(19) 中华人民共和国国家知识产权局

# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105008397 B
(45) 授权公告日 2021.07.06

(21) 申请号 201480013636.8

(22) 申请日 2014.03.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105008397 A

(43) 申请公布日 2015.10.28

(30) 优先权数据
61/787753 2013.03.15 US
61/791537 2013.03.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2015.09.10

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/026237 2014.03.13

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2014/151683 EN 2014.09.25

(73) 专利权人 勇士生物科学公司
地址 美国特拉华州

(72) 发明人 M.鲍聪 T.赫米斯顿

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 赵苏林 石克虎

(51) Int.Cl.
*C07K 16/00* (2006.01)
*C12P 21/08* (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2010/006136 A2,2010.01.14
CN 101743309 A,2010.06.16
Kristof Schutters ·Chris Reutelingsperger.Phosphatidylserine targeting for diagnosis and treatment of human diseases.《APOPTOSIS》.2010,第15卷(第9期),摘要、第1076页第2-3段.
mingdong huang等.structural basis of membrane binding by gla domains of vitamin K-dependent proteins.《nature structural biology》.2003,第10卷(第9期),第751-756页.
Francis G. Blankenberg.Imaging the Molecular Signatures of Apoptosis and Injury with Radiolabeled Annexin V.《PROCEEDINGS OF THE AMERICAN THORACIC SOCIETY》.2009,第6卷第469-476页.

审查员 周奋进

权利要求书1页 说明书29页
序列表8页 附图8页

(54) 发明名称

作为治疗试剂的Gla结构域

(57) 摘要

本公开内容涉及重组Gla结构域蛋白质,及其靶向细胞表面上的磷脂酰丝氨酸(PtdS)部分的用途,所述细胞特别是表达升高水平的PtdS的那些,例如经历细胞凋亡的细胞。

1.适合用于靶向细胞表面表达的磷脂酰丝氨酸的经分离的多肽，所述多肽包含：

由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或通过从SEQ ID NO:6去除HIS标签而获得的氨基酸序列组成的蛋白Sγ羧基谷氨酸(Gla)结构域；其连接于

选自可检测标记、蛋白质性质的序列及其组合的实体，

其中所述多肽缺乏C末端丝氨酸蛋白酶结构域和性激素结合球蛋白样结构域两者。

2.权利要求1的多肽，其中所述Gla结构域连接于可检测标记。

3.权利要求2的多肽，其中所述可检测标记是荧光标记、化学发光标记、放射性标记、酶、染料或配体。

4.权利要求1-3的任一项的多肽，其中所述Gla结构域连接于抗体Fc区。

5.适合用于靶向细胞表面表达的磷脂酰丝氨酸的经分离的多肽在制备用于治疗受试者中的癌症的药物中的用途，所述多肽包含：

由SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列或通过从SEQ ID NO:6去除HIS标签而获得的氨基酸序列组成的蛋白Sγ羧基谷氨酸(Gla)结构域；其连接于

选自可检测标记、治疗剂、蛋白质性质的序列及其组合的实体，并且

其中所述多肽缺乏C末端丝氨酸蛋白酶结构域和性激素结合球蛋白样结构域两者。

6.权利要求5的用途，其中所述癌症是乳腺癌、脑癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、结肠癌、皮肤癌、直肠癌、宫颈癌、子宫癌、肝癌、胰腺癌、头与颈癌或食道癌。

7.权利要求5或6的用途，其进一步包括用第二癌症疗法治疗所述受试者。

8.权利要求7的用途，其中所述第二癌症疗法是免疫疗法、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、细胞因子疗法或激素疗法。

# 作为治疗试剂的Gla结构域

[0001] 背景

[0002] 本申请要求于2013年3月15日提交的美国临时申请序列号61/791,537,和2013年3月15日提交的美国临时申请序列号61/787,753的优先权利益,所述美国临时申请的整个内容在此引入作为参考。

[0003] 1. 领域

[0004] 本公开内容涉及使用Gla结构域肽和多肽靶向细胞膜上的磷脂酰丝氨酸(PtdS)。公开了这些肽和多肽作为治疗试剂的用途。

[0005] 2. 相关技术

[0006] 磷脂酰丝氨酸(PtdS)是通常定位于细胞膜的内叶(细胞质侧)的带负电的磷脂组分。然而,PtdS可以通过混杂酶(翻转酶家族成员)从内叶转运到外叶,并且暴露于细胞表面上。除了极少数例外,PtdS的这种活性外化是对细胞损害的应答(van den Eijnde等人,2001;Erwig和Henson, 2008)。例如,组织损伤给血小板、白细胞和内皮细胞发信号,以快速且可逆地重新分配PtdS,这导致促进在细胞表面上的凝血和补体活化。类似地,细胞凋亡信号导致PtdS的外化,然而,以更逐步和持续的方式。这种外部PtdS提供了关键识别标记物,其允许巨噬细胞摄取来自周围组织的濒死细胞,同时压制完全和有害的免疫应答(Erwig和Henson, 2008)。这种去除过程是组织稳态必需的,并且在“健康”环境中,它是非常有效的。事实上,尽管每天丧失>$10^9$细胞,但凋亡细胞的组织学检测在正常组织中是罕见事件(Elltiot和Ravichandran, 2010;Elltiot等人,2009)。然而,在许多病理学状况下,存在凋亡细胞去除的过程不堪重负、延迟或不存在的证据(Elltiot和Ravichandran, 2010;Lahorte等人,2004)。例如,几项肿瘤学研究提出高细胞凋亡指数与更高级别的肿瘤、增加的迁移率和患者的预后不良相关(Naresh等人,2001;Loose等人,2007;Kurihara等人,2008;Kietselaer等人,2002)。这些研究以及类似这些的其他研究提出细胞凋亡和外部PtdS表达可以是有力的疾病标记物(Elltiot和Ravichandran, 2010)。

[0007] 存在对于阴离子磷脂表面具有高亲和力的几种蛋白质,其中膜联蛋白V最广泛用作PtdS靶向探针(Lahorte等人,2004)。对于含PtdS囊泡具有高亲和力($K_d$ = 0.5-7 nM)和低于肾滤过阈值(大约60 kDa)的分子量(37 kDa),膜联蛋白V在临床中已显示作为细胞凋亡探针的希望(Lin等人,2010;Tait和Gibson, 1992)。此外,它已用于广泛多样的适应症,包括肿瘤学、神经病学和心脏病学中的那些(Lahorte等人,2004;Boersma等人,2005;Blankenberg, 2009;Reutelingsperger等人,2002)。靶向PtdS细胞表面表达的生物探针的使用已在体外和在体内显示。虽然它们在临床中的效用是有希望的,但它们在很大程度上仍未被利用。

[0008] 概述

[0009] 因此,依照本公开内容,提供了靶向细胞膜磷脂酰丝氨酸(PtdS)的方法,其包括(a)提供包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域的经分离的多肽;和(b)使肽与细胞表面接触,其中所述多肽与细胞膜上的PtdS结合。细胞膜可以是心肌细胞膜、神经元细胞膜、内皮细胞膜、病毒感染细胞膜、凋亡细胞膜、血小板膜、质膜衍生的囊泡

(PMV)或癌细胞膜。多肽可以进一步包含EGF结合结构域、Kringle结构域和/或芳香族氨基酸堆叠结构域。Gla结构域可以来自因子II、因子VII、因子IX、因子X、蛋白S或蛋白C。多肽可以进一步包含可检测标记,例如荧光标记、化学发光标记、放射性标记、酶、染料或配体。

[0010] 多肽可以为300个残基或更少、200个残基或更少、或100个残基或更少,包括100-200和100-300个残基的范围。多肽可以包含5-15个Gla残基,9-13个Gla残基,包括5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个Gla残基。多肽可以包含超过13个Gla残基,但小于30%的总Gla残基。多肽可以大小为约4.5至30 kD。多肽可以包含至少一个二硫键或2-5个二硫键。多肽可以包含蛋白S Gla结构域。多肽可以包含蛋白S Gla结构域、蛋白S EGF结构域、凝血酶原Gla结构域、凝血酶原Gla结构域加上凝血酶原Kringle结构域、蛋白Z Gla结构域、蛋白Z Gla结构域加上凝血酶原Kringle结构域、因子VII Gla结构域、或因子VII Gla结构域加上凝血酶原Kringle结构域。多肽可以进一步包含抗体Fc区。前述中的任一种均可含有前述蛋白质的天然序列的保守置换,和/或显示出与所示天然结构域的同源性百分比。

[0011] 在另一个实施方案中,提供了治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。癌症可以是乳腺癌、脑癌、胃癌、肺癌、前列腺癌、卵巢癌、睾丸癌、结肠癌、皮肤癌、直肠癌、宫颈癌、子宫癌、肝癌、胰腺癌、头与颈癌或食道癌。该方法可以进一步包括用第二癌症疗法治疗受试者,所述第二癌症疗法例如免疫疗法、放射疗法、化学疗法、毒素疗法、细胞因子疗法或激素疗法。

[0012] 另外一个实施方案包括治疗受试者中的自身免疫疾病的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。自身免疫疾病可以是脊椎关节病、强直性脊柱炎、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、肠易激病、炎性肠病、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、家族性地中海热、肌萎缩侧索硬化、干燥综合征、早期关节炎、病毒性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、牛皮癣、脉管炎、韦格纳氏肉芽肿、阿狄森氏病、脱发、抗磷脂综合征、白塞氏病、乳糜泻、慢性疲劳综合症、溃疡性结肠炎、I型糖尿病、纤维肌痛、自身免疫性胃炎、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯氏病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、重症肌无力、寻常型天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、风湿热、肉瘤样病、硬皮病、白癜风、血管炎、小血管炎、肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉瘤样病、硬皮病、移植物抗宿主病(急性和慢性)、再生障碍性贫血、或周期性嗜中性粒细胞减少症。该方法可以进一步包括用第二自身免疫疾病疗法治疗受试者,所述第二自身免疫疾病疗法例如强的松、甲基强的松、Venipred、倍氟米松、氢化可的松、去炎松、关节内注射己曲安奈德、Methapred、口服Rayos、倍他米松或依那西普。

[0013] 在另外一个实施方案中,提供了治疗受试者中的病毒疾病的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。病毒疾病可以是流感、人类免疫缺陷病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、天花病毒、呼吸道合胞病毒、朝鲜出血热病毒、水痘、水痘带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒1或2、EB病毒、马尔堡病毒、汉坦病毒、黄热病病毒、甲、乙、丙或戊型肝炎、埃博拉病毒、人乳头状瘤病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、狂犬病病毒、新城疫病毒、轮状病毒、HTLV-1和-2。该方法可以进一步包括用第二抗病毒疗法治疗受试者,所述第二抗病毒疗法例如阿巴卡韦、无环鸟苷、阿昔洛韦、阿德福韦、金刚烷胺、氨普那韦、聚肌胞、阿比朵尔、阿

扎那韦、立普妥、Boceprevirertet、西多福韦、双汰芝、达芦那韦、地拉韦啶、去羟肌苷、二十二醇、依度尿苷、依非韦伦、恩曲他滨、恩夫韦地、恩替卡韦、进入抑制剂、泛昔洛韦、福米韦生、福沙那韦、膦甲酸、膦乙酸、更昔洛韦、伊巴他滨、异丙肌苷(Imunovir)、碘苷、咪喹莫特、茚地那韦、肌苷、整合酶抑制剂、干扰素III型、干扰素II型、干扰素I型、干扰素、拉米夫定、洛匹那韦、洛韦胺、马拉韦罗、吗啉胍、美替沙、奈非那韦、奈韦拉平、多吉美(Nexavir)、核苷类似物、奥司他韦、聚乙二醇干扰素α-2a、喷昔洛韦、帕拉米韦、普可那利、鬼臼毒素、蛋白酶抑制剂、雷特格韦、逆转录酶抑制剂、利巴韦林、金刚乙胺、利托那韦、Pyramidine、沙奎那韦、司他夫定、协同增强剂(抗逆转录病毒)、茶树油、特拉匹韦、替诺福韦、替诺福韦酯、替拉那韦、曲氟尿苷、三协唯、曲金刚烷、特鲁瓦达、伐昔洛韦、缬更昔洛韦、维立韦罗(Vicriviroc)、阿糖腺苷、伟拉咪定、扎西他滨、扎那米韦或齐多夫定。

[0014] 在再进一步的实施方案中,提供了治疗受试者中的高凝病症的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。该方法可以进一步包括用一种或多种另外的抗凝剂治疗受试者。

[0015] 还提供的是调节受试者中的凝血的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。该方法可以进一步包括给受试者施用凝血因子。

[0016] 另外一个实施方案包括治疗受试者中的败血症的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。再进一步的实施方案包括治疗镰状细胞受试者中的血管阻塞危象的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。

[0017] 最后,提供了治疗特征在于磷脂酰丝氨酸在细胞表面上的病理性表达的病症的方法,其包括给受试者施用经分离的多肽,其包含γ羧基谷氨酸(Gla)结构域且缺乏蛋白酶或激素结合结构域。

[0018] 考虑本文描述的任何方法或组合物均可就本文描述的任何其他方法或组合物而言实现。

[0019] 本公开内容的其他目的、特点和优点根据下述详述将变得显而易见。然而,应当理解详述和具体实施例虽然指示公开内容的具体实施方案,但仅给出作为举例说明,因为在公开内容的精神和范围内的各种变化和修饰根据该详述对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0020] 附图简述

[0021] 下述附图构成本说明书的部分,并且包括以进一步证实本公开内容的某些方面。通过参考与详述组合的这些附图中的一个或多个,公开内容可以得到更好理解。

[0022] 图1 - Gla和Gla-EGF/Kringle结构域蛋白质的实验对象组的构建。

[0023] 图2 - Gla结构域蛋白质构建体用于表达的测试。使用293cellFectin瞬时转染到293细胞内。10%凝胶具有还原样品,装载23.3 μl培养基。

[0024] 图3 - Gla结构域蛋白质构建体用于表达的测试。在BHK21细胞中瞬时转染。10%凝胶具有还原样品,装载20 μl(1/100总细胞团块)。

[0025] 图4 - 改变信号序列改变分泌。在BHK21细胞中瞬时转染。10%凝胶具有还原样品,装载13.3 μl。

[0026] 图5 - 蛋白S Gla + EGF序列。

[0027] 图6 - 蛋白S Gla + EGF的纯化。F1-F4是柱层析级分。10%凝胶,非还原条件。

[0028] 图7 - 蛋白S Gla + EGF的细胞凋亡测定。顶图和底图代表相同的一式两份操作,除了蛋白S Gla + EGF的量减少,以及抗His结构域抗体的量减少之外。

[0029] 图8 - 蛋白S Gla + EGF的细胞凋亡测定。顶图和底图代表相同的一式两份操作,除了使用的膜联蛋白V的量之外,所述量在底图中是加倍的。

[0030] 举例说明性实施方案的描述

[0031] 如同膜联蛋白,γ-羧基谷氨酸(Gla)结构域蛋白质例如因子II、VII、IX、X、蛋白C和蛋白S结合阴离子膜。事实上,Gla结构域已用作关于小分子的模型,所述小分子合理设计为细胞凋亡特异性探针(Cohen等人,2009)。此处,本发明人提议利用这些Gla结构域的膜靶向部分作为对于细胞凋亡和疾病特异性的新一类生物探针。这些天然存在和靶向蛋白质的使用可以导致相对于目前探针增强的特异性,伴随尺寸更小(<30 kDa)的附加优点。即使在包括EGF和/或Kringle结构域的更大实施方案中,这些蛋白质仍可以小于膜联蛋白V(37 kDa),且可能小至<5 kDa。这些生物探针可以在体外和体内靶向PtdS细胞表面表达。因此,能够开发细胞凋亡/疾病靶向探针,其在亲和力、特异性和大小方面优于膜联蛋白V,具有用作治疗剂的附加潜力。公开内容的这些及其他方面在下文更详细地描述。

[0032] 适当时,以单数使用的术语还包括复数,并且反之亦然。在下文所示的任何定义与该单词在任何其他文件,包括引入本文作为参考的任何文件中的使用冲突的情况下,应始终以下文所示的定义为准,用于解释本说明书及其相关权利要求的目的,除非明确预期相反含义(例如在其中该术语最初使用的文件中)。除非另有说明,否则“或”的使用意指“和/或”。除非另有说明,或当“一个或多个/一种或多种”明确不适当时,否则“一个/种”在本文中的使用意指“一个或多个/一种或多种”。“包含(comprise)”、“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(include)”、“包括(includes)”和“包括(including)”的使用是可互换的,并且不是限制性的。例如,术语“包括”应意指“包括但不限于”。单词“约”意指所述数目加上或减去5%。

[0033] 如本文使用的,“经分离的肽或多肽”意指基本上不含其他生物分子的肽或多肽,包括具有不同序列的肽或多肽。在一些实施方案中,经分离的肽或多肽为按干重计至少约75%、约80%、约90%、约95%、约97%、约99%、约99.9%或约100%纯。在一些实施方案中,纯度可以通过诸如柱层析、聚丙烯酰胺凝胶电泳或HPLC分析的方法进行测量。

[0034] 如本文使用的,“保守置换”指涉及一种或多种氨基酸置换具有相似生物化学特性的氨基酸的多肽修饰,其不导致多肽的生物学或生物化学功能丧失。“保守氨基酸置换”是其中氨基酸残基替换为具有相似侧链的氨基酸残基的置换。具有相似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中得到限定。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、具有β分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)、以及具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。本公开内容的抗体可以具有一种或多种保守氨基酸置换,仍保留抗原结合活性。

