a la secuencia peptídica nativa. Así pues, un análogo retroinverso tiene los extremos y la dirección de los enlaces peptídicos invertidos (NH-CO en lugar de CO-NH), al tiempo que mantiene aproximadamente la topología de las cadenas laterales como en la secuencia peptídica nativa. Véase Patente de EEUU. 6.261.569.

D. Síntesis

[0053] Será ventajoso producir polipéptidos utilizando las técnicas sintéticas en fase sólida (Merrifield, 1963). Otras técnicas de síntesis son bien conocidas por los expertos en la técnica (Bodanszky *et al.*, 1976; Peptide Synthesis, 1985; Solid Phase Peptide Synthesis, 1984). En los textos citados, así como en Protective Groups in Organic Chemistry (1973), se encontrarán grupos protectores apropiados para su uso en tales síntesis. 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 y selectivamente extraíble. Para los aminoácidos que contienen un grupo lateral reactivo, como la lisina, se utiliza un grupo protector diferente, selectivamente extraíble.

[0054] Utilizando la síntesis en fase sólida como ejemplo, el aminoácido protegido o derivatizado se une a un soporte sólido inerte a través de su grupo carboxilo o amino desprotegido. A continuación, el grupo protector del grupo amino o carboxilo se elimina selectivamente y el siguiente aminoácido de la secuencia que tiene el grupo complementario (amino o carboxilo) convenientemente protegido se mezcla y reacciona con el residuo ya unido al soporte sólido. A continuación, se elimina el grupo protector del grupo amino o carboxilo de este residuo de aminoácido recién añadido y se añade el siguiente aminoácido (convenientemente protegido), y así sucesivamente. Una vez enlazados todos los aminoácidos deseados en la secuencia adecuada, se eliminan secuencial o simultáneamente los grupos protectores terminales y laterales restantes (y el soporte sólido) para obtener el péptido final. Los péptidos y polipéptidos de la divulgación carecen preferentemente de aminoácidos bencilados o metilbencilados. Estos grupos protectores pueden utilizarse durante la síntesis, pero se eliminan antes de utilizar los péptidos y polipéptidos. Pueden ser necesarias reacciones adicionales, como se describe en otro lugar, para formar enlaces intramoleculares que restrinjan la conformación.

[0055] Aparte de los veinte aminoácidos estándar que pueden utilizarse, existe un gran número de aminoácidos "no estándar". Dos de ellos pueden especificarse mediante el código genético, pero son bastante raros en las proteínas. La selenocisteína se incorpora a algunas proteínas en un codón UGA, que normalmente es un codón de parada. La pirrolisina es utilizada por algunas arqueas metanogénicas en enzimas que utilizan para producir metano. Se codifica con el codón UAG. Algunos ejemplos de aminoácidos no estándar que no se encuentran en las proteínas son la lantionina, el ácido 2-aminoisobutírico, la dehidroalanina y el neurotransmisor ácido gamma-aminobutírico. Los aminoácidos no estándar suelen aparecer como intermediarios en las rutas metabólicas de los aminoácidos estándar; por ejemplo, la ornitina y la citrulina aparecen en el ciclo de la urea, que forma parte del catabolismo de los aminoácidos. Los aminoácidos no estándar suelen formarse mediante modificaciones de los aminoácidos estándar. Por ejemplo, la homocisteína se forma por la vía de la transulfuración o por la desmetilación de la metionina a través del metabolito intermedio S-adenosilmetionina, mientras que la hidroxiprolina se produce por una modificación postraducciona de la prolina.

E. Enlazadores

[0056] Se pueden utilizar enlazadores o agentes de reticulación para fusionar péptidos o polipéptidos de dominio Gla con otras secuencias proteináceas (*por ej.*, dominios Fc de anticuerpos). Los reactivos de reticulación bifuncionales se han utilizado ampliamente para diversos fines, como la preparación de matrices de afinidad, la modificación y estabilización de diversas estructuras, la identificación de sitios de unión de ligandos y receptores y los estudios estructurales. Los reactivos homobifuncionales que llevan dos grupos funcionales idénticos demostraron ser muy eficaces para inducir la reticulación entre macromoléculas idénticas y diferentes o subunidades de una macromolécula, y la unión de ligandos polipeptídicos a sus sitios de unión específicos. Los reactivos heterobifuncionales contienen dos grupos funcionales diferentes. Aprovechando las reactividades diferenciales de los dos grupos funcionales distintos, la reticulación puede controlarse de forma selectiva y secuencial. Los reactivos de reticulación bifuncionales pueden dividirse según la especificidad de sus grupos funcionales, *por ej.*, grupos amino-, sulfhidrilo-, guanidino-, indol- o carboxilo-específicos. De ellos, los reactivos dirigidos a grupos amino libres se han hecho especialmente populares por su disponibilidad comercial, facilidad de síntesis y las suaves condiciones de reacción en las que pueden aplicarse. La mayoría de los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen un grupo reactivo amino primario y un grupo reactivo tiol.

[0057] En otro ejemplo, los reactivos de reticulación heterobifuncionales y los métodos de uso de los reactivos de reticulación se describen en la Patente de EE. UU. 5.889.155. Los reactivos de reticulación combinan un residuo

nucleófilo de hidrazida con un residuo electrófilo de maleimida, permitiendo el acoplamiento, en un ejemplo, de aldehídos a tioles libres. El reactivo de reticulación puede modificarse para reticular varios grupos funcionales, por lo que resulta útil para reticular polipéptidos. En los casos en que un péptido concreto no contenga en su secuencia nativa un residuo susceptible de un determinado reactivo de reticulación, pueden utilizarse cambios genéticos o sintéticos conservadores de aminoácidos en la secuencia primaria.

F. Secuencias Polipeptídicas Adicionales

[0058] Uno de los factores en el desarrollo de fármacos es lograr semividas circulantes adecuadas, lo que repercute en la dosificación, la administración del fármaco y la eficacia, y esto es especialmente importante en el caso de los bioterapéuticos. Las proteínas pequeñas de menos de 60 kD son eliminadas rápidamente por el riñón y, por tanto, no alcanzan su objetivo. Esto significa que se necesitan dosis elevadas para alcanzar la eficacia. Las modificaciones que se utilizan actualmente para aumentar la semivida de las proteínas en circulación incluyen: PEGilación; conjugación o fusión genética con proteínas, por ejemplo, transferrina (WO2006/096515), albúmina, hormona del crecimiento (US2003/104578); conjugación con celulosa (Levy y Shoseyov, 2002); conjugación o fusión con fragmentos Fc; enfoques de glicosilación y mutagénesis (Carter, 2006).

[0059] En el caso de la PEGilación, el polietilenglicol (PEG) se conjuga con la proteína, que puede ser, por ejemplo, una proteína plasmática, un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo. Los primeros estudios sobre el efecto de la PEGilación de anticuerpos se realizaron en la década de 1980. La conjugación puede realizarse enzimática 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 protege aún más de la degradación proteolítica y ralentiza la eliminación de la sangre. Además, se ha informado de que la PEGilación puede reducir la inmunogenicidad y aumentar la solubilidad. La mejora de la farmacocinética por la adición de PEG se debe a varios mecanismos diferentes: aumento del tamaño de la molécula, protección frente a la proteólisis, reducción de la antigenicidad y enmascaramiento de secuencias específicas de los receptores celulares. En el caso de los fragmentos de anticuerpos (Fab), se ha conseguido multiplicar por 20 la semivida plasmática mediante la PEGilación (Chapman, 2002).

[0060] Hasta la fecha existen varios fármacos PEGilados aprobados, *por ej.*, el PEG-interferón alfa2b (PEG-INTRON) comercializado en 2000 y el alfa2a (Pegasys) comercializado en 2002. Un fragmento de anticuerpo PEGilado contra el TNF alfa, llamado Cimzia o Certolizumab Pegol, fue presentado para su aprobación por la FDA para el tratamiento de la enfermedad de Crohn en 2007 y ha sido aprobado el 22 de abril de 2008. Una limitación de la PEGilación es la dificultad de sintetizar especies monodispersas largas, especialmente cuando se necesitan cadenas de PEG de más de 1000 kD. Para muchas aplicaciones, se utiliza PEG polidisperso con una longitud de cadena superior a 10000 kD, lo que da lugar a una población de conjugados con cadenas de PEG de longitudes diferentes, que necesitan un análisis exhaustivo para garantizar lotes equivalentes entre producciones. La diferente longitud de las cadenas de PEG puede dar lugar a diferentes actividades biológicas y, por tanto, a diferentes farmacocinéticas. Otra limitación de la PEGilación es la disminución de la afinidad o de la actividad, como se ha observado con el interferón alfa Pegasys, que sólo tiene el 7% de la actividad antiviral de la proteína nativa, pero presenta una farmacocinética mejorada debido a la mayor semivida plasmática.

