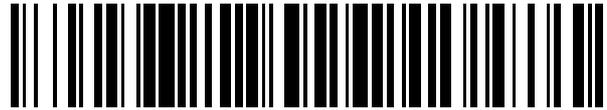


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 163**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08862538 .9**

96 Fecha de presentación: **18.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2234631**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54

Título: **Compuestos y métodos para el tratamiento de enfermedad vascular**

30

Prioridad:

18.12.2007 US 14594 P

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

19.12.2012

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

19.12.2012

73

Titular/es:

**ATHERA BIOTECHNOLOGIES AB (100.0%)
Fogdevreten 2A
171 77 Stockholm, SE**

72

Inventor/es:

**FROSTEGARD, JOHAN y
PETTERSSON, KNUT**

ES 2 393 163 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

Compuestos y métodos para el tratamiento de enfermedad vascular

Campo de la invención

- 5 La invención se refiere al uso en el tratamiento de disfunción vascular en pacientes, tales como los que padecen estos incluyendo angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil.

Antecedentes de la invención

- 10 La indicación o discusión de un documento aparentemente publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe considerarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es conocimiento general común.

15 La angina de pecho (“opresión en el pecho”) es un dolor de pecho debido a la falta de oxígeno en el miocardio. La falta de oxígeno se debe normalmente a isquemia, una reducción del suministro de sangre (y, por tanto, el suministro de oxígeno) al miocardio. Normalmente, esta isquemia está provocada por placas ateroscleróticas en los vasos coronarios, pero también puede estar provocada por un espasmo local en la vasculatura coronaria. Otras causas poco comunes pueden ser valvulopatía, anemia grave, estenosis aórticas y taquiarritmias. La angina de pecho se divide en angina por esfuerzo, angina desencadenada por ejercicio físico y/o mental; angina por espasmo (angina de Prinzmetal o variante), angina súbita sin correlación con una situación específica; y síndrome X, normalmente una angina relacionada con esfuerzo pero sin estenosis manifiesta en la angiografía. Un ataque de angina tiene normalmente una duración de 1 a 5 minutos. Si los ataques se producen en reposo, o tienen una duración que supera los 15 minutos, la enfermedad se denomina angina inestable y está asociada con riesgo inminente de acontecimiento cardiovascular. El estado también se clasifica como angina inestable cuando empeoran los síntomas de la angina estable. La angina inestable pertenece al síndrome coronario agudo (SCA) y es un estado crítico. Un infarto de miocardio está provocado normalmente por una ausencia casi completa de suministro de sangre a una parte del miocardio, normalmente provocada por la rotura de una lesión aterosclerótica coronaria con una formación posterior de un trombo ocluyente.

20 La enfermedad arterial periférica (EAP) es un estado con similitudes a la angina de pecho, pero está presente en arterias periféricas, normalmente las extremidades inferiores. El dolor isquémico es común en estos pacientes, y también está asociado normalmente con la actividad física. El dolor, o sensación de calambres, a menudo experimentado como resultado del ejercicio físico en pacientes con EAP se denomina normalmente claudicación intermitente.

25 *Endotelio en enfermedad cardiovascular (CV).* La disfunción vascular, en un sentido general, caracteriza a la mayoría de los estados de enfermedad CV, y a menudo implica función endotelial alterada. El endotelio es la capa de células más interna en todos los vasos sanguíneos. Es la mayor glándula endocrina del organismo, y secreta varios factores importantes que controlan el sistema circulatorio. Varios estudios recientes han mostrado que la “disfunción endotelial” está relacionada con un aumento del riesgo de acontecimientos CV [1]. La “disfunción endotelial” se mide normalmente como una pérdida de dilatación mediada por endotelio, la capacidad que tiene el endotelio para dilatar vasos sanguíneos en respuesta a determinados estímulos [2]. Hay varios modos de medir la dilatación mediada por endotelio, el más común es la dilatación de la arteria braquial durante la hiperemia, vasodilatación mediada por flujo (VMF) [3]. Usando tales mediciones de dilatación mediada por endotelio, se muestra que la función vascular se ve dificultada en individuos que padecen enfermedades relacionadas con aterosclerosis (hipertensión, hiperlipidemia, diabetes) [4, 5].

30 La liberación de óxido nítrico, NO, a partir del endotelio es un acontecimiento clave en la dilatación mediada por endotelio [6]. La enzima clave en la generación de NO es la óxido nítrico sintasa endotelial, eNOS. Se ha estudiado principalmente en conjunción directa con la regulación del sistema vascular (trombosis/hemostasia, regulación del flujo sanguíneo y crecimiento de vasos sanguíneos), pero también está relacionada con el desarrollo de aterosclerosis así como resistencia a la insulina y/o diabetes tipo 2 (T2DM). Por ejemplo, ratones deficientes en eNOS son más propensos a convertirse en ateroscleróticos que ratones con función eNOS normal y también son resistentes a la insulina [7].

35 La normalización de la (dis)función vascular en un estado de enfermedad arterial, medida como la restauración de la dilatación mediada por endotelio normal, puede ser o no el resultado de un aumento de la liberación de NO a partir del endotelio. La disfunción vascular puede resultar, o no, de la reducción de la sensibilidad de los músculos lisos arteriales al NO y/o puede resultar, o no, del aumento del metabolismo del NO que se genera. Otros mecanismos pueden también alterar la función vascular en enfermedad arterial; por ejemplo, se sabe bien que durante la inflamación vascular la formación de sustancias proinflamatorias y vasoconstrictoras aumenta, y esto podría desviar los efectos vasodilatadores, tales como los provocados por NO.

40 *Endotelio en angina de pecho y enfermedad arterial periférica.* Cuando se administra acetilcolina a arterias coronarias, se desencadena la liberación de NO a partir del endotelio coronario, lo que a su vez provoca la dilatación de las arterias coronarias (dilatación mediada por endotelio). Cuando se realizó este procedimiento en pacientes con arteriopatía coronaria, respondieron con una “vasoconstricción paradójica” [8]. Desde entonces, se ha mostrado que hay una pérdida

inapropiada de dilatación mediada por endotelio en pacientes que padecen cualquier forma de angina de pecho [9, 10], y que esta función alterada es un factor contribuyente importante a la isquemia miocárdica y, por tanto, al dolor anginoso en estos pacientes.

5 La EAP (normalmente medida como la reducción del índice tobillo brazo (ITB) debido a lesiones ateroscleróticas estenosantes) también se caracteriza por una reducción de la dilatación mediada por endotelio [11]. En pacientes en los que la enfermedad es sintomática (claudicación intermitente), la reducción de la dilatación mediada por endotelio es mayor que en pacientes no sintomáticos [12].

10 La hipertensión sistólica es una importante enfermedad en poblaciones en envejecimiento, y está asociada normalmente con un aumento de la rigidez del compartimento arterial central [13]. También se muestra que el NO reduce la rigidez [14], y un agente que pueda restaurar la dilatación mediada por endotelio reducida hasta la normal en un paciente con hipertensión sistólica puede ser por tanto de valor terapéutico.