[0035] 对于核酸和多肽,术语"基本同源性"指示当最佳比对且比较时,在至少约80%的核苷酸或氨基酸中,通常为至少约85%,在一些实施方案中,约90%、91%、92%、93%、94%或95%,在至少一个实施方案中,在至少约96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%或99.5%的核苷酸或氨基酸中,两个核酸或两个多肽或其指定序列是相同的,伴随适当的核苷酸或氨基酸插入或缺失。可替代地,当区段在选择杂交条件下与链的互补体杂交时,存在关于核酸的基本同源性。还包括的是与本文所述的特异性核酸序列和氨基酸序列具有基本同源性的核酸序列和多肽序列。

[0036] 两个序列之间的同一性百分比是由序列共享的相同位置数目的函数(即同源性% = 相同位置# / 位置总# x 100),考虑到缺口数目和每个缺口的长度,需要引入所述缺口用于两个序列的最佳比对。两个序列之间的序列比较和同一性百分比测定可以使用数学算法来完成,例如但不限于VectorNTI™(Invitrogen Corp., Carlsbad, CA)的AlignX™模块。对于AlignX™,多重比对的缺省参数是:缺口开放罚分:10;缺口延伸罚分:0.05;缺口分离罚分范围:8;比对延迟同一性%:40。(更多细节在万维网上的invitrogen.com/site/us/en/home/LINNEA-Online-Guides/LINNEA-Communities/Vector-NTI-Community/Sequence-analysis-and-data-management-software-for-PCs/AlignX-Module-for-Vector-NTI-Advance.reg.us.html处)。

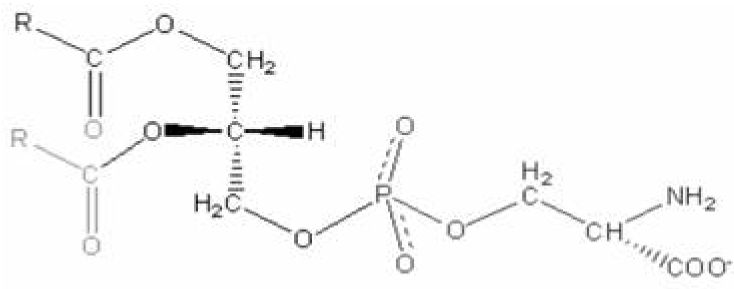
[0037] 用于测定查询序列(本公开内容的序列)和主题序列之间的最佳总体匹配的另一种方法,也称为总体序列比对,可以使用CLUSTALW计算机程序(Thompson等人,*Nucleic Acids Res*, 1994, 2(22): 4673-4680)进行测定,其基于Higgins等人,*Computer Applications in the Biosciences*(CABIOS), 1992, 8(2): 189-191)的算法。在序列比对中,查询和主题序列均为DNA序列。总体序列比对的结果以同一性百分比表示。可以用于DNA序列的CLUSTALW比对以经由配对比对计算同一性百分比的参数是:矩阵=IUB,k元组 = 1,顶部对角线数目 = 5,缺口罚分 = 3,缺口开放罚分 = 10,缺口延伸罚分 = 0.1。对于多重比对,可以使用下述CLUSTALW参数:缺口开放罚分 = 10,缺口延伸罚分 = 0.05;缺口分离罚分范围:8;比对延迟同一性%=40。

[0038] 核酸可以存在于全细胞、细胞裂解产物中、或者以部分纯化或基本上纯的形式存在。当从它在天然环境中通常与之结合的其他细胞组分纯化出时,核酸是"经分离的"或"致使基本上纯的"。为了分离核酸,可以使用诸如下述的标准技术:碱/ SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳和本领域众所周知的其他技术。

[0039] I. 磷脂酰丝氨酸(PtdS)

[0040] A. 结构和合成

[0041] 磷脂酰丝氨酸(缩写为PtdS、Ptd-L-Ser或PS)是磷脂组分,通常通过称为翻转酶的酶保持在细胞膜的内叶(细胞溶质侧)上。当细胞经历细胞凋亡时,磷脂酰丝氨酸不再局限于膜的细胞溶质部分,而是变得暴露于细胞表面上。PtdS的化学式为$C_{13}H_{24}NO_{10}P$,并且具有385.304的分子质量。结构显示于下文:

[0042] 

[0043] 磷脂酰丝氨酸通过使氨基酸丝氨酸与CDP(二磷酸胞苷)活化的磷脂酸缩合在细菌中生物合成。在哺乳动物中,磷脂酰丝氨酸通过与磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的碱交换反应来产生。相反,磷脂酰丝氨酸还可以产生磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱,尽管在哺乳动物中,由磷脂酰丝氨酸生成磷脂酰胆碱的途径仅在肝中操作。

[0044] B. 功能

[0045] 磷脂酰丝氨酸的早期研究由牛脑蒸馏获得化学制品。由于关于疯牛病的关注,现代研究和商购可得的产品由大豆制备。在大豆产品中附着至丝氨酸的脂肪酸不同于牛产品中的那些,并且也是不纯的。大鼠中的初步研究指示大豆产品至少与牛起源的产品一样有效。

[0046] 美国FDA已将"合格健康声明"情况给予磷脂酰丝氨酸,也就是说,"磷脂酰丝氨酸的消费可以降低老年人中的痴呆危险"和"磷脂酰丝氨酸的消费可以降低老年人中的认知功能障碍危险"。

[0047] 磷脂酰丝氨酸已证实在参与骑自行车、重量训练和耐力跑的运动员中加速恢复、预防肌肉酸痛、改善健康,并且可能具有生力特性。据报道通过钝化运动诱导的皮质醇水平增加,大豆PtdS以剂量依赖性方式(400 mg)是用于对抗运动诱导应激的有效补充剂。PtdS补充促进运动员的希望的激素平衡,并且可能减弱伴随过度训练和/或过度拉伸的生理性衰退。在近期研究中,PtdS已显示在心理应激期间增强青少年群组中的情绪,并且通过增加高尔夫球手的应激抗性,来改善在从球座开球期间的准确度。首个先导研究指示PtdS补充对于患有注意缺陷多动症的儿童可能是有利的。

[0048] 传统上,PtdS补充衍生自牛皮质(BC-PS);然而,由于传染病的潜在转移,大豆衍生的PS(S-PS)已确定为有效的安全替代物。大豆衍生的PS是一般认为安全的(GRAS),并且是用于老人的安全营养补充剂,如果每天三次吸收200 mg的剂量。磷脂酰丝氨酸已显示降低小鼠中的特异性免疫应答。

[0049] PtdS可以在肉类中发现,但在脑和内脏例如肝和肾中最丰富。仅少量PS可以在乳制品或蔬菜中发现,除了白豆之外。

[0050] 膜联蛋白A5是天然存在的蛋白质,对于PtdS具有狂热的结合亲和力。标记的膜联蛋白A5允许在体外或体内显现处于早期至中期细胞凋亡状态的细胞。另一种PtdS结合蛋白是Mfge8。锝标记的膜联蛋白A5允许区别恶性和良性肿瘤,其病理学包括与良性肿瘤中的细胞凋亡低速率相比较,在恶性肿瘤中的细胞分裂和细胞凋亡高速率。

[0051] II. Gla结构域蛋白质

[0052] A. Gla结构域

[0053] Gla结构域蛋白质的一般结构是Gla结构域,随后为EGF结构域,且随后为C末端丝氨酸蛋白酶结构域。例外是凝血酶原,其含有代替EGF结构域的Kringle结构域,和蛋白S,其

不具有丝氨酸蛋白酶结构域，而是性激素结合球蛋白样(SHBG)结构域(Hansson和Stenflo，2005)。Gla结构域蛋白质对阴离子膜的亲和力不同。大致上，它们分成3个类别：1)Kd为30-50 nM高亲和力结合剂，2)$K_d$为100-200 nM的中亲和力结合剂和3)Kd为1000-2000 nM的低亲和力结合剂。高亲和力Gla结构域蛋白质已显示结合阴离子膜，而蛋白S特别证实经由其与PtdS的相互作用与凋亡细胞结合(Webb等人，2002)。低亲和力Gla结构域蛋白质使用次级受体与细胞膜结合。例如，FVII利用组织因子(TF)。Gla结构域/第1个EGF结构域被认为构成FVII的高亲和力TF结合结构域。对于这种方法重要的是，存在已显示在癌细胞包括结肠直肠癌、NSCL癌和乳腺癌的表面上的TF上调的许多研究，并且这些高TF水平已与预后不良相关(Yu等人，2004)。尽管关于阴离子膜的亲和力对于FVII相对很低，但高亲和力TF相互作用的添加连同记载的癌症中TF上调使得它成为潜在有利的癌症特异性探针。

[0054] B. 含Gla结构域蛋白质

[0055] 1. 因子II

[0056] 凝血酶原也称为凝血因子II，在凝血级联中蛋白酶解切割，以形成凝血酶，其最终导致失血的制止。凝血酶依次又充当丝氨酸蛋白酶，其将可溶性纤维蛋白原转换成不溶性纤维蛋白链，以及催化许多其他凝血相关反应。它主要在肝中表达。

[0057] 编码凝血酶原的基因定位于染色体11上的着丝粒区域中。它由14个外显子组成且含有24千碱基的DNA。该基因编码信号区、前肽区、谷氨酸结构域、2个Kringle区和催化结构域。在维生素K的存在下，酶γ-谷氨酰羧化酶将*N*末端谷氨酸残基转换为γ-羧基谷氨酸残基。这些γ-羧基谷氨酸残基是凝血酶原与血小板膜上的磷脂结合必需的。

[0058] 遗传性因子II缺乏是常染色体隐性遗传病症，其可以表现为低凝血酶原血症，凝血酶原的总体合成中的减少，或表现为异常凝血酶原血症，功能失调的凝血酶原的合成。纯合个体一般是无症状的，并且具有2-25%的功能凝血酶原水平。然而，有症状的个体可以经历容易挫伤、鼻出血、软组织出血、过度术后出血和/或月经过多。

[0059] 凝血酶原在慢性荨麻疹、自身免疫疾病和各种血管病症中起作用。青斑样血管病变与免疫球蛋白(Ig)M抗磷脂酰丝氨酸-凝血酶原复合物抗体相关。在真皮上至中层中的抗磷脂酰丝氨酸-凝血酶原复合物抗体和组织病理性坏死性脉管炎的存在，指示皮肤白细胞破碎性脉管炎而不是皮肤结节性多动脉炎。

[0060] 除了凝血酶原缺乏之外，另一种凝血酶原病症是凝血酶原20210a突变。静脉血栓栓塞的家族原因，凝血酶原20210a突变导致增加水平的血浆凝血酶原和同时发生的发展血栓形成的危险增加。尽管这种病症的确切机制仍未阐明，但凝血酶原20210a突变涉及在凝血酶原基因的3’非翻译区内的位置20210处的丙氨酸置换鸟嘌呤。该突变改变基因的多腺苷酸化位点，且导致增加的mRNA合成，伴随蛋白质表达中的后续增加。

[0061] 2. 因子VII

[0062] 因子VII(以前称为前转化素(proconvertin))是促使凝血级联中的血液凝固的蛋白质之一。关于因子VII的基因定位于染色体13(13q34)上。它是丝氨酸蛋白酶类别的酶，并且重组形式的人因子VIIa(NovoSeven)具有美国食品和药物管理局批准，用于血友病患者中不受控制的出血。它有时未被许可地用于严重的无法控制的出血中，尽管存在安全关注。生物相似形式的重组活化因子VII(AryoSeven)由AryoGen Biopharma制造。

[0063] 因子VII(FVII)的主要作用是与组织因子(TF/因子III)结合起始凝血过程。组织

因子在血管外侧上发现 - 通常不暴露于血流。在血管损伤后,组织因子暴露于血液和循环因子VII。一旦与TF结合,FVII就被不同的蛋白酶活化为FVIIa,在所述蛋白酶中有凝血酶(因子IIa)、因子Xa、IXa、XIIa和FVIIa-TF复合物自身。关于FVIIa-TF的最重要底物是因子X和因子IX。因子VII已显示与组织因子(TF)相互作用。

[0064] 因子的作用被组织因子途径抑制剂(TFPI)阻碍,其在凝血起始后几乎立即释放。因子VII是维生素K依赖性的;它在肝中产生。华法林或相似抗凝剂的使用减少FVII的肝脏合成。

[0065] 缺乏是罕见的(先天性前转化素缺乏)和隐性遗传的。因子VII缺乏呈现为血友病样出血病症。它用重组因子VIIa(NovoSeven或AryoSeven)进行治疗。重组因子VIIa也用于患有血友病(患有因子VIII或IX缺乏)的人,其已发展针对替代凝血因子的抑制剂。它还已用于不受控制的出血的背景下,但它在该背景下的作用是有争论的,证据不足以支持它在临床试验外的使用。它在出血中的使用的首篇报道是在1999年在具有不受控制的出血的以色列共和国士兵中。它使用的危险包括动脉血栓形成的增加。

[0066] 3. 因子IX

[0067] 因子IX(克雷司马斯因子(Christmas factor))是凝血系统的丝氨酸蛋白酶之一;它属于肽酶家族S1。关于因子IX的基因定位于X染色体(Xq27.1-q27.2)上,并且因此是X连锁隐性遗传的:该基因中的突变比女性频繁得多地影响男性。这种蛋白质的缺乏引起血友病B。因子IX作为酶原(失活前体)产生。它进行处理以去除信号肽,糖基化且随后被因子XIa(接触途径的)或因子VIIa(组织因子途径的)切割,以产生其中链通过二硫桥连接的二链形式。当在$Ca^{2+}$、膜磷脂和因子VIII辅因子的存在下,活化成因子IXa时,它水解因子X中的一个精氨酸-异亮氨酸键,以形成因子Xa。因子IX被抗凝血酶抑制。

[0068] 因子VII、IX和X均在血液凝固中起关键作用,并且还共享共同的结构域体系结构。因子IX蛋白质由四个蛋白质结构域组成。它们是Gla结构域、EGF结构域的两个串联拷贝和C末端胰蛋白酶样蛋白酶结构域,其进行催化切割。N末端EGF结构域已显示至少部分负责结合组织因子。Wilkinson等人得出结论:第二个EGF结构域的残基88 -109介导与血小板的结合和因子X活化复合物的装配。所有四个结构域的结构已得到解决。对于猪蛋白质,测定两个EGF结构域和胰蛋白酶样结构域的结构。负责Ca(II)依赖性磷脂结合的Gla结构域的结构也通过NMR进行测定。“超活性”突变体的几种结构已得到解决,其揭示在凝血级联中通过其他蛋白质的因子IX活化的性质。

[0069] 因子IX的缺乏引起克雷司马斯病(血友病B)。超过100个因子IX突变已得到描述;一些不引起症状,但许多导致显著的出血病症。重组因子IX用于治疗克雷司马斯病,并且作为BeneFIX商购可得。因子IX的一些罕见突变导致升高的凝血活性,并且可以导致凝血疾病例如深静脉血栓形成。

[0070] 4. 因子X

[0071] 因子X(斯图尔特因子;凝血酶原酶)是凝血级联的酶。人因子X基因定位于第十三个染色体(13q34)上。它是丝氨酸内肽酶(蛋白酶组S1)。因子X在肝中合成,并且需要维生素K用于其合成。因子X通过因子IX(与其辅因子,在称为*固有Xase*的复合物中的因子VIII)和因子VII与其辅因子,组织因子(称为外源*Xase*的复合物)活化成因子Xa。因子X的半衰期为40-45小时。它因此是最后共同途径或凝血酶途径的第一个成员。它通过在两个位置(arg-

thr和随后arg-ile键)中切割凝血酶原来起作用,其获得活性凝血酶。当因子Xa在凝血酶原酶复合物中与活化的辅因子V复合时,这个过程得到最佳化。因子X是新鲜冷冻血浆和凝血酶原酶复合物的部分。唯一商购可得的浓缩剂是由CSL Behring制造的“Factor X P Behring”。

[0072] 因子Xa通过蛋白Z依赖性蛋白酶抑制剂(ZPI),丝氨酸蛋白酶抑制剂(丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin))失活。这种蛋白质对于因子Xa的亲和力通过蛋白Z的存在增加1000倍,而它不需要蛋白Z用于因子XI的失活。蛋白Z中的缺陷导致增加的因子Xa活性和血栓形成的倾向。

[0073] 因子X的天生缺乏非常罕见(1:500,000),并且可能呈现鼻出血(鼻血)、关节积血(关节内的出血)和胃肠道失血。除了先天性缺乏之外,低因子X水平可以在许多疾病状态下偶然发生。例如,因子X缺乏在淀粉样变性病中可见,其中因子X被吸附至脉管系统中的淀粉样纤维。另外,维生素K的缺乏或通过华法林(或相似药剂)的拮抗导致无活性因子X的产生。在华法林疗法中,这是阻止血栓形成希望的。截至2007年底,五种新出现的抗凝治疗剂中的四种靶向这种酶。直接Xa抑制剂是普遍的抗凝剂。

[0074] 在二十世纪六十年代开发的传统凝血模型设想两个分开的级联,外源(组织因子(TF))途径和固有途径。这些途径会聚于共同点,因子Xa/Va复合物的形成,其连同钙一起在磷脂表面上结合,由凝血酶原(因子II)生成凝血酶(因子IIa)。新模型,基于细胞的抗凝模型看起来更全面地解释凝血中的步骤。该模型具有三个阶段:1)在具有TF的细胞上的凝血起始,2)通过在具有TF的细胞上生成的凝血酶的促凝血信号放大,和3)在血小板表面上的凝血酶生成的传播。因子Xa在所有这三个阶段中起关键作用。

