

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 398 118**

51 Int. Cl.:

A61B 6/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 49/00 (2006.01)

A61K 51/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.1998 E 07023446 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2012 EP 1905357**

54 Título: **Procedimiento de formación de imágenes de muerte celular in vivo**

30 Prioridad:

30.04.1997 US 45399 P

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

13.03.2013

73 Titular/es:

**THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND
STANFORD JUNIOR UNIVERSITY (50.0%)
STANFORD
CALIFORNIA 94305, US y
UNIVERSITY OF WASHINGTON (50.0%)**

72 Inventor/es:

**BLANKENBERG, FRANCOIS G.;
STRAUSS, H.W.;
TAIT, JONATHAN F. y
KATSIKIS, PETER D.**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 398 118 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

Procedimiento de formación de imágenes de muerte celular *in vivo*

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de anexina radiomarcada para la formación de imágenes de regiones de una muerte celular en un mamífero utilizando formación de imágenes por rayos gamma.

Referencias

Amann, E. y Brosius, J., *Gene* 40: 183 (1985).

Asselin, B.L., et al., *Cancer Res.* 49 : 4363 (1989).

10 Ausubel, F.M., et al., *Protocolos actuales en Biología Molecular [Current Protocols in Molecular Biology]* (John Wiley and Soon, Inc., Media, PA).

Babich, J.W., et al., *Journal of Nuclear Medicine* 34: 1954 (1993).

Ballon, D., et al., *Magn. Reson. Med.* 19: 85 (1991)

Barrow, S.A., et al., *J. Nucl. Med.* 34: 1975 (1993).

Beames, et al., *Biotechniques* 11:378 (1991).

15 Bindl, J. M. & Warke, R.A., *Am. J. Clin. Pathol.* 85: 490 - 493 (1986).

Blankerberg, F.G., et al., *Blood* 87: 1951 (1996).

Borenstain - Ben Yashar, V., et al., *Am. J. Hematol.* 44: 63 (1993).

Connor, J., et al., *J. Biol. Chem.* 267: 19412 (1992).

D'Amico, A.V., y McKenna, W.G., *Radiotherapy and Oncology* 33: 3 (1994).

20 Darzynkiewicz, Z.J. *of Cell Biochem.* 58: 151 (1995).

Darzynkiewicz, Z., et al., *Methods in Cell Biology* 41: 15 (1994).

Dive, C., et al., *Biochim et Biophys Acta* 1133: 275 (1992).

Du, C., et al., *J. Cereb. Blood Flow and Metab.* 16 : 195 - 201 (1996).

Fadok, V.A., et al., *J. of Immunol.* 148: 2207 (1992).

25 Fadok, V.A., et al., *J. of Immuno.* 149: 4029 (1992).

Fadok, V.A., et al., *J. of Immunol.* 151: 4274 (1993).

Fischman, et al., *J. Nucl. Med.* 32 : 482 - 491 (1991).

Funakoshi, T., et al., *Biochemistry* 26: 5572 (1987).

Funk, G.M., et al., *J. Lipid Res.* 27 : 792 (1986).

30 Gavrieli, Y., et al., *J. Cel Biol.* 119 : 493 - 501 (1992).

Geng, Y.-J., et al., *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biol.* 15: 1995 (1995).

Harlow, E., et al., *ANTICUERPOS: UN MANUAL DE LABORATORIO [ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL]*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988).

Hnатовich, D.J., et al., *J. Immunol, Meth.* 65: 147 (1983).

35 Jensen, K.E., et al., *Magn. Reson. Imaging*, 8: 779 (1990).

Koopman, G., et al., *Blood* 84 (5): 1415 - 1520 (1994).

Lacronique, V., et al., *Nature Med.* 2 (1) : 80 (1996).

LaMuraglia, et al., *J. Vasc. Surg.* 10: 20 - 28 (1989).

- Lane, A., et al., *Am. J. Hematol.* 47: 295 (1994).
- Larson, S.K., et al., *Bioconjugate Chem.* 6: 635 - 638 (1995).
- Lind, et al., *J. Nucl. Med.* 31: 417 - 473 (1990).
- Maloney, D.G., et al., *Hybridoma* 4: 191 - 209 (1985).
- 5 Martin, S.J., et al., *J. Exp. Med.* 182 : 1545 (1995).
- May, G.L., et al., *J. Biochem.* 261 : 3048 (1986).
- Mettler, F.A. and m.J. Guiberteau, *ELEMENTOS ESENCIALES DE LA FORMACIÓN DE IMÁGENES EN MEDICINA NUCLEAR. [ESSENTIALS OF NUCLEAR MEDICINE IMAGING, Second Edition]*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA (1985)
- 10 Mirkovic, N., et al., *Radiotherapy and Oncology* 33: 11 (1994).
- Mitchell, K.T., et al., *Anal. Biochem.* 158: 447 (1986).
- Momers, C., et al., *Biochem et Biophys Acta* 551: 271 (1979).
- Mountford, C.E., and Tattersall, M.H.N., *Cancer Surv.* 6: 285 (1987).
- Mulkern R.V., et al., *J. Magn. Reson. Imaging* 4 : 585 (1994).
- 15 Mullins, K.B., et al., Patente estadounidense No. 4,683,195, concedida el 28 de julio de 1987.
- Mullis, K.B., Patente estadounidense No. 4,683,202, concedida el 28 de julio de 1987.
- Narula, J., et al., *New Engl. J. Med.* 335: 1182 (1996).
- Naumovski, L., and Cleray, M.L., *Blood* 83: 2261 (1994).
- Niemeyer, C.M., et al., (Protocolo 81 - 01 Actualización) [(Protocol 81-01 Update] *Blood*) 78: 2514 (1991).
- 20 Ogasawara, J., et al., *Nature* 364: 806 (1993).
- Pak, C.C. y I.J. Fidler, *Semin Cancer Biol.* 2: 189 (1991).
- Perillo, N.L., et al., *Nature* 378: 736 (1995).
- Reilly, P.R., et al., en *VECTORES DE EXPRESIÓN BACULOVÍRICA: UN MANUAL DE LABORATORIO [in BACULOVIRUS EXPRESSION VECTORS : A LABORATORY MANUAL]* (1992).
- 25 Rodriguez, I., et al., *J. Exp. Med.* 184: 2067 - 2072 (1996).
- Sambrook, J., et al.. *CLONACIÓN MOLECULAR: UN MANUAL DE LABORATORIO [MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Second Edition]*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1989).
- Schick, F., et al., *Magn. Reson. Med.* 26: 207 (1992)
- Schwartz, D.A., et al., *Bioconjugate Chem.* 2: 333 (1991).
- 30 Seigneuret, M., and P.F. Devaux, *Proc. National Acad. Sci. USA* 81 : 3751 (1984).
- Seiter, K., et al., *Leukemia* 9: 1961 (1995).
- Smith, D.B., et al., *Gene* 67: 31 (1988).
- Stark, R.E., et al., *J. of Physical Chemistry* 89: 272 (1985).
- Stark, R.E., et al., *Biochemica et Biophysica Acta* 860: 399 (1986).
- 35 Stephens, L.C., et al.,. *Radiation Res.* 135 : 75 (1993).
- Stratton, J.R., et al., *Circulation* 92 : 3113 - 3121 (1995).
- Tait, J.F., "Aplicaciones Clínicas de las Anexinas", en *ANEXINAS: ESTRUCTURA MOLECULAR PARA LA FUNCION CELULAR ["Clinical Applications of Annexins", in ANNEXINS: MOLECULAR STRUCTURE TO CELLULAR FUNCTION]* (Seaton, B.A., Ed.) R.G. Landes Company (1996).