[0061] Otro enfoque consiste en conjugar el fármaco con una proteína de vida larga, *por ej.*, la albúmina, que es de 67 kD y tiene una vida media plasmática de 19 días en humanos. La albúmina es la proteína más abundante en el plasma y participa en la regulación del pH plasmático, pero también sirve como transportador de sustancias en el plasma. En el caso del CD4, se ha conseguido aumentar su semivida plasmática tras fusionarlo con albúmina sérica humana (Yeh *et al.*, 1992). Otros ejemplos de proteínas de fusión son la insulina, la hormona del crecimiento humano, la transferrina y las citocinas (Duttaroy *et al.*, 2005; Melder *et al.*, 2005; Osborn *et al.*, 2002a; Osborn *et al.*, 2002b; Sung *et al.*, 2003) y véase (US2003/104578, WO2006/096515, y WO2007/047504).

[0062] También se ha estudiado ampliamente el efecto de la glicosilación en la vida media plasmática y la actividad de la proteína. En el caso del activador tisular del plasminógeno (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 a varias proteínas recombinantes e inmunoglobulinas (Elliott *et al.*, 2003; Raju y Scallan, 2007; Sinclair y Elliott, 2005; Umana *et al.*, 1999). Además, la glicosilación influye en la estabilidad de las inmunoglobulinas (Mimura *et al.*, 2000; Raju y Scallan, 2006).

[0063] Otra molécula utilizada para proteínas de fusión es el fragmento Fc de una IgG (Ashkenazi y Chamow, 1997). El enfoque de la fusión Fc se ha utilizado, por ejemplo, en la tecnología de trampas desarrollada por Regeneron (*por ej.*, la trampa IL1 y la trampa VEGF). El uso de albúmina para prolongar la semivida de los péptidos se ha descrito en el documento US2004/001827, así como para los fragmentos Fab y la proteína de fusión scFv-HSA. Se ha demostrado que la prolongada semivida sérica de la albúmina se debe a un proceso de reciclaje mediado por el FcRn (Anderson *et al.*, 2006; Chaudhury *et al.*, 2003).

[0064] Otra estrategia consiste en utilizar técnicas de mutagénesis 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 al FcRn se puede conseguir 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 por afinidad requieren varias rondas de mutagénesis y pruebas. Esto lleva tiempo, es costoso y está limitado por el número de aminoácidos que al mutar dan lugar a semividas prolongadas. Por lo tanto, se necesitan enfoques alternativos sencillos para mejorar la semivida *in vivo* de los bioterapéuticos. Las terapias con semividas prolongadas *in vivo* son especialmente importantes para el tratamiento de enfermedades crónicas, trastornos autoinmunes, enfermedades inflamatorias, metabólicas, infecciosas y oculares, y el cáncer, sobre todo cuando la terapia es necesaria durante un largo periodo de tiempo. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de desarrollar agentes terapéuticos (*por ej.*, anticuerpos y proteínas de fusión Fc) con mayor persistencia y semividas en circulación, a fin de reducir la dosis y/o la frecuencia de las inyecciones de una variedad de agentes terapéuticos.

G. Marcadores

[0065] Los péptidos y polipéptidos de la presente divulgación pueden conjugarse con marcadores con fines de diagnóstico, como para identificar células cancerosas o células infectadas por virus, incluido su uso en histoquímica. Un marcador según la presente divulgación se define como cualquier fracción que puede detectarse mediante un ensayo. Ejemplos no limitantes de moléculas informadoras incluyen enzimas, radiomarcadores, haptenos, marcadores fluorescentes, moléculas fosforescentes, moléculas quimioluminiscentes, cromóforos, moléculas de fotoafinidad, partículas coloreadas o ligandos, como la biotina.

[0066] Los conjugados de marcador se prefieren generalmente para su uso como agentes de diagnóstico. Los agentes de diagnóstico suelen pertenecer a dos clases: los que se utilizan en diagnósticos *in vitro* y los que se emplean en protocolos de diagnóstico *in vivo*, generalmente conocidos como "imagenaría dirigida". Se conocen en la técnica muchos agentes de formación de imágenes apropiados, así como métodos para su unión a péptidos y polipéptidos (véanse, *por ej.*, los documentos US5,021,236, US4,938,948 y US4,472,509). Los elementos de imagen utilizados pueden ser iones paramagnéticos, isótopos radiactivos, fluorocromos, sustancias detectables por RMN y agentes de imagen de rayos X.

[0067] En el caso de los iones paramagnéticos, se pueden citar a título de ejemplo iones como el cromo (III), el manganeso (II), el hierro (III), el hierro (II), el cobalto (II), el níquel (II), el cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) y/o erbio (III), siendo particularmente preferido el gadolinio. Los iones útiles en otros contextos, como las imágenes de rayos X, incluyen, entre otros, el lantano (III), el oro (III), el plomo (II) y, especialmente, el bismuto (III).

[0068] En el caso de los isótopos radiactivos de aplicación terapéutica y/o diagnóstica, cabe citar la astatina²¹¹, el ¹⁴carbono, el ⁵¹cromo, el ³⁶cloro, el ⁵⁷cobalto, el ⁵⁸cobalto, el cobre⁶⁷, el ¹⁵²Eu, el galio⁶⁷, el ³hidrógeno, el yodo¹²³, el yodo¹²⁵, el yodo¹³¹, el indio¹¹¹, el ⁵⁹hierro, el ³²fósforo, el renio¹⁸⁶, el renio¹⁸⁸, el ⁷⁵selenio, el ³⁵azufre, el tecnecio^{99m} y/o el itrio⁹⁰. A menudo se prefiere el uso de ¹²⁵I en determinadas formas de realización, y también se prefiere el uso de tecnecio^{99m} y/o indio¹¹¹ debido a su baja energía y a su idoneidad para la detección a larga distancia. Los polipéptidos marcados radiactivamente pueden producirse según métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, los polipéptidos pueden yodarse por contacto con yoduro sódico y/o potásico y un agente oxidante químico, como el hipoclorito sódico, o un agente oxidante enzimático, como la lactoperoxidasa. Los péptidos pueden marcarse con tecnecio^{99m} mediante un proceso de intercambio de ligandos, por ejemplo, reduciendo el pertecnato con una solución de estaño, quelando el tecnecio reducido en una columna Sephadex y aplicando el péptido a esta columna. Alternativamente, pueden utilizarse técnicas de etiquetado directo, *por ej.*, incubando pertecnato, un agente reductor como SNCl₂, una solución tampón como una solución de ftalato sódico-potásico, y el péptido. Los grupos funcionales intermediarios que suelen utilizarse para unir radioisótopos que existen como iones metálicos al péptido son el ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) o el ácido etilendiaminotetracético (EDTA).

[0069] 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, Cascade Blue, Cy3, Cy5,6-FAM, isotiocianato de fluoresceína, HEX, 6-JOE, verde de Oregón 488, verde de Oregón 500, verde de Oregón 514, azul del Pacífico, REG, verde rodamina, rojo rodamina, renografina, ROX, TAMRA, TET, tetrametilrodamina y/o Rojo Texas.

[0070] Otro tipo de conjugado contemplado es el destinado principalmente al uso *in vitro*, en el que el péptido está unido a un ligando de unión secundaria y/o a una enzima (una etiqueta enzimática) que generará un producto coloreado al entrar en contacto con un sustrato cromogénico. Ejemplos de enzimas adecuadas son la ureasa, la fosfatasa alcalina, la hidrógeno-peroxidasa (de rábano picante) o la glucosa oxidasa. Los ligandos de unión secundarios preferidos son la biotina y los compuestos de avidina y estreptavidina. El uso de dichos marcadores es bien conocido por los expertos en la técnica y se describe, por ejemplo, en los documentos US3,817,837, US3,850,752, US3,939,350, US3,996,345, US4,277,437, US4,275,149 y US4,366,241.

[0071] Se conocen otros métodos en la técnica para la unión o conjugación de un péptido a su fracción conjugada. Algunos métodos de unión implican el uso de un complejo de quelato metálico que emplea, por ejemplo, un agente quelante orgánico como el anhídrido del ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA); el ácido etilendiaminotetracético; la N-cloro-p-toluenosulfonamida; y/o el tetracloro-3 α -6 α -difenilglicouiril-3 unido al anticuerpo (US4,472,509 y

US4,938,948). Los polipéptidos también pueden reaccionar con una enzima en presencia de un agente de acoplamiento como el glutaraldehído o el periodato. Los conjugados con marcadores de fluoresceína se preparan en presencia de estos agentes de acoplamiento o por reacción con un isotiocianato.

5 IV. Diagnósticos y Terapias

A. Formulaciones Farmacéuticas y Vías de Administración

10 [0072] Cuando se contemplen aplicaciones clínicas, será necesario preparar composiciones farmacéuticas en una forma apropiada para la aplicación prevista. Generalmente, esto implicará preparar composiciones que estén esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que puedan ser perjudiciales para los seres humanos o los animales.