[0075] 在阶段1中,因子VII与细胞表面上的跨膜蛋白质TF结合,并且转换为因子VIIa。结果是催化因子X和因子IX活化的因子VIIa/TF复合物。在具有TF的细胞表面上形成的因子Xa与因子Va相互作用,以形成凝血酶原酶复合物,其在具有TF的细胞的表面上生成少量凝血酶。在阶段2放大阶段中,如果足够的凝血酶已生成,则血小板和血小板相关辅因子的活化发生。在阶段3凝血酶生成中,因子XIa活化在活化血小板表面上的游离因子IX。活化的因子IXa与因子VIIIa形成“tenase”复合物。该复合物活化更多因子X,其依次又与因子Va形成新的凝血酶原酶复合物。因子Xa是凝血酶原酶复合物的引发组分,其转换大量凝血酶原—“凝血酶原爆发”。每个因子Xa分子可以生成1000个凝血酶原分子。这种凝血酶原大爆发负责纤维蛋白聚合,以形成血栓。

[0076] 因子X的合成或活性的抑制是目前使用的许多抗凝剂的作用机制。华法林,香豆素的合成衍生物,是美国最广泛使用的经口抗凝剂。在一些欧洲国家,使用其他香豆素衍生物(苯丙香豆素和乙硝香豆素)。这些试剂是维生素K拮抗剂(VKA)。维生素K是因子II(促凝血酶)、VII、IX和X的肝脏合成必需的。肝素(未分级肝素)及其衍生物低分子量肝素(LMWH)与血浆辅因子抗凝血酶(AT)结合,以使几种凝血因子IIa、Xa、XIa和XIIa失活。

[0077] 近来,已开发了一系列新的特异性直接作用的因子Xa抑制剂。这些包括药物利伐沙班、阿哌沙班、贝曲西班、LY517717、达瑞沙班(YM150)、艾多沙班和813893。这些试剂具有超过目前疗法的几个理论优点。它们可以经口给予。它们具有快速的作用发作。另外它们可以更有效针对因子Xa,因为它们抑制凝血酶原酶复合物中的游离因子Xa和因子Xa两者。

[0078] 5. 蛋白S

[0079] 蛋白S是内皮中合成的维生素K依赖性血浆糖蛋白。在循环中，蛋白S以两种形式存在：游离形式和与补体蛋白质C4b结合蛋白(C4BP)结合的复合物形式。在人中，蛋白S由*PROS1*基因编码。最佳表征的蛋白S功能是其在抗凝途径中的作用，在其中它充当在因子和VIIIa失活中的蛋白C的辅因子。仅游离形式具有辅因子活性。

[0080] 蛋白S可以经由羧化GLA结构域与带负电的磷脂结合。这种特性允许蛋白S在去除经历细胞凋亡的细胞中起作用。细胞凋亡是由机体用于从组织中去除不需要或损害细胞的细胞死亡形式。其为细胞凋亡的细胞(即，在细胞凋亡过程中)不再主动管理磷脂在其外膜中的分布，并且因此开始在细胞表面上展示带负电的磷脂，例如磷脂酰丝氨酸。在健康细胞中，ATP(腺苷三磷酸)依赖性酶从细胞膜的外叶中去除这些磷脂。这些带负电的磷脂由吞噬细胞例如巨噬细胞识别。蛋白S可以与带负电的磷脂结合，并且充当凋亡细胞和吞噬细胞之间的桥分子。蛋白S的桥接特性增强凋亡细胞的吞噬作用，允许它被‘干净地’去除，而无任何组织损害症状例如炎症发生。

[0081] PROS1基因中的突变可以导致蛋白S缺乏，其是罕见的血液病症，其可以导致增加的血栓形成危险。蛋白S已显示与因子V相互作用。

[0082] 6．蛋白C

[0083] 蛋白C也称为自身凝血酶原IIA和血液凝固因子XIV，是酶原(失活)蛋白质，其活化形式在调控人及其他哺乳动物中的血液凝固、炎症、细胞死亡和维持血管壁的渗透性中起重要作用。活化蛋白C(APC)主要通过使蛋白质因子$V_a$和因子$VIII_a$蛋白酶解失活来执行这些操作。APC分类为丝氨酸蛋白酶，因为它在其活性位点中含有丝氨酸残基。在人中，蛋白C由在染色体2上发现的*PROC*基因编码。

[0084] 蛋白C的酶原形式是在血液血浆中循环的维生素K依赖性糖蛋白。它的结构是二链多肽的那种，由通过二硫键连接的轻链和重链组成。当蛋白C酶原与凝血酶(另一种积极参与凝血的蛋白质)结合时，它被活化，并且蛋白C的活化通过血栓调节蛋白和内皮蛋白C受体(EPCR)的存在得到极大促进。由于EPCR的作用，发现活化蛋白C主要接近内皮细胞(即构成血管壁的那些)发现，并且APC影响的正是这些细胞和白细胞(白血细胞)。由于蛋白C作为抗凝剂发挥的关键作用，具有蛋白C中的缺乏或一些种类的对APC的抗性的那些人，具有显著增加的形成危险血块(血栓形成)的危险。

[0085] 深入活化蛋白C的临床使用之内的研究也称为活化型替加色罗α(品牌Xigris)已被争议包围。制造商Eli Lilly和Company进行积极的营销活动，以促进其在患有严重败血症和败血性休克的人中的使用，包括赞助2004 Surviving Sepsis Campaign Guidelines。然而，2011 Cochrane综述发现它的使用不可以被推荐，因为它不改善存活(且增加出血危险)。

[0086] 人蛋白C是结构上类似于其他影响血液凝固的维生素K依赖性蛋白质(例如凝血酶原、因子VII、因子IX和因子X)的维生素K依赖性糖蛋白。蛋白C合成在肝中发生，并且以单链前体分子开始：在前体肽之前的32氨基酸N末端信号肽。当$Lys^{198}$和$Arg^{199}$的二肽被去除时，形成蛋白C；这促使转化成在每条链上具有*N*联碳水化合物的异源二聚体。该蛋白质具有通过在$Cys^{183}$和$Cys^{319}$之间的二硫键连接的一条轻链(21 kDa)和一条重链(41 kDa)。

[0087] 失活的蛋白C包含在多重结构域中的419个氨基酸：一个Gla结构域(残基43-88)；螺旋芳香族区段(89-96)；两个表皮生长因子(EGF)样结构域(97-132和136-176)；活化肽

(200-211)；和胰蛋白酶样丝氨酸蛋白酶结构域(212-450)。轻链含有Gla和EGF样结构域以及芳香族区段。重链含有蛋白酶结构域和活化肽。85-90%的蛋白C以这种形式在血浆中作为酶原循环，等待被活化。剩余蛋白C酶原包含轻微修饰形式的蛋白质。当凝血酶分子从重链N末端切割掉活化肽时，酶活化发生。活性位点含有丝氨酸蛋白酶典型的催化三联体($His^{253}$、$Asp^{299}$和$Ser^{402}$)。

[0088] 蛋白C的活化通过血栓调节蛋白和内皮蛋白C受体(EPCR)得到强烈促进，其中后者主要在内皮细胞(在血管内部上的细胞)上发现。血栓调节蛋白的存在使活化加速几个数量级，并且EPCR使活化加速20倍。如果这两种蛋白质中任一在鼠样本中不存在，则小鼠在仍处于胚胎状态时死于过度血液凝固。在内皮上，APC执行在调节血液凝固、炎症和细胞死亡(细胞凋亡)中的主要作用。由于血栓调节蛋白对蛋白C活化的加速效应，蛋白质可以被说成不是被凝血酶活化，而是被凝血酶-血栓调节蛋白(或甚至凝血酶-血栓调节蛋白- EPCR)复合物活化。一旦处于活化形式，APC就可以保持与EPCR结合或不结合，它针对其具有与蛋白质酶原大约相同的亲和力。

[0089] Gla结构域特别用于与带负电的磷脂结合用于抗凝，以及与EPCR结合用于细胞保护。一个特别的外部位点增强蛋白C使因子$V_a$有效失活的能力。另一个是用于与血栓调节蛋白相互作用所需的。

[0090] 以酶原形式的蛋白C以65-135 IU/dL的浓度存在于正常成人血液血浆中。活化蛋白C以比这低大约2000倍的水平发现。轻度蛋白C缺乏对应于高于20 IU/dL的血浆水平，但低于正常范围。中度严重缺乏描述1 -20 IU/dL的血液浓度；重度缺乏获得低于1 IU/dL的蛋白C水平或是无法检测的。健康足月儿中的蛋白C水平平均为40 IU/dL。蛋白C浓度增加直至六个月时，此时平均水平为60 IU/dL；该水平在儿童期始终保持很低，直到它在青春期后达到成人水平。活化的蛋白C的半衰期为约15分钟。

[0091] 蛋白C途径是控制体内的APC表达水平及其活性的特异性化学反应。蛋白C是多效的，具有两个主要的功能类别：抗凝和细胞保护(它对细胞的直接作用)。蛋白C执行哪种功能取决于APC在它活化后是否保持与EPCR结合；当它不结合时，APC的抗凝效应发生。在这种情况下，通过使因子$V_a$和因子$VIII_a$不可逆地蛋白酶解失活，将它们分别转变成因子$V_i$和因子$VIII_i$，蛋白C作为抗凝剂发挥作用。当仍与EPCR结合时，活化蛋白C执行其细胞保护效应，作用于效应子底物PAR-1，蛋白酶活化受体-1。在一定程度上，APC的抗凝特性不依赖于它的细胞保护特性，因为一种途径的表达不受另一种存在影响。

[0092] 蛋白C的活性可以通过减少可用的血栓调节蛋白或EPCR中任一的量进行下调。这可以通过炎症细胞因子例如白细胞介素(IL-1β)和肿瘤坏死因子-α(TNF-α)完成。活化白细胞在炎症期间释放这些炎症介质，抑制血栓调节蛋白和EPCR的产生，并且诱导其从内皮表面的脱落。这两种作用均下调蛋白C活化。凝血酶自身还可以对EPCR水平具有作用。另外，从细胞中释放的蛋白质可以阻碍蛋白C活化，例如嗜酸性粒细胞，其可以解释高嗜酸性粒细胞心脏病中的血栓形成。蛋白C可以通过血小板因子4上调。这种细胞因子推测通过形成从蛋白C的Gla结构域到血栓调节蛋白的糖胺聚糖(GAG)结构域的静电桥，降低其反应的米氏常数($K_M$)，来改善蛋白C的活化。另外，蛋白C被蛋白C抑制剂抑制。

[0093] 与简单杂合性相关的以其轻度形式的遗传蛋白C缺乏在成人中引起显著增加的静脉血栓形成危险。如果胎儿对于该缺乏是纯合的或复合杂合的，则可能存在在子宫内的暴

发性紫癜、严重的弥散性血管内凝血和同时的静脉血栓栓塞的呈现;这是非常严重且通常致命的。蛋白C基因在小鼠中的缺失引起在出生时的胎儿死亡。不含蛋白C的胎儿小鼠最初正常发育,但经历严重出血、凝血病、纤维蛋白沉积和肝坏死。在无症状个体中蛋白C缺乏的频率为200中一个至500中一个。相比之下,缺乏的严重症状在20,000个体中的一个是可检测的。未检测到人种或种族偏差。

[0094] 当APC不能执行其功能时,活化的蛋白C抗性发生。这种疾病具有与蛋白C缺乏类似的症状。在高加索人中导致活化蛋白C抗性的最常见突变在因子V对于APC的切割位点处。其中,$Arg^{506}$替换为Gln,产生因子V Leiden。这种突变也称为R506Q。导致该切割位点丧失的突变实际上阻止APC使因子$V_a$和因子$VIII_a$两者有效失活。因此,个人的血液太容易凝固,并且他永远处于增加的血栓形成危险中。对于因子$V_{Leiden}$突变杂合的个体携带比一般群体中高5-7倍的静脉血栓形成危险。纯合受试者具有高80倍的危险。这种突变也是高加索人中关于静脉血栓形成的最常见遗传危险。

[0095] 约5%的APC抗性与上述突变和因子$V_{Leiden}$无关。其他遗传突变引起APC抗性,但无一至因子$V_{Leiden}$的程度。这些突变包括各种其他形式的因子V,靶向因子V的自身抗体的自发生成,和APC辅因子中任一种的功能障碍。另外,一些获得性状况还降低APC在执行其抗凝功能中的功效。研究提出20% – 60%的血栓形成倾向患者具有一些形式的APC抗性。

[0096] C. Gla结构域肽和多肽

[0097] 本公开内容考虑了各种含Gla结构域肽和多肽的设计、产生和使用。这些分子的结构特点如下。首先,肽或多肽具有含有包含Gla结构域的约30-45个连续残基的Gla结构域。因此,术语“具有不超过“X”个连续残基的肽”即使当包括术语“包含”时,也不能理解为包含更大数目的连续残基。其次,肽和多肽可以包含另外的非Gla结构域残基,例如EGF结构域、Kringle结构域、Fc结构域等。

[0098] 一般而言,肽和多肽将为300个残基或更少,再次包含Gla结构域的30-45个连续残基。总体长度可以为30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、225、250、275和至多达300个残基。考虑了50-300个残基、100-300个残基、150-300个残基 200-300,个残基、50-200个残基、100-200个残基、和150-300个残基、和150-200个残基的肽长度范围。连续Gla残基数目可以为3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15。

[0099] 本公开内容可以利用L-构型氨基酸、D-构型氨基酸或其混合物。虽然L-氨基酸代表在蛋白质中发现的绝大多数氨基酸,但D-氨基酸在由外来海栖生物例如芋螺产生的一些蛋白质中发现。它们也是细菌的肽聚糖细胞壁的丰富组分。D-丝氨酸可以充当脑中的神经递质。关于氨基酸构型的L和D惯例不是指氨基酸自身的旋光性,而是指氨基酸理论上可以由其合成的甘油醛异构体的旋光性(D-甘油醛是右旋的;L-甘油醛是左旋的)。

[0100] 一种形式的“全D”肽是逆反式肽(retro-inverso peptide)。天然存在的多肽的逆反式修饰涉及具有α-碳立体化学的氨基酸的合成装配,与相应的L-氨基酸的那种相反,即D-氨基酸以就天然肽序列而言的倒序。逆反式类似物因此具有逆转末端和肽键的逆转方向(NH-CO而不是CO-NH),同时大致维持如天然肽序列中的侧链拓扑学。参见引入本文作为参考的美国专利6,261,569。

[0101] D. 合成

[0102] 使用固相合成技术(Merrifield, 1963)产生肽和多肽将是有利的。其他肽合成技

术是本领域技术人员众所周知的(Bodanszky等人,1976;Peptide Synthesis, 1985;Solid Phase Peptide Synthelia, 1984)。用于此类合成中的适当保护基团将在上述教科书,以及Protective Groups in Organic Chemistry(1973)中发现。这些合成方法涉及一种或多种氨基酸残基或合适的受保护氨基酸残基对生长中的肽链的序贯添加。通常,第一个氨基酸残基的氨基或羧基被合适的可选择性去除的保护基团保护。不同的可选择性去除的保护基团用于含有反应性侧基的氨基酸,例如赖氨酸。

[0103] 使用固相合成作为例子,受保护或衍生的氨基酸通过其未受保护的羧基或氨基附着至惰性固体支持物。氨基或羧基的保护基团随后被选择性去除,并且序列中具有适当保护的互补(氨基或羧基)基团的下一个氨基酸与已附着至固体支持物的残基混合且反应。氨基或羧基的保护基团随后从这个新添加的氨基酸残基中去除,并且随后加入下一个氨基酸(适当保护的)等等。在所有所需氨基酸已以适当顺序连接后,任何剩余末端和侧基保护基团(和固体支持物)被序贯或同时去除,以提供最终肽。公开内容的肽和多肽优选缺乏苄化或甲基苄化氨基酸。此类保护基团部分可以用于合成过程中,但它们在肽和多肽使用之前被去除。如其他地方描述的,另外的反应可能是需要的,以形成分子内键合以限制构象。

[0104] 除了可以使用的二十种标准氨基酸之外,存在大量"非标准"氨基酸。其中两种由遗传密码指定,但在蛋白质中是相当罕见的。硒代胱氨酸在UGA密码子处掺入一些蛋白质内,所述UGA密码子通常为终止密码子。吡咯赖氨酸由一些产甲烷古细菌用于酶中,它们使用所述酶来产生甲烷。它由密码子UAG编码。在蛋白质中未发现的非标准氨基酸的例子包括羊毛硫氨酸、2-氨基异丁酸、脱氢丙氨酸和神经递质γ-氨基丁酸。非标准氨基酸通常作为关于标准氨基酸的代谢途径中的中间产物出现 - 例如鸟氨酸和瓜氨酸在尿素循环中出现,所述尿素循环为氨基酸分解代谢的部分。非标准氨基酸通常通过对标准氨基酸的修饰而形成。例如,高半胱氨酸通过转硫途径或甲硫氨酸的脱甲基经由中间代谢产物S-腺苷甲硫氨酸而形成,而羟脯氨酸通过脯氨酸的翻译后修饰制备。