15 Otra observación interesante es que pacientes que padecen migraña también tienen dilatación mediada por endotelio alterada, y esto sugirió que las anomalías en la vasomotricidad vascular pueden ser un importante factor fisiopatológico en la migraña [15, 16]. En este contexto es interesante que una mutación en el gen de eNOS que está asociada con pérdida de función [17] y está asociada con aumento del riesgo de acontecimientos de CV [18-20], también está asociada con migraña [21].

Aún en otro aspecto del papel del endotelio y el NO en la enfermedad, la disfunción eréctil también está asociada con dilatación mediada por endotelio alterada [22], y la restauración de la dilatación mediada por endotelio normal también puede mejorar la disfunción eréctil.

20 A partir del resumen anterior, resulta evidente que la restauración del control endotelial normal del tono vascular mediante la normalización del metabolismo del NO endotelial es una oportunidad terapéutica en estados patológicos en los que se reduce la dilatación mediada por endotelio.

25 Tal como se describió anteriormente, la dilatación mediada por endotelio es un importante factor en el desarrollo de enfermedad arterial. También se sabe bien que estas enfermedades también están vinculadas a alteraciones en el sistema hemostático, y que la inflamación vascular está asociada con un estado en el que hay un aumento del riesgo de formación de trombos arteriales.

30 La anexina A5 es una proteína endógena que se une a fosfolípidos cargados tales como fosfatidilserina (PS) [23]. La anexina A5 es un potente agente antitrombótico [24], y se propone que la anexina A5, uniéndose a PS expuesta, puede formar un "escudo protector" que puede inhibir los efectos de PS sobre la formación de trombosis [25]. En este contexto es interesante que en pacientes con trastornos autoinmunitarios tales como APS y/o SLE, hay anticuerpos en el plasma que pueden reducir la unión de anexina A5 a PS sobre, por ejemplo, superficies de células endoteliales, aumentando de ese modo la exposición a PS. Este hallazgo puede explicar por qué estos pacientes tienen un riesgo superior de acontecimientos trombóticos que la población general [23]. De manera muy interesante, hubo una reducción significativa en la capacidad de unión de anexina A5 a células endoteliales de suero de controles para pacientes con SLE que no habían padecido acontecimientos trombóticos con respecto a pacientes con SLE que habían padecido tales acontecimientos [26].

40 Se ha mostrado que además de los efectos antiplaquetarios y anticoagulantes de la anexina A5, esta proteína y un análogo de la misma, el dímero de anexina A5 dianexina, es eficaz en la prevención frente a la lesión por reperusión en el hígado [27], y mejoraba el desenlace de trasplantes de hígado en ratas [28]. De manera interesante, en ambos de estos estudios los tratamientos estaban asociados con una actividad inflamatoria reducida en el endotelio hepático, medida como expresión reducida de moléculas de adhesión. Se sugirió que la dianexina mejoraba la supervivencia de los trasplantes de hígado mediante un efecto antitrombótico que conducía a un suministro de sangre mantenido al hígado [28].

45 Se ha sugerido anteriormente que puede usarse anexina A5 para estabilizar lesiones ateroscleróticas en arterias coronarias en pacientes, lo que debe reducir el riesgo de infarto de miocardio en estos pacientes ([26]; documento WO 2005/099744).

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. La anexina A5 restaura la vasodilatación mediada por endotelio

50 Registros representativos de la tensión arterial en un ratón apoE^(-/-) control (perfil superior) y un ratón tratado con anexina A5 (perfil inferior). Se inyectó metacolina tal como se indica mediante la línea discontinua. Paneles a la derecha con administración previa del inhibidor de eNOS, L-NAME.

Figura 2. Resumen de los efectos de anexina A5 sobre la vasodilatación mediada por endotelio medida como tensión arterial.

Las barras muestran la tensión arterial media antes (basal) y 3 minutos tras la administración de metacolina en ratones no tratados y tratados con anexina 5, respectivamente.

Figura 3. Resumen de los efectos de anexina A5 sobre cambios inducidos por metacolina en la tensión arterial sistólica y diastólica.

- 5 Se inyectó metacolina en el instante 0 en ratones ateroscleróticos o bien control (-♦-) o bien tratados con anexina A5 (...■...). Se muestra el efecto sobre la tensión arterial sistólica (A) y diastólica (B).

Descripción de la invención

10 En el presente documento se muestra que la anexina A5 puede restaurar la vasodilatación mediada por endotelio normal en ratones ateroscleróticos, mediante un mecanismo dependiente de NO. Por tanto, la anexina A5 o análogos de la misma proporcionan una nueva modalidad de tratamiento con efectos antiisquémicos que puede normalizar las anomalías de la vasomotricidad en enfermedades en las que esta anomalía se debe a una biodisponibilidad de NO o función de eNOS dificultada. No hay ningún informe previo que muestre que la anexina A5 tenga propiedades antiisquémicas. Tales enfermedades incluyen, pero no se limitan a, angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil.

15 El primer aspecto de la presente invención proporciona anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma para su uso en el tratamiento de disfunción vascular y/o para restaurar la función vascular, en el que la disfunción vascular está asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) reducida y/o biodisponibilidad de óxido nítrico reducida, comprendiendo el análogo o variante funcional de anexina A5 una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.

20 En una realización, puede decirse que un paciente padece disfunción vascular si el paciente presenta una capacidad reducida para responder a un estímulo vasodilatador (opcionalmente, cuando la respuesta promedio media del paciente se evalúa en múltiples repeticiones, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, de la prueba) en comparación con la capacidad promedio media de un grupo control (10 individuos sanos de edad y sexo coincidentes, opcionalmente en los que cada miembro del grupo control se evalúa en múltiples repeticiones, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, de la prueba) para responder a la misma dosificación del estímulo vasodilatador. Los estímulos vasodilatadores adecuados que pueden usarse en esta evaluación incluyen estímulos seleccionados del grupo que consiste en metacolina, acetilcolina, aumento de la velocidad de flujo sanguíneo, un compuesto que genera NO tal como nitroglicerina, o una prueba funcional tal como una prueba de ejercicio frecuentemente usada en pacientes con angina.

25 La capacidad de un individuo para responder a un estímulo vasodilatador puede evaluarse midiendo el cambio en la vasodilatación provocado por la administración del estímulo vasodilatador mediante administración intravenosa, intraarterial, sublingual, oral o subcutánea (cuando el estímulo vasodilatador es un agente que va a administrarse al sujeto de prueba) o midiendo la respuesta a una prueba funcional, tal como una prueba de ejercicio.

30 Se conocen en la técnica métodos para medir cambios en la vasodilatación, y el método más apropiado se elegirá dependiendo de la naturaleza de la disfunción vascular y/o el tipo de estímulo vasodilatador usado.

35 Una forma común para medir la vasodilatación en un sujeto de prueba, para los fines de evaluar la disfunción vascular, es medir la dilatación mediada por flujo de la arteria braquial tras la isquemia inducida por un manguito en la extremidad superior [3]. Informes previos de uso de esta técnica han mostrado que, normalmente, la hiperemia posisquémica provoca un aumento en el diámetro de la arteria braquial de aproximadamente un 10% en el individuo joven y sano, mientras que en un paciente con ECV o un paciente con diabetes tipo 2, esta respuesta puede ser por ejemplo del 2-4% o incluso estar completamente ausente. La respuesta puede inhibirse casi completamente mediante la administración de un inhibidor de la enzima generadora de NO, tal como L-NAME.

