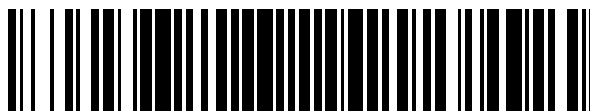


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 236**

51 Int. Cl.:
A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08862378 .0**
96 Fecha de presentación: **15.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231199**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **Marcador fluorescente de muerte celular en el ojo**

30 Prioridad:
14.12.2007 GB 0724412

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
22.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
22.11.2012

73 Titular/es:
**UCL BUSINESS PLC (100.0%)
THE NETWORK BUILDING 97 TOTTENHAM
COURT ROAD
LONDON, W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:
**CORDEIRO, FRANCESCA;
MOSS, STEPHEN y
FITZKE, FREDERICK**

74 Agente/Representante:
DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 391 236 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

Marcador fluorescente de muerte celular en el ojo

La invención se refiere al marcador para el uso en la visualización directa de muerte celular, en particular de la apoptosis en el ojo, especialmente la muerte de células individuales de células del nervio retiniano.

5 Las imágenes de células vivas se utilizan para detectar procesos celulares en ensayos *in vitro* de células cultivadas. Sin embargo, esto no ha sido aplicado previamente a nivel celular *in vivo* en el ojo. La pérdida de células nerviosas es un proceso que se produce en las primeras etapas de ciertos trastornos neurodegenerativos tales como el glaucoma, la retinopatía diabética y la enfermedad de Alzheimer. El glaucoma es la causa principal de ceguera irreversible en todo el mundo, que afecta al 2% de las personas mayores de 40. La enfermedad tiene una morbilidad significativa debido a su naturaleza silenciosa y progresiva, dando como resultado a menudo un retraso en el diagnóstico y el tratamiento. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia que se prevé aumente pasando de afectar de 4 a 12 millones de estadounidenses en los próximos 20 años. Sería útil el ser capaces de valorar la apoptosis de células nerviosas en la retina para evaluar la progresión de enfermedades como el glaucoma, así como enfermedades degenerativas del cerebro.

10 15 Mediante la optimización de un marcador para detectar la muerte celular, de la administración del marcador y del aparato de formación de imágenes, que ha conducido al desarrollo de la tecnología, los inventores han sido capaces de demostrar que la visualización de apoptosis de células individuales en el ojo es posible. Los inventores han superado inconvenientes significativos, incluyendo la autofluorescencia intrínseca de la retina y los efectos negativos, tales como las respuestas inflamatorias al marcador.

20 Según la invención, se proporciona el uso de un marcador de muerte celular, en particular una anexina, conjugada con una etiqueta de longitud de onda optimizada, en particular DY-776, para la identificación de la muerte celular en el ojo. La etiqueta de longitud de onda optimizada desarrollada proporciona una calidad de imagen mejorada mediante la mejora de la relación señal-ruido y al mismo tiempo reduce el efecto tóxico asociado con otras etiquetas.

25 El citado marcador de muerte celular etiquetado puede utilizarse en un método para identificar o controlar la muerte celular en el ojo, que comprende la administración de un marcador de muerte celular etiquetado o conjugado con una etiqueta de longitud de onda optimizada para un sujeto y generar una imagen de la longitud de onda emitida desde el ojo del sujeto usando un dispositivo de imagen optimizado. Esto permite la cuantificación de la muerte celular a nivel de células individuales en el ojo en tiempo real.

30 El término "Muerte celular" se refiere a cualquier proceso incluyendo, por ejemplo, la muerte de una célula por apoptosis y necrosis, durante el cual hay pérdida de integridad de la membrana plasmática. El marcador de muerte celular etiquetado de la invención permite que las células que se están muriendo, por ejemplo por apoptosis, sean identificadas

35 En general el término "Marcador de muerte celular" se refiere a un marcador que permite distinguir a las células vivas de las células que están muriendo o han muerto. Por ejemplo puede ser un compuesto o molécula que se une específicamente a células vivas pero no a células muertas o que se están muriendo, o que se une específicamente a las células muertas o que se están muriendo, pero no a células vivas. Marcadores de muerte celular incluyen, por ejemplo, la familia de proteínas de la anexina. Las anexinas son proteínas que se unen reversiblemente a las membranas celulares en presencia de cationes. Las anexinas pueden ser naturales o recombinantes. Puede ser la proteína completa o puede ser un fragmento funcional, es decir un fragmento o porción de una anexina que se une específicamente a las mismas moléculas que la proteína completa. Además, los derivados funcionales de estas proteínas son marcadores de muerte celular. Se dispone de una gran variedad de anexinas, tales como las descritas en la solicitud de patente EE.UU. N^o 2006/0134001 A. Una anexina preferida es anexina 5, que es bien conocida en el estado de la técnica. Otras anexinas que pueden ser utilizadas como marcadores de muerte celular incluyen las anexinas 11, 2 y 6. Se conocen otros marcadores de muerte celular especialmente de la apoptosis, en el estado de la técnica, entre los que se incluyen por ejemplo el yoduro de propidio y el dominio C2A de la sinaptotagmina [Jung et al., Bioconjing Chem. 2004 Sep-Oct; 15 (5): 983-7]. El marcador de muerte celular utilizado en la presente invención es una anexina

40 45 50 55 En general el término "etiqueta de longitud de onda optimizada" se refiere a una sustancia fluorescente, es decir una sustancia que emite luz en respuesta a la excitación, y que ha sido seleccionado para su uso debido a la alta relación señal-ruido y por lo tanto a una resolución y sensibilidad de imagen mejoradas mientras que se mantiene en el estándar de seguridad de exposición de luz para evitar efectos fototóxicos. Las longitudes de onda optimizadas incluyen longitudes de onda infrarroja e infrarroja cercana. Estas etiquetas son bien conocidos en la técnica e incluyen colorantes tales como IRDye 700, IRDye 800, Dy-776 y D-781. También se incluyen las sustancias fluorescentes formadas mediante la conjugación de tales colorantes con otras moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Es preferible que las longitudes de onda optimizadas causen poca o ninguna inflamación al ser administradas. La etiqueta de longitud de onda optimizada de esta invención es Dy-776, ya que se ha descubierto que causa poca o ninguna inflamación en el ojo, mientras que otros colorantes pueden causar inflamación. Los colorantes optimizados también demuestran preferiblemente una estrecha correlación entre el nivel de fluorescencia

que puede ser detectado histológicamente y el que puede ser detectado *in vivo*. Es preferible fundamentalmente que exista una correlación sustancial, especialmente una correlación 1:1 entre la fluorescencia histológica e *in vivo*.

5 El marcador de muerte celular etiquetado puede prepararse utilizando técnicas estándar para conjugar una etiqueta de longitud de onda optimizada con un compuesto marcador. Tales etiquetas pueden ser obtenidos de fuentes bien conocidas tales como Dyomics. Las técnicas apropiadas para conjugar la etiqueta con el marcador son conocidas en la técnica y puede ser proporcionadas por el fabricante de la etiqueta.

10 Con el fin de generar una imagen de la muerte celular, el marcador etiquetado se administra al sujeto, mediante, por ejemplo, inyección intravenosa. El área del objeto a visualizar, el ojo, se coloca dentro del campo de detección de un escáner médico. Después se escanean las longitudes de onda de emisión del marcador etiquetado y se construye una imagen de manera que cree un mapa de las zonas de muerte celular. La generación de la imagen se puede repetir permitiendo la monitorización de la muerte celular durante un periodo de tiempo. Se puede monitorizar en tiempo real. En especial se prefiere monitorizar la muerte celular de las células de la retina, especialmente de las células nerviosas de la retina. Las células nerviosas de la retina incluyen las células ganglionares, bipolares, amacrinas, horizontales y las células fotorreceptoras de la retina.

15 El marcador de muerte celular etiquetado se puede administrar localmente o sistémicamente. Los métodos para administrar el marcador son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la inyección intravenosa. Aunque los marcadores de muerte celular etiquetados se hayan administrado por vía intravenosa, los inventores han descubierto que sorprendentemente cruzan la barrera sanguínea de la retina permitiendo la visualización en el ojo. Los trabajos anteriores demostraron que el colorante Alexa Fluor 488 nm no se podía visualizar *in vivo* después de administración intravenosa, a pesar de que se demostró histológicamente su capacidad para cruzar la barrera sanguínea de la retina. Como alternativa, aunque menos preferente, el marcador de muerte celular etiquetado puede administrarse por vía tópica u ocular.

20 También se proporciona una composición farmacéutica, especialmente una composición de diagnóstico, que comprende un marcador de muerte celular etiquetado, en particular una anexina, con el marcador de longitud de onda optimizada Dy-776, estando la composición dispuesta de manera que sea adecuada para la administración intravenosa. Como alternativa, aunque menos preferida, la composición puede ser adecuada para la administración tópica u ocular.

La invención se describirá ahora en detalle, solamente a modo de ejemplo, haciendo referencia a las figuras, en las cuales:

30 La Figura 1 muestra la correlación entre el escáner *in vivo* y la apoptosis histológica de las células ganglionares de la retina cuando se utilizan fluoróforos que no están afectados por la autofluorescencia de la retina, lo que permite por ejemplo, la representación de los recuentos de apoptosis de células individuales *in vivo* que se corresponde exactamente al observado en el patrón histológico de referencia.