15 [0073] Por lo general, se deseará emplear sales y tampones apropiados para que los vectores de administración sean estables y puedan ser captados por las células diana. También se emplearán tampones cuando se introduzcan células recombinantes en un paciente. Las composiciones acuosas de la presente divulgación comprenden una cantidad eficaz del vector celular, disuelta o dispersa en un portador o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. Estas composiciones también se denominan inóculos. La frase "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas o de otro tipo cuando se
20 administran a un animal o a un ser humano. Tal como se utiliza aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con los vectores o células de la presente divulgación, se contempla su uso en
25 composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones principios activos suplementarios.

[0074] Las composiciones activas de la presente divulgación pueden incluir preparaciones farmacéuticas clásicas. La administración de estas composiciones según la presente divulgación se realizará a través de cualquier vía común siempre que el tejido diana esté disponible a través de dicha vía. Dichas vías incluyen la oral, nasal, bucal, rectal,
30 vaginal o tópica. Alternativamente, la administración puede ser por inyección ortotópica, intradérmica, subcutánea, intramuscular, intratumoral, intraperitoneal o intravenosa. Tales composiciones se administrarían normalmente como composiciones farmacéuticamente aceptables, descritas *supra*.

[0075] Los compuestos activos también pueden administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las soluciones de
35 los compuestos activos como base libre o sales farmacológicamente aceptables pueden prepararse en agua convenientemente mezclada con un tensioactivo, como la hidroxipropilcelulosa. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas, así como en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estos preparados contienen un conservante para evitar la proliferación de microorganismos.

40 [0076] Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la forma debe ser estéril y fluida hasta el punto de que se pueda jeringar fácilmente. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua,
45 etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de los mismos y aceites vegetales. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento, como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede lograrse mediante 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
50 sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

[0077] Las soluciones inyectables estériles se preparan incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida
55 en el disolvente apropiado con varios otros ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Por lo general, las dispersiones se preparan incorporando los diversos principios activos esterilizados a un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los demás ingredientes necesarios de entre los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son las técnicas de secado al vacío y liofilización que producen un
60 polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución previamente filtrada estérilmente.

[0078] Como se usa aquí, "portador farmacéuticamente aceptable" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la
65 absorción y similares. El uso de tales medios y agentes para sustancias activas farmacéuticas es bien conocido en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el principio activo, se

contempla su uso en las composiciones terapéuticas. También pueden incorporarse a las composiciones principios activos suplementarios.

[0079] Para la administración oral, los péptidos y polipéptidos de la presente divulgación pueden incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de enjuagues bucales y dentífricos no ingeribles. Puede prepararse un colutorio incorporando el principio activo en la cantidad requerida en un disolvente adecuado, como una solución de borato sódico (solución de Dobell). Alternativamente, el principio activo puede incorporarse a un lavado antiséptico que contenga borato sódico, glicerina y bicarbonato potásico. El principio activo también puede dispersarse en dentífricos, incluyendo: geles, pastas, polvos y lechadas. El principio activo puede añadirse en una cantidad terapéuticamente eficaz a un dentífrico en pasta que puede incluir agua, aglutinantes, abrasivos, agentes aromatizantes, agentes espumantes y humectantes.

[0080] Las composiciones de la presente divulgación pueden formularse en forma neutra o salina. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos como, por ejemplo, los ácidos clorhídrico o fosfórico, o con ácidos orgánicos como el acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivarse de bases inorgánicas como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y de bases orgánicas como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

[0081] Tras la formulación, las soluciones se administrarán de forma compatible con la formulación de la dosis y en la cantidad que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran fácilmente en diversas formas de administración, como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares. Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse adecuadamente si es necesario y el diluyente líquido debe hacerse primero isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas en particular son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. A este respecto, los expertos en la materia conocerán los medios acuosos estériles que pueden emplearse a la luz de la presente divulgación. Por ejemplo, una dosis podría disolverse en 1 ml de solución isotónica de NaCl y añadirse a 1000 ml de líquido de hipodermoclinis o inyectarse en el lugar propuesto para la infusión, (véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", 15ª edición, páginas 1035-1038 y 1570-1580). La administración variará necesariamente en función del estado del sujeto tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para cada sujeto. Además, para su administración en humanos, los preparados deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza exigidas por las normas de la Oficina de la FDA de Estándares biológicos.

B. Estados de Enfermedad y Afecciones

1. Cáncer

[0082] El cáncer es el resultado del crecimiento de una población clonal de células de un tejido. El desarrollo del cáncer, denominado carcinogénesis, puede modelarse y caracterizarse de varias maneras. Hace tiempo que se aprecia una asociación entre el desarrollo del cáncer y la inflamación. La respuesta inflamatoria interviene en la defensa del huésped contra la infección microbiana y también impulsa la reparación y regeneración de los tejidos. Numerosas pruebas apuntan a una conexión entre la inflamación y el riesgo de desarrollar cáncer, es decir, la inflamación crónica puede provocar displasia. Existen cientos de formas diferentes de cáncer humano y, a medida que aumenta el conocimiento de la genética y la biología subyacentes, estas formas se van subdividiendo y reclasificando.

[0083] Determinar qué causa el cáncer es complejo. Se sabe que muchas cosas aumentan el riesgo de cáncer, como el consumo de tabaco, ciertas infecciones, la radiación, la falta de actividad física, la obesidad y los contaminantes ambientales. Estos pueden dañar directamente los genes o combinarse con fallos genéticos existentes en las células para causar la enfermedad. Aproximadamente entre el cinco y el diez por ciento de los cánceres son totalmente hereditarios.

[0084] El cáncer puede detectarse de varias maneras, incluyendo la presencia de ciertos signos y síntomas, pruebas de detección o imágenes médicas. Una vez detectado un posible cáncer, se diagnostica mediante el examen microscópico de una muestra de tejido. El cáncer suele tratarse con quimioterapia, radioterapia y cirugía. Las posibilidades de sobrevivir a la enfermedad varían mucho en función del tipo y la localización del cáncer y de la extensión de la enfermedad al inicio del tratamiento. Aunque el cáncer puede afectar a personas de todas las edades, y algunos tipos de cáncer son más frecuentes en niños, el riesgo de padecerlo suele aumentar con la edad. En 2007, el cáncer causó alrededor del 13% de todas las muertes humanas en el mundo (7,9 millones). Las tasas aumentan a medida que aumenta el número de personas que llegan a la vejez y se producen cambios masivos en el estilo de vida de los países en desarrollo.

[0085] Los tratamientos se dividen en cinco categorías generales: cirugía, quimioterapia, radiación, medicina alternativa y cuidados paliativos. La cirugía es el principal método de tratamiento de la mayoría de los cánceres sólidos aislados y puede desempeñar un papel en la paliación y la prolongación de la supervivencia. Suele ser una parte importante para realizar el diagnóstico definitivo y la estadificación del tumor, ya que normalmente se requieren

biopsias. En el cáncer localizado, la cirugía suele intentar extirpar toda la masa junto con, en ciertos casos, los ganglios linfáticos de la zona. Para algunos tipos de cáncer esto es todo lo que se necesita para eliminar el cáncer.

[0086] La quimioterapia además de la cirugía ha demostrado ser útil en un número de diferentes tipos de cáncer incluyendo: cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, sarcoma osteogénico, cáncer testicular, cáncer de ovario y ciertos cánceres de pulmón. La eficacia de la quimioterapia suele verse limitada por la toxicidad en otros tejidos del organismo.

[0087] La radioterapia implica el uso de radiación ionizante en un intento de curar o mejorar los síntomas del cáncer. Se utiliza en aproximadamente la mitad de los casos y la radiación puede proceder de fuentes internas en forma de braquiterapia o de fuentes externas. La radiación suele utilizarse junto con la cirugía o la quimioterapia, pero en algunos tipos de cáncer, como el de cabeza y cuello, puede emplearse sola. En el caso de las metástasis óseas dolorosas, ha demostrado ser eficaz en aproximadamente el 70% de las personas.

[0088] Los tratamientos alternativos y complementarios incluyen un grupo diverso de sistemas, prácticas y productos sanitarios que no forman parte de la medicina convencional. "Medicina complementaria" se refiere a métodos y sustancias utilizados junto con la medicina convencional, mientras que "medicina alternativa" se refiere a compuestos utilizados en lugar de la medicina convencional. La mayoría de las medicinas complementarias y alternativas para el cáncer no se han estudiado ni probado de forma rigurosa. Algunos tratamientos alternativos han sido investigados y han demostrado su ineficacia, pero siguen comercializándose y promocionándose.

[0089] Finalmente, los cuidados paliativos se refieren al tratamiento que intenta hacer que el paciente se sienta mejor y puede o no combinarse con un intento de atacar el cáncer. Los cuidados paliativos incluyen acciones para reducir la angustia física, emocional, espiritual y psicosocial que experimentan las personas con cáncer. A diferencia del tratamiento dirigido a eliminar directamente las células cancerosas, el objetivo principal de los cuidados paliativos es mejorar la calidad de vida del paciente.

2. Infección Vírica

[0090] Un virus es un pequeño agente infeccioso que sólo puede replicarse dentro de las células vivas de un organismo. Los virus pueden infectar todo tipo de organismos, desde animales y plantas hasta bacterias y arqueas. Se han descrito detalladamente unos 5.000 virus, aunque existen millones de tipos diferentes. Los virus se encuentran en casi todos los ecosistemas de la Tierra y son el tipo de entidad biológica más abundante.