[0105] E. 接头

[0106] 接头或交联剂可以用于使Gla结构域肽或多肽融合至其他蛋白质性质的序列(例如抗体Fc结构域)。双功能交联剂已广泛用于各种目的,包括亲和基质的制备、不同结构的修饰和稳定、配体和受体结合位点的鉴定、以及结构研究。携带两个相同官能团的同双功能试剂被证明在诱导相同和不同大分子或大分子亚基之间的交联,以及多肽配体与其特异性结合位点的连接中是高度有效的。异双功能试剂含有两个不同的官能团。通过利用两个不同官能团的不同反应性,可以选择性且序贯地控制交联。双功能交联剂可以根据其官能团的特异性进行划分,例如氨基、巯基、胍基、吲哚基或羧基特异性基团。在这些中,由于其商购可得性、易于合成和它们可以在其下应用的温和反应条件,针对游离氨基的试剂已变得尤其受欢迎。大多数异双功能交联剂含有伯胺反应基团和硫醇反应基团。

[0107] 在另一个例子中,异双功能交联剂和使用交联剂的方法在美国专利5,889,155中描述,所述美国专利特别整体引入本文作为参考。交联剂组合亲核肼残基与亲电子马来酰亚胺残基,在一个例子中,允许醛与游离硫醇的偶联。交联剂可以进行修饰,以使各种官能团交联,并且因此可用于使多肽交联。在其中特定肽在其天然序列中不含顺应给定交联剂的残基的情况下,可以利用在一级序列中的保守遗传或合成氨基酸变化。

[0108] F. 另外的肽/多肽序列

[0109] 一种因子药物开发是实现足够的循环半衰期，其影响给药、药物施用和功效，并且这对于生物治疗剂是特别重要的。低于60 kD的小蛋白质被肾快速清除，并且因此不到达其靶。这意指需要高剂量以达到功效。目前用于增加蛋白质在循环中的半衰期的修饰包括：PEG化；与蛋白质缀合或遗传融合，所述蛋白质例如转铁蛋白(WO06096515A2)、白蛋白、生长激素(美国专利公开2003104578AA)；与纤维素缀合(Levy和Shoseyov, 2002)；与Fc片段缀合或融合；糖基化和诱变方法(Carter, 2006)。

[0110] 在PEG化的情况下，聚乙二醇(PEG)缀合至蛋白质，其可以是例如血浆蛋白质、抗体或抗体片段。关于抗体PEG化的效应的首个研究在二十世纪八十年代执行。缀合可以酶促或化学完成，并且在本领域充分确定(Chapman, 2002;Veronese和Pasut, 2005)。使用PEG化，总大小可以增加，这降低肾滤过的机会。PEG化进一步使免于蛋白酶解降解，并且减慢从血液中的清除率。进一步地，据报道PEG化可以降低免疫原性且增加可溶性。通过添加PEG改善的药物代谢动力学是由于几种不同机制：分子大小中的增加、使免于蛋白酶解、降低的抗原性和特异性序列对细胞受体的掩蔽。在抗体片段(Fab)的情况下，已通过PEG化实现血浆半衰期中的20倍增加(Chapman, 2002)。

[0111] 迄今为止，存在几种批准的PEG化药物，例如2000年上市的PEG-干扰素α2b(PEG-INTRON)和2002年上市的α2a(Pegasys)。针对TNFα的PEG化的抗体片段称为Cimzia或Certolizumab Pegol，在2007年提交用于FDA批准用于治疗克罗恩氏病，并且已在2008年4月22日得到批准。PEG化的局限性是合成长单分散种类中的困难，尤其当需要超过1000 kD的PEG链时。对于许多应用，使用具有超过10000 kD链长的多分散PEG，导致具有不同长度PEG链的缀合物群体，其需要广泛分析以确保产品之间的等价批量。PEG链的不同长度可以导致不同的生物活性和因此不同的药物代谢动力学。PEG化的另一种局限性是亲和力或活性中的减少，如对于α-干扰素Pegasys观察到的，其仅具有天然蛋白质的7%的抗病毒活性，但由于增强的血浆半衰期而具有改善的药物代谢动力学。

[0112] 另一种方法是使药物与长寿蛋白质例如白蛋白缀合，所述白蛋白为67 kD且在人中具有19天的血浆半衰期。白蛋白是血浆中最丰富的蛋白质，并且涉及血浆pH调节，但还充当血浆中的物质载体。在CD4的情况下，增加的血浆半衰期已在使其与人血清白蛋白融合后达到(Yeh等人，1992)。融合蛋白的其他例子是胰岛素、人生长激素、转铁蛋白和细胞因子(Duttaroy等人，2005;Melder等人，2005;Osborn等人，2002a;Osborn等人，2002b;Sung等人，2003)，并且参见(整体引入本文作为参考的美国专利公开2003104578A1、WO06096515A2和WO07047504A2)。

[0113] 糖基化对血浆半衰期和蛋白质活性的作用也已得到广泛研究。在组织纤溶酶原激活物(tPA)的情况下，新糖基化位点的添加减少血浆清除率，且改善效力(Keyt等人，1994)。糖改造已成功应用于许多重组蛋白质和免疫球蛋白(Elliott等人，2003;Raju和Scallon, 2007;Sinclair和Elliott, 2005;Umana等人，1999)。进一步地，糖基化影响免疫球蛋白的稳定性(Mimura等人，2000;Raju和Scallon, 2006)。

[0114] 用于融合蛋白的另一种分子是IgG的Fc片段(Ashkenazi和Chamow, 1997)。Fc融合方法已例如用于由Regeneron开发的陷阱技术(例如IL1陷阱和VEGF陷阱)中。使用白蛋白来延长肽的半衰期已在美国专利公开2004001827A1中得到描述。白蛋白的正面效应也已对于Fab片段和scFv-HSA融合蛋白得到报道。已证实白蛋白延长的血清半衰期是由于由FcRn介

导的再循环过程(Anderson等人,2006;Chaudhury等人,2003)。

[0115] 另一种策略是使用靶向免疫球蛋白与其受体的相互作用的定向诱变技术,以改善结合特性,即Fc区中的亲和力成熟。伴随对FcRn的亲和力增加,可以在体内达到延长的半衰期(Ghetie等人,1997;Hinton等人,2006;Jain等人,2007;Petkova等人,2006a;Vaccaro等人,2005)。然而,亲和力成熟策略需要几轮诱变和测试。这很费时间,昂贵且受限于突变时导致延长半衰期的氨基酸数目。因此,需要简单的替代方法以改善生物治疗剂的体内半衰期。在体内具有延长半衰期的治疗剂对于慢性疾病、自身免疫性病症、炎性疾病、代谢疾病、传染病和眼疾病、以及癌症的治疗是尤其重要的,尤其当治疗需要经过长时间段时。相应地,仍存在开发在循环中具有增强的持续性和半衰期的治疗试剂(例如抗体和Fc融合蛋白)的需要,以便减少各种治疗试剂的剂量和/或注射频率。

[0116] G. 标记

[0117] 本公开内容的肽和多肽可以缀合至标记用于诊断目的。依照本公开内容的标记定义为可以使用测定进行检测的任何部分。报道分子的非限制性例子包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、生色团、光亲和分子、有色颗粒或配体例如生物素。

[0118] 标记缀合物一般优选用作诊断试剂。诊断试剂一般分成两类:用于体外诊断的那些和用于体内诊断方案的那些,一般称为“直接成像”。许多适当的显像剂是本领域已知的,如其附着至肽和多肽的方法一样(参见例如美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。使用的成像部分可以是顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、NMR可检测物质和X射线显像剂。

[0119] 在顺磁性离子的情况下,可以提及例如离子,例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镝(III)、钬(III)和/或铒(III),其中钆是特别优选的。在其他背景例如X射线成像下有用的离子包括但不限于镧(Ⅲ)、金(III)、铅(II)、且尤其是铋(III)。

[0120] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可以提及砹$^{211}$、$^{14}$碳、$^{51}$铬、$^{36}$氯、$^{57}$钴、$^{58}$钴、铜$^{67}$、$^{152}$Eu、镓$^{67}$、$^{3}$氢、碘$^{123}$、碘$^{125}$、碘$^{131}$、铟$^{111}$、$^{59}$铁、$^{32}$磷、铼$^{186}$、铼$^{188}$、$^{75}$硒、$^{35}$硫、锝$^{99m}$和/或钇$^{90}$。$^{125}$I通常优选用于某些实施方案中,并且由于其低能量和用于远程检测的适合性,锝$^{99m}$和/或铟$^{111}$也通常是优选的。放射性标记的肽和多肽可以根据本领域众所周知的方法进行生产。例如,通过与碘化钠和/或碘化钾和化学氧化剂例如次氯酸钠、或酶促氧化剂例如乳过氧化物酶接触,肽和多肽可以得到碘化。肽可以通过配体交换过程用锝$^{99m}$进行标记,例如通过用亚锡溶液还原过锝酸盐,使还原的锝螯合到Sephadex柱上,并且将肽施加于这个柱。可替代地,可以使用直接标记技术,例如通过使过锝酸盐、还原剂例如$SNCl_2$、缓冲溶液例如邻苯二甲酸钠-钾溶液和肽一起温育。通常用于使作为金属离子存在的放射性同位素与肽结合的中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0121] 在考虑用作缀合物的荧光标记中包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、级联蓝、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、俄勒冈州绿488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝、REG、罗丹明绿、罗丹明红、Renographin、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或德克萨斯红。

[0122] 考虑的另一类缀合物是主要预期用于在体外使用的那种，其中肽连接至次级结合配体和/或酶(酶标签)，其将在与生色底物接触后生成有色产物。合适酶的例子包括尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的次级结合配体是生物素和抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白化合物。此类标记的使用是本领域技术人员众所周知的，并且例如在美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中描述。

[0123] 用于使肽附着或缀合至其缀合物部分的其他方法是本领域已知的。一些附着方法涉及金属螯合络合物的使用，采用例如附着至抗体的有机螯合剂，例如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA)；乙二胺四乙酸；N-氯-对甲苯磺酰胺；和/或四氯-3α-6α-二苯基甘脲-3(美国专利4,472,509和4,938,948)。在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的存在下，肽或多肽还可以与酶反应。具有荧光素标记物的缀合物在这些偶联剂的存在下或通过与异硫氰酸酯反应进行制备。

[0124] IV. 疗法

[0125] A. 药物制剂和施用途径

[0126] 当考虑临床应用时，必须制备以适合于预期应用的形式的药物组合物。一般地，这需要制备基本上不含热原以及可以对人或动物有害的其他杂质的组合物。

[0127] 一般希望采用适当的盐和缓冲剂，以致使递送载体稳定且允许由靶细胞摄取。当重组细胞引入患者内时，也将采用缓冲剂。本公开内容的水性组合物包含有效量的针对细胞的载体，溶解于或分散于药学可接受的载体或水性介质中。此类组合物还被称为接种物。短语“药学或药理学可接受的”指分子实体和组合物，当施用于动物或人时，其不产生不利、过敏或其他不良反应。如本文使用的，“药学可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质，包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的此类介质和试剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与本公开内容的载体或细胞不相容，否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充性活性成分也可以掺入组合物内。

[0128] 本公开内容的活性组合物可以包括常规药物制剂。这些组合物根据本公开内容的施用经由任何常见途径，只要靶组织经由该途径可获得。此类途径包括经口、经鼻、经颊、直肠、阴道或局部途径。可替代地，施用可以通过原位、皮内、皮下、肌内、肿瘤内、腹膜内或静脉内注射。此类组合物通常作为下文描述的药学可接受的组合物施用。

[0129] 活性化合物还可以肠胃外或腹膜内施用。作为游离碱或药学可接受的盐的活性化合物的溶液可以在与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和油中制备。在普通贮存和使用条件下，这些制剂含有防腐剂，以预防微生物的生长。

[0130] 适合于可注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体，以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下，形式必须是无菌的，并且必须流动至存在容易可注射性的程度。它在制造和贮存条件下必须是稳定的，并且必须针对微生物例如细菌和真菌的污染作用进行防腐。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油的溶剂或分散介质。适当流动性可以通过下述得到维持：例如通过使用包衣例如卵磷脂，在分散体的情况下通过维持所需粒子大小和通过使用表面活性剂。微生物作用的预防可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂来实现，例如对羟

基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等。在许多情况下，优选包括等渗剂例如糖或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中使用延迟吸收的试剂来实现，所述试剂例如单硬脂酸铝和明胶。

[0131] 无菌可注射溶液通过下述进行制备：将活性化合物以所需量掺入具有如上所述的各种其他成分的适当溶剂中，需要时，随后为无菌过滤。一般地，分散体通过将各种无菌活性成分加入无菌媒介物内进行制备，所述无菌媒介物含有基础分散介质和来自上文列出那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下，优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术，其获得来自其先前无菌过滤溶液的活性成分加上任何另外所需成分的粉末。

[0132] 如本文使用的，"药学可接受的载体"包括任何和所有溶剂、分散介质，包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。用于药学活性物质的此类介质和试剂的使用是本领域众所周知的。除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容，否则考虑其在治疗组合物中的使用。补充性活性成分也可以掺入组合物内。

[0133] 对于经口施用，本公开内容的肽和多肽可以与赋形剂一起掺入，且以不可摄取的漱口药和洁齿剂的形式使用。通过将活性成分以所需量掺入适当溶剂例如硼酸钠溶液（朵贝氏溶液）内，可以制备漱口药。可替代地，活性成分可以掺入含有硼酸钠、甘油和碳酸氢钾的杀菌洗剂内。活性成分还可以分散在洁齿剂中，包括：凝胶、糊剂、粉末和浆料。活性成分可以以治疗有效量加入糊剂洁齿剂中，其可以包括水、结合剂、磨料、调味剂、起泡剂和湿润剂。

[0134] 本公开内容的组合物可以配制成中性或盐形式。药学可接受的盐包括酸加成盐（由蛋白质的游离氨基形成），并且由无机酸例如盐酸或磷酸，或此类有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。由游离羧基形成的盐还可以衍生自无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，以及此类有机碱如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0135] 在配制后，溶液以与剂量制剂相容的方式和如治疗上有效的此类量施用。制剂以各种剂型例如可注射溶液、药物释放胶囊等容易地施用。对于在水溶液中的肠胃外施用，例如，需要时，溶液应适当地缓冲，并且液体稀释剂首先用足够的盐水或葡萄糖致使等渗。这些特定水溶液特别适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。在这方面，根据本公开内容，可以采用的无菌水性介质将是本领域技术人员已知的。例如，一个剂量可以溶解于1 ml等渗NaCl溶液中，并且加入1000 ml皮下输液中，或在计划的输注部位处注射（参见例如"Remington's Pharmaceutical Sciences,"第15版，第1035-1038和1570-1580页）。取决于待治疗受试者的状况，剂量中的一些变动将必须发生。在任何情况下，负责施用的人决定个别受试者中的适当剂量。此外，对于人施用，制剂应满足如由FDA生物制品办公室标准要求的无菌、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0136] B. 疾病状态和状况

[0137] 1. 癌症

[0138] 背景。癌症起因于来自组织的细胞克隆群体的过度生长。癌症的发展称为癌发生可以进行建模，并且以许多方式进行表征。癌症发展和炎症之间的相关长期以来已得到理解。炎症应答涉及针对微生物感染的宿主防御，并且还驱动组织修复和再生。相当多的证据

指向炎症和发展癌症的危险之间的关联，即慢性炎症可以导致异型增生。存在几百种不同形式的人癌症，并且随着越来越多的癌症潜在遗传学和生物学了解，这些形式进一步细分且再分类。

[0139] 测定何者引起癌症是复杂的。许多事物已知增加癌症的危险，包括烟草使用、某些感染、辐射、缺乏体力活动、肥胖和环境污染物。这些可以直接损害基因或与细胞内的现有遗传缺陷组合，以引起该疾病。大约五至十百分比的癌症是完全遗传性的。

[0140] 癌症可以以许多方式进行检测，包括某些体征和症状的存在、筛选测试或医学成像。一旦检测到可能的癌症，它就通过组织样品的显微镜检查进行诊断。癌症通常用化学疗法、放射疗法和手术进行治疗。该疾病的存活机会在很大程度上通过癌症类型和位置以及在治疗开始时的疾病程度而改变。虽然癌症可以影响所有年龄的人，并且少数类型的癌症在儿童中更常见，但发展癌症的危险一般随着年龄而增加。在2007年，癌症引起全世界约13%的所有人类死亡(7.9百万)。随着更多人活到老年，且随着在发展中国家中出现大量生活方式改变，比率上升。

[0141] 治疗分成五个一般类别:手术、化学疗法、辐射、替代医学和姑息护理。手术是大多数孤立的实体癌症的主要治疗方法，并且可以在缓解和存活延长中起作用。它通常是作出明确诊断且给癌症分期的重要部分，因为通常需要活组织检查。在局限性癌症中，手术通常尝试摘除整个团块连同在某些情况下，区域中的淋巴结。对于一些类型的癌症，这是根除癌症所需的全部。

[0142] 除手术之外的化学疗法已证明可用于许多不同癌症类型中，包括:乳腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、成骨性肉瘤、睾丸癌、卵巢癌和某些肺癌。化学疗法的有效性通常受限于对机体中的其他组织的毒性。

[0143] 放射疗法涉及在治愈或改善癌症症状的尝试中使用电离辐射。它在所有病例的约一半中使用，并且辐射可以来自以近距离放射疗法形式的内部来源或外部来源。辐射通常加上手术和或化学疗法使用，但对于某些类型的癌症，例如早期头与颈癌，可以单独使用。对于疼痛的骨转移，它已发现在约70%的人中是有效的。

[0144] 可替代和补充治疗包括不同的卫生保健系统、实践和产品，其并非传统医学的部分。“补偿医学”指连同传统医学一起使用的方法和物质，而“替代医学”指代替传统医学使用的化合物。用于癌症的大多数补偿和替代医学没有经过严格的研究或测试。一些替代治疗已进行研究且显示是无效的，但仍继续上市且推广。