- Tait, J.F. and Gibson, D., J. Lab. Clin. Med. 123: 741 (1994).
- Tait, J.F. and Smith, C., Arch. Biochem. Biophys. 288: 141 (1991).
- Tait, J.F., et al., J. Biol. Chem. 264: 7944 (1989).
- Tait, J.F., et al., Biochem 27 : 6268 (1988).
- 5 Thompson, C.B., Science 267 : 1456 (1995).
- Verhoven, B., et al., J. Experimental Med. 182: 1597 (1995).
- Wang, Z.Q., et al., European Journal of Immunology 24: 1549 (1994).
- Williamson, P., and Schlegel, R.A., Molecular Membrane Biology 1: 199 (1994).
- Wood, B.L., et al., Blood 88: 1873 - 1880 (1996).
- 10 Woodley, S.L., et al., Transplantation 56: 1443 - 1447 (1993).
- Young, T.L. & Santella, R.M., Carcinogenesis 9: 589 - 592 (1988).
- Zwaal, R.F.A., and Schroit, A.J., Blood 89 (4) : 1121 - 1132 (1997).
- Zwaal, R.F.A., et al., Biochem. Soc. Trans. 21: 248 (1993).

Antecedentes de la invención

- 15 La apoptosis o muerte celular programada juega un papel crucial en el desarrollo de una pluralidad de procesos patológicos y homeostáticos (Thompson, 1985). Por tanto, pueden ser posibles nuevas estrategias terapéuticas de una diversidad de enfermedades mediante la modulación de la muerte celular apoptótica. El estudio de nuevos agentes farmacológicos para promover o inhibir la muerte celular apoptótica ha resultado impedido por la falta de un (unos) procedimiento(s) no invasivo(s) para detectar y controlar la muerte celular apoptótica *in vivo*.
- 20 La espectroscopia por resonancia magnética nuclear de protones lípidos (¹H NMRS) ha resultado ser de utilidad en la detección de los cambios de composición específicos y / o de la fluidez de la membrana plasmática de los linfoblastos u otras estirpes celulares sometidas a una muerte celular apoptótica (Blankenberg, *et al.*, 1996). El uso clínico de la apoptosis mediante el estudio de la ¹H NMRS de los lípidos está en la actualidad limitada por complejos microentornos locales magnéticos encontrados de forma natural en muchos tejidos y órganos.
- 25 La presente invención se define mediante las reivindicaciones.
- Radionúclidos útiles en el procedimiento incluyen el Yodo 123, el Yodo 131, el Galio 67, el Indio 111, el Flúor 18, y el Tecnecio 99 m (Tc99m). Debe apreciarse que el Flúor 18 es un emisor de positrones y, por tanto, resulta útil en la tomografía por emisión de positrones (PET). El Yodo 123, el Yodo 131, el Galio 67, el Indio 111 y el Tecnecio 99 m son útiles en la detección de emisiones gamma estándar. El Tc99m es un radionúclido preferente para su uso en la
- 30 invención. En una forma de realización preferente, el Tc99m está unido a la anexina por medio de la hidrazino nicotinamida (HYNIC). La anexina mercada con Tc99m es típicamente administrada en una dosis de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 20 mCi.
- El dispositivo detector de las radiaciones puede ser un dispositivo detector de rayos gamma y la emisión de las radiaciones medidas es la emisión de rayos gamma. El dispositivo detector de las radiaciones puede ser un
- 35 dispositivo detector de la emisión de positrones y la emisión de las radiaciones medidas es una medición de positrones.
- Las etapas (b) y (c) pueden ser repetidas a intervalos seleccionados, en los que la repetición sea eficaz para realizar el seguimiento de los cambios de la intensidad de la emisión de las radiaciones (por ejemplo, la emisión de rayos gamma o de positrones) desde la región a lo largo del tiempo, reflejando los cambios en el número de células
- 40 sometidas a la muerte celular.
- Las etapas (b) y (c) pueden ser repetidas a intervalos seleccionados, en las que la repetición sea eficaz para realizar el seguimiento de los cambios de la localización de la emisión de rayos gamma en la región a lo largo del tiempo, reflejando los cambios en la localización de las células sometidas a una muerte celular.
- 45 El dispositivo detector de las radiaciones puede ser por ejemplo un equipo de gammagrafía Anger o una cámara de formación de imágenes en 3 dimensiones.
- Una anexina preferente para su uso en la invención es la anexina V. Típicamente es administrada en dosis inferiores a aproximadamente 300 µg proteína / kg, de modo preferente entre aproximadamente 1 y 10 µg proteína / kg. Son

posibles diversas vías de administración, incluyendo la administración intravenosa (i.v.), intraperitoneal (i.p.), intralumbal, e intrapleural.

5 La medición de la emisión de rayos gamma para construir una imagen se lleva típicamente a cabo entre aproximadamente 5 minutos y 2 horas después de la administración de la anexina marcada. En una forma de realización, la medición de la medición de rayos gamma para construir la imagen se lleva a cabo aproximadamente 1 hora después de la administración de anexina marcada.

10 Diferentes partes de la persona pueden ser representadas por imagen utilizando el procedimiento divulgado en la presente memoria. Por ejemplo, la región puede incluir sustancialmente la totalidad de la persona, o una parte de la persona, como por ejemplo la cabeza o una parte de la misma, el corazón o una parte del mismo, el hígado o una parte del mismo, y similares.

15 La invención, así mismo, proporciona un kit para la formación de imágenes de una muerte celular *in vivo*. El kit incluye (i) un frasco cerrado herméticamente que contiene una anexina marcada por HYNIC, preparada, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito en la sección de Materiales y Procedimientos (A), (ii) un frasco cerrado herméticamente que contiene una solución de tricina de Sn, por ejemplo, de acuerdo con lo descrito en la Sección de Materiales y Procedimientos (B), y mantenida con N₂, (iii) instrucciones para elaborar la anexina marcada con Tc-99m utilizando los componentes de (i) y (ii) junto con el Tc-99m y (iv) instrucciones para la administración de la anexina Tc-99m en las áreas de formación de imágenes de la muerte de las células *in vivo*. En una forma de realización, el kit es mantenido a -70° C y expedido sobre anhídrido carbónico sólido. En otra forma de realización, la anexina marcada con HYNIC es liofilizada.

20 Estos y otros objetivos y características distintivas de la invención se pondrán de manifiesto de forma más acabada tras la lectura de la descripción detallada subsecuente en combinación con los dibujos que se acompañan.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 es una imagen generada por computadora que muestra una apoptosis hepática fulminante con la intervención de Fas tal y como ha sido detectada con la anexina V con HYNIC con Tc99m.

25 La Figura 2 es una imagen generada por computadora que muestra la señal procedente de la ovoalbúmina con HYNIC con Tc99m durante la apoptosis hepática fulminante con la intervención del Fas.