35 La Figura 1a muestra una comparativa del escáner *in vivo* con la apoptosis histológica de la retina en un modelo animal de glaucoma de 3 semanas. La superposición de la microscopía confocal correspondiente (histología) sobre la imagen *in vivo* muestra más células apoptóticas etiquetadas con anexina-488 intravítrea (puntos grises en superposición) en la imagen histológica que en la imagen *in vivo* (manchas blancas en la imagen de fondo).

40 La Figura 1b muestra imágenes de las áreas de la retina correspondientes utilizando histología, análisis *in vivo* y *ex vivo* de ojo de rata tratado con estaurosporina utilizando anexina Dy-776 intravítrea (manchas etiquetadas de rojo). Se ve claramente una correlación 1:1 entre los tres métodos.

45 Figura 2A y 2B muestran imágenes DARC (Detección de apoptosis de células de la retina) de la retina que demuestran que la anexina 488 (125 ug) intravenosa no se puede visualizar *in vivo*, aunque a través de las imágenes de histología de SSP (a) y glaucoma (b) los animales revelasen apoptosis - demostrando que el marcador había cruzado la barrera de sangre de la retina. Los inventores consideraron el escáner *in vivo* no era posible debido al alto nivel de autofluorescencia de fondo encontrado a esta longitud de onda no optimizada.

La Figura 2c muestra que a las longitudes de onda optimizadas, por ejemplo, infrarroja, la anexina-DY 776 (125 ug) intravenosa era capaz de mostrar SSP inducida, apoptosis de una célula aislada de la retina *in vivo*, e histológicamente.

50 La Figura 3 muestra imágenes reflectantes y DARC de retinas tratadas solo con DY-776 (A), con anexina-DY-776 (B) y con anexina IRDye 800 (c) demostrando que la tortuosidad vascular de la retina *in vivo* puede ser vista usando IRDye 800 pero no con Dy-776 (ya sea por separado o con inyección reiterada).

La Figura 4 es una micrografía electrónica de barrido de un ojo tratado con anexina etiquetada con IRDye 800 que muestra la presencia de células inflamatorias en la base del vítreo. Se observan varios hialocitos pero también algunas células inflamatorias en el vítreo.

- La Figura 5 muestra los resultados de una evaluación con DARC (Detección de apoptosis de células de la retina) de la neurodegeneración diabética en modelos transgénicos. Se puede ver apoptosis de células ganglionares de la retina en la retina diabética (a), pero no en el control de tipo silvestre agrupado por edades (b).
- 5 La Figura 6 muestra la metodología para la técnica de visualización de los marcadores de muerte celular de longitud de onda optimizada en el ojo. En resumen, se administra una inyección intravenosa (ocular, tópica, o de otro modo) con el colorante de longitud de onda optimizada, después de la cual, transcurrido un tiempo óptimo, se consigue la visualización de la retina tras la excitación con una luz láser de longitud de onda optimizada y la detección, con filtros correctos a las longitudes de onda optimizadas.
- 10 La Figura 7 muestra imágenes de áreas correspondientes del mismo ojo de la rata histológicamente e *in vivo* después de las inyecciones intravítreas con estaurosporina (7,14 nanomoles ó 0,2 mg/ml) y anexina 488. Existe una discrepancia sorprendente entre el número de manchas positivas (anexina 488) escaneadas *in vivo* en comparación con la histología, viéndose muchas más histológicamente.
- 15 La Figura 8 es un gráfico que muestra el promedio del recuento de manchas positivas histológicamente de anexina 488 administrada de forma intravítrea en comparación con las manchas positivas de apoptosis RGC vistas en las imágenes *in vivo* correspondientes tomadas para 3 ojos después de tratamiento con SSP. Hay un recuento significativamente más alto en la imagen histológica.
- La Figura 9 muestra los resultados de la administración intravenosa de anexina 488 (0,2 ml 25ug/ml) en un ojo tratado con SSP. El ojo mostró manchas histológicamente positivas de anexina 488 pero ninguna *in vivo*.
- 20 La Figura 10 muestra los resultados de la administración intravenosa de anexina 488. En particular, hubo recuentos medios similares de manchas histológicamente positivas de anexina 488 comparados con los de anexina intravítrea 488, pero se visualizaron muy pocos *in vivo*.
- La figura 11 muestra en imágenes *in vivo* de DARC del mismo ojo utilizando anexina Alexa Fluor 555 al inicio del estudio y 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas que muestran apoptosis se ven *in vivo* - pero muy débilmente.
- 25 La Figura 12 muestra la estructura molecular de tres de los colorantes infrarrojos utilizados.
- La Figura 13 muestra los resultados de una evaluación de etiquetas fluorescentes. De todas las etiquetas fluorescentes evaluadas, el colorante que mejor se acopló con anexina 5 fue Dy-776. Se mostró una perfecta correlación (1:1) con escaneado *in vivo* e histología con anexina Dy-776.
- 30 La Figura 14 muestra los resultados de la administración de anexina etiquetada con IRDye 800. La administración de anexina IRDye 800 a un modelo de glaucoma mostró un aumento del etiquetado de apoptosis de las células de la retina *in vivo*. Hubo sin embargo, todavía un 20% de reducción en el nivel de etiquetado *in vivo* en comparación con el marcaje de histología.
- La Figura 15 muestra las imágenes reflectantes de ojos de rata tratados con la misma dosis de anexina 5 conjugada con diferentes colorantes infrarrojos fluorescentes 5 días después de la administración. Sólo el ojo tratado con anexina 5 Dy-776 no mostró tortuosidad de vasos retinianos en ese momento.
- 35 La Figura 16 es un gráfico que muestra la diferencia observada en el nivel de la tortuosidad de la retina calificada por observadores ciegos mirando imágenes *in vivo*. Hubo un aumento significativo en la tortuosidad de los vasos en los ojos a los que se suministro IRDye 800 y DY-781 intravítrea en comparación con DY-776 y el control. Este hecho sugiere totalmente inflamación.
- 40 La figura 17 es una imagen de microscopía electrónica de barrido de un macrófago localizado en el vítreo de un ojo con anexina 5 IRDye-800 lo que confirma la presencia de inflamación causada por el colorante.
- La Figura 18 muestra imágenes de DARC *in vivo* del mismo ojo utilizando anexina 11 Dy-776 al inicio del estudio y después de 2 horas de administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas demuestran claramente que la anexina 11 puede ser utilizada para detectar apoptosis *in vivo*.
- 45 La Figura 19 contiene imágenes de un ojo de rata tratado con estaurosporina (SSP) y al que después se administra anexina 488 y yoduro de propidio (PI). Se muestran diferentes fases de muerte RGC inducida con SSP en la foto fija de la misma zona del ojo seguida durante varias horas. Se puede ver la apoptosis de células aisladas en las fases temprana (sólo tinción positiva con anexina 488) y tardía (tinción positiva con anexina 488 y con PI) apoptóticas y necróticas (tinción con PI solamente) 2,0 (a), 2,5 (b), y 3,0 (c) horas después del tratamiento con SSP. (d) Usando esta técnica, es posible seguir los cambios en las mismas células (señaladas con flechas e identificadas como Puntos 1 y 2) a lo largo del tiempo, experimentando las etapas secuenciales de la muerte celular apoptótica. Ambas células muestran que el nivel máximo de anexina 5 etiquetada se produce antes del de PI, y justifica la reivindicación de que la optimización de la longitud de onda de los marcadores puede conducir a la visualización de la muerte celular en el ojo.
- 50

La Figura 20 muestra una comparativa entre el etiquetado MC540 *in vivo* de ojos tratados con disolución salina y SSP y lo compara con anexina DY-776 etiquetada. Como se puede ver, la anexina DY-776 es capaz de etiquetar las células aisladas que son claramente visibles individualmente en las imágenes *in vivo*. El nivel de apoptosis RGC es mucho mayor después de la administración de SSP en la anexina-DY-776. En comparación, debido a que los MC 540 etiquetan las membranas completas, se detecta una señal fluorescente difusa, por lo que es imposible identificar células individuales, aunque la imagen de MC 540 después de SSP tiene un nivel de fluorescencia claramente superior al control.

La Figura 21 es un diagrama que muestra capas de la retina. Las células nerviosas de la retina son: células fotorreceptoras, bipolares, horizontales, amacrinas, y células ganglionares.

La figura 22 muestra una sección histológica de la retina de un modelo de isquemia de ratón. Se suministro Anx-F intravítrea antes de que el animal fuese sacrificado. Las flechas muestran cuatro células con tinción positiva para Anx-F en diferentes capas de la retina - confirmando la presencia de apoptosis en la capa nuclear interior (INL), nuclear externa (ONL) y en las capas fotorreceptoras (PL).