[0091] Las partículas víricas (conocidas como *viriones*) constan de dos o tres partes: i) el material genético formado por ADN o ARN, moléculas largas que transportan información genética; ii) una cubierta proteica que protege estos genes; y en algunos casos iii) una envoltura de lípidos que rodea la cubierta proteica cuando están fuera de una célula. Las formas de los virus van desde simples formas helicoidales e icosaédricas hasta estructuras más complejas. El tamaño medio de un virus es una centésima parte del de una bacteria. La mayoría de los virus son demasiado pequeños para ser vistos directamente con un microscopio óptico.

[0092] Los virus se propagan de muchas maneras; los virus en las plantas a menudo se transmiten de planta a planta por insectos que se alimentan de la savia de la planta, como los áfidos; los virus en los animales pueden ser transportados por insectos chupadores de sangre. Estos organismos portadores de enfermedades se conocen como vectores. Los virus de la gripe se propagan al toser y estornudar. El norovirus y el rotavirus, causas frecuentes de gastroenteritis vírica, se transmiten por vía fecal-oral y pasan de una persona a otra por contacto, entrando en el organismo a través de los alimentos o el agua. El VIH es uno de varios virus que se transmiten por contacto sexual y por exposición a sangre infectada. El rango de células huésped que un virus puede infectar se denomina "rango huésped". Este puede ser estrecho o, como cuando un virus es capaz de infectar a muchas especies, amplio.

[0093] Las infecciones víricas en animales provocan una respuesta inmunitaria que suele eliminar el virus infeccioso. Las respuestas inmunitarias también pueden producirse mediante vacunas, que confieren una inmunidad adquirida artificialmente frente a la infección vírica específica. Sin embargo, algunos virus, incluidos los que causan el sida y la hepatitis vírica, eluden estas respuestas inmunitarias y dan lugar a infecciones crónicas. Los antibióticos no tienen efecto sobre los virus, pero se han desarrollado varios medicamentos antivirales.

[0094] Diversas enfermedades son fomentadas por infecciones víricas, como la gripe, el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del dengue, el virus del Nilo Occidental, el virus de la viruela, el virus respiratorio sincitial, el virus de la fiebre hemorrágica coreana, la varicela, el virus de la varicela zoster, el virus del herpes simple 1 o 2 virus de Epstein-Barr, virus de Marburgo, hantavirus, virus de la fiebre amarilla, hepatitis A, B, C o E, virus del Ébola, virus del papiloma humano, rinovirus, virus Cocksackie, virus de la poliomielitis, virus del sarampión, virus de la rubéola, virus de la rabia, virus de la enfermedad de Newcastle, rotavirus, HTLV-1 y -2.

C. Métodos de Tratamiento

[0095] Los péptidos y polipéptidos pueden administrarse a sujetos mamíferos (*por ej.*, pacientes humanos) solos o

junto con otros fármacos que traten las enfermedades expuestas anteriormente. La dosis necesaria depende de la elección de la vía de administración; de la naturaleza de la formulación, incluidos los agentes adicionales unidos al polipéptido; de la naturaleza de la enfermedad del paciente; de la talla, el peso, la superficie, la edad y el sexo del sujeto; de otras terapias combinadas; y del criterio del médico tratante. Las dosis adecuadas oscilan entre 0,0001 y 100 mg/kg. Cabe esperar grandes variaciones en la dosis necesaria, dada la variedad de compuestos disponibles y la distinta eficacia de las diversas vías de administración. Por ejemplo, cabe esperar que la administración oral requiera dosis más altas que la administración por inyección intravenosa. Las variaciones en estos niveles de dosificación pueden ajustarse utilizando rutinas empíricas estándar para la optimización, como es bien sabido en la técnica. Las administraciones pueden ser únicas o múltiples (*por ej.*, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 150 o más veces). La encapsulación del polipéptido en un vehículo de administración adecuado (por ej., micropartículas poliméricas o dispositivos implantables) puede aumentar la eficacia de la administración, en particular para la administración oral.

[0096] Las proteínas de dominio Gla de ingeniería pueden utilizarse como agentes de direccionamiento para administrar cargas terapéuticas a las células cancerosas, como radionucleidos, 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 leuprólido, 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, citarabina, fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, interferón α -2b, plicamicina, mercaptopurina, metotrexato, interferón α -2a, acetato de medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, estradiol, acetato de leuprólido, 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, hidroxiaurea, cladribina, mitotán, hidroclicloruro de procarbazona, tartrato de vinorelbina, pentostatina sódica, mitoxantrona, pegaspargasa, denileuquina difitix, altreinoína, porfimer, bexaroteno, paclitaxel, docetaxel, trióxido de arsénico, o tretinoína. Entre las toxinas se encuentran la exotoxina de *Pseudomonas* (PE38), la cadena A de la ricina, la toxina diftérica, además de PE y RT, la proteína antiviral *Pokeweed* (PAP), la saporina y la gelonina. Los radionucleidos para la terapia del cáncer incluyen Y-90, P-32, 1-131, In-111, Sr-89, Re-186, Sm-153 y Sn-117m.

[0097] Los agentes o factores adecuados para la terapia contra infecciones virales incluyen Abacavir, Aciclovir, Aciclovir, Adefovir, Amantadina, Amprenavir, Ampligen, Arbidol, Atazanavir, Atripla, Boceprevir, Cidofovir, Combivir, Darunavir, Delavirdina, Didanosina, Docosanol, Edoxudina, Efavirenz, Emtricitabina, Enfuvirtida, Entecavir, Inhibidores de la entrada, Famciclovir, Fomivirsen, Fosamprenavir, 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 la proteasa, Raltegravir, Inhibidor de la transcriptasa inversa, Ribavirina, Rimantadina, Ritonavir, Piramidina, Saquinavir, Estavudina, Potenciador sinérgico (antirretroviral), Aceite del árbol del té, Telaprevir, Tenofovir, Tenofovir disoproxil, Tipranavir, Trifluridina, Trizivir, Tromantadina, Truvada, Valaciclovir, Valganciclovir, Vicriviroc, Vidarabina, Viramidina, Zalcitabina, Zanamivir y Zidovudina.

[0098] El experto en la técnica puede consultar "Remington's Pharmaceutical Sciences" 15ª edición, capítulo 33, en particular las páginas 624-652. La administración variará necesariamente en función del estado del sujeto tratado. La persona responsable de la administración determinará, en cualquier caso, la dosis adecuada para cada sujeto. Además, para su administración en humanos, los preparados deben cumplir las normas de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza exigidas por las normas de la Oficina de la FDA de Estándares biológicos.

V. Ejemplos

EJEMPLO 1

[0099] Las afinidades de las proteínas de dominio Gla por las membranas celulares se han determinado *in vitro* utilizando vesículas de fosfolípidos preparadas (Shah *et al.*, 1998; Nelsestuen, 1999). Sin embargo, aún no se ha dilucidado del todo cómo se trasladan estos valores *in vitro* a un contexto *in vivo*. La interacción del FVII con el 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 por 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.

[0100] Por lo tanto, los inventores propusieron fabricar y probar 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 (aglutinante de afinidad media que contiene kringle), hFVII (baja afinidad-utiliza un "receptor" secundario que también está regulado al alza en el cáncer), y B0178 (hFVII con afinidad fosfolípida aumentada). Estas proteínas tienen potencialmente diversas características de unión *in vivo* que pueden ser beneficiosas para su uso como sondas (y, si

se validan y son selectivas, potencialmente como terapéuticas) y que hasta la fecha han pasado desapercibidas.

[0101] El enfoque general consistió en construir proteínas recombinantes y probar su expresión. A continuación, se desarrollarían ensayos para evaluar la unión. A continuación, se optimizarían los métodos de expresión y purificación, seguidos del control de calidad de la gamma-carboxilación.

[0102] FIG. 1 muestra secuencias de una variedad de proteínas de dominio Gla que incluyen sitios de carboxilación. FIG. 2 muestra la expresión de una variedad de diferentes proteínas de dominio Gla que fueron diseñadas y expresadas transitoriamente en células 293. FIG. 3 muestra un estudio similar en células BHK21. Dado que uno de los constructos que mejor se expresaba era un constructo de Proteína S + EGF, se utilizó la secuencia señal de la Proteína S con Protrombina Gla + Kringle y Proteína Z + EGF. Sin embargo, sólo se observó expresión intracelular (FIG. 4).