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

30 El término “muerte celular ” en el contexto de “detección de una muerte celular ” o “localización de una muerte celular ” se refiere a las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática así como a los procesos mediante los cuales las células de los mamíferos mueren. Dichos procesos incluyen la apoptosis y los procesos que se consideran implicados en la apoptosis (por ejemplo la senescencia de las células), así como la necrosis. La “muerte de las células” se utiliza en la presente memoria para referirse a la muerte o a la muerte inminente de las células nucleadas (por ejemplo neuronas, miocitos, hepatocitos, etc.), así como a la muerte o a la muerte inminente de células anucleadas (por ejemplo, los hematocitos, las plaquetas, etc.).

35 Un “radionúclido biocompatible” o un “radioisótopo biocompatible” es un isótopo que se reconoce como útil para su inyección en un paciente para aplicaciones de medicina nuclear. Por ejemplo radionúclidos biocompatibles incluyen el Yodo 123, el Yodo 131, el Galio 67, el Indio 111, el Flúor 18 y el Tecnecio 99 m.

II. Muerte de las Células - Apoptosis y Necrosis

40 Apoptosis se refiere a la “muerte programada de las células”, por medio de la cual la célula ejecuta un programa de “suicidio de la célula”. En la actualidad se considera que el programa de apoptosis se conserva de manera evolutiva entre virtualmente todos los organismos multicelulares, así como entre todas la células de un organismo concreto. Así mismo, se cree que, en muchos casos, la apoptosis puede ser un programa “por defecto” que debe ser impedido de forma activa en células que sobreviven sanas.

45 La decisión por parte de una célula de someterse a la apoptosis puede ser influenciada por una diversidad de estímulos regulatorios y de factores medioambientales (Thompson, 1995). Los activadores fisiológicos de la apoptosis incluyen el factor de necrosis de los tumores (TNF), el ligando Fas, la transformación del factor de crecimiento β, los neurotransmisores del glutamato, la dopamina, el N - metil - D - aspartato, la retirada de los factores de crecimiento, la pérdida de la fijación de la matriz, del calcio y de los glucocorticoides. Inductores de la apoptosis relacionados con las lesiones incluyen el choque térmico, la infección viral, las toxinas bacterianas, los oncogenes *myc*, *rel* y *E1A*, supresor tumoral p53, células T citolíticas, oxidantes, carencia de radicales libres y nutrientes (antimetabolitos). Los inductores de la apoptosis asociados con la terapia incluyen la radiación gamma, la radiación UV y una diversidad de fármacos antineoplásicos, incluyendo el cisplatino, la doxorubicina, la bleomicina,

el arabinosido de citosina, la mecloretamina, el metotrexato y la vincristina. Los inductores de la apoptosis relacionados con las toxinas incluyen el etanol y el péptido amiloide - β .

5 La apoptosis puede tener unas consecuencias especialmente devastadoras cuando se produce de manera patológica en células que no se regeneran normalmente, como por ejemplo las neuronas. Debido a que dichas células no son sustituidas cuando mueren, su pérdida puede conducir a una disfunción debilitante y algunas veces fatal del órgano afectado. Dicha disfunción se evidencia en una pluralidad de desórdenes neurodegenerativos que han sido asociados con un aumento de la apoptosis incluyendo la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica, la retinitis pigmentaria y la degeneración cerebulsosa.

10 Las consecuencias de la apoptosis no deseada pueden ser también igualmente devastadoras en otras patologías, incluyendo la lesión isquémica, tal y como se produce habitualmente en casos de infarto de miocardio, lesión por revascularización y accidente cerebrovascular. En particular, se cree que la apoptosis juega un papel central en el infarto muy retardado después de una isquemia focal ligera (Du, *et al.*, 1996). Patologías adicionales asociadas con el aumento de la apoptosis incluyen, pero no se limitan a, las siguientes: SIDA; síndromes mielodisplásicos, como por ejemplo la anemia aplásica; la hepatopatía inducida por toxinas, incluyendo los daños debidos al consumo excesivo de alcohol.

15 La necrosis es la muerte localizada de células o tejido debida a causas distintas de la apoptosis (esto es, distintas de la ejecución del programa suicida intrínseco de la célula). La necrosis puede ser causada por lesión traumática, infección bacteriana, hipoxia aguda y similares. Hay un cierto solape entre los dos tipos de muerte de las células, en el sentido de que los estímulos pueden provocar o bien necrosis o bien apoptosis o parte de ambas, dependiendo de la gravedad de la lesión.

20 III. Asimetría de las Membranas Biológicas

En general se cree que las membranas biológicas son asimétricas con respecto a los fosfolípidos específicos de la membrana. En particular, la lámina externa de las membranas plasmáticas eucarióticas se forma, de manera predominante, con los colina fosfolípidos, como por ejemplo la esfingomielina y la fosfatidilcolina (PC), mientras que la lámina interna contiene, de modo predominante, aminofosfolípidos, como por ejemplo fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE). Esta asimetría se considera que transporta de manera selectiva la PS y la PE entre las láminas de dos caras (Seigneuret y Devaux, 1984). Otras enzimas que se considera implicadas en el transporte de fosfolípidos entre las láminas incluyen la flopasa dependiente del ATP (Connor *et al.*, 1992) y la escramblasa lipídica (Zwaal, *et al.*, 1993).

30 Aunque la asimetría resulta ser la regla para las células normales, la pérdida de dicha asimetría está asociada con determinados procesos fisiológicos así como patogénicos. Por ejemplo, se ha llegado al convencimiento de que la asimetría de las membranas, detectada como aparición de la PS sobre la lámina externa de la membrana plasmática ("exposición de la PS"), es una de las manifestaciones más tempranas de la apoptosis, precediendo a la fragmentación del ADN, la formación de vesículas en la membrana plasmática, y la pérdida de la integridad de la membranas (Martin, *et al.*, 1995; Fadok, *et al.*, 1992).

35 Una reorientación similar se ha observado en la patología drepanocítica (Lane *et al.*, 1994), la talasemia - β (Borenstain - Ben Yashar, *et al.*, 1993), la activación de las plaquetas, y en algunas estirpes celulares tumorales mutantes con un transporte de la PS defectuoso. Una aparición gradual de la PS sobre la lámina externa se ha observado que también se produce en glóbulos rojos seniles (Tait y Gibson, 1994). Cuando la exposición a la PS sobre ciertas células alcanza un nivel de umbral, las células son retiradas de la circulación por los macrófagos (Pak y Fidler, 1991).

Todas las anomalías expuestas culminan de manera inmediata en la muerte de las células afectadas (esto es, las células con una exposición a la PS considerable).

45 Debe apreciarse que la exposición a la PS es un componente tanto de la apoptosis como de la necrosis. Su papel en las etapas iniciales de la apoptosis se ha resumido en las líneas anteriores. Una vez que la célula apoptótica ha alcanzado las etapas terminales de la apoptosis (esto es, la pérdida de la integridad de la membrana), se apreciará que la PS en ambas láminas de la membrana plasmática quedarán "expuestas" al medio extracelular. Una situación similar se produce en la muerte de las células por necrosis, donde la pérdida de la integridad de las membranas es o bien el factor inicial o bien se produce precozmente en el proceso de la muerte de las células necróticas; de acuerdo con ello, dichas células necróticas presentan, así mismo, una PS "expuesta", dado que ambas láminas de la membrana plasmática están "expuestas".