Ejemplos

15 Conjugación de Dy-776 con anexina 5

La anexina 5 recombinante (5 mg en 1 ml de tampón isotónico) expresada en bacterias se dializa frente al 'tampón de etiquetado' durante tres horas con dos cambios (250 ml cada vez). El tampón de etiquetado se produce disolviendo 21 g (250 mmol) de bicarbonato de sodio en 400 ml de agua destilada. Se añade 1 g de azida de sodio (0,2 por ciento). El pH se ajusta con una disolución acuosa concentrada de hidróxido de sodio a pH 9,0. Antes de usar, el tampón se diluye por adición de 9 partes de agua a una parte de la disolución estándar concentrada (v / v). La proteína anexina 5 está ahora lista para la reacción de etiquetado. La proporción colorante proteína se mantiene constante para cada reacción de etiquetado. Por lo tanto, se utilizan 0,5 mg de éster D776-NHS para etiquetar 1 mg de anexina 5. Esto proporciona una relación molar entre el colorante y la proteína anexina 5 de aproximadamente 500. El éster NHS se disuelve en dimetilformamida mediante agitación tipo vórtex, y se inicia la reacción mediante la adición del colorante a la proteína anexina 5 en el tampón de etiquetado. La concentración final de anexina 5 en la reacción de etiquetado debería ser de 5 mg / ml. El etiquetado se lleva a cabo en un tubo Eppendorf dispuesto en un agitador durante de dos horas.

Concluido el periodo de reacción la disolución coloreada de etiquetado se pipetea cuidadosamente en una columna de Sephadex G-25 de 5 ó 10 ml y se deja que penetre en el gel. A continuación el conjugado se eluye añadiendo lentamente 100 mM de una disolución amortiguadora PBS de pH 7,4 gota a gota sobre la columna. La proteína etiquetada se adelanta como una banda relativamente definida, mientras que el colorante libre corre lentamente por detrás. Una vez que el conjugado de anexina 5 llega a la parte inferior de la columna se recoge en un tubo Eppendorf y estando lista para su uso inmediato.

Métodos de imagen

Las imágenes podrían llevarse a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica, tales como los descritos a continuación:

Todas las imágenes *in vivo* se llevaron a cabo con la técnica DARC (Detección de apoptosis de células de la retina) con un cSLO modificado (oftalmoscopio láser confocal de barrido) a 790 nm (Heidelberg Retina Angiograph 2, Heidelberg Engineering, Dossenheim, Alemania)^{1, 2, 3}. Se utilizaron lentes estándar (15° x 15° a 30° x 30°) y lentes de Gran Angular (55°- todos los valores de grados calibrados para el ojo humano). La reflectancia y las imágenes fluorescentes correspondientes, con diferentes ajustes de enfoque fueron tomadas de la retina de rata. Para mejorar la relación señal-ruido y para mejorar el contraste de la imagen, se calculó la imagen promedio de una serie de imágenes individuales (hasta 100) tras la corrección de los movimientos del ojo.

Optimización de fluorescencia

Los inventores descubrieron que la presencia de señales fluorescentes intrínsecas de la retina significaba que los marcadores de muerte celular etiquetados con ciertas etiquetas fluorescentes no podían ser tomadas adecuadamente. Los inventores habían usado previamente una anexina etiquetada con fluorescencia (anexina 488) para captar la imagen de la apoptosis de las células ganglionares de la retina. Los inventores han encontrado que, de manera sorprendente, cuando se administra sistémicamente, la autofluorescencia inherente a la retina interfiere con la señal en tal grado que no se pueden obtener resultados útiles.

Para evitar la interferencia de la autofluorescencia de la retina, los inventores investigaron otros fluoróforos que incluyen fluoróforos del infrarrojo cercano e infrarrojo, tales como Licor CW 800, Dy-776 y D-781. Utilizando estas etiquetas, los inventores fueron capaces de visualizar apoptosis de células individuales en el ojo vivo, que se correspondían exactamente con la localización histológica. Esto se ilustra en las Figuras 1, 2 y 3.

En la evaluación de los tres colorantes, los inventores han encontrado que tanto Licor CW 800 como D-781 provocaron tortuosidad vascular e inflamación vítrea. Dy-776 no causó inflamación ni cambios vasculares. Esto se muestra en las figuras 3 y 4.

Evaluación de la neurodegeneración diabética en modelos transgénicos.

5 Se llevó a cabo una evaluación con DARC de la neurodegeneración diabética en modelos transgénicos usando las técnicas descritas en la presente memoria. Como se ve en la figura 5, el animal diabético (a) muestra significativamente más apoptosis de células ganglionares de la retina que el control de tipo silvestre agrupado por edades (b).

Optimización de la longitud de onda de anexina 5 marcada con fluorescencia (ANX-F)

10 **In vivo v Discrepancia de Histología en células etiquetadas**

a) Administración intravítrea

Los inventores habían utilizado previamente una anexina 5 etiquetada con fluorescencia (anexina 488) que se administraba por vía intravítrea en el ojo para tomar imágenes de la apoptosis de las células ganglionares de la retina. anexina 5 etiquetada con Alexa Fluor 488, o anexina 5 etiquetada con otro marcador fluorescente. Se evaluaron:

- 15 > Anexina Alexa Harina 532 excitación / emisión máxima de 532/553
- > Anexina Alexa Fluor 555 excitación / emisión máxima de 555/568
- > Anexina Dy-776 de excitación / emisión máxima de 771/793
- > Anexina Dy-781 de excitación / emisión máxima de 783/800
- 20 > Anexina Licor IRDye 800 excitación / emisión máxima de 774/789

Se menciona la anexina etiquetada con un colorante distinto a Dy-776 solo a efectos comparativos.

Los inventores también encontraron que el número de moléculas de colorante conjugado por molécula de anexina era importante. Los inventores sostienen que conseguir un número bajo de moléculas de colorante (menos de 12 y preferiblemente menos de 5) por molécula de anexina mejora la fluorescencia nativa del conjugado mientras que conserva su afinidad de unión a las células apoptóticas.

Los inventores también encontraron que era importante la forma en que la molécula de colorante se conjugaba con la molécula de anexina. Los inventores descubrieron que la molécula de anexina etiquetada con el colorante en el extremo N-terminal tenía como resultado una relación señal-a-ruido mejorada, y cuando se administra por vía intravenosa daba como resultado una absorción menor en los órganos principales, por ejemplo, en el hígado y el riñón. Además, el etiquetado de restos cisteína en lugar de restos lisina en la molécula de anexina daba como resultado un menor ruido.

Las imágenes de la figura 11 muestran el DARC *in vivo* utilizando anexina Alexa Fluor 555 en un mismo ojo al inicio del estudio y después de 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Se aprecian las manchas blancas que muestran apoptosis *in vivo* - pero muy débilmente. En comparación con los colorantes infrarrojos (ver más abajo), tanto anexina Alexa Fluor 555 como anexina Alexa Fluor 532 claramente no son óptimas para imágenes *in vivo* con DARC.

Sorprendentemente, de todos los marcadores fluorescentes evaluados, el colorante que mejor se acoplaba con la anexina 5 era Dy-776. Mostró una correlación perfecta (1:1) con anexina Dy-776 en las imágenes *in vivo* e histología, como se ve a continuación.

40 En el análisis estadístico comparando histología con *in vivo*, utilizando la distancia de separación entre los puntos, la separación promedio fue de 19,756 píxeles en las imágenes superiores, en comparación con un modelo de ruido aleatorio (30.986 píxeles), y la probabilidad de que esto ocurra por casualidad es de 0,001305 por ciento. Un resultado similar se obtuvo con los puntos individuales coincidentes - con $p = 0.001597$ por ciento - es decir, es muy poco probable que la coincidencia de puntos entre histología y las imágenes *in vivo* pudiera haber sucedido por casualidad. Esto se puede comparar con otros colorantes infrarrojos de anexina, tales como la IRDye 800 (Licor) que

45 mostró un 20% menos de manchas *in vivo*.

El uso de anexina Dy-781 dió resultados similares, pero como en el caso de la anexina IRDye 800, la imagen a los 5 días después de que se administrase la coloración reveló tortuosidad vascular retiniana - sugiriendo inflamación.

Las imágenes de las figuras 13, 14 y 15 muestran ojos de rata tratados con la misma dosis de anexina 5 conjugada con diferentes colorantes infrarrojos fluorescentes 5 días después de la administración. Únicamente el ojo tratado con anexina 5 Dy-776 no mostró anomalías en los vasos retinianos.

5 El gráfico de la figura 16 muestra la diferencia observada a nivel de la tortuosidad retiniana, tal como fue clasificada por los observadores ciegos mirando imágenes *in vivo*. Hubo un aumento significativo en la tortuosidad vascular en los ojos a los que se había administrado IRDye 800 y DY-781 intravítrea en comparación con DY-776 y el control. Este hecho explica totalmente la inflamación, que se investigó posteriormente en conjunción con histología.

La Figura 17 es una imagen de microscopía electrónica de barrido de un macrófago observado en el vítreo de un ojo con anexina 5 IRDye 800, lo que confirma la presencia de la inflamación causada por el colorante.

10 **Uso de otras anexinas como marcadores**

Hemos demostrado que otros marcadores de anexina tales como anexina 11, anexina 2 y anexina 6, las cuales tienen todas afinidad por fosfatidilserina expuesta, también se unen a células apoptóticas de la retina.

15 Las imágenes de la figura 18 muestran imágenes de DARC *in vivo* utilizando anexina 11 Dy-776 en un mismo ojo al inicio del estudio y después de 2 horas después de administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas demuestran claramente que la anexina 11 puede ser utilizada para detectar la apoptosis *in vivo*.