40 Alternativamente, la vasodilatación en las arterias de resistencia de un sujeto de prueba (por ejemplo arterias en el antebrazo y/o la mano) puede medirse como cambios en el flujo sanguíneo usando la técnica conocida en la técnica de pletismografía. En este entorno experimental, el estímulo vasodilatador podría ser opcionalmente una administración local (tal como, intraarterial) de una sustancia vasodilatadora, tal como acetilcolina.

45 La función vascular coronaria puede evaluarse mediante una prueba de ejercicio tal como una prueba de ejercicio en bicicleta o una prueba de marcha en cinta andadora. En esta situación, la isquemia cardiaca se mide mediante los cambios en el electrocardiograma cardiaco (ECG), y/o como la cantidad de trabajo físico que puede realizar un sujeto antes de que se produzca dolor isquémico (angina).

50 Alternativamente, puede evaluarse la función de arterias coronarias grandes mediante la inyección local de un compuesto vasodilatador durante la cateterización cardiaca, y la respuesta se evalúa mediante angiografía coronaria.

55 Por tanto, un paciente que padece disfunción vascular puede presentar una capacidad para responder a un estímulo vasodilatador que es, como máximo, un 95%, 90%, 85%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10% o menos que la capacidad promedio media del grupo control para responder a la misma dosificación del estímulo vasodilatador.

Pacientes que padecen enfermedades tales como angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil presentan comúnmente disfunción vascular.

5 Por tanto, la disfunción vascular puede tratarse y/o la función vascular restaurarse mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, a un paciente que lo necesita. Una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, cuando se usa para tratar la disfunción vascular y/o restaurar la función vascular, puede evaluarse

10 (i) monitorizando la respuesta a un estímulo vasodilatador de un paciente que padece disfunción vascular, y comparando la respuesta observada antes, y luego después, del tratamiento con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma; y/o

15 (ii) monitorizando la respuesta a un estímulo vasodilatador de un paciente que padece disfunción vascular que se ha tratado con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma, y comparando la respuesta observada con la capacidad promedio media del grupo control de individuos sanos (tal como se definió anteriormente, en el que los miembros del grupo control no se han tratado con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma) para responder a la misma dosificación del estímulo vasodilatador; y/o

20 (iii) monitorizando la respuesta a un estímulo vasodilatador de un paciente que padece disfunción vascular que se ha tratado con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma, y comparando la respuesta observada con la capacidad promedio media de un grupo control de individuos con estado coincidente (10 individuos de estado, edad y sexo coincidentes, opcionalmente en los que cada miembro del grupo control se evalúa en múltiples repeticiones, tales como 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10, de la prueba), en el que los miembros del grupo control no se han tratado con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma, para responder a la misma dosificación del estímulo vasodilatador.

La capacidad de un individuo para responder a un estímulo vasodilatador puede evaluarse midiendo el cambio en la vasodilatación provocado por la administración del estímulo vasodilatador tal como se expuso anteriormente.

25 Cuando el efecto terapéutico de la anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma se determina como en (i) anteriormente, entonces el nivel de vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador logrado en el paciente antes del tratamiento con anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma puede mejorarse en al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% o al menos el 100% o incluso valores superiores, tales como al menos el 150%, 200%, 250%, 300% o más, mediante tratamiento con una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma según la presente invención, en comparación con el nivel antes del tratamiento de la vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador lograda en el paciente.

30 Cuando el efecto terapéutico de la anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, se determina como en (ii) anteriormente, entonces el nivel de vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador logrado en el paciente tras el tratamiento con anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, puede mejorarse hasta un nivel que es al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, sustancialmente de aproximadamente el 100% o más en comparación con el nivel promedio medio de vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador observado en el grupo control.

40 Cuando el efecto terapéutico de la anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, se determina como en (iii) anteriormente, entonces el nivel de vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador logrado en el paciente tras el tratamiento con anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, puede mejorarse hasta un nivel que es mayor del 100%, tal como al menos el 150%, 200%, 250%, 300% o más, en comparación con el nivel promedio medio de vasodilatación inducida por el estímulo vasodilatador observado en el grupo control.

La disfunción vascular puede estar asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada y/o puede estar asociada con una actividad eNOS reducida y/o una biodisponibilidad de NO reducida.

50 El segundo aspecto de la presente invención proporciona anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, para su uso en la reducción del dolor isquémico, tal como angina de pecho o dolor asociado con enfermedad arterial periférica (EAP), en el que una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO: 1, se administra a un paciente que necesita tal tratamiento.

55 El paciente tratado con el primer o segundo aspecto de la invención puede ser o no un sujeto que padece una enfermedad seleccionada de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil, y por tanto la disfunción vascular y/o el dolor isquémico puede estar asociado con una cualquiera o más de estas enfermedades.

Cuando el paciente padece angina de pecho, puede estar provocada o no por uno cualquiera de placas ateroscleróticas en los vasos coronarios, espasmo local en la vasculatura coronaria, valvulopatía, anemia grave, estenosis aórticas y/o taquiarritmias. El paciente puede padecer o no angina por esfuerzo, angina por espasmo (angina de Prinzmetal o variante), angina súbita o síndrome X. El paciente puede padecer o no angina estable o inestable.

- 5 El tratamiento de la disfunción vascular y/o la restauración de la función vascular en pacientes con estados tales como angina de pecho según la presente invención también puede reducir el riesgo de aparición de infarto agudo de miocardio (IAM) y sus complicaciones posteriores tales como las indicadas por la clasificación internacional de enfermedad (CIE) en <http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>, en la categoría I.23 que incluye hemopericardio tras IAM (I23.0), comunicación interauricular tras IAM (I23.1), defecto del tabique ventricular tras IAM (I23.2), rotura de la pared cardiaca sin hemopericardio tras IAM (I23.3), rotura de la cuerda tendinosa tras IAM (I23.4), rotura del músculo papilar tras IAM (I23.5), trombosis de la aurícula, orejuela auricular y ventrículo tras IAM (I23.6) y otras complicaciones actuales tras IAM (I23.8).

Cuando el paciente padece cardiopatía isquémica, el paciente puede padecer o no aterosclerosis, o angina sin aterosclerosis manifiesta.

- 15 El paciente puede ser o no un ser humano. El paciente puede ser o no un animal no humano, tal como un animal doméstico (por ejemplo, gato, perro, conejo, vaca, oveja, cerdo, ratón u otro roedor).

- 20 El tercer aspecto de la presente invención proporciona anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO: 1, para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción del riesgo de aparición de una enfermedad vascular que está asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, actividad eNOS reducida y/o biodisponibilidad de NO reducida. La enfermedad vascular tratada con el tercer aspecto de la invención puede ser o no una enfermedad seleccionada de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil, tal como los estados mencionados anteriormente en más detalle con respecto a los aspectos primero y segundo de la invención.