50 IV. Anexina

La familia de las anexinas de las proteínas es de utilidad en la práctica de la presente invención. La anexina V se encuentra normalmente en elevados niveles en el citoplasma de una pluralidad de células que incluyen la placenta, los linfocitos, y el epitelio tubular biliar renal (cortical). Aunque la función fisiológica de las anexinas no se ha aclarado totalmente, diversas propiedades de las anexinas las hacen útiles como agentes diagnósticos y / o terapéuticos. En particular, se ha descubierto que las anexinas poseen una afinidad muy elevada con las superficies

fosfolípicas aniónicas, como por ejemplo una lámina de membrana que presente una superficie expuesta de fosfatidilserina (PS).

V. Panorámica de los Resultados Experimentales

5 Los experimentos llevados a cabo en apoyo a la presente invención han demostrado que la administración de la anexina radiomarcada puede ser utilizada para la formación de imágenes de una muerte de las células *in vivo*. Por ejemplo, los experimentos del Ejemplo 1 describen la formación de imágenes y la cuantificación de la muerte de hepatocitos con intervención del Fas en respuesta a la inyección del anticuerpo Jo 2 purificado en ratones (Okasawara, *et al.*, 1993). Los resultados de estos experimentos (véase, por ejemplo, la FIG. 1) mostraron la duplicación y la cuadruplicación de la absorción hepática de la anexina V radiomarcada en una o dos horas, respectivamente, debido en concreto a la muerte de los hepatocitos con la intervención del Fas después de la inyección del anticuerpo Jo 2. Así mismo, se observó una duplicación transitoria de la absorción esplénica temprana después del tratamiento, la cual posteriormente cayó hasta los valores de control. Esta declinación de la señal procedente del bazo puede haberse debido a una rápida depuración de los linfocitos de la circulación y esplénicos en respuesta a una eclosión de la apoptosis con intervención del FAS después del tratamiento.

15 El enlace de la anexina fue, así mismo, observado en los riñones. Sin embargo, ese enlace se produjo en presencia de cualquier estímulo inductor de la apoptosis y, de hecho, decreció cuando aumentó la señal de los hepatocitos. La reducción progresiva de la actividad renal con el tiempo después de la administración de la Ab anti-FAS, junto con el aumento de la absorción hepática en el mismo periodo, implica que la afinidad renal no relacionada con la apoptosis respecto de la anexina V es inferior a la del tejido apoptótico. El enlace cortical renal de la anexina V inyectada puede ser debida en parte a la reactividad cruzada de la anexina con el fosfolípido tubular renal.

20 Debe destacarse que hubo escasa excreción renal de la anexina marcada, lo que indicaría que la radiomarca (en este caso, el Tc99m), permaneció vinculada a la anexina mientras duraron los experimentos. Así mismo, la anexina inyectada marcada con el Tc99m fue rápidamente depurada del torrente sanguíneo, ofreciendo una semivida sérica de aproximadamente de 3 a 7 minutos. Estos factores permitieron la formación de imágenes de la señal radiofarmacéutica de 1 a 2 horas después de su administración.

25 Las características descritas con anterioridad hacen posible unos estudios de formación de imágenes seriadas diarios (o cada dos días) cada uno de los cuales representan una instantánea de la actividad apoptótica de un tejido u órgano de interés en el momento de la inyección de la anexina V radiomarcada.

VI. Formación de Imn Vivo de Muerte Celular

30 La presente invención incluye, en un aspecto, el uso de anexina marcada con un radionúclido biocompatible para la propagación de un agente diagnóstico apropiado para su uso en un procedimiento de formación de imágenes *in vivo* de una muerte celular (debida, por ejemplo, a apoptosis o necrosis) en una región de un sujeto mamífero. En el procedimiento, una anexina radiomarcada (por ejemplo, una anexina V marcada con Tecnecio 99m) es administrada al sujeto. Después de un periodo de tiempo en el cual el conjugado puede alcanzar la localización en el sujeto, el sujeto es situado dentro del campo de detección de un dispositivo detector de rayos gamma. El sujeto es mantenido en una posición inmovilizada mientras la emisión de rayos gamma procedente del tecnecio 99m es medida utilizando el dispositivo detector de rayos gamma. Después de la fase de medición, se construye una imagen de la emisión de rayos gamma. La imagen construida de esta manera es, a continuación, utilizada para proporcionar al facultativo responsable un mapa o una localización de áreas de la muerte celular del sujeto mamífero o de la región del sujeto mamífero que está siendo analizada.

35 Para facilitar la interpretación de una imagen obtenida mediante la utilización del procedimiento expuesto, la imagen puede ser procesada de forma digital para filtrar el fondo, el ruido y / o una localización no específica (por ejemplo, una localización del riñón) del conjugado de la anexina / Tc99m de acuerdo con lo descrito con mayor detalle más adelante.

45 Una ventaja del procedimiento expuesto es que, mediante la medición de los rayos gamma y la formación de una imagen a intervalos seleccionados, el procedimiento puede ser utilizado para realizar el seguimiento de los cambios de la intensidad de la emisión de rayos gamma procedente del sujeto a lo largo del tiempo, reflejando los cambios en el número de células experimentados por la muerte de las células. Dicho sistema puede, así mismo, ser utilizado para efectuar el seguimiento de los cambios de la localización de la emisión de rayos gamma procedente del sujeto a lo largo del tiempo, reflejando los cambios en la distribución de las células sometidas a la muerte celular.

A. Síntesis de la Anexina radiomarcada

La invención puede ponerse en práctica utilizando una anexina natural purificada, recombinante, o preparada de forma sintética. La anexina V, por ejemplo, puede ser purificada de forma conveniente a partir de la placenta humana (Funakosh, *et al.*, 1987). La anexina recombinada ofrece varias ventajas, sin embargo, incluyendo la facilidad de preparación y su rentabilidad económica. Una pluralidad de diferentes anexinas, han sido clonadas de seres humanos y otros organismos. Sus secuencias se encuentran disponibles en bases de datos de secuencias, incluyendo GenBank.