[0103] Se seleccionó la Gla + EGF de Proteína S para su estudio posterior. La secuencia se muestra en la FIG. 5. La proteína se produjo en células BHK21 utilizando el medio RF286. Se recogieron 600 ml y se concentraron 4X. La purificación se realizó en tres etapas:

1. Columna Ni-NTA, 10 ml, recién envasada. El medio se carga en la columna y se eluye con gradiente de Imidazol. Todas las fracciones se someten a inmunoelectrotransferencia de Gla para identificar la proteína S G+E Gla marcada con His.
2. Hitrap Q con elución por etapas de CaCl_2 . Las fracciones Gla positivas se agrupan y se someten a 1 ml de Hitrap Q con elución de 10 mM CaCl_2 .
3. Hitrap Q con gradiente de CaCl_2 (gradiente de sombra 0-10 mM). Las proteínas Gla purificadas por etapas se aplicaron a Q y se eluyeron con CaCl_2 en gradiente (hasta 10 mM). Se produjo un total de 0,9 mg de proteína con un nivel de pureza del 95%. FIG. 6 muestra las fracciones de purificación en condiciones reductoras y no reductoras. FIGS. 7 y 8 muestran diferentes ensayos de apoptosis basados en FACs. Ambas demuestran que el constructo Gla + EGF de Proteína S es específico para las células que sufren apoptosis al igual que la Anexina V (FIG. 7), y que la anexina V puede competir con la unión de la Gla + EGF de Proteína S.

[0104] En resumen, se expresó y purificó la Proteína S Gla+EGF. 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 a las células se producía a través de la fosfatidilserina, como demostraron los ensayos de competencia con Anexina V.

VI. Referencias

[0105] Las siguientes referencias, en la medida en que proporcionan detalles de procedimiento ejemplares u otros detalles complementarios a los expuestos en el presente documento, 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, US6,312,694, US6,261,569, US2005/0015232, US2004/001827A1, US2003/104578A2, US2003/104578A1, WO06096515A2, WO07047504A2, WO06096515A2
- Aaronson and Horvath, Science, 296(5573):1653-5, 2002.
 Abe and 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.
 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.
 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.
 Carter, Nature Reviews Immunol 6, 343-357, 2006.
 Chapman, Advanced Drug Delivery Reviews 54, 531-545, 2002.
 Chaudhury et al., J ExperMed 197, 315-322, 2003.
 Chen & Greene, Mol. Cell. Biol. 5:392-401, 2004.
 Cohen et al., J. Med. Chem., 33:883-894, 1990.

- Cohen et al., *Cell Res*, 19 p625-637, 2009.
Duraismy et al., *Gene*, 373:28-34, 2006.
Duttaroy et al., *Diabetes* 54, 251-258, 2005.
Elliott et al., *NatBiotechnol* 21, 414-421, 2003.
5 Elltiot et al., *Nature*, 461, p2-286, 2009.
Elltiot y Ravichandran, *J. Cell Biol*, 189 (7) p1059-1070, 2010.
Erwig and Henson, *Cell Death Differentiation* 15, p243-250, 2008.
Fischer, *Med. Res. Rev.*, 27(6):755-796, 2007.
10 Gaemers et al., *J. Biol. Chem.*, 276:6191-6199, 2001.
Gendler et al., *J. Biol. Chem.*, 263:12820-12823, 1988.
Germain y Frank, *Clin. Cancer Res.*, 13(19):5665-9, 2007.
Gerondakis et al., *Oncogene* 25(51):6781-99, 2006.
Ghetie et al., *Nature Biotechnol* 15, 637-640, 1997.
15 Ghosh et al., *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16:225-60, 1998.
Gilmore, available from NF-kB.org, 2008.
Grillot et al., *J. Immunol.*, 158:4750-7, 1997.
Gronenborn et al., *Anal. Chem.*, 62(1):2-15, 1990.
Hansson y Stenflo. *J Thrombosis Haemostasis*, 3, P2633-2648, 2005.
20 Hayden and Ghosh, *Cell*, 132:344-62, 2008.
Hinton et al., *J Immunol* 176, 346-356, 2006.
Hodel et al., *Mol. Cell*, 10(2):347-58, 2002.
Hoffman et al., *Oncogene*, 25:6706-16, 2006.
Huang et al., *Cancer Biol Ther.*, 2:702-706, 2003.
Huang et al., *Cancer Res.*, 65:10413-10422, 2005.
25 Huxford et al., *Cell* 95(6):759-70, 1998.
Jackson, *Seminars in Oncology*, 24:L164-172, 1997.
Jacobs et al., *Cell*, 95:749-58, 1998.
Jain et al., *Trends Biotechnol* 25, 307-316, 2007.
Johnson et al., In: *Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto et al. (Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
30 Jones et al., *J. Med. Chem.*, 39:904-917, 1996.
Karin & Lin, *Nat. Immunol.*, 3:221-7, 2002.
Kau et al., *Nat. Rev. Cancer*, 4(2):106-17, 2004.
Kawano et al., *Cancer Res.*, 67:11576-84, 2007.
Keyt et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3670-3674, 1994.
35 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.
Kurihara et al., *Appl Radiat Isot*, 66(9); p1175-1182, 2008.
Lagow and Carson, *J. Cell. Biochem.*, 86:759-72, 2002.
40 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.
Levitán et al., *J. Biol. Chem.*, 280:33374-33386, 2005.
Levy y Shoseyov, *Biotechnol Advances* 20, 191-213, 2002.
45 Li et al., *Cancer Biol. Ther.*, 2:187-193, 2003b.
Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276:35239-35242, 2001.
Li et al., *J. Biol. Chem.*, 276:6061-6064, 2001.
Li et al., *Mol. Cancer Res.*, 1:765-775, 2003c.
Li et al., *Mol. Cell Biol.*, 18:7216-7224, 1998.
50 Li et al., *Oncogene*, 22:6107-6110, 2003a.
Ligtenberg et al., *J. Biol. Chem.*, 267, 6171-6177, 1992.
Lin et al., *Amino Acids*, Published online 17 March 2010.
Loose et al., *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007.
Macao, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 13, 71-76, 2006.
55 McPherson, *J. Biol. Chem.*, 251:6300-6306, 1976.
Melder et al., *Cancer Immunol Immunother* 54, 535-5475, 2005.
Merlo et al., *Cancer Res.*, 49, 6966-6971, 1989.
Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963.
Micheau & Tschopp, *Cell*, 114:181-90, 2003.
60 Mimura et al., *Mol Immunol* 37, 697-706, 2000.
Muthuswamy, *Nat. Cell Biol.*, 3(9):785-92, 2001.
Naresh et al., *Cancer*, 91(3), p578-548, 2001.
Natoli et al., *Nat. Immunol.*, 6:439-45, 2005.
Navia et al., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:202-210, 1992.
65 Nelsestuen, *Trends CardiovascMed*, 9(6), p162-167, 1999.
Okada et al., *Thrombosis Research* 125 (2010): e246-e250.

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.
 Solic. PCT PCT/US00/03745
 Solic. PCT PCT/US00/14667
 Solic. PCT PCT/US99/11913
 Solic. PCT PCT/US99/18441
 Peptide Synthesis, 1985
 Percipalle et al., J. Mol. Biol., (4):722-32, 1997.
 Perey et al., Cancer Res., 52(22):6365-6370, 1992.
 Petkova et al., International Immunol 18, 1759-1769, 2006a.
 Protective Groups in Organic Chemistry, 1973
 Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, J. Cavanagh et al., Academic Press, San Diego, 1996.
 Raina et al., Direct targeting of the GLA DOMAIN oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. Cancer Res., 2009 (IN PRESS).
 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.
 Ramasamy et al., Mol. Cell, 27:992-1004, 2007.
 Remington's Pharmaceutical Sciences, 15^a Ed., 1035-1038 and 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.
 Reutelingsperger et al., J Immunol Methods 265, 123- 132, 2002.
 Ryan and Wentte, 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.
 Schutters y Reutelingsperger, Apoptosis (2010), 15: 1072-1082.
 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.
 Solid Phase Peptide Synthelia, 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.
 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 and Pasut, Drug Discovery Today 10, 1451-1458, 2005.
 Webb et al., J Immunol, 169 p2580-2586, 2002.
 Weber, Advances Protein Chem., 41:1-36, 1991.
 Wegenka et al., Mol. Cell Biol., 14(5):3186-96, 1994.
 Wei et al., Cancer Cell, 7:167-178, 2005.
 Wei et al., Cancer Res., 67(4):1853-8, 2007.
 Wei et al., Mol. Cell., 21:295-305, 2006.
 Weis, Cell, 112(4):441-51, 2003.
 Wen et al., J. Biol. Chem., 278:38029-38039, 2003.
 Wider, BioTechniques, 29:1278-1294, 2000.
 Wijnen et al., Biochem J. (1998), 330, 389-396.
 Yamamoto et al., J. Biol. Chem., 272:12492-12494, 1997.
 Yeh et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89, 1904-1908, 1992.
 Yin et al., J. Biol. Chem., 278:35458-35464, 2003.
 Yin et al., J. Biol. Chem., 279:45721-45727, 2004.
 Yin et al., J. Biol. Chem., 282:257-266, 2007.
 Young et al., Cell. 112(1):41-50, 2003.
 Yu et al., Seminars Thrombosis Hemostasis, 30(1), p21-30, 2004.
 Yu and Jove, Nat. Rev. Cancer, 4(2):97-105, 2004.
 Zhang et al., Mol. Cell. Biol., 19:7138-7146, 1999.