- 25 El tratamiento de estados tales como angina de pecho según la presente invención también puede reducir el riesgo de aparición de infarto agudo de miocardio (IAM) y sus complicaciones posteriores tales como las indicadas por la clasificación internacional de enfermedad (CIE) en <http://www.who.int/classifications/apps/icd/icd10online/>, en la categoría I.23 que incluye hemopericardio tras IAM (I23.0), comunicación interauricular tras IAM (I23.1), defecto del tabique ventricular tras IAM (I23.2), rotura de la pared cardiaca sin hemopericardio tras IAM (I23.3), rotura de la cuerda tendinosa tras IAM (I23.4), rotura del músculo papilar tras IAM (I23.5), trombosis de la aurícula, orejuela auricular y ventrículo tras IAM (I23.6) y otras complicaciones actuales tras IAM (I23.8).

Por tanto, el tercer aspecto de la presente invención incluye la reducción del riesgo de aparición de IAM o sus complicaciones posteriores mediante el tratamiento de una enfermedad vascular en la que una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO: 1, se administra a un paciente.

- 35 La anexina A5, o el análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO: 1, puede administrarse conjuntamente con (es decir, de manera separada, simultánea o secuencial con) uno o más agentes activos adicionales, tales como

- un producto terapéutico trombolítico, tal como activador de plasminógeno tisular, urocinasa o una enzima bacteriana,
- 40 • un agente antiplaquetario, tal como aspirina o clopidogrel (Plavix), y/o
- nitroglicerina y/o morfina.

- 45 También se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma para el tratamiento de una enfermedad vascular seleccionada de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña y disfunción eréctil, tal como se comentó anteriormente con respecto a los aspectos primero y segundo de la invención. La enfermedad vascular puede estar asociada con (en otras palabras, un paciente con la enfermedad vascular puede presentar) vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad eNOS reducida y/o una biodisponibilidad de NO reducida.

- 50 También se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma para el tratamiento de una disfunción vascular y/o la restauración de la función vascular. La disfunción vascular puede estar asociada con (en otras palabras, un paciente con la disfunción vascular puede presentar) vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad eNOS reducida y/o una biodisponibilidad de NO reducida. La disfunción vascular puede estar asociada con una enfermedad seleccionada de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil, tal como se comentó anteriormente con respecto a los aspectos primero y segundo de la invención.

Una composición farmacéutica puede comprender por tanto anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma en mezcla con un adyuvante, diluyente o portador farmacéutica o veterinariamente aceptable, que se seleccionará normalmente con respecto a la vía de administración prevista y la práctica farmacéutica convencional. La composición puede estar en forma de aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Preferiblemente, la formulación es una dosificación unitaria que contiene una unidad o dosis diaria, subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

La composición farmacéutica puede estar destinada o no para y, por tanto, formulada de una manera adecuada para, administración parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, o puede administrarse mediante técnicas de infusión. Puede usarse de la mejor manera en forma de una disolución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer que la disolución sea isotónica con la sangre. Las disoluciones acuosas pueden tamponarse de manera adecuada (preferiblemente a un pH de desde 3 hasta 9), si es necesario. La preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

Tales formulaciones pueden incluir disoluciones de inyección estériles acuosas y no acuosas que pueden contener anti-oxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes de espesamiento. Las formulaciones pueden presentarse en envases de dosis unitaria o de múltiples dosis, por ejemplo viales y ampollas selladas, y pueden almacenarse en un estado secado por congelación (liofilizado) que sólo requiere la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse disoluciones y suspensiones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos y comprimidos estériles de la clase anteriormente descrita.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma para su administración a un paciente, tal como un paciente humano, basándose en un nivel de dosificación diario, puede ser de desde 0,01 hasta 1000 mg de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma por adulto (por ejemplo, desde aproximadamente 0,001 hasta 20 mg por kg del peso corporal del paciente, tal como de 0,01 a 10 mg/kg, por ejemplo más de 0,1 mg/kg y menos de 20, 10, 5, 4, 3 ó 2 mg/kg, tal como aproximadamente 1 mg/kg), administrada en dosis individuales o divididas.

El médico, en cualquier caso, determinará la dosificación real que será la más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son a modo de ejemplo del caso promedio. Por supuesto, puede haber casos individuales en los que se necesiten intervalos de dosificación superiores o inferiores y tales están entro del alcance de esta invención.

Para uso veterinario, se administra un compuesto de la invención como una formulación adecuadamente aceptable según la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que serán los más apropiados para un animal particular.

En un cuarto, quinto y sexto aspecto, la invención proporciona el uso de anexina A5, o un análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, en la preparación de una especialidad farmacéutica para el tratamiento, la prevención o la reducción del riesgo de aparición de un estado definido anteriormente en el contexto de uno cualquiera de los aspectos primero, segundo o tercero de la presente invención, respectivamente.

La anexina A5, o el análogo o variante funcional de la misma que comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a SEQ ID NO:1, según la invención puede ser anexina A5 humana (SEQ ID NO:1), una variante alélica o genética de la misma, un ortólogo de mamífero de la misma o una variante alélica o genética del mismo. Preferiblemente, el análogo o variante funcional de anexina A5 según la invención es idéntico en más del 95% o el 99% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina tal como sigue. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos, por ejemplo, con SEQ ID NO:1 usando el programa BLAST 2 Sequences (BI2seq) de la versión independiente de BLASTZ que contiene la versión de BLASTN 2.0.14 y la versión de BLASTP 2.0.14. Esta versión independiente de BLASTZ puede obtenerse del sitio web del Centro Nacional de Información Biotecnológica del gobierno de los Estados Unidos en ncbi.nlm.nih.gov. Pueden encontrarse instrucciones que explican cómo usar el programa BI2seq en el archivo léame adjunto a BLASTZ. BI2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos usando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de BI2seq se fijan tal como sigue: -i se fija a un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos que va a compararse (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se fija a un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos que va a compararse (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se fija a blastp; -o se fija a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las otras opciones se dejan en sus parámetros por defecto. Por ejemplo, puede usarse el siguiente comando para generar un archivo de salida que contiene una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará las regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineada

das, se determina el número de coincidencias contando el número de posiciones en las que está presente un residuo de aminoácido o nucleótido idéntico en ambas secuencias.

El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias entre la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada seguido por la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, si se compara una secuencia con la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1 (la longitud de la secuencia expuesta en SEQ ID NO:1 es de 320) y el número de coincidencias es de 288, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad de 90 (es decir, $288 \div 320 * 100 = 90$) con la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 1.

Por tanto, un análogo o variante funcional de anexina A5 puede ser una proteína en la que en una o más posiciones ha habido inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, o bien conservativas o bien no conservativas, siempre que tales cambios den como resultado una proteína cuyas propiedades básicas para funcionar de una manera equivalente a anexina A5 no hayan cambiado significativamente. "Significativamente" en este contexto significa que un experto en la técnica diría que las propiedades de la variante pueden ser todavía diferentes pero serían obvias con respecto a las de la proteína original.

Por "sustituciones conservativas" quiere decirse combinaciones tales como Gly, Ala; Val, Ile, Leu; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg; y Phe, Tyr.

Tales variantes pueden prepararse usando los métodos de modificación de proteínas por ingeniería genética y mutagénesis dirigida al sitio que se conocen bien en la técnica.