- La invención se lleva a la práctica, de modo preferente, utilizando la anexina V, por varias razones. En primer lugar, la anexina V es una de las anexinas más abundantes, (ii) es sencilla de fabricar a partir de fuentes naturales o recombinadas y, (iii) presenta una elevada afinidad para las membranas fosfolipídicas (Tait, *et al.*, 1988). La anexina V humana tiene un peso molecular de 36 kd y una elevada afinidad ($k_d = 7 \text{ nmol} / \text{L}$) para la forfatidilserina(PS). La secuencia de la anexina V humana se puede obtener del GenBank bajo los números de acceso U05760 - U05770.
- Un sistema de expresión ejemplar apropiado para fabricar la anexina para su uso en la presente invención se designa en el apartado de Materiales y Procedimientos. Emplea el vector de expresión pET12a (Novagen, Madison, Wisconsin) en *E. Coli*.
- Así mismo, pueden ser utilizados otros vectores de expresión. Incluyen, por ejemplo, el pGEX plásmido (Smith, *et a.*, 1988) y sus derivados (por ejemplo, la serie pGEX en Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Estos vectores expresan las secuencias de polipéptidos de un inserto clonado fundido enmarcado con glutatión - S - transferasa. Los plásmidos pGEX recombinantes pueden ser transformados en unas cepas apropiadas de *E. coli* y la producción de proteínas de condensación puede ser inducida mediante la adición de IPTG (isopropiltio galactopiranoside). La proteína de condensación recombinante solubilizada puede, a continuación, ser purificada de los lisados celulares de los cultivos inducidos utilizando cromatografía de afinidad con glutatión-agarosa de acuerdo con procedimientos estándar (Ausubel, *et al.*). Otros sistemas de expresión comercialmente disponibles incluyen los sistemas de expresión de levadura, como por ejemplo el kit de expresión *Pichia* en Invitrogen (San Diego, CA); sistemas de expresión de baculovirus (Reilly, *et al.*; Beames, *et al.*; Clontech, Palo Alto, CA); y sistemas de expresión de células mamíferas (Clontech, Palo Alto, CA; Gibco, BRL, Gaithersburg MD).
- Una pluralidad de elementos característicos pueden ser genomanipulados en vectores de expresión, como por ejemplo secuencias líder que promuevan la secreción de las secuencias expresadas en un medio de cultivo. Los polipéptidos producidos de forma recombinada son típicamente aislados de las células lisadas o de los medios de cultivo.
- Los polipéptidos recombinantes aislados de acuerdo con lo descrito anteriormente pueden ser purificados mediante procedimientos estándar de purificación de la proteína, incluyendo la precipitación diferencial, la cromatografía de tamiz molecular, la cromatografía de intercambio iónico, la focalización isoelectrica, la electroforesis en gel y la cromatografía de afinidad. Las preparaciones de la proteína pueden, así mismo, ser concentradas mediante, por ejemplo, filtración (Amicon, Danvers, Mass.).
- La anexina producida de acuerdo con lo descrito con anterioridad es, a continuación, marcada con un radionúclido seleccionado. El isótopo concreto seleccionado dependerá de la aplicación concreta del procedimiento reivindicado.
- La invención puede ser llevada a la práctica con uno cualquiera entre una diversidad de radionúclidos actualmente disponibles. Al seleccionar un radionúclido apropiado, el facultativo típicamente tendrá en cuenta la aplicación concreta de la invención, junto con los factores comunes a la formación de imágenes nucleares en general. Dichos factores incluyen (i) el mínimo de emisión de partículas, (ii) una energía fotónica primaria de entre aproximadamente 50 y 500 keV, (iii) una semivida física mayor que el tiempo requerido para preparar el material destinado a la administración, (iv) una semivida eficaz más larga que el tiempo de examen, una forma y una reactividad química apropiadas, una baja toxicidad y la estabilidad o la cuasiestabilidad de la anexina marcada con ese radionúclido.
- Un radionúclido ejemplar es el Tc99m el cual tiene una semivida de aproximadamente 6 horas y puede ser utilizado para marcar la anexina para actividades muy específicas. Satisface la mayoría de los criterios expuestos y se utiliza en más del 80% de los procedimientos de formación de imágenes de medicina nuclear. Otros isótopos que pueden ser utilizados incluyen el Yodo 123 (semivida de ~ 13,2 horas), el Yodo 131 (semivida de ~ 8 días), el Galio 67 (semivida de ~ 78 horas), y el Indio 111 (semivida de ~ 2,8 días).
- El enlace del isótopo con la anexina puede llevarse a cabo utilizando técnicas conocidas. Por ejemplo, el Tc99m puede ser enlazado con la anexina mediante el uso de un grupo de hidrazino nicotinamida (HYNIC), disponible, por ejemplo en AnorMed, Langley, Britihs Columbia, Canadá, de acuerdo con lo descrito más adelante, en la sección de Materiales y Procedimientos. El Galio 67 y el Indio 111 pueden ser utilizados para radiomarcas proteínas utilizando, por ejemplo, el procedimiento descrito con Anatwich *et al.*, 1983, incorporado en la presente memoria por referencia.
- Son conocidos otros procedimientos para marcar proteínas con radionúclidos. Por ejemplo, la Patente estadounidense No. 5,552,525, concedida el 3 de septiembre de 1996 (Dean), da a conocer la fabricación de péptidos marcados con tecnecio 99m (Tc-99m). Así mismo, se divulgan procedimientos para el marcado de péptidos y polipéptidos con Tc99m divulgados en las Patentes estadounidenses Nos. 5,443,815 y 5,508,020. Lind *et al.*, (1990) dan a conocer anticuerpos monoclonales marcados con Tc-99m. La Muraglia, *et al.*, (1989) dan a conocer la inmunoglobulina humana no específica ¹¹¹intrínsecamente marcada, y Fishamn, *et al.* (1991), dan a conocer conjugados de DTPA ¹¹¹intrínsecamente marcadas de péptido de fornilo quimiotáctico.

B. Administración de la Anexina Radiomarcada

La anexina radiomarcada puede ser administrada utilizando protocolos estándar para la administración de compuestos radiomarcados. La dosificación depende de dos consideraciones fundamentales: (i) la cantidad y el tipo del radionúclido inyectado, y (ii) la cantidad de la proteína de anexina inyectada.

- 5 El Tecnecio 99m puede ser administrado a humanos adultos en dosis de hasta aproximadamente 20 nCi. La dosis preferente para una administración de Tc99m oscila entre aproximadamente 5 y 20 nCi.

10 La anexina V empieza a presentar efectos farmacológicos (efectos anticoagulantes) a dosis superiores a aproximadamente 300 µg / kg. De acuerdo con ello, los procedimientos de diagnóstico de la presente invención (los cuales buscan evitar los efectos farmacológicos de la anexina marcada) se llevan, de modo preferente a la práctica, en dosis inferiores a 300 µg / kg, típicamente inferiores a aproximadamente 50 µg / kg. Dichas dosis del marcador (por ejemplo, 10 µg / kg a 50 µg / kg) no hay noticias de que presenten efectos farmacológicos o tóxicos colaterales en animales o personas.

15 La anexina radiomarcada es típicamente suspendida en un vehículo de administración apropiado, como por ejemplo una solución salina estéril. El vehículo puede, por ejemplo, contener agentes estabilizantes, portadores, excipientes, estabilizadores, emulgentes, y similares, como es conocido en la técnica.

20 La anexina radiomarcada puede ser administrada por cualquiera de las diversas vías conocidas como eficaces para la administración de proteínas radiomarcadas para la formación de imágenes en medicina nuclear. Un procedimiento de administración preferente es la inyección intravenosa (i.v.). Está especialmente indicado para la formación de imágenes de órganos internos bien vascularizados, como por ejemplo el corazón, el hígado, el bazo, etc. Son conocidos los procedimientos para la inyección i.v. de radiofármacos. Por ejemplo, es conocido que un fármaco radiomarcado típicamente administrado como una inyección intravenosa rápida utilizando ya sea el procedimiento Oldendorf / Tourniquet ya sea mediante el procedimiento de empuje ultravenoso (véase, por ejemplo, Mettler y Guierbteau, 1985 Apéndice D).

25 Para la formación de imágenes del cerebro, la anexina marcada puede ser administrada por vía intralumbar. La administración intralumbar distribuye el compuesto directamente en el espacio subaracnoideo que contiene el líquido cefalorraquídeo (CSF). La distribución en las regiones de la médula espinal puede, así mismo, ser llevada a cabo mediante inyección epidural por una región de la médula espinal exterior a la membrana aracnoides.

30 Otras modalidades de administración incluyen la administración peritoneal (por ejemplo, para pacientes tratados con diálisis de riñón), y la intrapleural. Para aplicaciones específicas, la invención contempla modos adicionales de distribución, incluyendo la administración intramuscular, subcutánea, intralinfática, la insuflación, y la administración oral intravaginal y / o rectal.