[0145] 最后，姑息护理指尝试使得患者感觉更好的治疗，并且可以与攻击癌症的尝试组合或不组合。姑息护理包括降低由患有癌症的人经历的身体、情感、精神和社会心理困扰的动作。与旨在直接杀死癌细胞的治疗不同，姑息护理的主要目标是改善患者的生活质量。

[0146] Gla结构域活性。在本公开内容的上下文中，考虑经改造的Gla蛋白质可以以几种不同方式用作抗癌剂。首先，癌症患者通常具有高凝状态，其可以导致栓塞和死亡。在这个实施方案中，Gla结构域蛋白质(任选连接至Fc区)施用于受试者的脉管系统内，其量足以降低栓塞形成和病理性凝血。本文公开的此类Gla结构域蛋白质可用于降低、阻断和/或抑制此类患者中的病理性凝血。

[0147] 另外，已知PtdS在压制针对癌症的免疫应答中起作用。因此，在另一个实施方案中，本发明人设想Gla结构域蛋白质结合且阻断/掩蔽癌细胞上的PtdS的用途。这作用于阻

止通过PtdS的致耐受性信号传导，其诱导抗炎细胞因子且压制促炎细胞因子，从而促进癌细胞的免疫逃避。当与其他“标准”癌症治疗剂组合时，这可以证明是特别有用的方法，如下文详细讨论的。

[0148] 2．自身免疫/炎性疾病

[0149] 背景。本公开内容考虑了各种自身免疫和/或炎性疾病状态的治疗，例如脊椎关节病、强直性脊柱炎、牛皮癣性关节炎、反应性关节炎、肠病性关节炎、溃疡性结肠炎、克罗恩氏病、肠易激病、炎性肠病、类风湿性关节炎、幼年型类风湿性关节炎、家族性地中海热、肌萎缩侧索硬化、干燥综合征、早期关节炎、病毒性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮、牛皮癣、脉管炎、韦格纳氏肉芽肿、阿狄森氏病、脱发、抗磷脂综合征、白塞氏病、乳糜泻、慢性疲劳综合症、溃疡性结肠炎、I型糖尿病、纤维肌痛、自身免疫性胃炎、古德帕斯丘综合征、格雷夫斯氏病、特发性血小板减少性紫癜(ITP)、重症肌无力、寻常型天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、风湿热、肉瘤样病、硬皮病、白癜风、血管炎、小血管炎、肝炎、原发性胆汁性肝硬化、肉瘤样病、硬皮病、移植物抗宿主病(急性和慢性)、再生障碍性贫血、或周期性嗜中性粒细胞减少症。这些疾病的诊断和治疗在文献中得到充分记录。

[0150] Gla结构域活性。已知某些免疫病症的特征在于凋亡细胞的缺陷性吞噬作用，导致继发性坏死、促炎信号传导和自身抗体产生。进一步地，在其表面上含有PtdS的质膜衍生囊泡(PMV)从凋亡细胞脱落，且被认为与免疫细胞例如巨噬细胞结合(DeRose等人，2011)。Gla结构域蛋白质可以用于掩蔽PMV表面上发现的PtdS，从而降低PMV的“诱饵”效应且允许凋亡细胞的吞噬作用。这应破坏持续的炎症信号传导的循环且降低免疫过度活跃。

[0151] 3．高凝病症

[0152] 背景。高凝病症引起血液凝固的趋势增加，这使患者处于静脉和动脉阻塞的危险中。在正常止血或出血停止中，血块在血管损伤部位处形成，在高凝状态中，血块在循环血液中发展。当这遍及机体的血管发生时，可以出现称为血栓形成的状况。血栓形成可以导致梗塞或组织死亡。高凝病症包括高同型半胱氨酸血症、抗凝血酶III缺乏、因子V leyden、以及蛋白C或蛋白S缺乏。

[0153] 使用体格检查、医疗史和血液测试的组合完成高凝病症的诊断。当发现时，可以施用香豆素和肝素抗凝剂，以降低凝血效应且维持血液中的流动性。具有高凝病症的患者的预后取决于凝血和血栓形成的严重性而改变，但如果未被检测且未经治疗，则血栓形成可以导致肺栓塞和死亡。

[0154] 镰状细胞病(SCD)尽管不是凝血病症，仍具有相同表现中的一些。有趣的是，在红细胞亚群上表面表达的PtdS的水平增加是这种疾病的普遍特点(Wood等人，*Blood*, Vol 88, No 5(9月1日), 1996)。SCD是超显性的常染色体隐性遗传性血液病症，其特征在于采取异常、僵硬、镰刀状的红血细胞。镰状化减少细胞的灵活性且导致各种并发症的危险。镰状化由于血红蛋白基因中的突变而发生。预期寿命缩短。镰状细胞病在来自热带和亚热带撒哈拉以南地区的部分的人(或其后代)中更常发生，在所述地区中疟疾是或曾是常见的。在其中疟疾常见的区域中，存在仅携带单个镰状细胞基因(镰状细胞性状)中的健康利益。仅具有镰状细胞病的两个等位基因之一的那些，虽然不是完全抗性的，但对感染更耐受且因此当感染时显示更不严重的症状。

[0155] 镰状细胞贫血是镰状细胞病的特异性形式的名称，其中对于引起HbS的突变存在

纯合性。镰状细胞贫血也称为“HbSS”、“SS疾病”、“血红蛋白S”或其排列变化。在仅具有一个镰刀基因和一个正常成人血红蛋白基因的杂合的人中，它被称为“HbAS”或“镰状细胞性状”。其他更罕见形式的镰状细胞病包括镰状血红蛋白C疾病(HbSC)、镰状细胞β-加上地中海贫血(HbS/$\beta^+$)和镰状细胞β-零地中海贫血(HbS/$\beta^0$)。这些其他形式的镰状细胞病是复合杂合状态，其中个人仅具有引起HbS的突变的一个拷贝和另一个异常血红蛋白等位基因的一个拷贝。

[0156] 在特定方面，SCD可以与血液流动相关。血管阻塞危象通过镰刀状红血细胞引起，其阻塞毛细血管且限制对器官的血液流动，导致缺血、疼痛、坏死和通常的器官损害。这些危象的频率、严重性和持续时间差别很大。疼痛的危象用水化、镇痛药和输血进行治疗；疼痛管理需要每隔一定时间的阿片样物质施用，直至危象已解决。对于更轻度的危象，患者亚组用NSAID(例如双氯芬酸或萘普生)管理。对于更严重的危象，大多数患者需要关于静脉内阿片样物质的住院患者管理；患者自控性镇痛(PCA)装置通常用于这种设置下。涉及器官例如阴茎或肺的血管阻塞危象视为紧急状况，且用红血细胞输血进行治疗。苯海拉明有时有效用于与阿片样物质使用相关的瘙痒。推荐刺激性肺量测定法，促进深呼吸以使肺膨胀不全发展降到最低的技术。

[0157] Gla结构域活性。本发明考虑使用Gla结构域来控制或调节PtdS在高凝状态中的促凝作用。PtdS表面表达是凝血级联的有力刺激物。经由使用Gla结构域多肽掩蔽暴露的PtdS可以抑制或阻止这种级联。这种治疗对于SCA个体可以是特别有利的，其中认为仅RBC的小群体可能负责与疾病相关的高凝性。

[0158] 4. 病毒感染

[0159] 背景。病毒是可以仅在生物的活细胞内复制的小传染剂。病毒可以感染所有类型的生物，从动物和植物到细菌和古细菌。约5,000种病毒已得到详细描述，尽管存在数百万不同类型。病毒在地球上几乎每一种生态系统中发现，并且是最丰富类型的生物实体。

[0160] 病毒颗粒(称为病毒粒子)由两个或三个部分组成：i)由DNA或RNA制备的遗传材料，携带遗传信息的长分子；ii)保护这些基因的蛋白质外壳；以及在一些情况下，iii)当它们在细胞外时，围绕蛋白质外壳的脂质包膜。病毒的形状范围从简单的螺旋状和二十面体形式到更复杂的结构。平均病毒为平均细菌大小的约一百分之一。大多数病毒太小而无法直接用光学显微镜看见。

[0161] 病毒以许多方式传播；植物中的病毒通常通过以植物体液为食物的昆虫例如蚜虫在植物间传播；动物中的病毒可以由吸血昆虫携带。这些具有疾病的生物称为携带者。流感病毒通过咳嗽和打喷嚏来传播。诺瓦克病毒和轮状病毒，病毒性胃肠炎的常见原因，通过粪口途径传播并且通过接触在人之间传递，在食物或水中进入机体。HIV是通过性接触和通过暴露于受感染的血液而传播的几种病毒之一。病毒可以感染的宿主细胞范围称为它的“宿主范围”。这可以很窄，或如当病毒能够感染许多物种时，可以很宽。

[0162] 动物中的病毒感染引发免疫应答，其通常消除感染病毒。免疫应答还可以通过疫苗产生，这赋予针对特异性病毒感染的人工获得性免疫。然而，一些病毒包括引起AIDS和病毒性肝炎的那些逃避这些免疫应答，并且导致慢性感染。抗体对病毒没有作用，但几种抗病毒药物已得到开发。

[0163] 各种疾病通过病毒感染得到促进，包括流感、人类免疫缺陷病毒、登革热病毒、西

尼罗河病毒、天花病毒、呼吸道合胞病毒、朝鲜出血热病毒、水痘、水痘带状疱疹病毒、单纯疱疹病毒1或2、EB病毒、马尔堡病毒、汉坦病毒、黄热病病毒、甲、乙、丙或戊型肝炎、埃博拉病毒、人乳头状瘤病毒、鼻病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、狂犬病病毒、新城疫病毒、轮状病毒、HTLV-1和-2。

[0164] Gla结构域活性。PtdS被隔离至静止哺乳动物细胞的质膜内叶。磷脂酰丝氨酸不对称性的丧失在细胞凋亡、细胞损伤和细胞活化期间发生，例如在病毒感染期间观察到的。这起因于易位酶的抑制，或者磷脂酰丝氨酸输出蛋白或脂质混乱酶例如混杂酶的活化(Soares等人，2008)。病毒活化宿主细胞以有效复制，并且病毒诱导的细胞活化可以导致细胞内$Ca^{2+}$的上升，这依次又通过活化磷脂酰丝氨酸输出蛋白，且通过抑制经由易位酶的磷脂酰丝氨酸输入，引起磷脂酰丝氨酸外化。此外，磷脂酰丝氨酸易位至外部宿主细胞表面可以是与病毒诱导的细胞凋亡相关的早期事件(Soares等人，2008)。

[0165] 在受感染细胞、出芽病毒粒子或衍生自凋亡前细胞的微囊泡的表面上的PtdS导致免疫逃避。使用本公开内容的Gla结构域多肽掩蔽这些膜上的PtdS，正常免疫功能可以更有效地解决病毒攻击，因此降低病毒载量、限制感染且破坏病毒粒子和受感染细胞。

[0166] 5. 败血症

[0167] 背景。在败血症中，炎症和血栓形成是循环(例如白细胞和血小板)、内皮和平滑肌细胞之间的相互作用的原因和结果两者。微粒是源于在细胞活化后生成且在体液中释放的质膜的促炎和促凝片段。在血管中，它们构成从各种各样的细胞起源获得的生物活性效应物库，并且可以充当细胞内信使。微粒暴露磷脂酰丝氨酸，在膜重塑后使得可接近的促凝磷脂，和组织因子(TF)，在内皮和白细胞表面处的血液凝固起始剂。它们构成IL-1β的分泌途径且上调靶细胞的促炎应答。微粒以低水平在健康个体中循环，但经历表型变化和量变，其可以在炎性疾病中发挥病理生理作用。微粒(MP)可以通过多重方式参与败血症的发病机制。它们能够调节血管紧张度且是有力的血管促炎和促凝介质。微粒的能力在解密败血性休克的多器官功能障碍的潜在机制中越来越感兴趣。

[0168] 内皮细胞和单核细胞的质膜由磷脂酰丝氨酸的外化和加密的组织因子TF表达重新组构，允许在细胞表面处的因子VII(FVIIa)活化和凝血酶(FIIa)生成。起泡发生，伴随具有TF的微粒释放，导致用于促凝反应的表面增加。血小板粘附和聚集也伴随MP的释放而发生；血小板和MP具有GPIbα，通过凝血酶的因子XI活化的辅因子，导致具有高水平的凝血酶生成和纤维蛋白形成的蔓延期。具有内皮TF的MP允许TF转移至PMN，增加TF散播和血栓性微血管病或弥散性血管内凝血。血液凝固的TF起始通过在内皮和单核细胞表面上例如MP上的组织因子途径抑制剂(TFPI)得到快速下调。内皮蛋白C受体(EPCR)结合的蛋白C通过凝血酶-血栓调节蛋白复合物活化，并且活化蛋白C(APC)抑制因子Va和因子VIIIa，限制凝血酶生成的蔓延期。EPCR结合的APC还调节NF-κB，对内皮细胞和单核细胞具有细胞保护作用。APC诱导出血，散发能够活化蛋白C的具有EPCR的MP，导致抗凝和抗细胞凋亡活性的散播。

[0169] Gla结构域活性。本发明考虑了使用Gla结构域来控制或调节在其表面上含有PtdS和TF的微粒的促凝作用。它们还可以下调在败血症中例如通过IL-1β发生的有关促炎信号传导，以及调节具有PtdS的微粒对血管紧张度的作用。

[0170] C. 治疗方法

[0171] 肽和多肽可以单独或与治疗上述疾病的其他药物结合施用于哺乳动物受试者(例

如人患者)。所需剂量取决于选择的施用途径;制剂的性质,包括附着至多肽的另外试剂;患者的病的性质;受试者的大小、重量、表面积、年龄和性别;进一步的组合疗法;以及主治医师的判断。合适的剂量在0.0001-100 mg/kg的范围内。考虑到各种可用化合物和各种施用途径的不同效率,将预期所需剂量中的广泛变动。例如,经口施用预期需要比通过静脉内注射施用更高的剂量。使用如本领域充分了解的用于最佳化的标准凭经验惯例,可以调整这些剂量水平中的变动。施用可以是单次或多次(例如2-、3-、4-、6-、8-、10-、20-、50-、100-、150-次或更多次)。多肽封装在合适的递送媒介物(例如聚合微粒或可植入装置)中可以增加特别是对于经口递送的递送效率。

[0172] D. 组合疗法

[0173] 在许多医学领域中用多重治疗模式治疗疾病是常见的,通常被称为“组合疗法”。为了使用本公开内容的方法和组合物治疗病症,一般使靶细胞或受试者与Gla结构域多肽和至少一种其他疗法接触。这些疗法将以有效达到一种或多种疾病参数中的降低的组合量提供。这个过程可以涉及使细胞/受试者与两种试剂/疗法同时接触,例如使用包括两种试剂的单一组合物或药物制剂,或通过使细胞/受试者与两种不同组合物或制剂同时接触,其中一种组合物包括Gla结构域多肽,并且另一种包括另一种试剂。

[0174] 可替代地,Gla结构域多肽可以在其他治疗之前或之后,间隔范围为数分钟到数周。一般确保在每次递送时间之间不过期显著时间段,使得疗法仍能够对细胞/受试者发挥有利的组合作用。在此类情况下,考虑在彼此约12-24小时内、在彼此约6-12小时内、或伴随仅约12小时的延迟时间,使细胞与两种模式接触。在一些情况下,可能希望延迟时间段用于显著治疗;然而,其中在分别施用之间经过几天(2、3、4、5、6或7)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0175] 还可设想需要Gla结构域蛋白质或另一种疗法/试剂的超过一次施用。可以采用各种组合,其中Gla结构域蛋白质是“A”,并且另一种疗法是“B”,如下文例示的:

[0176]

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| A/B/A | B/A/B | B/B/A | A/A/B | B/A/A | A/B/B | B/B/B/A | B/B/A/B |
| A/A/B/B | A/B/A/B | A/B/B/A | B/B/A/A | B/A/B/A | B/A/A/B | B/B/B/A | |
| A/A/A/B | B/A/A/A | A/B/A/A | A/A/B/A | A/B/B/B | B/A/B/B | B/B/A/B | |

[0177] 考虑了其他组合。

[0178] 适用于针对癌症的组合疗法中的试剂或因子包括放射性核素、化学治疗剂或毒素。具体的化学治疗剂包括替莫唑胺、埃博霉素、美法仑、卡莫司汀、白消安、洛莫司汀、环磷酰胺、达卡巴嗪、聚苯丙生、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、氮芥、白消安、环磷酰胺、卡铂、顺铂、噻替派、卡培他滨、链佐星、比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、乙酸亮丙瑞林、盐酸多柔比星、硫酸博莱霉素、盐酸柔红霉素、更生霉素、脂质体柠檬酸柔红霉素、脂质体盐酸多柔比星、盐酸表阿霉素、盐酸伊达比星、丝裂霉素、多柔比星、戊柔比星、阿那曲唑、柠檬酸托瑞米芬、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟达拉滨、氟尿苷、干扰素α-2b、普卡霉素、巯嘌呤、氨甲蝶呤、干扰素α-2a、乙酸甲羟孕酮、雌氮芥磷酸钠、雌二醇、乙酸亮丙瑞林、乙酸甲地孕酮、乙酸奥曲肽、二磷酸己烯雌酚、睾内酯、乙酸戈舍瑞林、磷酸依托泊苷、硫酸长春新碱、依托泊苷、长春碱、依托泊苷、硫酸长春新碱、替尼泊苷、曲妥珠单抗、吉妥珠单抗奥佐米星、利妥昔单抗、依西美坦、盐酸依立替康、天冬酰胺酶、盐酸吉西他滨、六甲蜜胺、盐酸托泊替康、羟基脲、克拉屈滨、米托