El análogo o variante funcional de anexina A5 según la invención puede ser o no un dímero de anexina A5 o un análogo o variante funcional del mismo, o puede ser o no una anexina A5 pegilada o un análogo o variante funcional de la misma. Se dan a conocer dianexina A5 y anexina A5 pegilada en el documento WO 02/067857.

La pegilación es un método bien conocido para los expertos en la técnica en el que un polipéptido o compuesto peptidomimético (para los fines de la presente invención, anexina A5 o el análogo o variante funcional) se modifica de manera que una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) se unen covalentemente a la cadena lateral de uno o más aminoácidos o derivados de los mismos. Es una de las técnicas de química estructural de alteración de moléculas (MASC) más importantes. Pueden usarse otras técnicas de MASC; tales técnicas pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de la molécula, por ejemplo extendiendo su semivida *in vivo*. Se forma un conjugado de PEG-proteína activando en primer lugar el resto de PEG de modo que reaccionará con, y se acoplará a, la proteína o el compuesto peptidomimético de la invención. Los restos de PEG varían considerablemente en cuanto a conformación y peso molecular, siendo los restos tempranos (PCG monofuncionales; mPEG) lineales con pesos moleculares de 12 kDa o menos, y siendo los restos posteriores de pesos moleculares aumentados. PEG2, una reciente innovación en la tecnología de PEG, implica el acoplamiento de un mPEG de 30 kDa (o menos) a un aminoácido lisina (aunque la pegilación puede extenderse a la adición de PEG a otros aminoácidos) que se hace reaccionar adicionalmente para formar una estructura ramificada que se comporta como un mPEG lineal de peso molecular mucho mayor (Kozlowski *et al.*, (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429). Se describen adicionalmente métodos que pueden usarse para unir covalentemente las moléculas de PEG a polipéptidos en Roberts *et al.*, (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476, Bhadra *et al.*, (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29, Kozlowski *et al.*, (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224, y Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 -417 y referencias mencionadas en los mismos.

Las ventajas de la pegilación para el polipéptido o compuesto peptidomimético de la invención incluyen aclaramiento renal reducido que, para algunos productos, da como resultado una adsorción más sostenida tras la administración así como distribución restringida, conduciendo posiblemente a concentraciones plasmáticas más constantes y sostenidas y por tanto a un aumento de la eficacia clínica (Harris *et al.*, (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551). Las ventajas adicionales pueden incluir inmunogenicidad reducida del compuesto terapéutico (Reddy, (2001) *Ann Pharmacother* 34, 915 - 923), y toxicidad inferior (Kozlowski *et al.*, (2001), *Biodrugs* 15, 419-429).

El análogo o variante funcional de anexina A5 según la invención puede ser una proteína de fusión que comprende la secuencia de anexina A5 o una variante de la misma. Por tanto, por ejemplo, la anexina A5 o una variante de la misma puede fusionarse con una o más secuencias polipeptídicas de pareja de fusión para extender la semivida de la molécula dentro del sistema circulatorio de un paciente y/o añadir funcionalidad adicional a la molécula.

Por un análogo o variante "funcional" de anexina A5 quiere decirse una proteína que puede unirse a fosfatidilserina en una membrana biológica, preferiblemente a un nivel que es al menos del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o aproximadamente el 100% del presentado por anexina A5 humana (SEQ ID NO:1) en las mismas condiciones. Se conoce en la técnica un método adecuado para medir la unión de anexina A5 a fosfatidilserina en una membrana biológica [29].

Un análogo o variante "funcional" de anexina A5 también puede tener, adicional o alternativamente, al menos el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o aproximadamente el 100% de la actividad terapéutica de anexina A5 humana (SEQ ID NO:1) cuando se usa a la misma dosificación (es decir, equivalente molar), para el tratamiento de disfunción vascular, para restaurar la función vascular, para reducir el dolor isquémico y/o para el tratamiento de una enfermedad vascular según cualquiera de los aspectos de la invención.

En este contexto, la actividad terapéutica de un análogo o variante “funcional” de anexina A5 puede determinarse, en comparación con la de anexina A5 humana (SEQ ID NO:1), comparando la capacidad de una cantidad equivalente molar del análogo o variante funcional y de anexina A5 humana para tratar la disfunción vascular tal como se describió anteriormente, y/o para restaurar la capacidad de ratones apoE^(-/-) mantenidos con una dieta de alto contenido en lípidos y colesterol durante 4 meses para presentar dilatación mediada por endotelio en respuesta a la administración intraperitoneal de 3 µg/kg de peso corporal (10 µl/g) de metacolina (Sigma), cuando se les administra a los ratones, mediante inyección intraperitoneal, una cantidad equivalente molar o bien de anexina A5 o bien del análogo o variante en cuestión una vez al día por la mañana durante 3 días consecutivos, siendo la inyección final aproximadamente 2-3 horas antes de la administración de metacolina, y en el que el grado de dilatación mediada por endotelio en los sujetos de prueba se mide evaluando la tensión arterial mediante cateterización de la arteria carótida izquierda, tal como usando la metodología expuesta en el siguiente ejemplo.

“Enfermedad vascular asociada con una actividad eNOS reducida o una biodisponibilidad de NO reducida” tal como se usa en el presente documento se refiere a una enfermedad vascular que está provocada por, provoca o conduce a, tiene una causa común con, o coexiste con, una actividad eNOS reducida o una biodisponibilidad de NO reducida.

“Disfunción vascular asociada con una enfermedad” tal como se usa en el presente documento se refiere a una disfunción vascular, tal como una pérdida de vasodilatación mediada por endotelio, que está provocada por, provoca o conduce a, tiene una causa común con, o coexiste con, la enfermedad en cuestión. Anteriormente se proporcionaron ejemplos de tales enfermedades.

Ejemplo

Ratones que se hacen deficientes en apolipoproteína E mediante direccionamiento génico (ratones apoE^(-/-)) son hiperlipidémicos y desarrollan aterosclerosis. Este proceso se acelera alimentando a los ratones con una dieta denominada Western, por ejemplo Harlan Teklad TD.88137. Ésta es una dieta purificada con un 21% de grasa láctea anhidra (manteca), un 34% de sacarosa y un total del 0,2% de colesterol que, en comparación con dietas de ratón normales, contiene lípidos extra y algo de colesterol. Se administró una dieta de este tipo a ratones apoE^(-/-) macho durante al menos 4 meses, tras lo cual se evaluaron los efectos de anexina A5 sobre la dilatación mediada por endotelio. De este modo, los ratones desarrollarán enfermedad vascular que incluye una alteración de la dilatación mediada por endotelio que es típica para pacientes con, por ejemplo, angina de pecho, hipertensión, diabetes e hiperlipidemia.

Evaluación de la dilatación mediada por endotelio en ratones anestesiados.

Se indujo anestesia mediante isoflurano al 4,5% (Isoba®vet, Schering-Plough Animal Health, Dinamarca) y entonces se mantuvo suministrando isoflurano según fuese necesario (normalmente al 1,5-2%).