Uso de otros marcadores de la muerte celular (es decir, no anexinas) (solamente a efectos comparativos)

Yoduro de propidio

20 A continuación los inventores evaluaron otros marcadores de muerte celular. En primer lugar, el yoduro de propidio (PI) que identifica las células necróticas mediante el etiquetado de las células con membranas rotas y etiquetando con fluorescencia su ADN y ARN. PI tiene un máximo de excitación y de emisión de 532 nm y 649 nm, respectivamente. Las imágenes de la figura 19 muestran una comparativa entre PI *in vivo* que etiqueta células necróticas y anexina 488 que etiqueta células apoptóticas *in vivo* en la retina.

25 (a-c) Las fotografías fijas tomadas de un vídeo de muerte RGC inducida por estaurosporina (SSP), muestran células individuales en las fases temprana (verde, solo tinción positiva de anexina 488) y tardía (amarillo, tinción positiva de anexina 488 y PI) fases apoptóticas y necróticas (rojo, sólo tinción de PI) 2,0 (a), 2,5 (b), y 3,0 (c) horas después del tratamiento SSP. (d) Usando esta técnica es posible seguir los cambios de las mismas células (marcadas con flechas e identificadas como Puntos 1 y 2) a lo largo del tiempo, experimentando las etapas secuenciales de la muerte apoptótica celular. Ambas células muestran que el nivel máximo de etiquetado de anexina 5 se produce antes que el de PI, y confirma la reivindicación de que la optimización de la longitud de onda de los marcadores puede conducir a la visualización de la muerte celular en el ojo.

30

Los inventores también encontraron que es posible la visualización simultánea de múltiples marcadores de muerte celular, tales como la anexina V y el yoduro de propidio siempre y cuando la longitud de onda de cada marcador particular haya sido optimizada.

Merocianina 540 (MC540)

35 La merocianina 540 es un colorante que identifica las células apoptóticas en virtud del hecho de unirse a la membrana externa de las células y de fluorescer en función del grado de desorganización de las membranas, lo cual sucede al comienzo de la apoptosis. MC450 tiene máximos de excitación y emisión de 488 nm y 575 nm, respectivamente. Las imágenes de la figura 20 muestran una comparativa entre el etiquetado *in vivo* con MC540 de ojos tratados con disolución salina y SSP y el etiquetado con anexina 776.

40 Como se puede ver, la anexina 776 es capaz de etiquetar las células aisladas que son claramente visibles individualmente en las imágenes *in vivo* mostradas anteriormente. El nivel de apoptosis RGC es mucho mayor después de administración del SSP. En comparación, debido a que MC 540 etiqueta las membranas completas, se detecta una señal fluorescente difusa, por lo que es imposible identificar células aisladas, aunque la imagen de MC540 después de SSP tiene un nivel de fluorescencia claramente superior que el estándar de base.

45 **Etiquetado de células apoptóticas en toda la retina**

Los inventores han demostrado previamente que Anx-F puede ser utilizada para identificar la apoptosis RGC. Más recientemente, utilizando la misma técnica, se ha demostrado que es posible visualizar la apoptosis de células bipolares. Actualmente se ha demostrado, que Anx-F cuando se administra por vía intravítrea, también puede teñir otras células de la retina, como se ve en la figura 21.

50 La sección histológica de la figura 22 se obtiene de un ojo de ratón que ha padecido isquemia inducida experimentalmente. Se le administró Anx-F intravítrea antes de que el animal fuese sacrificado. Las flechas

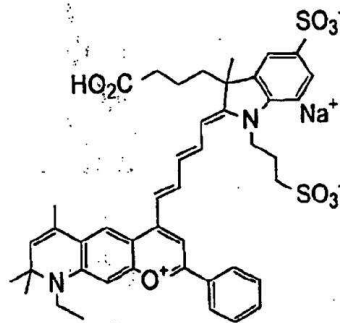
muestran cuatro células con tinción positiva para Anx-F en diferentes capas de la retina - confirmando la presencia de apoptosis en las capas nuclear interior (INL), nuclear externa (ONL) y en las capas fotorreceptoras (PL).

Referencias

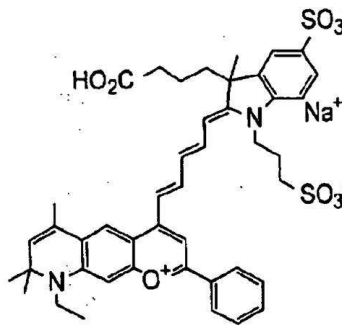
- 5
1. Cordeiro MF, Guo L, Luong V, et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 13352-13356 .
 2. Guo L, Salt TE, Luong V, et al. Targeting amyloid- β in glaucoma treatment. Proc Natl Acad Sci USA 2007
 3. Maass A, Lundt von Leithner P, Luong V, et al. Assessment of rat and mouse RGC apoptosis imaging in-vivo with different scanning laser ophthalmoscopes. Curr Eye Res 2007 ;1. [aceptado para su publicación]

REIVINDICACIONES

1. Un marcador de muerte celular etiquetado con una etiqueta que tiene una longitud de onda dentro del espectro infrarrojo, para uso en la identificación de muerte celular en el ojo, donde el marcador de muerte celular es una anexina y la etiqueta es DY-776 que tiene la siguiente estructura:



- 5
2. El marcador de muerte celular según la reivindicación 1, donde el marcador de muerte celular es anexina 5, 11, 2 ó 6.
3. Un marcador de muerte celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el marcador está destinado a la identificación de la muerte celular de las células de la retina, tal como la muerte de las células del nervio retiniano.
- 10
4. Un marcador de muerte celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el marcador está destinado a la identificación de la muerte celular de células individuales.
5. Un marcador de muerte celular según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el marcador está destinado al diagnóstico del glaucoma, de la retinopatía diabética o de la enfermedad de Alzheimer.
- 15
6. Una composición farmacéutica que comprende una anexina etiquetada con DY-776, donde DY-776 tiene la estructura siguiente



y donde la composición es adecuada para administración intravenosa, ocular o tópica