Los procedimientos para la puesta en práctica de las modalidades de administración enunciadas con anterioridad son conocidos en la técnica.

C. Localización de la Anexina Radiomarcada

35 Después de que la anexina es administrada se deja que se localice en el tejido u órgano escogido como objetivo. La localización en este contexto se refiere a una condición en la que o bien se ha conseguido una relación de equilibrio o un estado de pseudoestabilidad entre la anexina adherida "localizada" y un estado no localizado "libre" de la anexina marcada dentro de un sujeto. La cantidad de tiempo requerido para dicha localización oscila típicamente entre minutos y decenas de minutos. Se puede estimar mediante la semivida sérica de la anexina marcada. En el caso de la anexina V marcada con Tc99m inyectada por vía intravenosa, la semivida sérica oscila entre aproximadamente 3 y 7 minutos. El tiempo de localización, así mismo, depende de la accesibilidad del tejido destinatario a la anexina marcada. Ello, a su vez, depende de la modalidad de administración, como es sabido en la técnica.

45 La formación de imágenes se inicia, de modo preferente, después de que la mayoría de la anexina marcada ha localizado su(s) destino(s). Para la anexina V marcada con Tc99m administrada por vía intravenosa, esto se produce después de varias semividas. Una duración de aproximadamente 10 semividas (aproximadamente de 30 a 60 minutos en el caso de los conjugados de anexina / Tc99m) se considera como un tiempo extenso para conseguir esencialmente la completa localización. La persona experta en la materia apreciará, sin embargo, que puede ser conveniente llevar a cabo la formación de imágenes en tiempos inferiores o superiores al tiempo marcado de ~ 10 semividas descrito con anterioridad. Por ejemplo, en la formación de imágenes de una muerte celular debida a la lesión de vasos sanguíneos, la accesibilidad del tejido destinatario es muy elevada, de tal manera que se puede obtener una intensa señal desde el emplazamiento destinatario en solo unos pocos minutos, especialmente si se administra de forma gradual una dosis reducida de anexina marcada para reducir al mínimo la señal procedente de la marca circulante.

55 En todos los casos referidos, puede llevarse a cabo una estimación razonable del tiempo necesario para conseguir la localización por una persona experta en la materia. Así mismo, el estado de la localización como función del

tiempo puede ir seguido por la formación de imágenes de la señal de rayos gamma procedente de la anexina marcada de acuerdo con los procedimientos de la invención.

D. Dispositivos de Detección de los Rayos Gamma

5 Los dispositivos de formación de imágenes de rayos gamma funciona mediante la señal de acumulación que se origina a partir de los rayos gamma emitidos a partir del sujeto a lo largo del tiempo. Uno de los procedimientos más ampliamente utilizados para la detección de rayos gamma es el equipo de gammagrafía Anger (Mettler y Guiberteau, 1985). Funciona mediante la conversión de los rayos gamma emitidos por el radionúclido en fotones (por lo general con cristales Nal (T1), los cuales son, a continuación, amplificados en tubos fotomultiplicadores (PETs), convertidos en una señal de voltaje, y utilizados para construir una imagen. Los componentes del equipo gammagrafía Anger típicamente incluyen un colimador, un cristal de centelleo, un conjunto de PMTs, un analizador de la altura de los impulsos, un tubo de rayos catódicos (CRT), y una consola de control. El sistema del equipo incluye así mismo típicamente una computadora. El procesamiento entre los PMTs y la pantalla (por ejemplo el CRT) puede ser o bien analógico o bien digital. Una descripción detallada de la teoría y del funcionamiento de de los equipos de gammagrafía Anger se puede encontrar en cualquiera entre una pluralidad de revistas y / o textos de medicina nuclear (véase, por ejemplo, Mettler y Guiberteau, 1985, incorporada en la presente memoria por referencia).

Se puede obtener una imagen más informativa utilizando una tomografía de emisión computerizada (ECT) para generar una imagen en 3 dimensiones. Los dos tipos básicos de la ECT son la tomografía computerizada con única emisión de fotones (SPECT), la cual utiliza isótopos tales como el Tc-99m y la tomografía por emisión de positrones (PET), la cual se basa en fotones de aniquilación de gran energía (511-keV) para proporcionar una localización de gran precisión. Un inconveniente de la PET es que típicamente se utiliza con isótopos producidos por ciclotrones de corta vida, como el ^{11}C , ^{13}N y ^{18}F . La SPECT, por otro lado, puede ser utilizada con los tipos de radiofármacos descritos en la presente memoria (por ejemplo el Tc-99m).

Los sistemas SPECT típicamente incluyen uno o dos cabezas del equipo de gammagrafía Anger controladas por computadora que pueden rotar alrededor del paciente en una órbita circular o elíptica. Dichas cámaras SPECT son disponibles en una pluralidad de suministradores. Por ejemplo, Siemens (Des Plains, IL) comercializa varias cámaras de este tipo, incluyendo la "E-CAM", "ORBITER", "ECAT", "MULTISPECT 3", "MUTISPECT 2", y la "DIACAM".

Las cámaras del tipo descrito con anterioridad incluyen ahora típicamente procesadores de imágenes integrados los cuales pueden manipular imágenes como ficheros digitales para eliminar el fondo, añadir pseudocolor y similares. Una vez que las imágenes se incorporan en forma de ficheros digitales, pueden ser manipuladas mediante una diversidad de programas de procesamiento de imágenes (por ejemplo, "ADOBE-PHOTOSHOP", Adobe Systems, Adobe Systems, Mt. View, CA) en una computadora personal, como por ejemplo un PC compatible con IBM o una Apple Macintosh (Apple Computer, Cupertino, CA) y a continuación ser impresos.

E. Colocación del Sujeto en el Campo de un Dispositivo de Detección de Rayos Gamma

35 1. Detección del Campo del Dispositivo. El campo de detección del dispositivo se define como el área a partir de la cual pueden ser obtenidas mediciones constantes y fiables de emisión de rayos gamma. Si la ECT está siendo utilizada para generar la imagen, la detección del dispositivo es el entero espacio a partir del cual la emisión de rayos gamma puede ser medida de manera fiable, o la porción de dicho espacio que el sistema de ECT está programado para incluir en la exploración. Este espacio es típicamente sustancialmente mayor que el campo de detección de una única cámara no de ECT.

40 Debe entenderse que la totalidad del animal o el sujeto no necesita necesariamente estar situado en el campo de detección del dispositivo de detección de rayos gamma. Por ejemplo, si se está interesado en el análisis de la señal procedente de un órgano concreto, solo necesita ser medida la señal procedente de la región que contiene el órgano, y una zona "oscura" circundante suficiente, para obtener la información deseada.

45 2. Colocación del Sujeto: Inmovilización. Para recoger la señal que se utiliza para generar una imagen, el sujeto es colocado dentro del campo de detección de los dispositivos de fotodetección durante el periodo durante el cual los rayos gamma, que serán utilizados para construir una imagen, están siendo medidos. Si la señal es suficientemente intensa para que se pueda construir una imagen a partir de la emisión de rayos gamma medida en menos de aproximadamente 20 milisegundos, y / o el sujeto no se mueve con respecto al plano de la formación de imágenes en la medida suficiente para sustancialmente deteriorar la imagen, no se requieren típicamente especiales precauciones de inmovilización. Todo lo que se requiere es que el sujeto esté situado en el campo del dispositivo de detección durante la extensión del periodo de medición.