坦、盐酸丙卡巴肼、酒石酸长春瑞滨、喷司他丁钠、米托蒽醌、培门冬酶、地尼白介素、altretinoin、卟吩姆、贝沙罗汀、紫杉醇、多西紫杉醇、三氧化二砷或维甲酸。毒素包括假单胞菌属(*Pseudomonas*)外毒素(PE38)、蓖麻毒素A链、白喉毒素、Besides PE和RT、美洲商陆抗病毒蛋白(PAP)、皂草素和白树毒素。用于癌症疗法的放射性核素包括Y-90、P-32、I-131、In-111、Sr-89、Re-186、Sm-153和Sn-117m。

[0179] 适用于针对自身免疫病症的组合疗法中的试剂或因子包括消炎药和免疫调节组合物。这些包括强的松、甲基强的松、Venipred、倍氟米松、氢化可的松、去炎松、关节内注射己曲安奈德、Methapred、口服Rayos、倍他米松和依那西普。

[0180] 适用于针对心血管疾病的组合疗法中的试剂或因子包括β阻滞剂、抗高血压剂、强心剂、抗血栓形成剂、血管扩张剂、激素拮抗剂、内皮素拮抗剂、细胞因子抑制剂/阻滞剂、钙通道阻滞剂、磷酸二酯酶抑制剂和血管紧张素2型拮抗剂。

[0181] 适用于针对高凝病症的组合疗法中的试剂或因子包括抗凝剂例如肝素和华法林。

[0182] 适用于针对病毒感染的组合疗法中的试剂或因子包括阿巴卡韦、无环鸟苷、阿昔洛韦、阿德福韦、金刚烷胺、氨普那韦、聚肌胞、阿比朵尔、阿扎那韦、立普妥、Boceprevirertet、西多福韦、双汰芝、达芦那韦、地拉韦啶、去羟肌苷、二十二醇、依度尿苷、依非韦伦、恩曲他滨、恩夫韦地、恩替卡韦、进入抑制剂、泛昔洛韦、福米韦生、福沙那韦、膦甲酸、膦乙酸、更昔洛韦、伊巴他滨、异丙肌苷、碘苷、咪喹莫特、茚地那韦、肌苷、整合酶抑制剂、干扰素III型、干扰素II型、干扰素I型、干扰素、拉米夫定、洛匹那韦、洛韦胺、马拉韦罗、吗啉胍、美替沙、奈非那韦、奈韦拉平、多吉美、核苷类似物、奥司他韦、聚乙二醇干扰素α-2a、喷昔洛韦、帕拉米韦、普可那利、鬼臼毒素、蛋白酶抑制剂、雷特格韦、逆转录酶抑制剂、利巴韦林、金刚乙胺、利托那韦、Pyramidine、沙奎那韦、司他夫定、协同增强剂(抗逆转录病毒)、茶树油、特拉匹韦、替诺福韦、替诺福韦酯、替拉那韦、曲氟尿苷、三协唯、曲金刚烷、特鲁瓦达、伐昔洛韦、缬更昔洛韦、维立韦罗、阿糖腺苷、伟拉咪定、扎西他滨、扎那米韦和齐多夫定。

[0183] 技术人员被引导到“Remington's Pharmaceutical Sciences”第15版,第33章,特别是第624-652页。取决于待治疗受试者的状况,剂量中的一些变动将必须发生。在任何情况下,负责施用的人决定个别受试者中的适当剂量。此外,对于人施用,制剂应满足如由FDA生物制品办公室标准要求的无菌、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0184] 还应指出前述疗法中的任一种均可证明单独可用于治疗。

[0185] V. 实施例

[0186] 包括下述实施例以证实公开内容的优选实施方案。本领域技术人员应当理解,下述实施例中公开的技术代表由本发明人发现在公开内容的实践中良好起作用的技术,并且因此可以视为构成用于其实践的优选模式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,可以在公开的具体实施方案中作出许多变化,并且仍获得相同或相似结果,而不背离公开内容的精神和范围。

[0187] 实施例1

[0188] 通过使用制备的磷脂囊泡,Gla结构域蛋白质对于细胞膜的亲和力已在体外进行测定(Shah等人,1998;Nelsestuen, 1999)。然而,这些体外值如何转变为体内背景仍未得到完全阐明。例如,FVII与TF的相互作用强调下述事实:尽管这些蛋白质的Gla结构域是非

常同源的，但在其细胞膜结合特异性和亲和力中的另外差异可以通过其EGF和/或Kringle结构域介导。不幸的是，这些相互作用不能通过仅基于磷脂囊泡的研究概括，且可能仍是有待鉴定的。

[0189] 因此，发明人提出由下述蛋白质实验对象组制备且测试Gla+EGF/Kringle结构域以及单独的Gla结构域：hS(高亲和力结合剂)、hZ(中等亲和力结合剂)、hPT(含有中等亲和力kringle)、hFVII(低亲和力-利用在癌症中也是上调的次级“受体”)、和B0178(具有增加的磷脂亲和力的hFVII)。这些蛋白质潜在具有不同的体内结合特征，其对于其作为探针(并且如果被验证和选择性，潜在作为治疗剂)的用途可以是有利的，并且迄今为止未认识到。

[0190] 一般方法是构建重组蛋白质且测试其表达。随后将开发测定以评价结合。随后，表达和纯化方法将得到最佳化，随后为γ-羧化的质量控制。

[0191] 图1显示了来自各种Gla结构域蛋白质的序列，包括羧化位点。图2显示了各种不同Gla结构域蛋白质的表达，所述Gla结构域蛋白质经改造且在293细胞中瞬时表达。图3显示了在BHK21细胞中的相似研究。考虑到最佳表达构建体之一是蛋白S + EGF构建体，所以来自蛋白S的信号序列用于凝血酶原Gla + Kringle和蛋白Z + EGF。然而，表达仅在细胞内观察到(图4)。

[0192] 选择蛋白S Gla + EGF用于进一步研究。序列显示于图5中。蛋白质使用RF286培养基在BHK21细胞中产生。收获600 ml且4X浓缩。纯化利用三个步骤：

[0193] 1. Ni-NTA柱，10 ml，新鲜填充的。将培养基装载至柱且用咪唑梯度洗脱。对所有级分实施Gla蛋白质印迹，以鉴定加上His标签的Gla蛋白S G+E。

[0194] 2. 伴随$CaCl_2$逐步洗脱的Hitrap Q。将Gla阳性级分合并且实施1 ml Hitrap Q伴随10 mM $CaCl_2$洗脱。

[0195] 3. 伴随$CaCl_2$梯度(0-10 mM阴影梯度)的Hitrap Q。将逐步纯化的Gla蛋白质施加于Q且用梯度$CaCl_2$(高达10 mM)洗脱。产生以95%纯度水平的总共0.9 mg蛋白质。图6显示了在还原和非还原条件下的纯化级分。图7和8显示了不同的基于FAC的细胞凋亡测定。两者均显示蛋白S Gla + EGF构建体对于经历细胞凋亡的细胞是特异性的，正如膜联蛋白V(图7)，并且膜联蛋白V可以竞争掉蛋白S Gla + EGF结合。

[0196] 总之，将蛋白S Gla + EGF表达且纯化。对纯化材料的分析表明它是高度γ羧化的。基于FAC的细胞凋亡测定证实蛋白S G+E(11 Gla)可以与“凋亡”细胞结合，并且这种对细胞的结合经由磷脂酰丝氨酸的靶向，如通过膜联蛋白V竞争测定证实的。

[0197] **************

[0198] 根据本公开内容，无需过度实验，可以制备且执行本文公开和请求保护的所有组合物和/或方法。虽然本公开内容的组合物和方法已按照优选实施方案进行描述，但对于本领域技术人员显而易见的是，可以对组合物和/或方法和本文所述方法的步骤或步骤顺序施加变动，而不背离公开内容的概念、精神和范围。更具体而言，显而易见的是化学和生理学相关的某些试剂可以替代本文描述的试剂，同时达到相同或相似结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似替代和修饰视为在如由所附权利要求限定的公开内容的精神、范围和概念内。

[0199] VI. 参考文献

[0200] 下述参考文献特别引入本文作为参考，达到与它们对本文所述那些提供补充性示

例性操作或其他细节的程度。

[0201] 美国专利5,440,013

[0202] 美国专利5,446,128

[0203] 美国专利5,475,085

[0204] 美国专利5,597,457

[0205] 美国专利5,618,914

[0206] 美国专利5,670,155

[0207] 美国专利5,672,681

[0208] 美国专利5,674,976

[0209] 美国专利5,710,245

[0210] 美国专利5,790,421

[0211] 美国专利5,840,833

[0212] 美国专利5,859,184

[0213] 美国专利5,889,155

[0214] 美国专利5,929,237

[0215] 美国专利6,093,573

[0216] 美国专利6,261,569

[0217] 美国专利申请2005/0015232

[0218] 美国专利申请2004/001827A1

[0219] 美国专利申请2003/104578A2

[0220] 美国专利申请2003/104578A1

[0221] W006096515A2

[0222] W007047504A2

[0223] W006096515A2

[0224] Aaronson和Horvath, *Science*, 296(5573):1653-5, 2002.

[0225] Abe和Kufe, *Cancer Res.*, 49(11):2834-2839, 1989.

[0226] Agata等人,*Cancer Res.*, 68:6136-44, 2008.

[0227] Ahmad等人,*Cancer Res.*, 68:2920-2926, 2008.

[0228] Ahmad等人,*J. Biol. Chem.*, 281:35764-9, 2006.

[0229] Ahmad等人,*Nat. Cell Biol.*, 9:1419-1427, 2007.

[0230] Alvarez等人,*Cancer Res.*, 65(12):5054-62, 2005.

[0231] Alvarez等人,*Cancer Res.*, 66(6):3162-8, 2006.

[0232] Anderson等人,*Trends Immunol* 27, 343-348, 2006.

[0233] Ashkenazi和Chamow, *Curr Op Immunol* 9, 195-200, 1997.

[0234] Baldus等人,*Clin. Cancer Res.*, 10(8):2790-2796, 2004.

[0235] Blankenberg, *Proc Am Thorac Soc*, 6, p 469-476, 2009.

[0236] Bodanszky等人,*J. Antibiot.*, 29(5):549-53, 1976.

[0237] Boersma等人,*J Nuclear Med*, 46(12), p2035-2050, 2005.

[0238] Bowman等人,*Oncogene*, 19(21):2474-88, 2000.

[0239] Bromberg等人,*Cell*, 98(3):295-303, 1999.
[0240] Buerger等人,*J. Biol. Chem.*, 278(39):37610-21, 2003.
[0241] Carter, *Nature Reviews Immunol* 6, 343-357, 2006.
[0242] Chapman, *Advanced Drug Delivery Reviews* 54, 531-545, 2002.
[0243] Chaudhury等人,*J Exper Med* 197, 315-322, 2003.
[0244] Chen & Greene, *Mol. Cell. Biol.* 5:392-401, 2004.
[0245] Cohen等人,*J. Med. Chem.*, 33:883-894, 1990.
[0246] Cohen等人,*Cell Res*, 19 p625-637, 2009.
[0247] Duraisamy等人,*Gene*, 373:28-34, 2006.
[0248] Duttaroy等人,*Diabetes* 54, 251-258, 2005.
[0249] Elliott等人,*Nat Biotechnol* 21, 414-421, 2003.
[0250] Elltiot等人,*Nature*, 461, p2-286, 2009.
[0251] Elltiot和Ravichandran, *J. Cell Biol*, 189(7)p1059-1070, 2010.
[0252] Erwig和Henson, *Cell Death Differentiation* 15, p243-250, 2008.
[0253] Fischer, *Med. Res. Rev.,* 27(6):755-796, 2007.
[0254] Gaemers等人,*J. Biol. Chem.*, 276:6191-6199, 2001.
[0255] Gendler等人,*J. Biol. Chem.*, 263:12820-12823, 1988.
[0256] Germain和Frank, *Clin. Cancer Res.*, 13(19):5665-9, 2007.
[0257] Gerondakis等人,Oncogene 25(51):6781-99, 2006.
[0258] Ghetie等人,*Nature Biotechnol* 15, 637-640, 1997.
[0259] Ghosh等人,*Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 16:225-60, 1998.
[0260] Gilmore, available from NF-kB.org, 2008.
[0261] Grillot等人,*J. Immunol.*, 158:4750-7, 1997.
[0262] Gronenborn等人,*Anal. Chem.*, 62(1):2-15, 1990.
[0263] Hansson和Stenflo. *J Thrombosis Haemostasis*, 3, P2633-2648, 2005.
[0264] Hayden和Ghosh, *Cell*,132:344-62, 2008.
[0265] Hinton等人,*J Immunol* 176, 346-356, 2006.
[0266] Hodel等人,*Mol. Cell*, 10(2):347-58, 2002.
[0267] Hoffman等人,*Oncogene*, 25:6706-16, 2006.
[0268] Huang等人,*Cancer Biol Ther.*, 2:702-706, 2003.
[0269] Huang等人,*Cancer Res.*, 65:10413-10422, 2005.
[0270] Huxford等人,*Cell* 95(6):759-70, 1998.
[0271] Jackson, *Seminars in Oncology,* 24:L164-172, 1997.
[0272] Jacobs等人,*Cell,* 95:749-58, 1998.
[0273] Jain等人,*Trends Biotechnol* 25, 307-316, 2007.
[0274] Johnson等人,*In: Biotechnology And Pharmacy*, Pezzuto等人(Eds.), Chapman and Hall, NY, 1993.
[0275] Jones等人,*J. Med. Chem.*, 39:904-917, 1996.
[0276] Karin & Lin, *Nat. Immunol.*,3:221-7, 2002.

[0277] Kau等人,*Nat. Rev. Cancer*, 4(2):106-17, 2004.

[0278] Kawano等人,*Cancer Res.*, 67:11576-84, 2007.

[0279] Keyt等人,*Proc Natl Acad Sci USA* 91, 3670-3674, 1994.

[0280] Kietselaer等人,*Netherlands Heart J*, 10(7/8), p313-317,(002.

[0281] Kinlough等人,*J. Biol. Chem.,* 279(51):53071-53077, 2004.

[0282] Kufe等人,*Hybridoma,* 3:223-232, 1984.

[0283] Kurihara等人,*Appl Radiat Isot*, 66(9);p1175-1182, 2008.

[0284] Lagow和Carson, *J. Cell. Biochem.*,86:759-72, 2002.

[0285] Lahorte等人,*Eur J Nuclear Medicine Mol Imaging*, 31(6), p887-919, 2004.

[0286] Lee等人,*Cancer Cell*, 15(4):283-293, 2009.

[0287] Leng等人,*J. Biol. Chem.*, 282:19321-19330, 2007.

[0288] Levitan等人,*J. Biol. Chem.*, 280:33374-33386, 2005.

[0289] Levy和Shoseyov, *Biotechnol Advances* 20, 191-213, 2002.

[0290] Li等人,*Cancer Biol. Ther.*, 2:187-193, 2003b.

[0291] Li等人,*J. Biol. Chem.*, 276:35239-35242, 2001.

[0292] Li等人,*J. Biol. Chem.*, 276:6061-6064, 2001.

[0293] Li等人,*Mol. Cancer Res.*, 1:765-775, 2003c.

[0294] Li等人,*Mol. Cell Biol.*, 18:7216-7224, 1998.

[0295] Li等人,*Oncogene*, 22:6107-6110, 2003a.

[0296] Ligtenberg等人,*J. Biol. Chem.*, 267, 6171-6177, 1992.

[0297] Lin等人,*Amino Acids*, Published online 17 March 2010.

[0298] Loose等人,*Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2007.

[0299] Macao, *Nat. Struct. Mol. Biol.,* 13, 71-76, 2006.

[0300] McPherson, *J. Biol. Chem.*, 251:6300-6306, 1976.

[0301] Melder等人,*Cancer Immunol Immunother* 54, 535-5475, 2005.

[0302] Merlo等人,*Cancer Res.*, 49, 6966-6971, 1989.

[0303] Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.*, 85:2149-2154, 1963.

[0304] Micheau & Tschopp, *Cell*,114:181-90, 2003.

[0305] Mimura等人,*Mol Immunol* 37, 697-706, 2000.

[0306] Muthuswamy, *Nat. Cell Biol.*, 3(9):785-92, 2001.

[0307] Naresh等人,*Cancer*, 91(3), p578-548, 2001.

[0308] Natoli等人,*Nat. Immunol.*, 6:439-45, 2005.

[0309] Navia等人,*Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:202-210, 1992.

[0310] Nelsestuen, *Trends Cardiovasc Med*, 9(6), p162-167, 1999.

[0311] Osborn等人,*J Pharmacol Experimental Therapeutics* 303, 540-548, 2002a.

[0312] Osborn等人,Eur J Pharmacol 456, 149-158, 2002b.

[0313] Pasparakis等人,*Cell Death Differ.* 13:861-72, 2006.