Para las mediciones de la tensión arterial, se realizó una cateterización (Samba Sensor preclin 420 LP, Västra Frölunda, Suecia) de la arteria carótida izquierda. Después de eso, se movió el catéter suavemente al interior del arco aórtico. Se conectó el sensor Samba a una unidad Samba 3200, desde la que se transfirieron los datos a, y se almacenaron en, el software Powerlab (AD Instrument, versión 5) a 2 kHz.

Entonces se dejó que los ratones se estabilizaran durante aproximadamente 15 minutos. Entonces se indujo dilatación mediada por endotelio mediante la administración intraperitoneal (i.p.) de 3 µg/kg de peso corporal (10 µl/g) de metacolina (Sigma), y se midió la tensión arterial durante 5 minutos. Cuando se estimula de manera sistémica la dilatación mediada por endotelio, se reduce la resistencia vascular periférica total, y la vasodilatación puede medirse como una reducción de la tensión arterial. La metacolina provoca una estimulación transitoria del endotelio arterial para liberar NO, lo que a su vez provocará vasodilatación mediada por endotelio en un ratón sano, normal. Después de desaparecer el efecto de la metacolina y establecerse de nuevo la tensión inicial, se administró una dosis i.p. de 50 mg/kg de peso corporal de L-NAME (éster metílico de N^G-nitro-L-arginina) (Sigma). Éste es un inhibidor de la enzima eNOS, que convierte arginina en NO (y citrulina), y por tanto es responsable de la dilatación mediada por endotelio. Entonces se realizó un seguimiento de la tensión arterial hasta que se alcanzó una nueva meseta (12-15 minutos), tras lo cual se administró de nuevo metacolina 3 µg/kg y se midió la tensión arterial durante 5 minutos.

Resultados.

Los ratones normales responderán a las inyecciones de metacolina mediante una reducción de la tensión arterial tanto sistólica como diastólica. Tras 4 meses con la dieta Western, se realizó un estudio piloto de algunos ratones apoE^(-/-) para verificar que estaba ausente la respuesta normal a una inyección de metacolina. Cuando se hubo establecido esto, los ratones recibieron 1 mg de anexina A5 humana recombinante (Bender Medsystems, Viena, Austria)/kg de peso corporal o su vehículo (solución salina) por la mañana durante 3 días mediante inyección intraperitoneal. En el 3^{er} día, y aproximadamente 2-3 horas tras la inyección final de anexina A5/vehículo, se investigó la dilatación mediada por endotelio tal como se describió anteriormente. La figura 1 es un ejemplo de un experimento típico:

La figura 1 muestra registros representativos de la tensión arterial en un ratón apoE^(-/-) control (perfil superior) y un ratón tratado con anexina A5 (perfil inferior). Se inyectó metacolina tal como se indica mediante la línea discontinua. El ratón

tratado con anexina A5 respondió con una profunda vasodilatación, una marcada mejora en comparación con el ratón control, que apenas respondió en absoluto (paneles izquierdos). El panel a la derecha muestra que esta respuesta se inhibió mediante la administración previa del inhibidor de eNOS, L-NAME, lo que verifica que el efecto de anexina A5 sobre la dilatación mediada por endotelio estaba mediado por NO. La reducción de la tensión arterial sistólica fue mayor que la reducción de la tensión arterial diastólica.

La figura 2 resume los efectos de la anexina A5 sobre la dilatación mediada por endotelio en este modelo de angina de pecho y muestra que en los ratones apoE^(-/-) no tratados la inyección de metacolina no redujo la tensión arterial media. En cambio, los ratones apoE^(-/-) tratados con anexina A5 respondieron a la metacolina con una reducción significativa de la tensión arterial. Puesto que este efecto se bloqueaba por L-NAME, se concluyó que el efecto estaba mediado por eNOS/óxido nítrico.

La figura 3 muestra que el tratamiento con anexina A5 durante 3 días mejoró significativamente la reducción mediada por endotelio de las tensiones arteriales tanto sistólica (A) como diastólica (B).

El tratamiento con anexina A5 restauró no solo la función de las arterias de resistencia tal como se indica mediante la reducción de la tensión arterial diastólica, sino que como el efecto sobre la tensión arterial sistólica fue mayor que los efectos sobre la tensión arterial diastólica, el tratamiento farmacológico también aumentó la elasticidad de las arterias centrales.

Este estudio muestra por primera vez que la anexina A5 puede restaurar la función normal del endotelio en un modelo de ratón de arteriopatía/angina de pecho. El efecto estaba mediado por la restauración del metabolismo del NO en el endotelio. Este hallazgo muestra el potencial de la anexina A5 para ejercer efectos antiisquémicos. El tratamiento más común de la angina de pecho es restaurar el flujo sanguíneo al tejido miocárdico isquémico mediante la administración de NO exógeno, normalmente en forma de nitratos orgánicos tales como nitroglicerina. Puesto que el uso repetido de nitratos orgánicos exógenos está asociado con el desarrollo de tolerancia a los nitratos, este tratamiento se limita normalmente a situaciones isquémicas agudas. En el presente documento se ha mostrado el potencial de la anexina A5 como tratamiento antiisquémico alternativo en enfermedades vasculares en las que el metabolismo de NO normal está dificultado.

Resumen. Las anomalías de la vasomotricidad arterial debidas a dilatación mediada por endotelio alterada son comunes en la mayoría de los pacientes con enfermedad vascular isquémica. En un modelo de tal enfermedad, se encontró sorprendentemente que la anexina A5 restauraba la función mediada por endotelio alterada a través de un mecanismo dependiente de NO.

Bibliografía

1. Lerman, A. y A.M. Zeiher, Endothelial function: cardiac events. *Circulation*, 2005. 111(3): p. 363-8.
2. Landmesser, U., B. Hornig, y H. Drexler, Endothelial function: a critical determinant in atherosclerosis? *Circulation*, 2004. 109 (21 supl. 1): p. II27-33.
3. Sorensen, K.E., *et al.*, Non-invasive measurements of human endothelium dependent arterial responses: accuracy and reproducibility. *Br Heart J*, 1995. 74(3): p. 247-53.
4. Raitakari, O.T. y D.S. Celermajer, Flow-mediated dilatation. *Br J Clin Pharmacol*, 2000. 50(5): p. 397-404.
5. Ter Avest, E., A.F. Stalenhoef, y J. de Graaf, What is the role of non-invasive measurements of atherosclerosis in individual cardiovascular risk prediction? *Clin Sci (Lond)*, 2007. 112(10): p. 507-16.
6. Doshi, S.N., *et al.*, Flow-mediated dilatation following wrist and upper arm occlusion in humans: the contribution of nitric oxide. *Clin Sci (Lond)*, 2001. 101(6): p. 629-35.
7. Duplain, H., *et al.*, Insulin resistance, hyperlipidemia, and hypertension in mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*, 2001. 104(3): p. 342-5.
8. Ludmer, P.L., *et al.*, Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*, 1986. 315(17): p. 1046-51.
9. Kang, S.M., *et al.*, Relation of vasodilator response of the brachial artery to inflammatory markers in patients with coronary artery disease. *Echocardiography*, 2002. 19(8): p. 661-7.
10. Kostner, K.M., *et al.*, Inflammation, complement activation and endothelial function in stable and unstable coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 2006. 365(1-2): p. 129-34.
11. Fronck, A., D.G. DiTomasso, y M. Allison, Noninvasive assessment of endothelial activity in patients with peripheral arterial disease and cardiovascular risk factors. *Endothelium*, 2007. 14(4-5): p. 199-205.