FIG. 1A

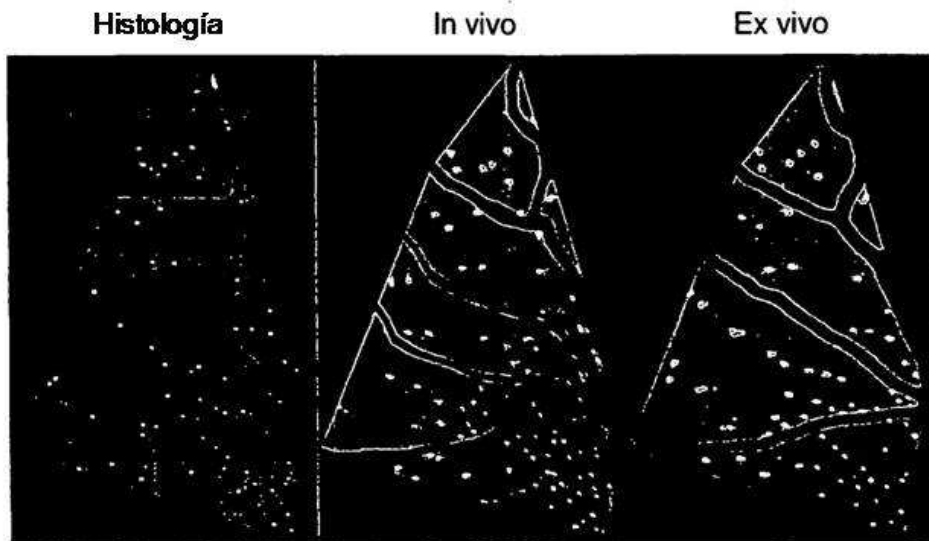


FIG. 1B

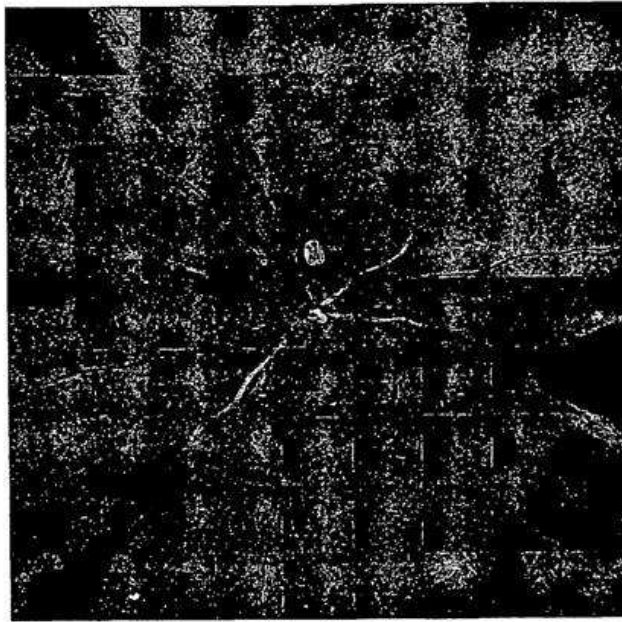


FIG. 2A

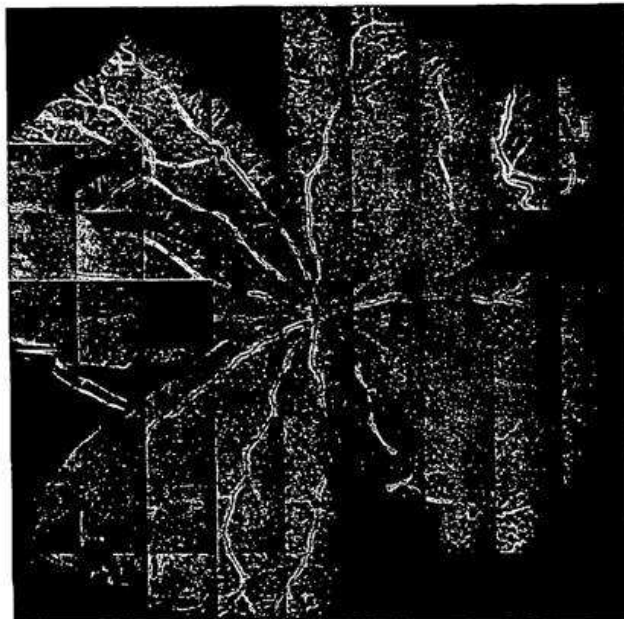


FIG. 2B

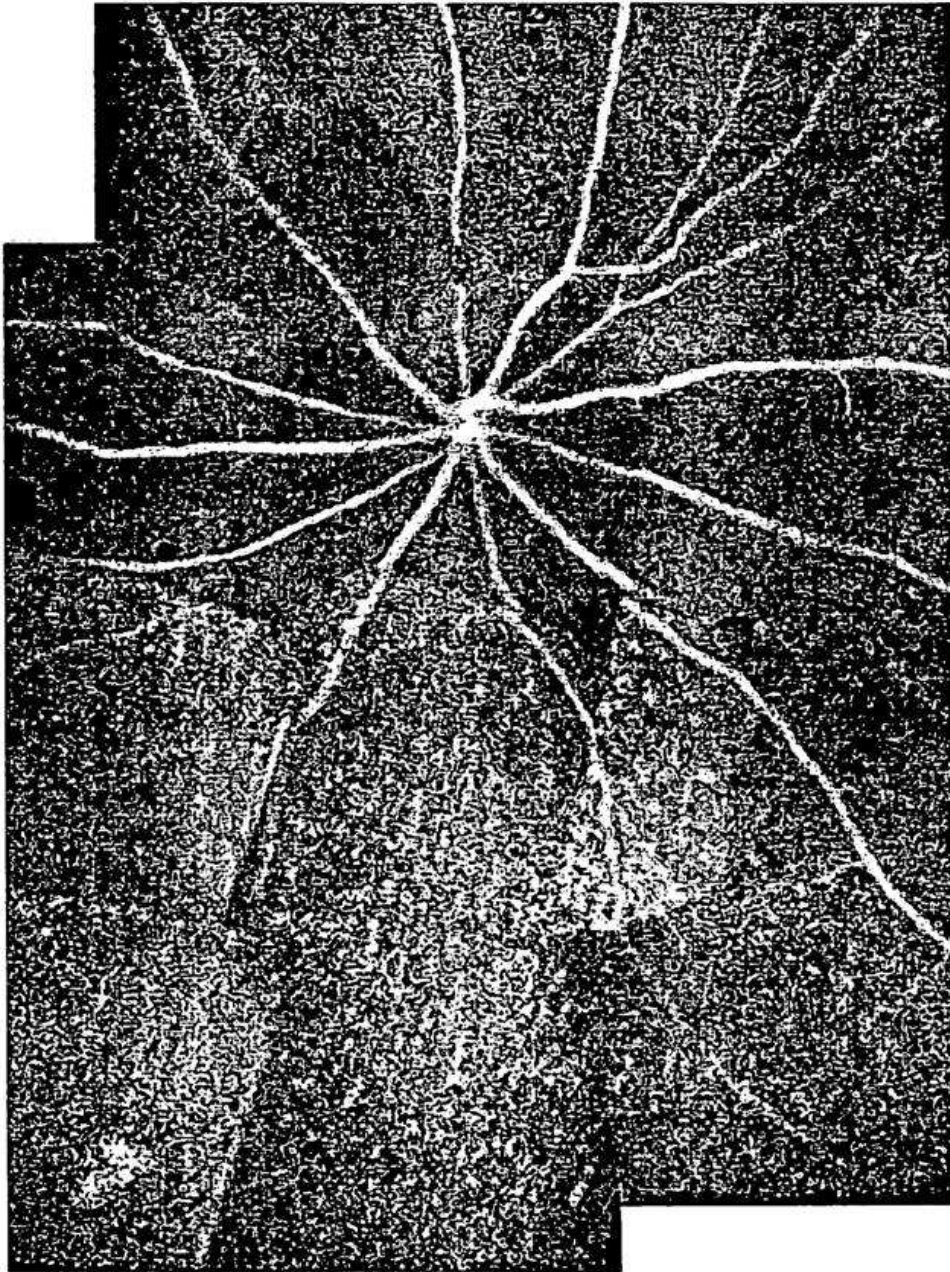


FIG. 2C

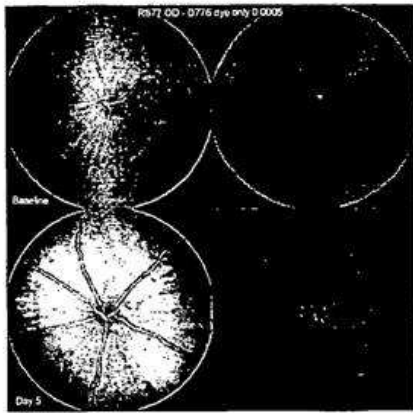


FIG. 3A

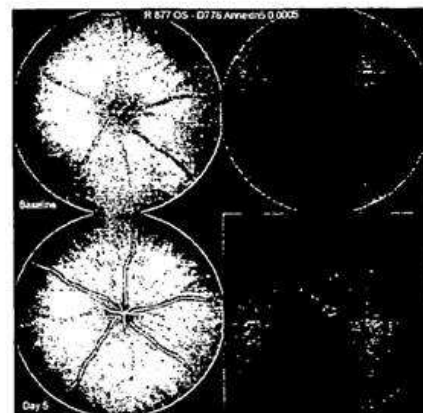


FIG. 3B

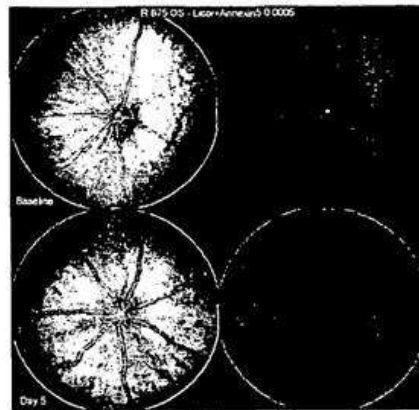


FIG. 3C

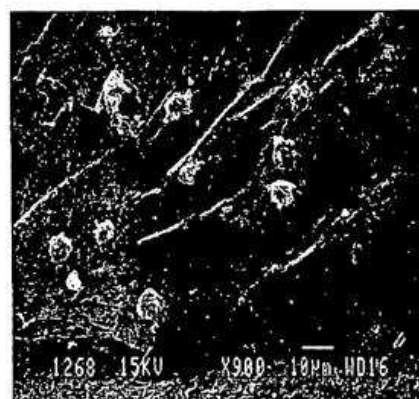