[0314] PCT申请PCT/US00/03745

[0315] PCT申请PCT/US00/14667
[0316] PCT申请PCT/US99/11913
[0317] PCT申请PCT/US99/18441
[0318] Peptide Synthesis, 1985
[0319] Percipalle等人,*J. Mol. Biol.*,(4):722-32, 1997.
[0320] Perey等人,*Cancer Res.*, 52(22):6365-6370, 1992.
[0321] Petkova等人,*International Immunol* 18, 1759-1769, 2006a.
[0322] Protective Groups in Organic Chemistry, 1973
[0323] Protein NMR Spectroscopy, Principles and Practice, J. Cavanagh等人, Academic Press, San Diego, 1996.
[0324] Raina等人,*Direct targeting of the GLA DOMAIN oncoprotein blocks survival and tumorigenicity of human breast carcinoma cells. Cancer Res.*, 2009(IN PRESS).
[0325] Raina等人,*EMBO J.*, 25:3774-3783, 2006.
[0326] Raina等人,*J. Biol. Chem.*, 279:20607-20612, 2004.
[0327] Raju和Scallon, *Biotechnol Prog* 23, 964-971, 2007.
[0328] Raju和Scallon, *Biochem Biophys Res Commun* 341, 797-803, 2006.
[0329] Ramasamy等人,*Mol. Cell*, 27:992-1004, 2007.
[0330] Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, 1035-1038和1570-1580, 1990.
[0331] Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版, 3:624-652, 1990.
[0332] Ren等人,*Cancer Cell*, 5:163-175, 2004.
[0333] Ren等人,*J. Biol. Chem.*, 277:17616-17622, 2002.
[0334] Reutelingsperger等人,*J Immunol Methods* 265, 123- 132, 2002.
[0335] Ryan和Wente, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 12(3):361-71, 2000.
[0336] Schneider-Brachert等人,*Immunity*,21:415-28, 2004.
[0337] Schroeder等人,*J. Biol. Chem.*, 276(16):13057-13064 2001.
[0338] Schroeder等人,*Oncogene*, 23:5739-5747, 2004.
[0339] Shah等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, p4229-4234, 1998.
[0340] Shuai, *Oncogene,* 19(21):2638-44, 2000.
[0341] Siddiquee等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(18):7391-6, 2007.
[0342] Siddiqui等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:2320-2323, 1988.
[0343] Sinclair和Elliott, *J Pharmaceutical Sci* 94, 1626-1635, 2005.
[0344] Solid Phase Peptide Synthelia, 1984
[0345] Song等人,*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102(13):4700-5, 2005.
[0346] Soule等人,*Cancer Res.*, 50(18):6075-6086, 1990.
[0347] Suh和Gumbiner, *Exp. Cell Res.*, 290(2):447-56, 2003.
[0348] Sung等人,*J Interferon Cytokine Res* 23, 25-36, 2003.
[0349] Tait和Gibson. *Arch Biochem Biophys*. 298(1), p187-191, 1992.

[0350] Truscott等人,*J Cell Biol.*, 163(4):707-713, 2003.

[0351] Umana等人,*Nat Biotechnol* 17, 176-180, 1999.

[0352] Vaccaro等人,*Nature Biotechnol* 23, 1283-1288, 2005.

[0353] van den Eijnde等人,*J Cell Science*, 114, p3631-3642, 2001.

[0354] Vermeer等人,*Nature*, 422(6929):322-6, 2003.

[0355] Veronese和Pasut, *Drug Discovery Today* 10, 1451-1458, 2005.

[0356] Webb等人,*J Immunol*, 169 p2580-2586, 2002.

[0357] Weber, *Advances Protein Chem.,* 41:1-36, 1991.

[0358] Wegenka等人,*Mol. Cell Biol.*, 14(5):3186-96, 1994.

[0359] Wei等人,*Cancer Cell*, 7:167-178, 2005.

[0360] Wei等人,*Cancer Res.*, 67(4):1853-8, 2007.

[0361] Wei等人,*Mol. Cell.*, 21:295-305, 2006.

[0362] Weis, *Cell*, 112(4):441-51, 2003.

[0363] Wen等人,*J. Biol. Chem.*, 278:38029-38039, 2003.

[0364] Wider, *BioTechniques*, 29:1278-1294, 2000.

[0365] Yamamoto等人,*J. Biol. Chem.*, 272:12492-12494, 1997.

[0366] Yeh等人,Proc. *Nat'l Acad. Sci. USA* 89, 1904-1908, 1992.

[0367] Yin等人,*J. Biol. Chem.*, 278:35458-35464, 2003.

[0368] Yin等人,*J. Biol. Chem.*, 279:45721-45727, 2004.

[0369] Yin等人,*J. Biol. Chem.*, 282:257-266, 2007.

[0370] Young等人,*Cell.* 112(1):41-50, 2003.

[0371] Yu等人,*Seminars Thrombosis Hemostasis*, 30(1), p21-30, 2004.

[0372] Yu和Jove, *Nat. Rev. Cancer*, 4(2):97-105, 2004.

[0373] Zhang等人,*Mol. Cell. Biol.*, 19:7138-7146, 1999。

[0001] 序列表

[0002] <110> Bayer Healthcare, LLC

[0003] BAUZON, Maxine

[0004] HERMISTON, Terry

[0005] <120> 作为治疗试剂的Gla结构域

[0006] <130> BAYR.P0005WO

[0007] <150> 61/791,537

[0008] <151> 2013-03-15

[0009] <160> 6

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 45

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 人工序列

[0015] <220>

[0016] <223> 合成肽

[0017] <220>

[0018] <221> misc_feature

[0019] <222> (6)..(7)

[0020] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0021] <220>

[0022] <221> misc_feature

[0023] <222> (14)..(14)

[0024] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0025] <220>

[0026] <221> misc_feature

[0027] <222> (16)..(16)

[0028] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0029] <220>

[0030] <221> misc_feature

[0031] <222> (19)..(20)

[0032] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0033] <220>

[0034] <221> misc_feature

[0035] <222> (25)..(26)

[0036] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0037] <220>

[0038] <221> misc_feature

[0039] <222> (29)..(29)
[0040] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0041] <220>
[0042] <221> misc_feature
[0043] <222> (32)..(32)
[0044] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0045] <220>
[0046] <221> misc_feature
[0047] <222> (36)..(36)
[0048] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0049] <400> 1
[0050] Ala Asn Ser Leu Leu Xaa Xaa Thr Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa
[0051] 1 5 10 15
[0052] Cys Ile Xaa Xaa Leu Cys Asn Lys Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa
[0053] 20 25 30
[0054] Asn Asp Pro Xaa Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu
[0055] 35 40 45
[0056] <210> 2
[0057] <211> 46
[0058] <212> PRT
[0059] <213> 人工序列
[0060] <220>
[0061] <223> 合成肽
[0062] <220>
[0063] <221> misc_feature
[0064] <222> (7)..(8)
[0065] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0066] <220>
[0067] <221> misc_feature
[0068] <222> (11)..(11)
[0069] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0070] <220>
[0071] <221> misc_feature
[0072] <222> (15)..(15)
[0073] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0074] <220>
[0075] <221> misc_feature
[0076] <222> (17)..(17)
[0077] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0078] <220>

[0079] <221> misc_feature

[0080] <222> (20)..(21)

[0081] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0082] <220>

[0083] <221> misc_feature

[0084] <222> (26)..(27)

[0085] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0086] <220>

[0087] <221> misc_feature

[0088] <222> (30)..(30)

[0089] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0090] <220>

[0091] <221> misc_feature

[0092] <222> (33)..(33)

[0093] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0094] <220>

[0095] <221> misc_feature

[0096] <222> (35)..(35)

[0097] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0098] <220>

[0099] <221> misc_feature

[0100] <222> (40)..(40)

[0101] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0102] <400> 2

[0103] Ala Gly Ser Tyr Leu Leu Xaa Xaa Leu Phe Xaa Gly Asn Leu Xaa Lys

[0104] 1 5 10 15

[0105] Xaa Cys Tyr Xaa Xaa Ile Cys Val Tyr Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe

[0106] 20 25 30

[0107] Xaa Asn Xaa Val Val Thr Asp Xaa Phe Trp Arg Arg Tyr Lys

[0108] 35 40 45

[0109] <210> 3

[0110] <211> 45

[0111] <212> PRT

[0112] <213> 人工序列

[0113] <220>

[0114] <223> 合成肽

[0115] <220>

[0116] <221> misc_feature

[0117] <222> (6)..(7)
[0118] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0119] <220>
[0120] <221> misc_feature
[0121] <222> (14)..(14)
[0122] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0123] <220>
[0124] <221> misc_feature
[0125] <222> (16)..(16)
[0126] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0127] <220>
[0128] <221> misc_feature
[0129] <222> (19)..(20)
[0130] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0131] <220>
[0132] <221> misc_feature
[0133] <222> (25)..(26)
[0134] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0135] <220>
[0136] <221> misc_feature
[0137] <222> (29)..(29)
[0138] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0139] <220>
[0140] <221> misc_feature
[0141] <222> (32)..(32)
[0142] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0143] <400> 3
[0144] Ala Asn Thr Phe Leu Xaa Xaa Val Arg Lys Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa
[0145] 1 5 10 15
[0146] Cys Val Xaa Xaa Thr Cys Ser Tyr Xaa Xaa Ala Phe Xaa Ala Leu Xaa
[0147] 20 25 30
[0148] Ser Ser Thr Ala Thr Asp Val Phe Trp Ala Lys Tyr Thr
[0149] 35 40 45
[0150] <210> 4
[0151] <211> 45
[0152] <212> PRT
[0153] <213> 人工序列
[0154] <220>
[0155] <223> 合成肽

[0156] <220>
[0157] <221> misc_feature
[0158] <222> (6)..(7)
[0159] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0160] <220>
[0161] <221> misc_feature
[0162] <222> (14)..(14)
[0163] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0164] <220>
[0165] <221> misc_feature
[0166] <222> (16)..(16)
[0167] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0168] <220>
[0169] <221> misc_feature
[0170] <222> (19)..(20)
[0171] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0172] <220>
[0173] <221> misc_feature
[0174] <222> (25)..(26)
[0175] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0176] <220>
[0177] <221> misc_feature
[0178] <222> (29)..(29)
[0179] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0180] <220>
[0181] <221> misc_feature
[0182] <222> (35)..(35)
[0183] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基
[0184] <400> 4
[0185] Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Pro Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa
[0186] 1 5 10 15
[0187] Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Lys
[0188] 20 25 30
[0189] Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser
[0190] 35 40 45
[0191] <210> 5
[0192] <211> 45
[0193] <212> PRT
[0194] <213> 人工序列

[0195] <220>

[0196] <223> 合成肽

[0197] <220>

[0198] <221> misc_feature

[0199] <222> (6)..(7)

[0200] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0201] <220>

[0202] <221> misc_feature

[0203] <222> (14)..(14)

[0204] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0205] <220>

[0206] <221> misc_feature

[0207] <222> (16)..(16)

[0208] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0209] <220>

[0210] <221> misc_feature

[0211] <222> (19)..(20)

[0212] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0213] <220>

[0214] <221> misc_feature

[0215] <222> (25)..(26)

[0216] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0217] <220>

[0218] <221> misc_feature

[0219] <222> (29)..(29)

[0220] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0221] <220>

[0222] <221> misc_feature

[0223] <222> (32)..(32)

[0224] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0225] <220>

[0226] <221> misc_feature

[0227] <222> (35)..(35)

[0228] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0229] <400> 5

[0230] Ala Asn Ala Phe Leu Xaa Xaa Leu Arg Gln Gly Ser Leu Xaa Arg Xaa

[0231] 1 5 10 15

[0232] Cys Lys Xaa Xaa Gln Cys Ser Phe Xaa Xaa Ala Arg Xaa Ile Phe Xaa

[0233] 20 25 30

[0234] Asp Ala Xaa Arg Thr Lys Leu Phe Trp Ile Ser Tyr Ser

[0235] 35 40 45

[0236] <210> 6

[0237] <211> 250

[0238] <212> PRT

[0239] <213> 人工序列

[0240] <220>

[0241] <223> 合成肽

[0242] <220>

[0243] <221> misc_feature

[0244] <222> (6)..(7)

[0245] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0246] <220>

[0247] <221> misc_feature

[0248] <222> (14)..(14)

[0249] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0250] <220>

[0251] <221> misc_feature

[0252] <222> (16)..(16)

[0253] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0254] <220>

[0255] <221> misc_feature

[0256] <222> (19)..(20)

[0257] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0258] <220>

[0259] <221> misc_feature

[0260] <222> (25)..(26)

[0261] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0262] <220>

[0263] <221> misc_feature

[0264] <222> (29)..(29)

[0265] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0266] <220>

[0267] <221> misc_feature

[0268] <222> (32)..(32)

[0269] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0270] <220>

[0271] <221> misc_feature

[0272] <222> (36)..(36)

[0273] <223> X是γ-羧基谷氨酸残基

[0274] <400> 6

[0275] Ala Asn Ser Leu Leu Xaa Xaa Thr Lys Gln Gly Asn Leu Xaa Arg Xaa

[0276] 1 5 10 15

[0277] Cys Ile Xaa Xaa Leu Cys Asn Lys Xaa Xaa Ala Arg Xaa Val Phe Xaa

[0278] 20 25 30

[0279] Asn Asp Pro Xaa Thr Asp Tyr Phe Tyr Pro Lys Tyr Leu Val Cys Leu

[0280] 35 40 45

[0281] Arg Ser Phe Gln Thr Gly Leu Phe Thr Ala Ala Arg Gln Ser Thr Asn

[0282] 50 55 60

[0283] Ala Tyr Pro Asp Leu Arg Ser Cys Val Asn Ala Ile Pro Asp Gln Cys

[0284] 65 70 75 80

[0285] Ser Pro Leu Pro Cys Asn Glu Asp Gly Tyr Met Ser Cys Lys Asp Gly

[0286] 85 90 95

[0287] Lys Ala Ser Phe Thr Cys Thr Cys Lys Pro Gly Trp Gln Gly Glu Lys

[0288] 100 105 110

[0289] Cys Glu Phe Asp Ile Asn Glu Cys Lys Asp Pro Ser Asn Ile Asn Gly

[0290] 115 120 125

[0291] Gly Cys Ser Gln Ile Cys Asp Asn Thr Pro Gly Ser Tyr His Cys Ser

[0292] 130 135 140

[0293] Cys Lys Asn Gly Phe Val Met Leu Ser Asn Lys Lys Asp Cys Lys Asp

[0294] 145 150 155 160

[0295] Val Asp Glu Cys Ser Leu Lys Pro Ser Ile Cys Gly Thr Ala Val Cys

[0296] 165 170 175

[0297] Lys Asn Ile Pro Gly Asp Phe Glu Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Arg

[0298] 180 185 190

[0299] Tyr Asn Leu Lys Ser Lys Ser Cys Glu Asp Ile Asp Glu Cys Ser Glu

[0300] 195 200 205

[0301] Asn Met Cys Ala Gln Leu Cys Val Asn Tyr Pro Gly Gly Tyr Thr Cys

[0302] 210 215 220

[0303] Tyr Cys Asp Gly Lys Lys Gly Phe Lys Leu Ala Gln Asp Gln Lys Ser

[0304] 225 230 235 240

[0305] Cys Glu Ser Arg His His His His His His

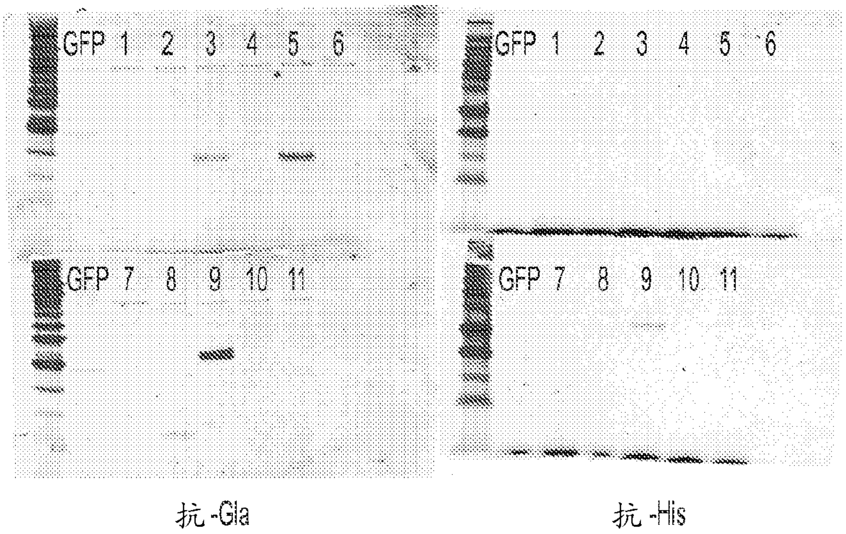
[0306] 245 250

| Gla蛋白质 | 膜亲和力 | Gla残基 | 另外的结构域 | 大小** (kD) |
|---|---|---|---|---|
| 蛋白S | 高 | 11 | EGF结构域 | 4.95, 26.7 |
| 蛋白Z | 中 | 13 | EGF结构域 | 5.06, 13.9 |
| 凝血酶原 | 中 | 10 | Kringle结构域 | 5.06, 27.3 |
| FVII | 低 | 10 | 与TF结合相关的EGF结构域 | 4.95, 14.1 |
| B0178 | 中* | 11 | 与TF结合相关的EGF结构域 | 4.95, 14.1 |