50 Si, por otro lado, la medición de la emisión de rayos gamma dura más de aproximadamente 20 milisegundos, y el sujeto está agitado, las precauciones tomadas para asegurar la inmovilización del sujeto durante la medición de la emisión de rayos gamma, en consonancia con el grado de agitación del sujeto, deben ser tenidas en cuenta para preservar la información espacial de la imagen construida. Por ejemplo, en un supuesto en el que un sujeto sea una persona y el tiempo de medición de la emisión de fotones se sitúa en torno a unos pocos segundos, se puede solicitar del sujeto que permanezca lo más quieto posible durante la medición de la emisión de rayos gamma

(emisión de imágenes). Por otro lado, si el sujeto es un animal, por ejemplo un ratón, el sujeto puede ser inmovilizado utilizando, por ejemplo, un anestésico o un dispositivo de restricción mecánico.

5 Se puede construir una diversidad de dispositivos de restricción. Por ejemplo, un dispositivo de restricción eficaz para inmovilizar un ratón durante decenas de segundos a minutos puede ser construido mediante la fijación de una hoja transparente a los rayos gamma sobre un cojín de espuma. El cojín presenta una indentación destinada a la cabeza del animal en un extremo. El animal es situado por debajo de la hoja de tal manera que su cabeza se sitúe sobre la indentación, permitiendo que respire libremente, aunque el movimiento de su cuerpo está constreñido por el cojín de espuma.

10 Debe entenderse que la región cuyas imágenes se toman puede incluir sustancialmente el entero sujeto o solo una parte del sujeto que necesita ser diagnosticada o controlada con respecto a una muerte celular. Por ejemplo, la región puede incluir solo una extremidad o parte de dicha extremidad, la cabeza, el sistema nervioso central o una cavidad interna, como por ejemplo, la cavidad torácica o peritoneal. En formas de realización específicas, las regiones pueden contener solo un órgano seleccionado o una porción de éste. Por ejemplo, el procedimiento puede ser aplicado en análisis de una muerte celular solo en el sistema nervioso central, el cerebro, el corazón, el hígado, 15 el bazo, los pulmones, la médula ósea o una porción de cualquiera de estos órganos. Así mismo, la región analizada puede ser restringida a un tumor, por ejemplo, en un paciente con cáncer sometido a un tratamiento diseñado para provocar una muerte celular en el tumor.

F. Construcción de una Imagen de la Emisión de Rayos Gamma: Procesamiento de la Imagen

20 En la mayoría de las cámaras apropiadas, la medición de la emisión de rayos gamma genera una señal de voltaje la cual puede ser o bien representada en un CRT o almacenada y / o analizada por una computadora como una matriz de números. Estos números son utilizados para generar una imagen mediante procedimientos de formación de imágenes estándar. Por ejemplo, la imagen es típicamente analizada mediante la normalización de los recuentos de rayos gamma (ya sea sobre un valor fijo, seleccionado de antemano o bien sobre un número máximo detectado en cualquier píxel) y convirtiendo el número normalizado en una luminosidad (escala de grises) o en un color 25 (pseudocolor) que se represente sobre un monitor. En una representación de pseudocolor, las asignaciones de color típicas son las siguientes. A los píxeles con cero recuentos se les asigna el negro, bajos recuentos de azul, y recuentos en aumento de colores de longitud de onda crecientes sobre hasta el rojo para los valores de recuento de valores gamma más altos. La localización de los colores en el monitor representa la distribución de la emisión de rayos gamma y, de acuerdo con ello, la localización de las áreas de la muerte celular.

30 Si se desea seguir la localización y / o la señal a lo largo del tiempo, por ejemplo, para registrar los efectos de un tratamiento sobre la distribución y / o la localización de una muerte celular, la medición de la emisión de rayos gamma o la formación de imágenes puede ser repetida a intervalos de tiempo seleccionados para construir una serie de imágenes. Los intervalos pueden ser tan cortos como de minutos, o tan largos como de días, semanas, meses o años.

35 Las imágenes generadas mediante los procedimientos de la presente invención pueden ser analizadas mediante una diversidad de procedimientos. Dichos procedimientos van desde un simple examen visual, la evaluación mental y / o la expresión de una copia impresa, hasta el análisis de las imágenes digitales ultramoderno.

VII. Aplicaciones

40 Los usos principales de la anexina V radiomarcada incluyen la detección de una apoptosis inapropiada en estados patológicos en los que no debería ocurrir, por ejemplo, en desórdenes inmunitarios, como por ejemplo, el Lupus, el rechazo de trasplantes o el de células sometidas a una severa isquemia; y la detección de una apoptosis insuficiente cuando se produzcan, por ejemplo, tumores o células infectadas con virus.

45 Los resultados descritos en la presente memoria indican que la anexina radiomarcada puede ser empleada en una diversidad de ámbitos médicos en los cuales una muerte celular apoptótica y / o necrótica necesita ser monitorizada, como por ejemplo, sin limitación, rechazo de trasplante o lesión de órgano y médula ósea, patologías inflamatorias infecciosas y no infecciosas, patología autoinmunitaria, infarto e isquemia miocárdica y cerebral, cardiomiopatías, patología aterosclerótica, patologías neurales y neuromusculares degenerativas, patología depreanocítica, talasemia - β , terapia del cáncer, SIDA, síndromes mielodisplásicos, y patología del hígado inducidas por toxinas, etc. La anexina radiomarcada puede, así mismo, ser de utilidad como herramienta de investigación 50 clínica para estudiar el sistema inmunitario normal, el desarrollo embriológico y la tolerancia y la alergia inmunitarias.

La anexina V radiomarcada puede ser utilizada, por ejemplo, para tomar imágenes y cuantificar una muerte celular apoptótica en tejidos normales y malignos sometidos a tratamiento. La monitorización de la apoptosis con estudios seriados con formación de imágenes utilizando la anexina V radiomarcada puede ser utilizada para el ensayo y el desarrollo rápidos de nuevos fármacos y terapias en una diversidad de patologías. Así mismo, pueden ser utilizados 55 procedimientos para vigilar el progreso del tratamiento, vigilar un proceso de la enfermedad, o ambos. Así mismo, pueden ser utilizados para ayudar a la detección precoz de determinadas enfermedades.

Los ejemplos siguientes ilustran, pero de ninguna forma pretenden limitar, la presente invención.

Materiales y procedimientos**A. Preparación de la anexina V marcada con HYNIC**

Una anexina V humana fue fabricada mediante la expresión en *E. coli* a partir del plásmido pET12a - PAPI y purificada de acuerdo con lo descrito con anterioridad (Wood, *et al.*, 1996, incorporada en la presente memoria por referencia). Una disolución de partida de 30 mM ("disolución de partida de éster GYNIC") del éster N - hidroxisuccinimida de hidrazino nicotinamida (HYNIC; obtenida en AnorMED, Langley, British Columbia, Canadá; Babich, *et al.*, 1993, incorporada en la presente memoria por referencia) fue preparada mediante la suspensión de 220 µg de hidrocloreuro de 6 - hidrazinonicotinato succinimidilo (SHNH) en 18,5 µl de N, N - dimetilformamida. Cinco mg de anexina V disueltos en 893 µL de Tampón A (20 mM HEPES, pH 7,4 100 mM NaCl) fueron sometidos a reacción con la disolución de partida del éster de HYNIC durante tres horas con una agitación suave protegida de la luz a temperatura ambiente de acuerdo con el procedimiento descrito por Schwartz *et al.*, 1991, incorporada en la presente por referencia. La reacción fue congelada rápidamente con 500 µL de mM de glicina con un pH 5,3 y a continuación dializada a 4° C contra 20 mL de citrato de sodio, un pH de 5,2, 100 mM NaCl. El precipitado fue retirado mediante centrifugación a 1500 xg durante diez minutos. 100 µL (100 µg) partes de la anexina V con HYNIC fueron conservados a - 70° C.