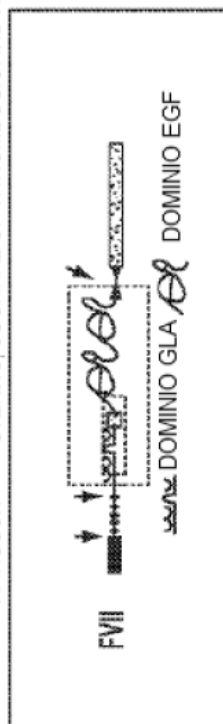
REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido adecuado para dirigir la expresión de la superficie celular de la fosfatidilserina tanto *in vitro* como *in vivo*, comprendiendo dicho polipéptido:
 - un dominio de ácido gamma-carboxiglutámico (Gla) de la proteína S,
 - un dominio EGF, y
 - un agente terapéutico;
 en el que el polipéptido carece de un dominio de proteasa y también carece de un dominio de unión a hormona.
2. El polipéptido según la reivindicación 1, que comprende un dominio EGF de la proteína S.
3. El polipéptido según la reivindicación 2, en el que el dominio GLA tiene la secuencia mostrada en SEQ ID N°: 1.
4. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido tiene 300 aminoácidos o menos.
5. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende SEQ ID N°: 6.
6. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido comprende una región Fc de anticuerpo.
7. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el agente terapéutico se selecciona del grupo que consiste en un agente anticancerígeno, un quimioterapéutico, un radioterapéutico, una citoquina, una hormona, un anticuerpo, un fragmento de unión a anticuerpo, una enzima convertidora de profármacos, un factor de crecimiento, un factor de coagulación y un anticoagulante.
8. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el polipéptido está unido a una carga terapéutica adecuada para tratar el cáncer.
9. El polipéptido según la reivindicación 8, en el que dicha carga útil terapéutica es un quimioterápico, un radioterápico o una toxina.
10. El polipéptido según la reivindicación 9, en el que el quimioterapéutico se selecciona del grupo que consiste en temozolomida, epotilonas, melfalán, carmustina, busulfán, lomustina, ciclofosfamida, dacarbazina, polifeprosán, ifosfamida, clorambucilo, mecloretamina, busulfán, ciclofosfamida, carboplatino, cisplatino, tiotepa, capecitabina, estreptozocina, bicalutamida, flutamida, nilutamida, acetato de leuprólido, 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, citarabina, fluorouracilo, fludarabina, floxuridina, interferón α -2b, plicamicina, mercaptopurina, metotrexato, interferón α -2a, acetato de medroxiprogesterona, fosfato sódico de estramustina, estradiol, acetato de leuprólido, 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, hidroxurea, cladribina, mitotán, hidroclicloruro de procarbazona, tartrato de vinorelbina, pentostatina sódica, mitoxantrona, pegaspargasa, denileuquina diftitix, altretinoína, porfimer, bexaroteno, paclitaxel, docetaxel, trióxido de arsénico, o tretinoína.
11. El polipéptido según la reivindicación 9, donde la toxina se selecciona del grupo que consiste en exotoxina de *Pseudomonas* (PE38), cadena A de ricina, toxina diftérica, además de PE y RT, proteína antiviral Pokeweed (PAP), saporina y gelonina.
12. El polipéptido según la reivindicación 9, en el que el radionucleido se selecciona del grupo que consiste en Y-90, P-32, I-131, In-111, Sr-89, Re-186, Sm-153 y Sn-117m.
13. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, para su uso en el tratamiento del cáncer.
14. El polipéptido para uso según la reivindicación 13, en el que dicho cáncer es cáncer de mama, cáncer cerebral, 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 de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de cabeza y cuello o cáncer de esófago.
15. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende un marcador detectable.

16. El polipéptido según la reivindicación 15, en el que el marcador detectable se selecciona del grupo que consiste en una etiqueta fluorescente, una etiqueta quimioluminiscente, una radiomarcación, una enzima, un colorante y un ligando.
- 5 17. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido está unido a un agente antiviral.
18. El polipéptido según la reivindicación 17, para su uso en el tratamiento de enfermedades víricas.
- 10 19. El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido está fusionado a una secuencia proteínica.



MODIFICADO DE HANSSON Y STENNO. JOURNAL OF THROMBOSIS AND HAEMOSTASIS

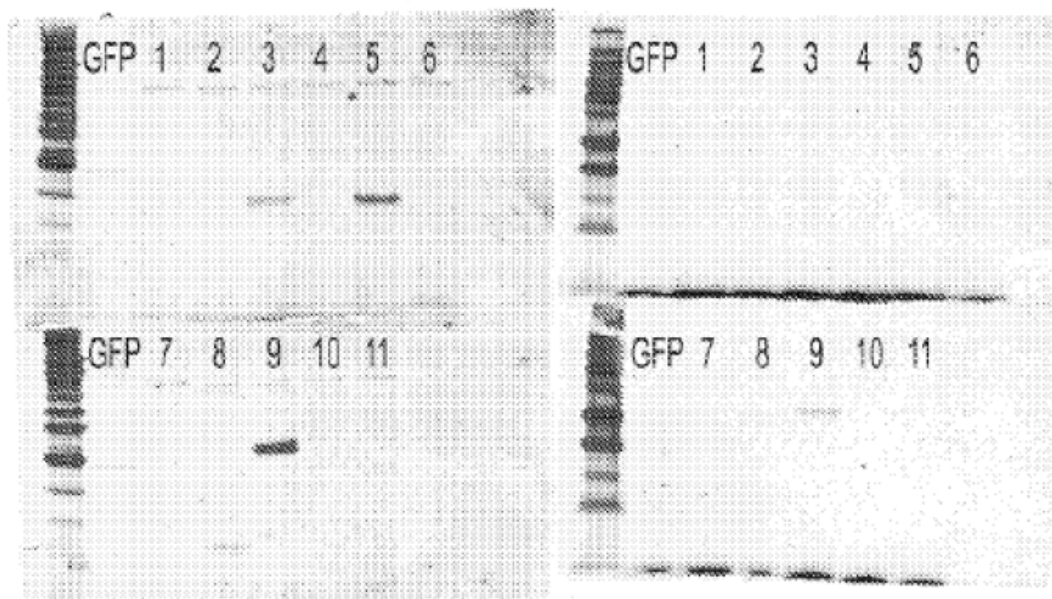


PROTEÍNA Gl α	AFINIDAD DE MEMBRANA	RESIDUOS Gl α	DOMINIO(S) ADICIONAL(ES)	TAMAÑO ** (kD)
PROTEÍNA S	ALTA	11	DOMINIOS EGF	4.95, 26.7
PROTEÍNA Z	MEDIA	13	DOMINIOS EGF	5.06, 13.9
PROTROMBINA	MEDIA	10	DOMINIOS KRINGLE	5.06, 27.3
FVII	BAJA	10	DOMINIO EGF ASOCIADO CON UNIÓN A TF	4.95, 14.1
B0178	MEDIA*	11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