12. Silvestro, A., *et al.*, Inflammatory status and endothelial function in asymptomatic and symptomatic peripheral arterial disease. *Vasc Med*, 2003. 8(4): p. 225-32.
13. Chobanian, A.V., Clinical practice. Isolated systolic hypertension in the elderly. *N Engl J Med*, 2007. 357(8): p. 789-96.
- 5 14. Sugawara, J., *et al.*, Effect of systemic nitric oxide synthase inhibition on arterial stiffness in humans. *Hypertens Res*, 2007. 30(5): p. 411-5.
15. Yetkin, E., *et al.*, Decreased endothelium-dependent vasodilatation in patients with migraine: a new aspect to vascular pathophysiology of migraine. *Coron Artery Dis*, 2006. 17(1): p. 29-33.
- 10 16. Yetkin, E., *et al.*, Increased dilator response to nitrate and decreased flow-mediated dilatation in migraineurs. *Headache*, 2007. 47(1): p. 104-10.
17. Philip, I., *et al.*, G894T polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with an enhanced vascular responsiveness to phenylephrine. *Circulation*, 1999. 99(24): p. 3096-8.
18. Hingorani, A.D., *et al.*, A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu298-->Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. *Circulation*, 1999. 100(14): p. 1515-20.
- 15 19. Lembo, G., *et al.*, A common variant of endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) is an independent risk factor for carotid atherosclerosis. *Stroke*, 2001. 32(3): p. 735-40.
20. Rose, K.M., *et al.*, Migraine and other headaches: associations with Rose angina and coronary heart disease. *Neurology*, 2004. 63(12): p. 2233-9.
- 20 21. Borroni, B., *et al.*, Endothelial nitric oxide synthase (Glu298Asp) polymorphism is an independent risk factor for migraine with aura. *Headache*, 2006. 46(10): p. 1575-9.
22. Giugliano, F., *et al.*, Erectile dysfunction associates with endothelial dysfunction and raised proinflammatory cytokine levels in obese men. *J Endocrinol Invest*, 2004. 27(7): p. 665-9.
23. Cederholm, A. y J. Frostegard, Annexin A5 as a novel player in prevention of atherothrombosis in SLE and in the general population. *Ann N Y Acad Sci*, 2007. 1108: p. 96-103.
- 25 24. Thiagarajan, P. y C.R. Benedict, Inhibition of arterial thrombosis by recombinant annexin V in a rabbit carotid artery injury model. *Circulation*, 1997. 96(7): p. 2339-47.
25. Rand, J.H., Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J Autoimmun*, 2000. 15(2): p. 107-11.
- 30 26. Cederholm, A., *et al.*, Decreased binding of annexin v to endothelial cells: a potential mechanism in atherothrombosis of patients with systemic lupus erythematosus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. 25(1): p. 198-203.
27. Teoh, N.C., *et al.*, Diannexin, a novel annexin V homodimer, provides prolonged protection against hepatic ischemia-reperfusion injury in mice. *Gastroenterology*, 2007. 133(2): p. 632-46.
28. Shen, X.D., *et al.*, Diannexin, a novel annexin V homodimer, protects rat liver transplants against cold ischemia-reperfusion injury. *Am J Transplant*, 2007. 7(11): p. 2463-71.
- 35 29. Vermes, I., *et al.*, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, 1995. 184(1): p. 39-51.

Lista de secuencias

<110> Athera Biotechnologies AB

5 <110> Knut Pettersson

<110> Johan Frostegård

<110> Andrew Wright

10

<120> Compuestos y métodos para el tratamiento de enfermedad vascular

<130> P42228PC

15 <150> Documento US 61/014.594

<151> 18-12-2007

<160> 1

20 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 320

<212> PRT

25 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc_feature

<223> Anexina A5 humana

30

<400> 1

ES 2 393 163 T3

Met Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly
 20 25 30

Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala
 35 40 45

Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp
 50 55 60

Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu
 65 70 75 80

Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu
 85 90 95

ES 2 393 163 T3

Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu
100 105 110

Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val
115 120 125

Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp
130 135 140

Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn
145 150 155 160

Arg Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala
165 170 175

Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu
180 185 190

Lys Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys
195 200 205

Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr
210 215 220

Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val
225 230 235 240

Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr
245 250 255

Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val
260 265 270

Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe
275 280 285

Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr
290 295 300

Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Glu Asp Asp
305 310 315 320

REIVINDICACIONES

1. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso en el tratamiento de disfunción vascular asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) reducida y/o una biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) reducida, comprendiendo el análogo o variante funcional de anexina A5 una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.
2. Uso de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento de disfunción vascular asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) reducida y/o una biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) reducida, en el que el análogo o variante funcional de anexina A5 comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.
3. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso en la reducción del dolor isquémico, comprendiendo el análogo o variante funcional de anexina A5 una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.
4. Uso de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma en la preparación de un medicamento para su uso en la reducción del dolor isquémico, en el que el análogo o variante funcional de anexina A5 comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO:1
5. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según las reivindicaciones 1 ó 3, o uso según las reivindicaciones 2 ó 4, para su uso en la reducción del riesgo de aparición de infarto agudo de miocardio (IAM).
6. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3 ó 5, o uso según las reivindicaciones 2, 4 ó 5, en el que el paciente tratado padece una enfermedad seleccionada de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil.
7. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción del riesgo de aparición de una enfermedad vascular que está asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad eNOS reducida y/o una biodisponibilidad de NO reducida, comprendiendo el análogo o variante funcional de anexina A5 una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1.
8. Uso de anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma en la preparación de un medicamento para su uso en el tratamiento, la prevención o la reducción del riesgo de aparición de una enfermedad vascular que está asociada con vasodilatación mediada por endotelio alterada, una actividad eNOS reducida y/o una biodisponibilidad de NO reducida, en el que el análogo o variante funcional de anexina A5 comprende una proteína que es idéntica en más del 90% a anexina A5 humana, SEQ ID NO: 1
9. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma según la reivindicación 7, o uso según la reivindicación 8, en el que el tratamiento reduce el riesgo de aparición de infarto agudo de miocardio (IAM).
10. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según las reivindicaciones 7 ó 9, o uso según las reivindicaciones 8 ó 9, en el que la enfermedad vascular se selecciona de angina de pecho, cardiopatía isquémica, arteriopatía periférica, hipertensión sistólica, migraña, diabetes tipo 2 y disfunción eréctil.
11. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7, 9 ó 10, o uso según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, debiendo administrarse la anexina A5 o el análogo o variante funcional de la misma conjuntamente con un producto terapéutico trombolítico tal como activador de plasminógeno tisular, urocinasa o una enzima bacteriana.
12. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 7 ó 9 a 11, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, debiendo administrarse la anexina A5 o el análogo o variante funcional de la misma conjuntamente con un agente antiplaquetario tal como clopidogrel o aspirina.
13. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 a 7, o 9 a 12, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 6, u 8 a 12, seleccionándose la anexina A5 o el análogo o variante funcional de la misma de;
 - a) anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1),
 - b) un ortólogo de mamífero de anexina A5 humana,
 - c) una variante alélica o genética de a) o b),
 - d) un análogo funcional de anexina A5 que es una proteína que es idéntica en más del 95% a anexina A5 humana, SEQ ID NO:1,

e) un dímero de, o proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d), y

f) una variante pegilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

14. Anexina A5 o análogo o variante funcional de la misma para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1, 3, 5 a 7, o 9 a 13, o uso de cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 a 6, u 8 a 13, que debe administrarse por vía parenteral, por vía intravenosa, por vía intraarterial, por vía intraperitoneal, por vía intramuscular o por vía subcutánea.