FIG. 4

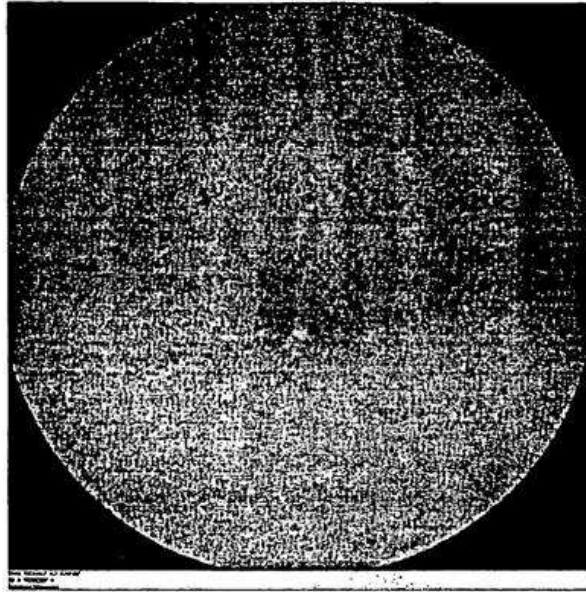


FIG. 5A

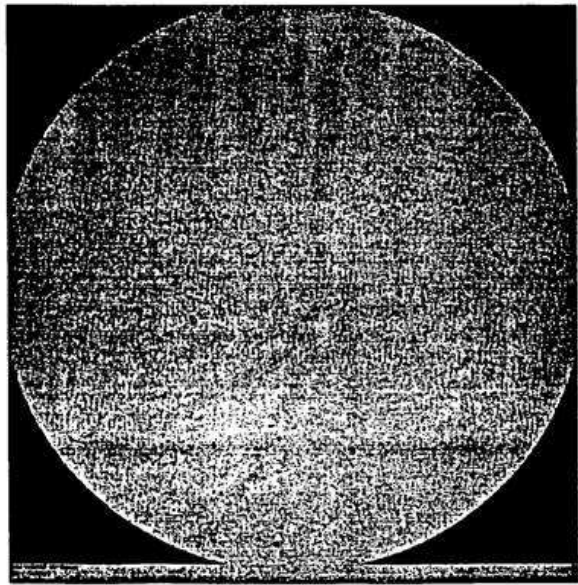


FIG. 5B

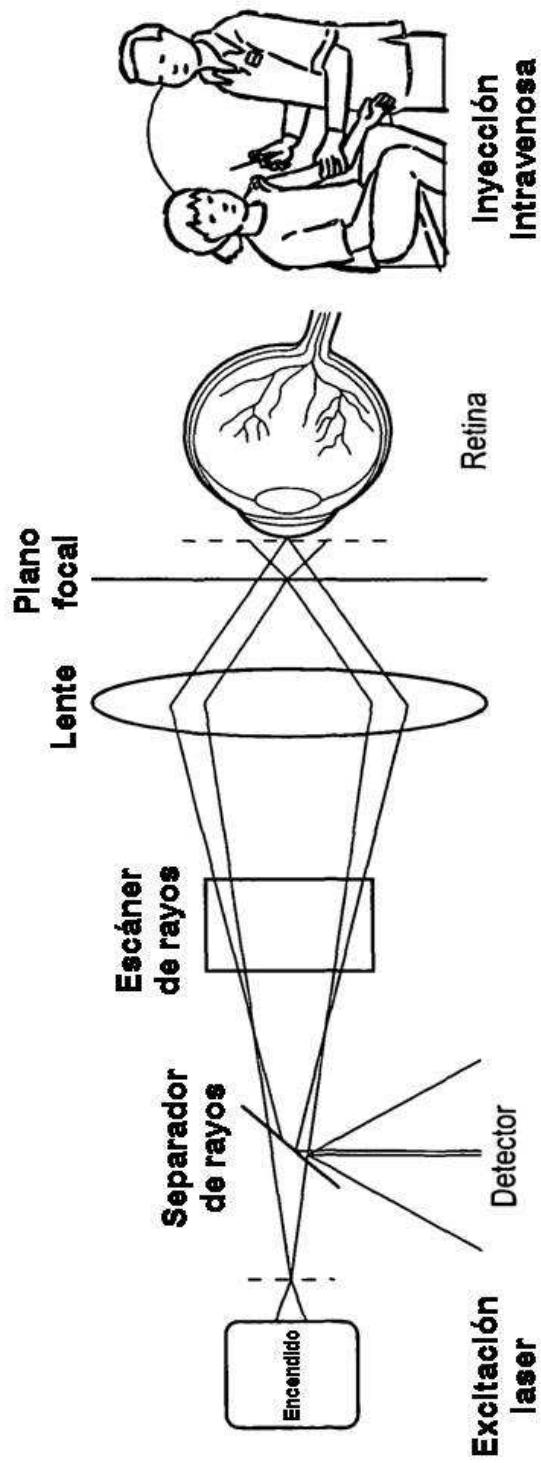


FIG. 6

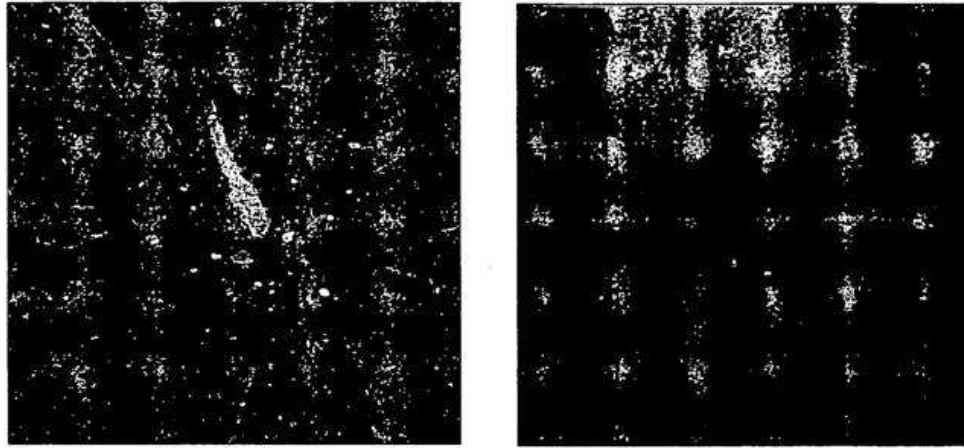


Imagen histología Anexina488 intravítrea Imagen in vivo

FIG. 7

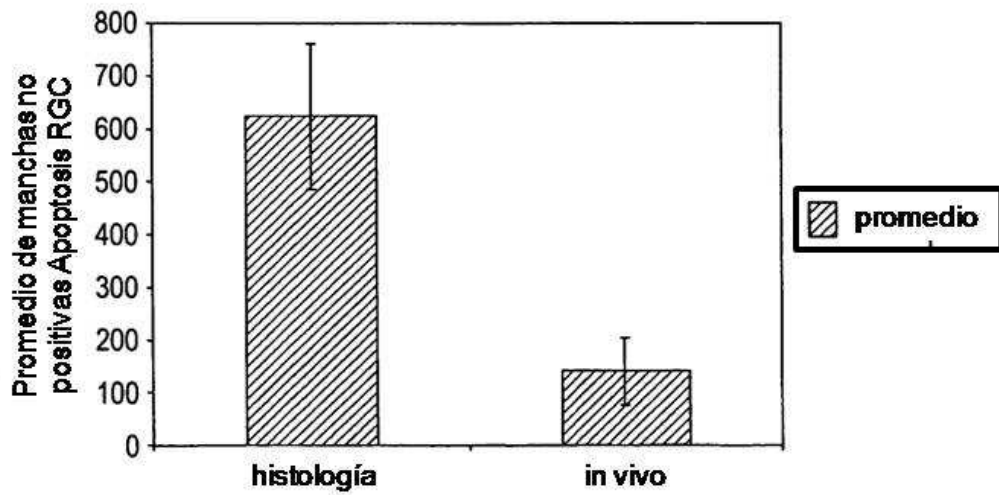


FIG. 8

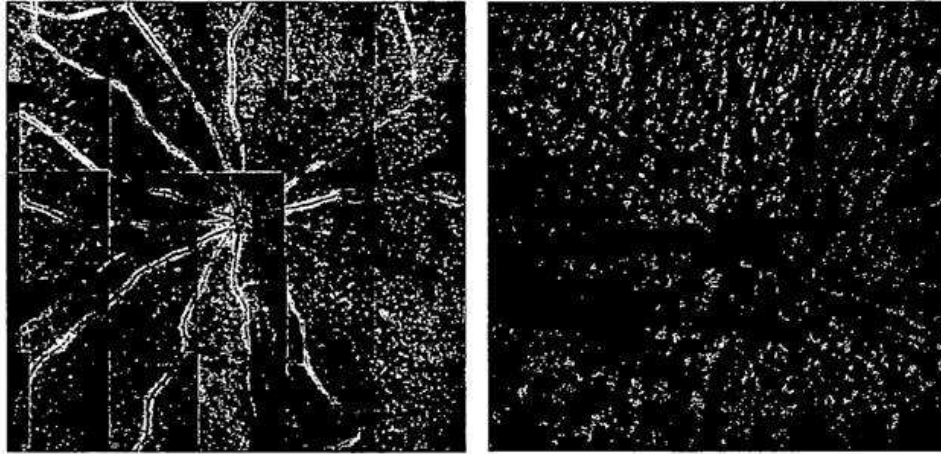