ॐ



ANTI-Gla

ANTI-His

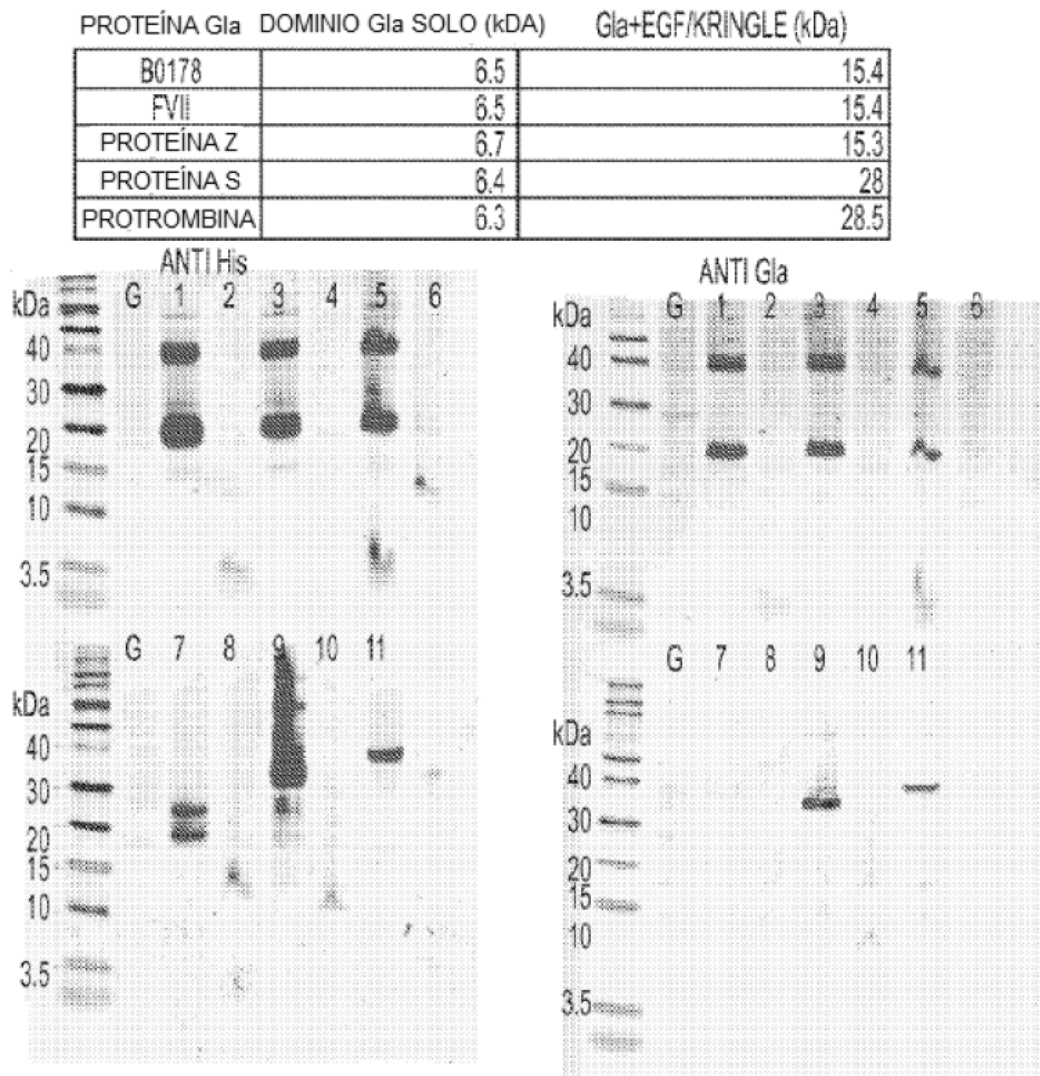
PREP

- 1 pEAKfl-CMV B0178 Gla+EGF
- 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

DESCRIPCIÓN

SECUENCIA SEÑAL/PROPÉPTIDO DE PROTROMBINA

FIG. 2



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

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

FIG. 3

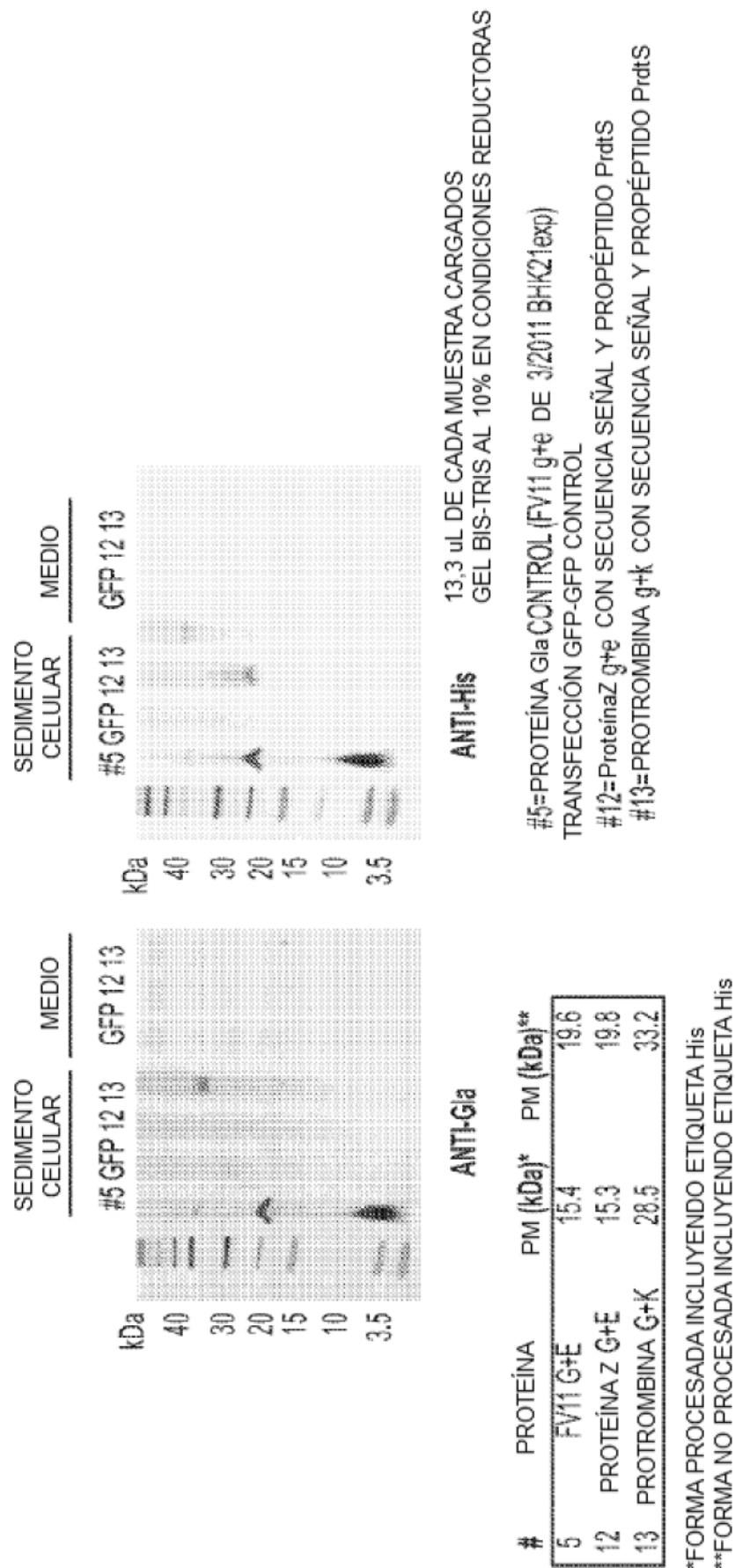


FIG. 4

```

1      11      21      31      41      51      61      71
ANSLLEETKQ GNLERECIEE LCNKEEAREV FENDPETDYF YPKYLVCLRS FQTGLFTAAR QSTNAYPDLR SCVNAIPDQC
81      91      101      111      121      131      141      151
SPLPCNEDGY MSCKD GKASF TCTCKPGWQG EKCEFDINEC KDPSNINGGC SQICDNTPGS YHCCKNGFV MLSNKKDCKD
161      171      181      191      201      211      221      231
VDECSLKPSI CGTAVCKNIP GDFECECEPEG YRYNLKSKSC EDIDECSENM CAQLCVNYPG GYTCTCDGKK GKLAQDQKS
241
CESRHHHHHH

```

MPT:

γ-CARBOXILACIÓN: 11Gla

D95: HIDROXILACIÓN

ENLACE DISULFURO: POSIBLE 14, REPORTADOS 16

ETIQUETA: 6xHis

FIG. 5

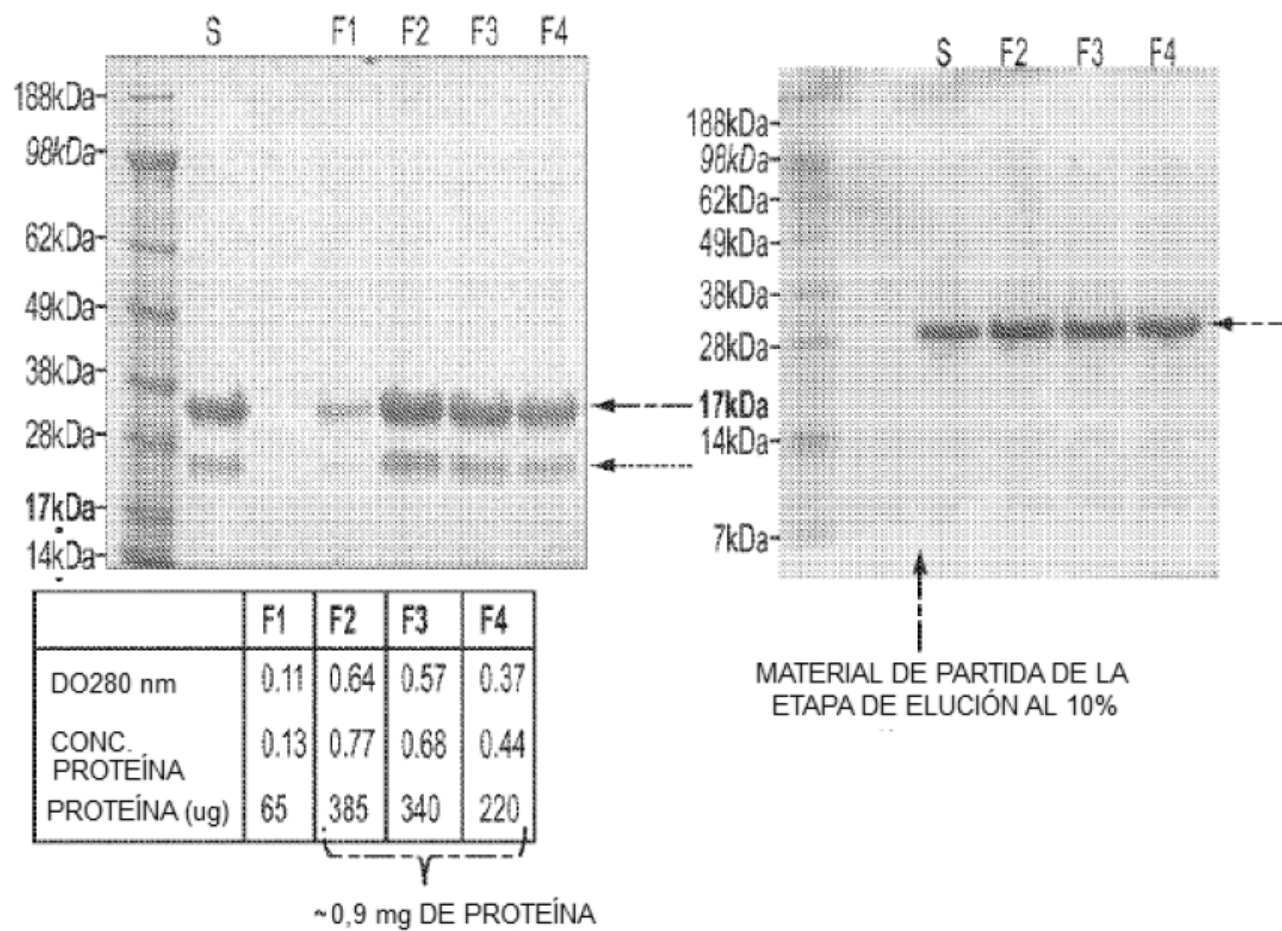


FIG. 6

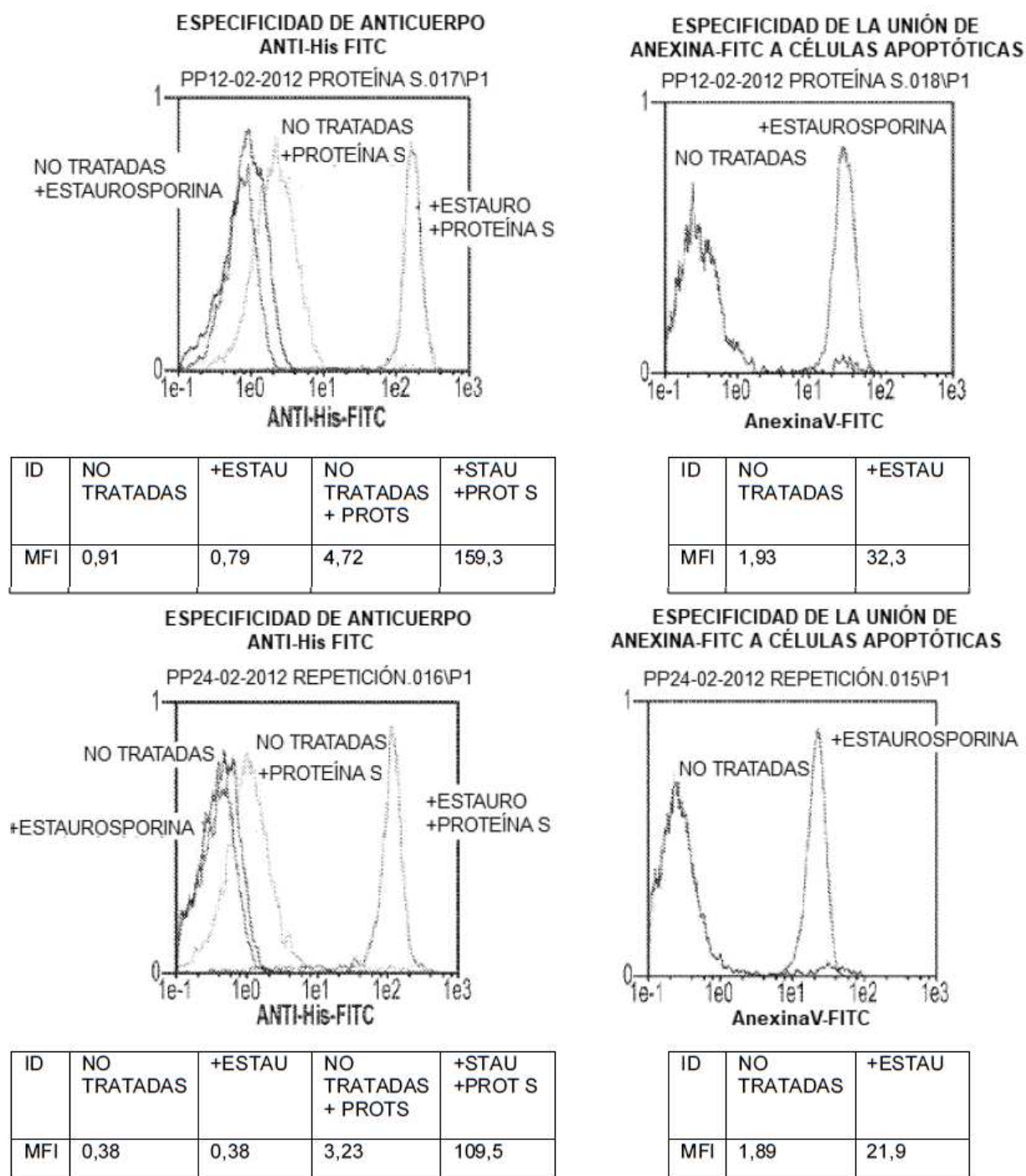
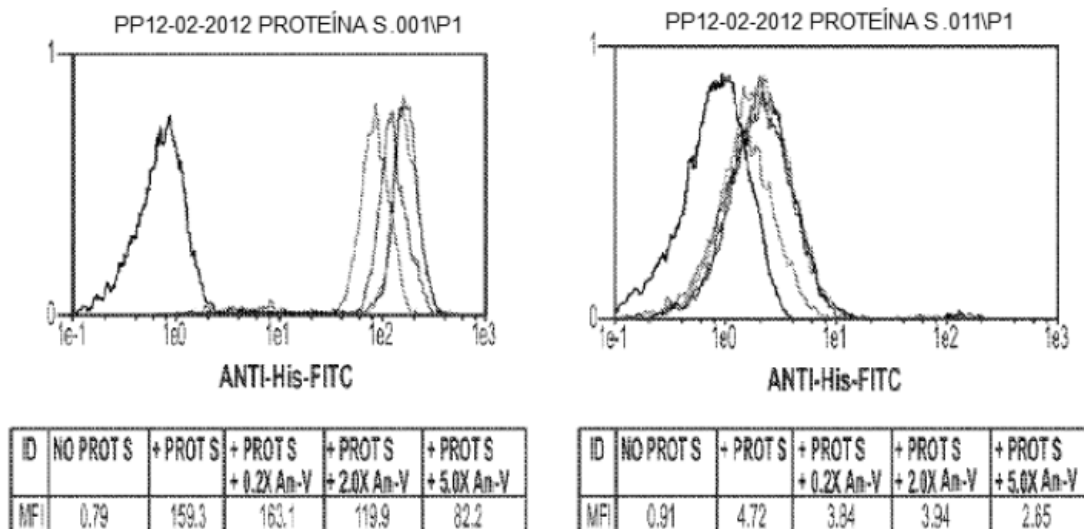


FIG. 7

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



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

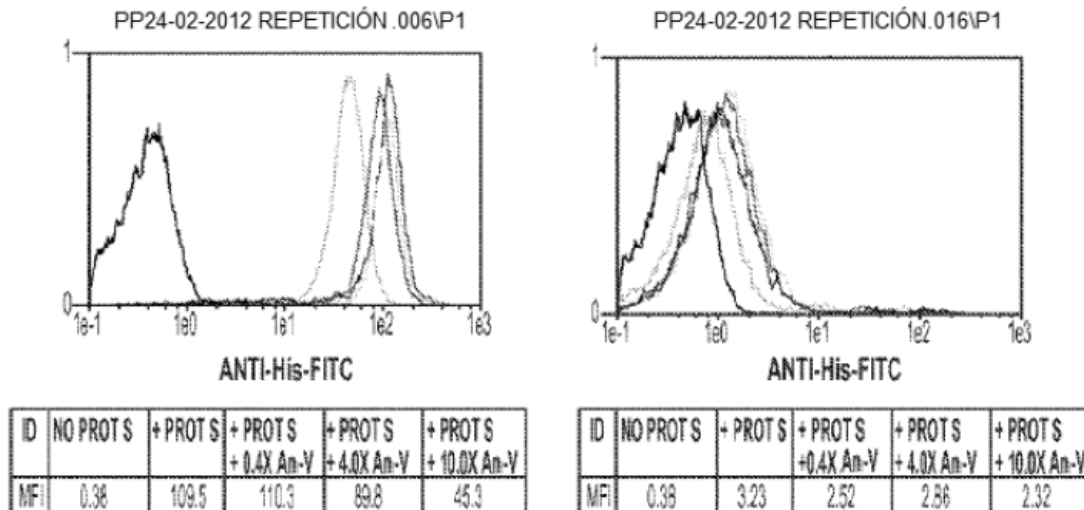


FIG. 8