5

Fig. 1

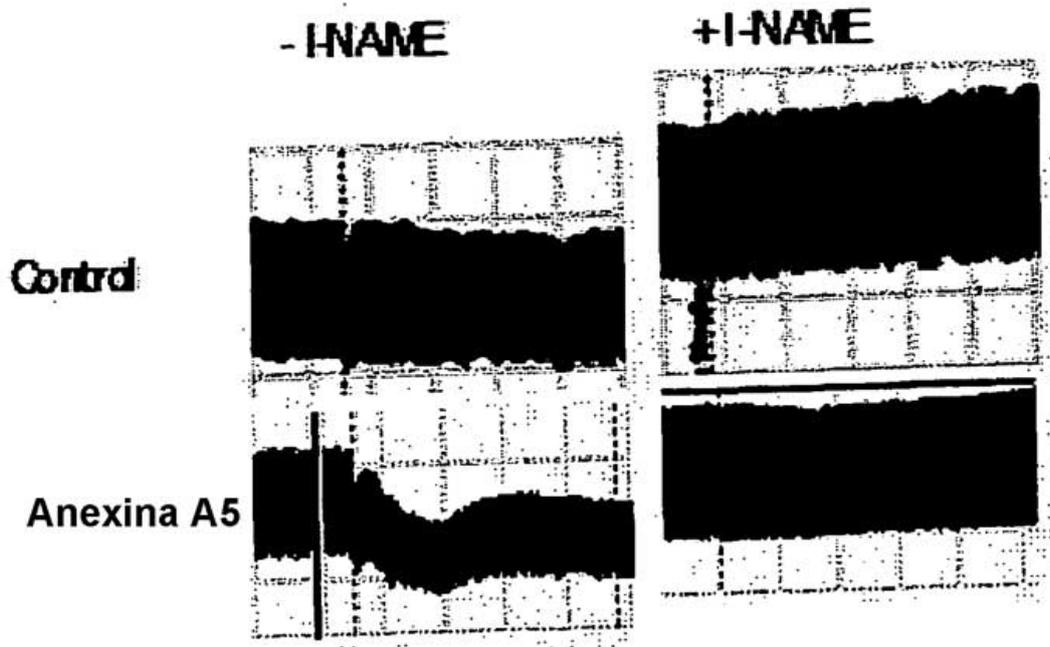


Fig. 2

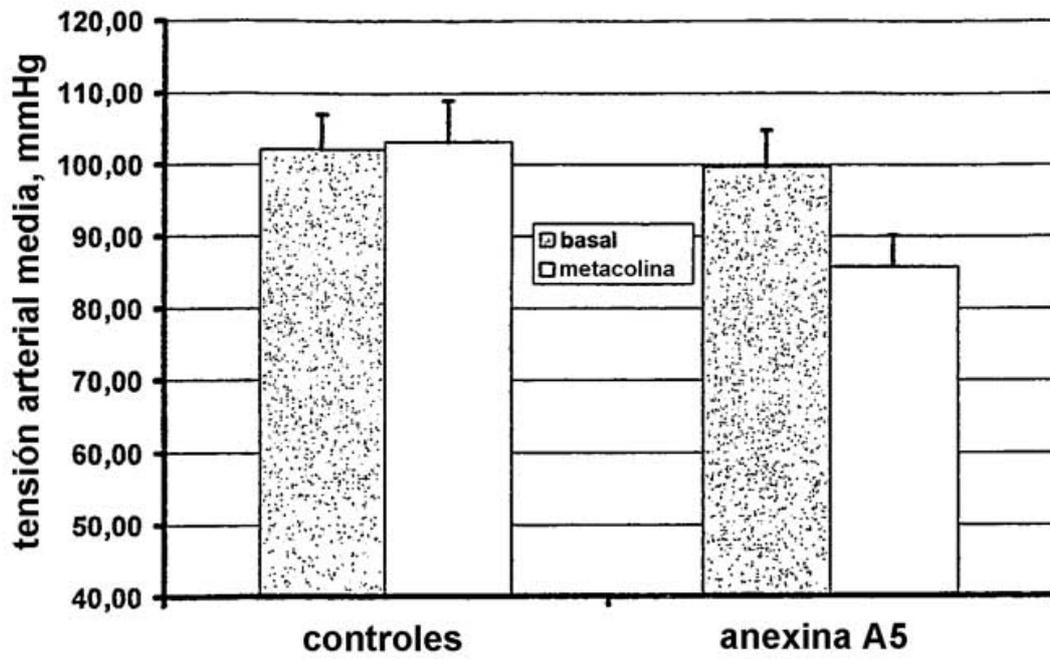
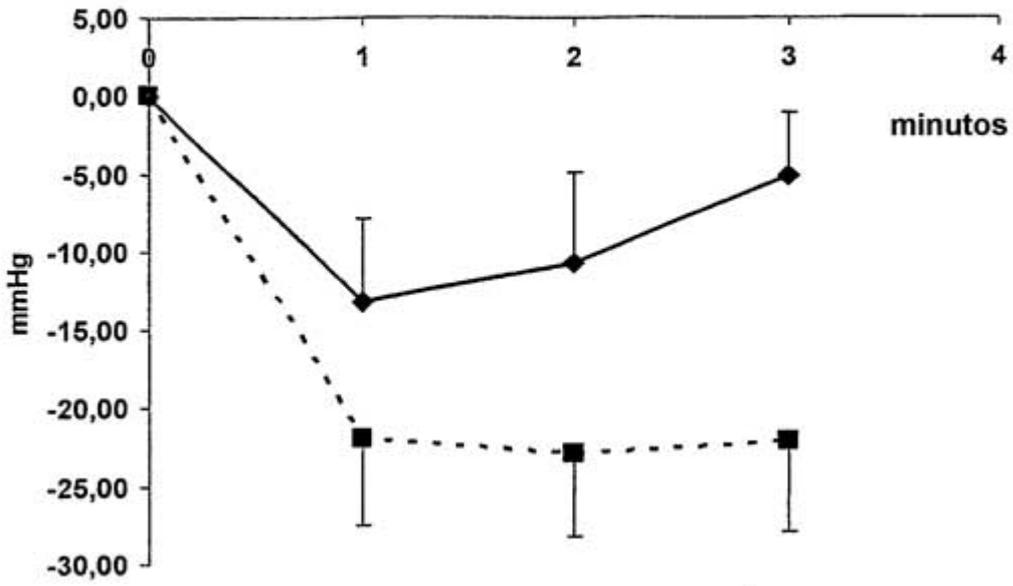


Fig. 3

A



B