Imagen histología Anexina IV 488 Imagen in vivo

FIG. 9

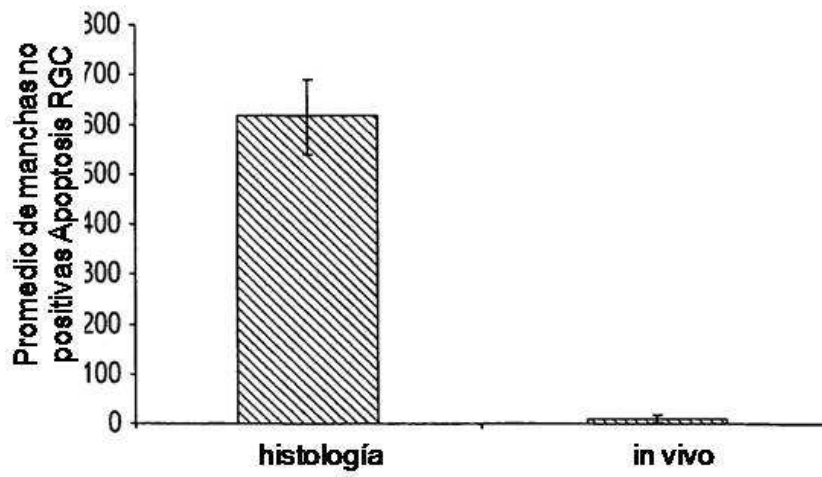


FIG. 10

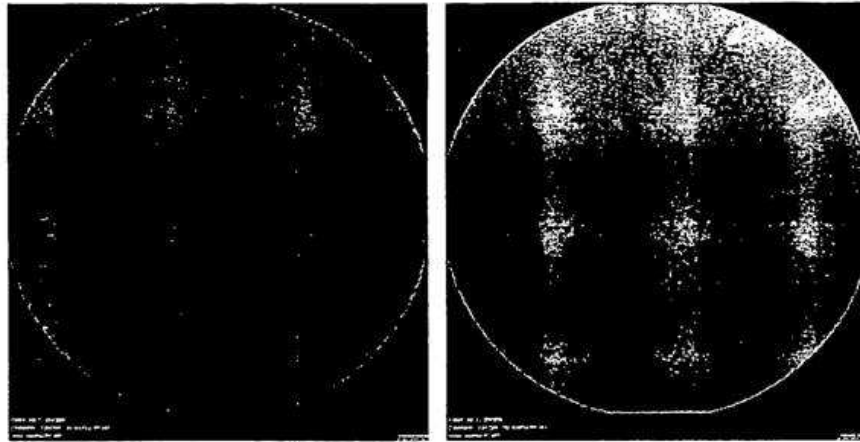


Imagen control
in vivo

Anexina Alexa
Fluor 555

Imagen in vivo dos
horas después de SSP

FIG. 11

Licor IRDye800

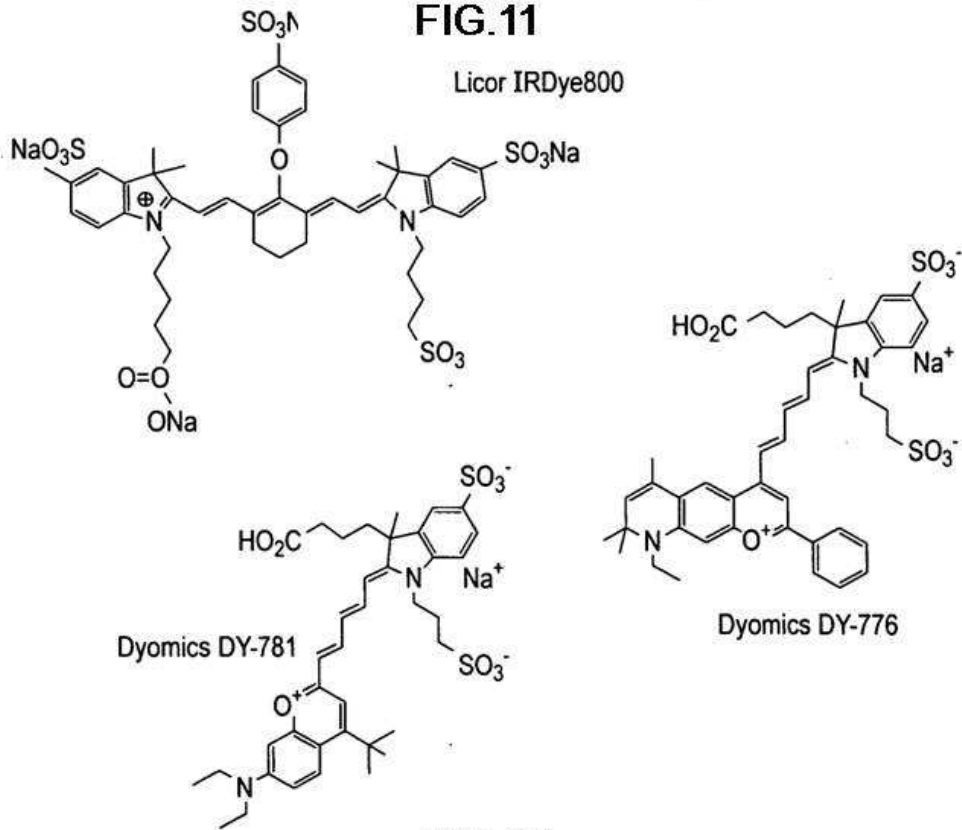


FIG. 12

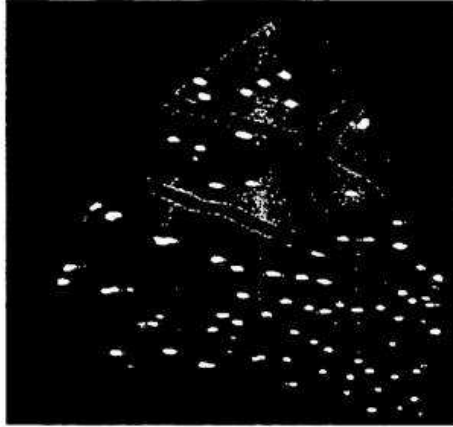
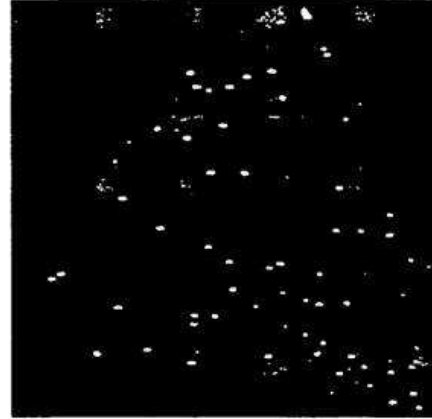