*如通过对活化血小板的FAC测定的，与FVII相比较

** 不含标签

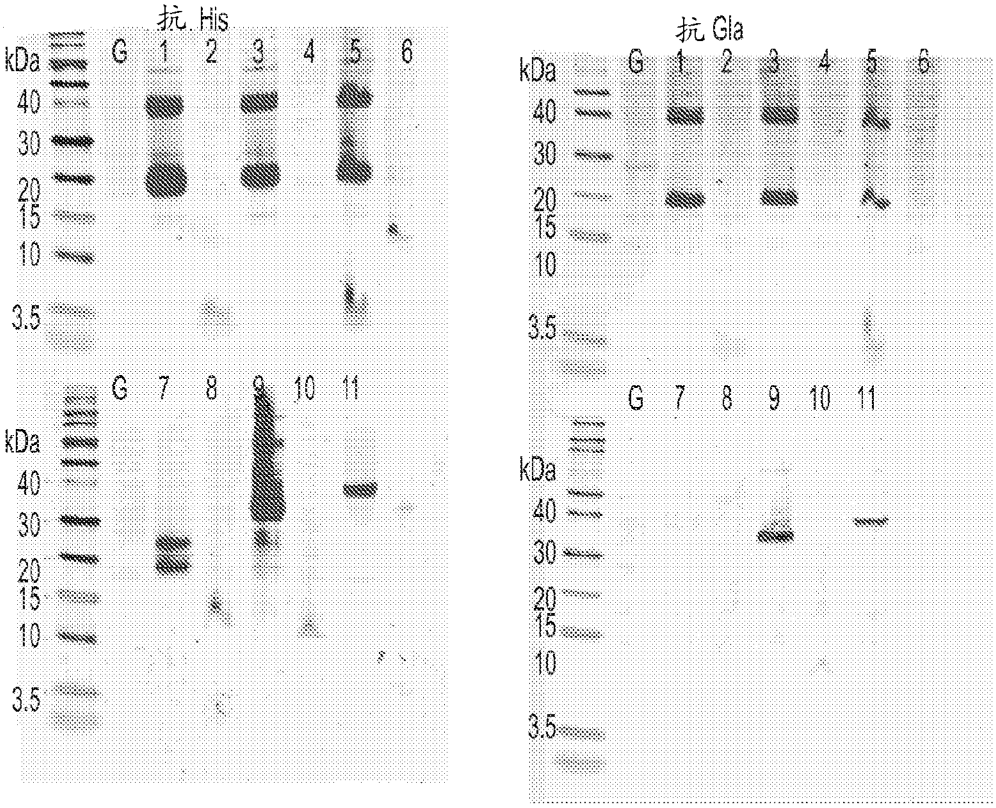
图 1




| 制剂 | 描述 | |
|---|---|---|
| 1 | pEAKfl-CMV B0178 Gla+EGF | 凝血酶原信号序列/前肽 |
| 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 蛋白Z Gla | |
| 7 | pEAKfl-CMV 蛋白Z Gla+EGF | |
| (8) | pEAKfl-CMV 蛋白S Gla | |
| (9) | pEAKfl-CMV 蛋白S Gla+EGF | |
| 10 | pEAKfl-CMV 凝血酶原 Gla | |
| 11 | pEAKfl-CMV 凝血酶原 Gla+KRINGLE | |

图 2

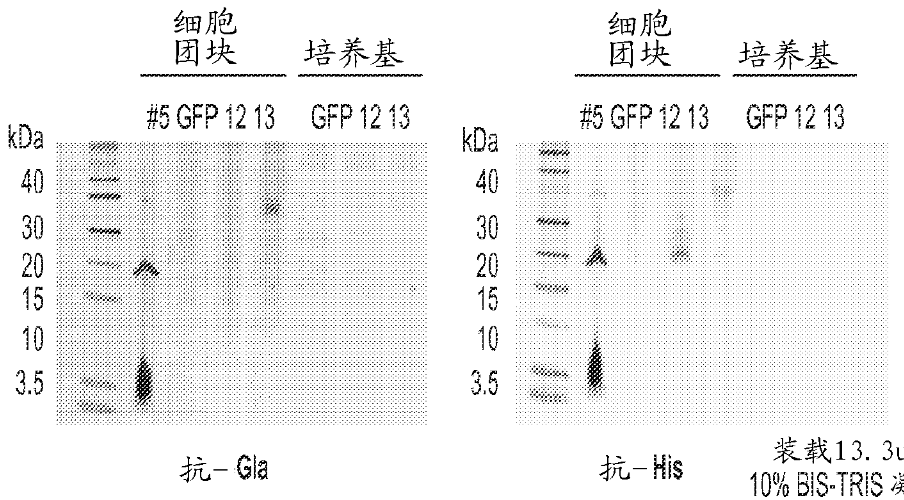
| Gla蛋白质 | 仅Gla结构域 (kDa) | Gla+EGF/KRINGLE (kDa) |
|---|---|---|
| B0178 | 6.5 | 15.4 |
| FVII | 6.5 | 15.4 |
| 蛋白Z | 6.7 | 15.3 |
| 蛋白S | 6.4 | 28 |
| 凝血酶原 | 6.3 | 28.5 |




装载20ul样品（1/100个总细胞团块）

| 制剂 | | 描述 |
|---|---|---|
| 1 | pEAKfl-CMV B0178 Gla+EGF | 凝血酶原信号序列/前肽 |
| 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 蛋白Z Gla | |
| 7 | pEAKfl-CMV 蛋白Z Gla+EGF | |
| 8 | pEAKfl-CMV 蛋白S Gla | |
| 9 | pEAKfl-CMV 蛋白S Gla+EGF | |
| 10 | pEAKfl-CMV 凝血酶原 Gla | |
| 11 | pEAKfl-CMV 凝血酶原 Gla+KRINGLE | |

图 3




装载13.3ul每种样品
10% BIS-TRIS 凝胶，还原条件

| # | 蛋白质 | MW (kDa)* | MW (kDa)** |
|---|---|---|---|
| 5 | FV11 G+E | 15.4 | 19.6 |
| 12 | 蛋白Z G+E | 15.3 | 19.8 |
| 13 | 凝血酶原G+K | 28.5 | 33.2 |

*包括His标签的经处理的形式
**包括His标签的未经处理的形式

#5= Gla蛋白质对照 (FV11 g+e FROM 3/2011 BHK21exp)
GFP=GFP 转染对照
#12=ProteinZ g+e 具有PtdS信号序列和前肽的蛋白
#13=PROTHROMBIN g+k 具有PtdS信号序列和前肽的凝血酶原

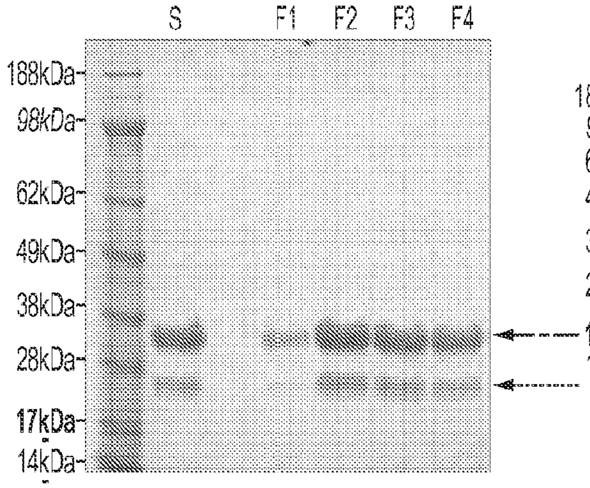
图 4

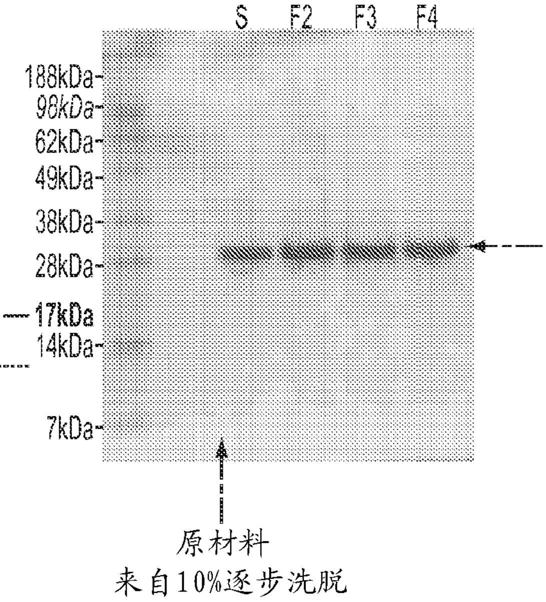
| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 11 | 21 | 31 | 41 | 51 | 61 | 71 |
| ANSLLEETKQ | GNLERECIEE | LCNKEEAREV | FENDPETDYF | YPKYLVCLRS | FQTGLFTAAR | QSTNAYPDLR | SCVNAIPDQC |
| 81 | 91 | 101 | 111 | 121 | 131 | 141 | 151 |
| SPLPCNEDGY | MSCKDGKASF | TCTCKPGWQG | EKCEFDINEC | KDPSNINGGC | SQICDNTPGS | YHCSCKNGFV | MLSNKKDCKD |
| 161 | 171 | 181 | 191 | 201 | 211 | 221 | 231 |
| VDECSLKPSI | CGTAVCKNIP | GDFECECPEG | YRYNLKSKSC | EDIDECSENM | CAQLCVNYPG | GYTCYCDGKK | GFKLAQDQKS |
| 241 | | | | | | | |
| CESRHHHHHH | | | | | | | |

**PTMs:**

γ-羧化: 11Gla
D95: 羟基化
二硫键: 可能14, 报道6
标签: 6xHis

图 5

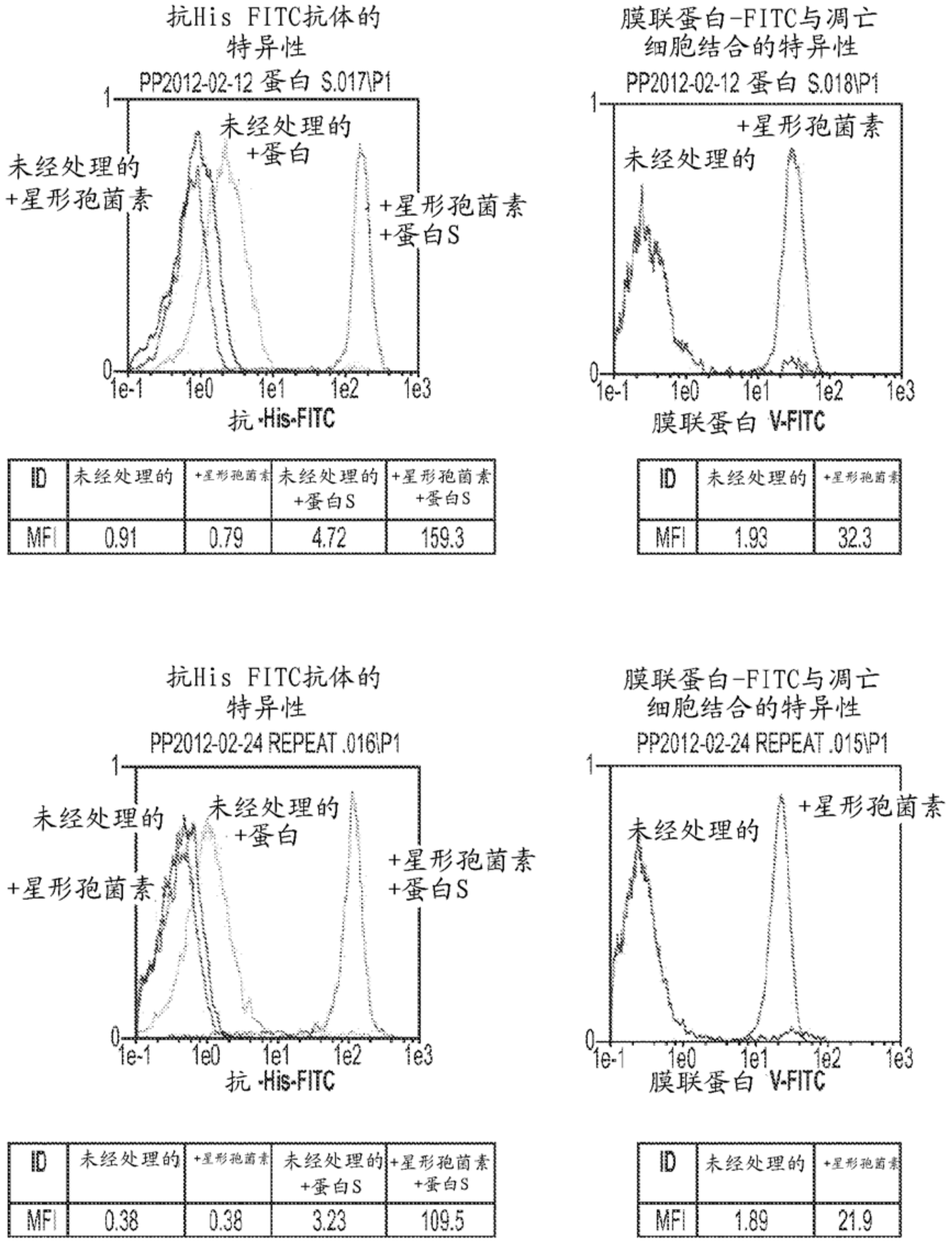



| | F1 | F2 | F3 | F4 |
|---|---|---|---|---|
| OD280nm | 0.11 | 0.64 | 0.57 | 0.37 |
| 蛋白质浓度 | 0.13 | 0.77 | 0.68 | 0.44 |
| 蛋白质 (ug) | 65 | 385 | 340 | 220 |

~0.9 mg 蛋白质,

图 6




| ID | 未经处理的 | +星形孢菌素 | 未经处理的+蛋白S | +星形孢菌素+蛋白S |
|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.91 | 0.79 | 4.72 | 159.3 |

| ID | 未经处理的 | +星形孢菌素 |
|---|---|---|
| MFI | 1.93 | 32.3 |

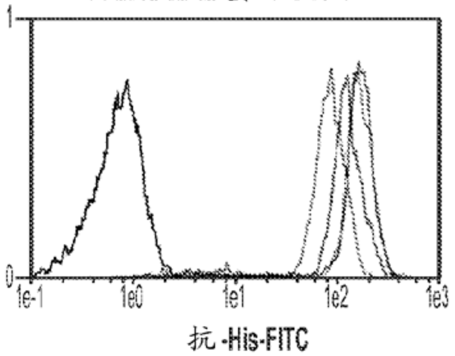
| ID | 未经处理的 | +星形孢菌素 | 未经处理的+蛋白S | +星形孢菌素+蛋白S |
|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.38 | 0.38 | 3.23 | 109.5 |

| ID | 未经处理的 | +星形孢菌素 |
|---|---|---|
| MFI | 1.89 | 21.9 |

图 7

膜联蛋白V竞争掉蛋白S与星形孢菌素处理的Jurkat细胞的结合

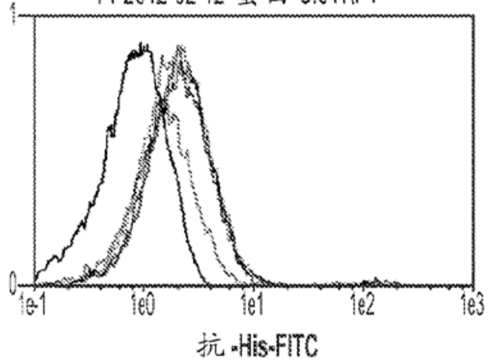
PP2012-02-12 蛋白 S.001\P1




| ID | 无蛋白S | +蛋白S | +蛋白S + 0.2X Ann-V | +蛋白S + 2.0X Ann-V | +蛋白S + 5.0X Ann-V |
|---|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.79 | 159.3 | 163.1 | 119.9 | 82.2 |

蛋白S与未经处理的Jurkat的弱结合也被膜联蛋白V竞争掉

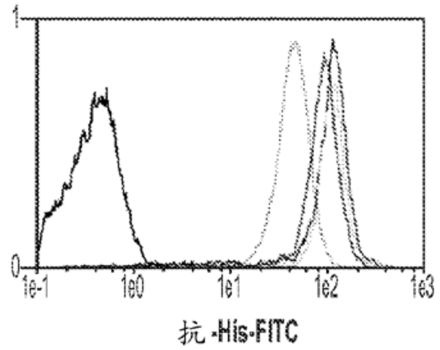
PP2012-02-12 蛋白 S.011\P1




| ID | 无蛋白S | +蛋白S | +蛋白S +0.2X Ann-V | +蛋白S + 2.0X Ann-V | +蛋白S + 5.0X Ann-V |
|---|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.91 | 4.72 | 3.84 | 3.94 | 2.65 |

膜联蛋白V竞争掉蛋白S与星形孢菌素处理的Jurkat细胞的结合

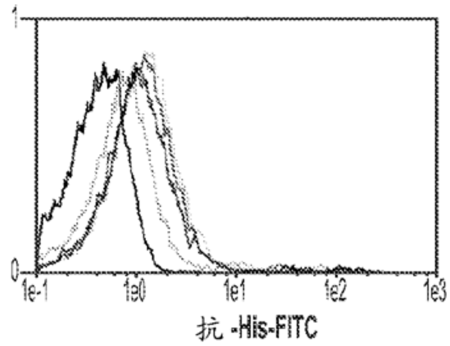
PP2012-02-24 REPEAT .006\P1




| ID | 无蛋白S | +蛋白S | +蛋白S + 0.4X Ann-V | +蛋白S + 4.0X Ann-V | +蛋白S + 10.0X Ann-V |
|---|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.38 | 109.5 | 1'0.3 | 89.8 | 45.3 |

蛋白S与未经处理的Jurkat的弱结合也被膜联蛋白V竞争掉

PP2012-02-24 REPEAT .016\P1




| ID | 无蛋白S | +蛋白S | +蛋白S +0.4X Ann-V | +蛋白S + 4.0X Ann-V | +蛋白S + 10.0X Ann-V |
|---|---|---|---|---|---|
| MFI | 0.38 | 3.23 | 2.52 | 2.86 | 2.32 |

图 8