Imagen histología



Anexina5 DY776

Imagen in vivo

FIG. 13

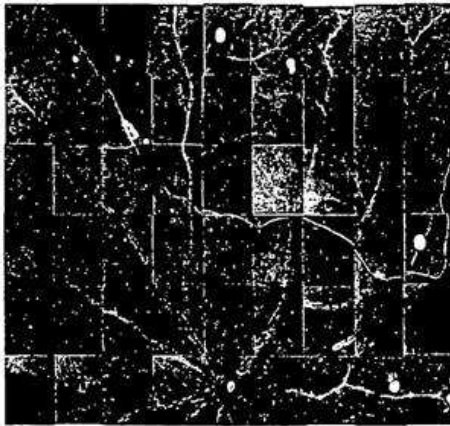


Imagen histología

Anexina5 IRDye 800

Imagen in vivo

FIG. 14

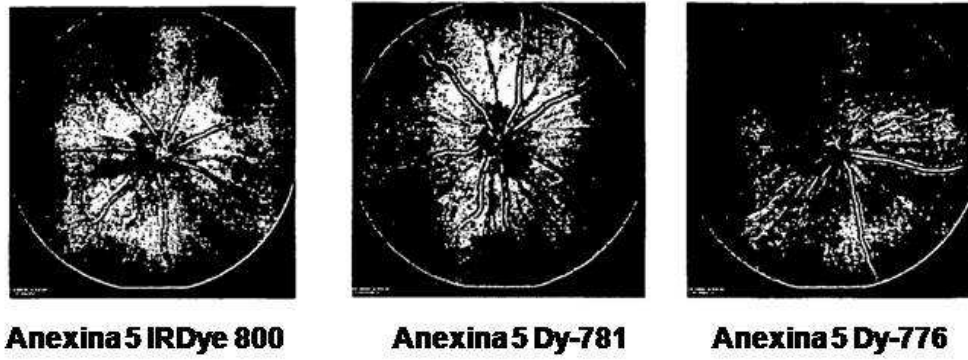


FIG. 15

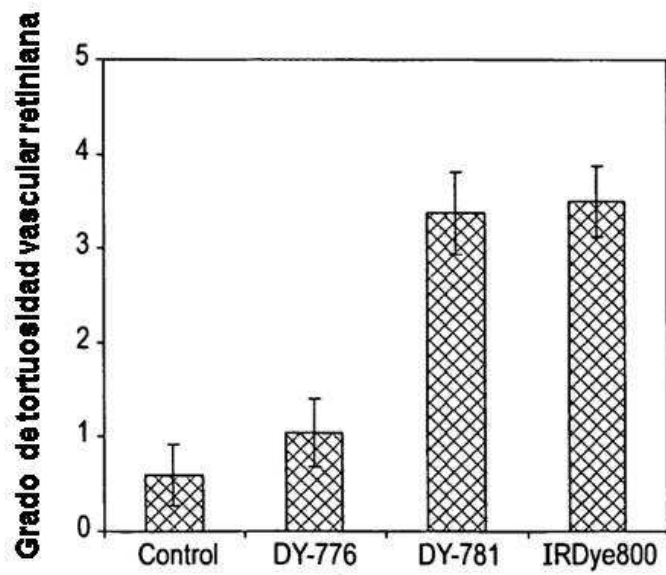


FIG. 16

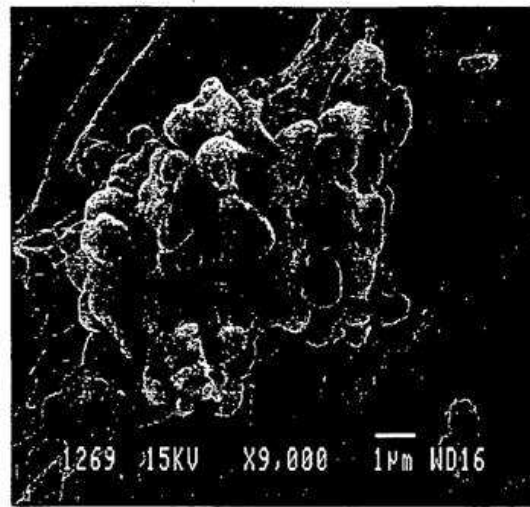


FIG. 17

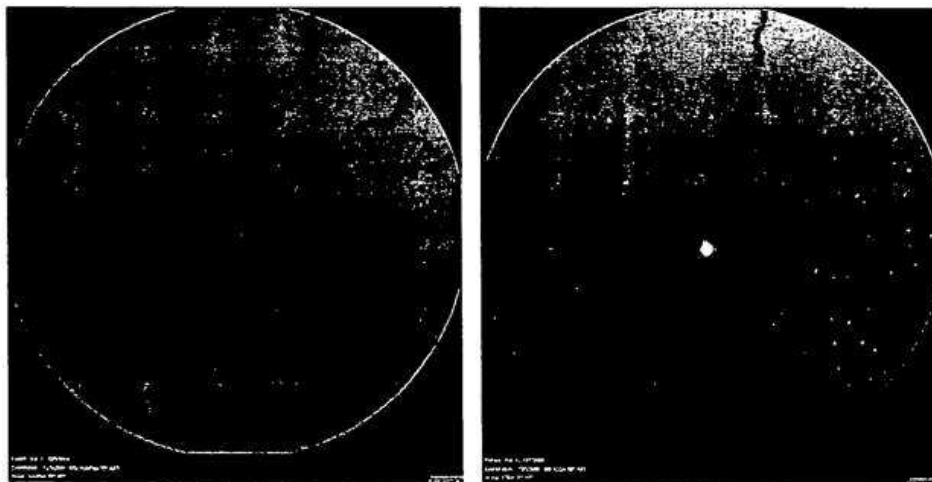


Imagen control
in vivo

Anexina 11 Dy776

Imagen in vivo dos
horas después de SSP

FIG. 18

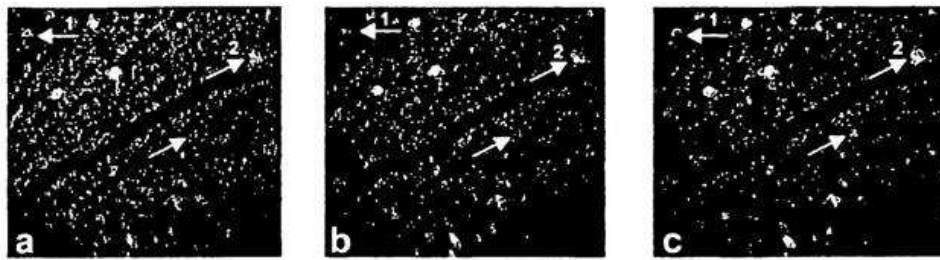


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

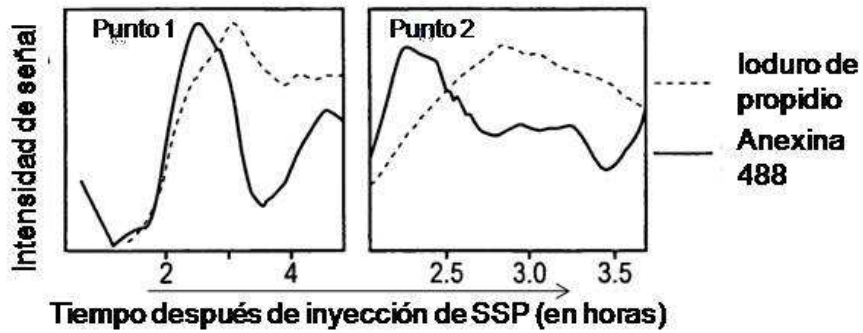


FIG. 19D

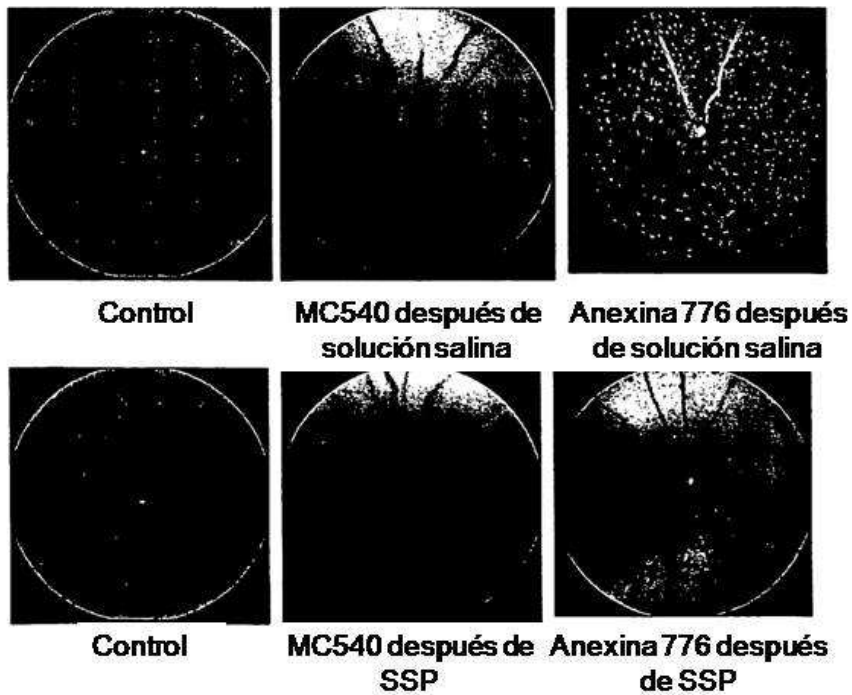


FIG. 20

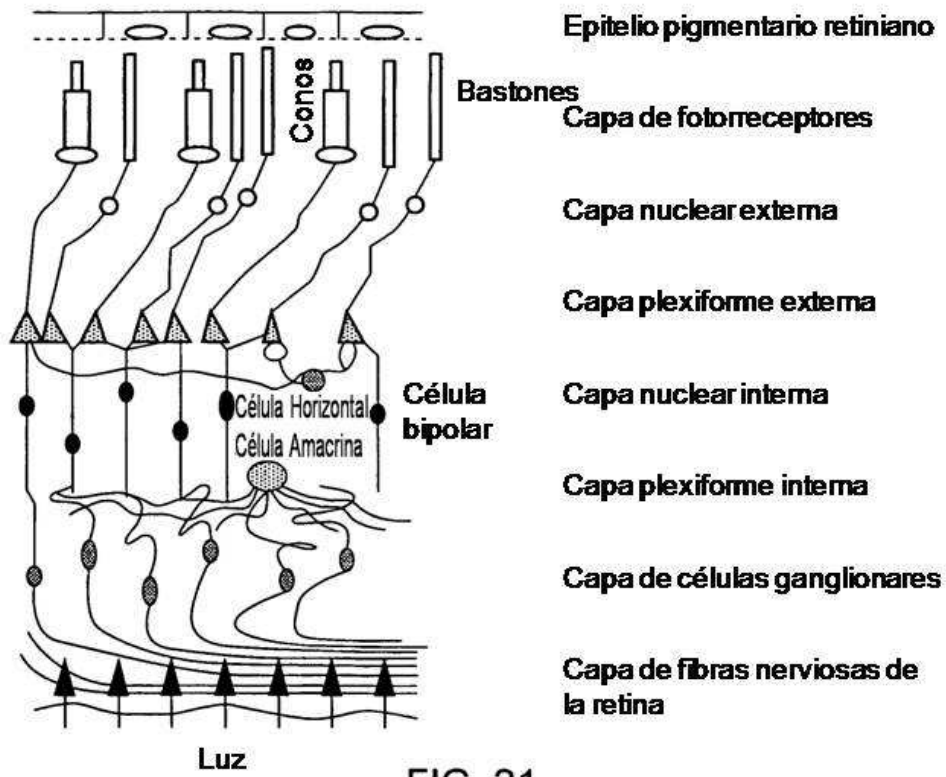


FIG. 21

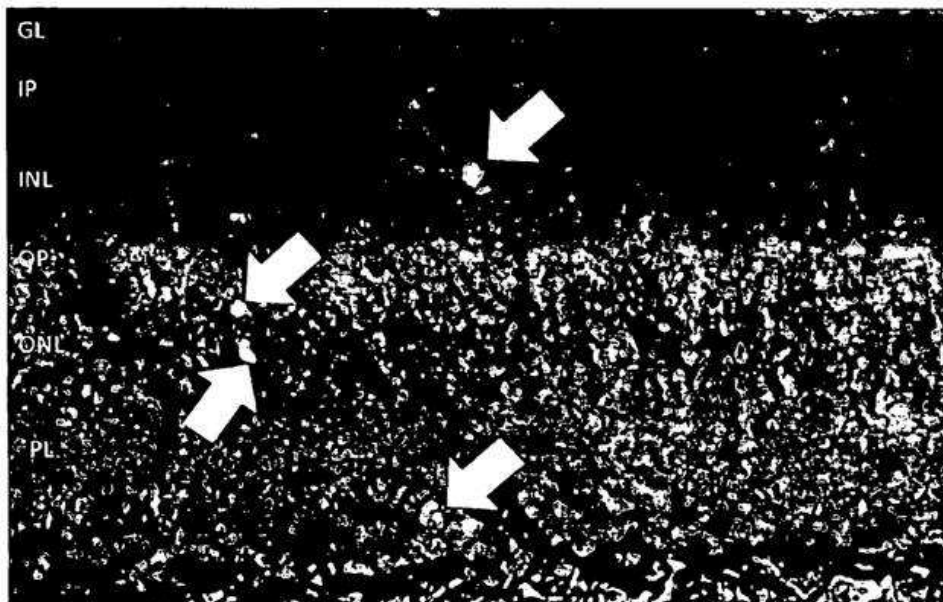


FIG. 22