B. Radiomarcado de la anexina V - HYNIC

80 µL de SnCl₂ (50 mg / ml en 0,1 N HCl purgadas durante dos horas con un gas N₂) fueron añadidas a 50 ml de una disolución de tricina de 20 mM (pH 7,1, purgadas durante una hora con un gas N₂; trcsina = N - [tris (hidroximetil) metil] glicina). 200 µL de la disolución de Sn - tricina fue añadida a los 100 µL de Tc99m (actividad de 4 a 8 mCi) mezclados con 100 µL de anexina V (preparada de acuerdo con lo descrito con anterioridad) de acuerdo con los procedimientos descritos por Larson, *et al.*, 1995.

La actividad específica de la anexina radiomarcada fue de una proteína de 20 a 200 µCi / µg (dependiendo de la actividad deseada) con una radiopureza de un 92% a un 97% determinada con una cromatografía instantánea de capa delgada (ITLC) utilizando una solución salina como disolvente. La actividad de la unión de la membrana de la anexina V - HYNIC y de la anexina V - HYNIC con Tc99m se determinó mediante un ensayo de competición modificado en el cual la anexina V - FITC de 5 nM fue sustituida por la anexina V del I¹²⁵ (Wood, *et al.*, 1996). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la muestra fue centrifugada, la anexina V - FITC unida a las células granuladas fue liberada con EDTA y la anexina V - FITC medida mediante fluorometría. En este sistema de ensayo, la anexina no modificada, la anexina con HYNIC y la anexina V con HYNIC con Tc99m presentaron una inhibición competitiva (concentraciones de un 50% del enlace de la anexina V - FITC) de 8 nM, 10,5 nM, y 12,3 nM, respectivamente. La incorporación del HYNIC en la anexina V resultó ser de 0,9 moles por mol de anexina V.

C. Formación de Imágenes y Estudios de Biodistribución

Se infectaron a unos ratones de 50 a 150 µCi de anexina con HYNIC - Tc99m (0,125 a 0,25 µg de proteína) después de la determinación de Tc99m libre frente al ligado utilizando una solución salina ITLC como disolvente. Son formaron imágenes de los ratones una o dos horas después de la inyección del radiofármaco en la posición de prono. Se obtuvieron imágenes durante 15 minutos utilizando un gammáfrago Móvil de Baja Energía (LEM) con un colimador de agujeros paralelos de alta sensibilidad y una matriz de formación de imágenes de 128 x 128 (Siemens, Des Plains, IL). Los mismos protocolos fueron utilizados para todos los barridos antes y después del tratamiento.

Los estudios de biodistribución fueron llevados a cabo después de la recogida de especímenes de los nodos cervicales / glándulas salivares, cerebro, timo, corazón, pulmones, hígado, bazo, estómago, tracto GI, riñones, músculo esquelético, grasa, sangre y partes restantes del cuerpo. Las muestras fueron contadas en un contador de centelleo autogamma Packard Cobra II (Packard Instrument, Downers Grove, IL) expresadas como recuentos corregidos por minutos para la desintegración de isótopos y la actividad del fondo.

D. Inmunotinción para la anexina V humana Unida y los Núcleos Apoptóticos

Los tejidos embebidos en Parafina y fijados en formalina fueron seccionados en 5 µm para su tinción con hematoxilina / eosina u otras técnicas. La inmunotinción para la anexina V humana unida se llevó a cabo con un antisuero de conejo elevado contra la anexina V placentar humanal y purificada por afinidad con la anexina V recombinante acoplada al Affi-Gel (Bio-Rad). La detección inmunohistoquímica, a continuación, fue completada por incubaciones secuenciales con un anticuerpo cabra anticonejo y un complejo adivina - peroxidasa de rábano silvestre (Jackson Immuno Research), seguido por la reacción con 3, 3' - diaminobenzidina de acuerdo con lo descrito por Bindl y Warnke (Bindl, J.M. & Warnke, R.A., 1986, incorporada en la presente memoria por referencia).

Para la detección de los núcleos apoptóticos, las secciones fueron teñidas utilizando una modificación del procedimiento de marcado terminal UTP (TUNEL) con la intervención de deoxinucleotidiltransferasa terminal descrito por Gavrieli *et al.*, (Gavrieli, Y., *et al.*, 1992, incorporada en la presente memoria por referencia). Después de la inhibición de la peroxidasa endógena, las secciones desparafinadas fueron digeridas con proteinasa K (20 µg / ml) durante 15 min. a temperatura ambiente. Las secciones fueron, a continuación, incubadas con exonucleasa λ (Life Technologies, Gaithersburg, MD) en 5 unidades / ml durante 30 min a 37° C seguido por la equilibración con el

tampón de reacción de la deoxinucleotidiltransferasa terminal (0,2 M cacodilato de potasio, 25 nM Tris· HCL, 0,25 mg / ml BSA, 1,5 nM CaCl₂. 20 mg / ml de polivinilpirrolidona, y 20 mg / ml de Ficoll) y 5 μM dATP. La reacción de marcado final fue, a continuación, llevada a cabo en el tampón de reacción de la deoxinucleotidiltransferasa terminal conteniendo también una concentración final de 75 unidades / ml de deoxinucleotidiltransferasa terminal y 100 μM de 1, N - 6 - etanol - dATP (Sigma). Después de una incubación de 60 min a 37° C, la reacción fue congelada rápidamente por medio de enjuague con 1 x SCC (citrato salino estándar). Las secciones fueron, a continuación, incubadas con murina 1G4 mAb (gentileza de Regina Santella, Columbia University), lo cual permite advertir la presencia de la fracción de etenoadenina (Young, T.L. & Santella, R.M. 1998, incorporada en la presente memoria por referencia). La detección posterior inmunohistoquímica se describió con anterioridad, utilizando un anticuerpo cabra antirratón marcado con biotina.

Ejemplo 1

Formación de Imágenes In Vivo de la Apoptosis con intervención del Fas

La apoptosis de hígado en ratones fue inducida mediante la inyección del anticuerpo anti-Fas, lo cual provoca la apoptosis de hígado extensiva en una o dos horas seguido por la muerte a las tres horas en un 90% de los animales tratados (Ogasawara).

Ratones Balb / c hembra de 18 a 24 gramos de cinco a seis semanas de edad fueron inyectados por vía intravenosa (i.v.) con un anticuerpo anti-Fas monoclonal de hamster purificado (Jo2, 10 μg por animal, Pharmingen, San Diego, CA). Después de la inyección con el anticuerpo anti-Fas, los animales fueron inyectados por vía intravenosa con aproximadamente 90 μCi de anexina V radiomarcada con hidrazino nicotinamida (HYNIC) con tecnecio 99 m (Tc99m) en 0, 1 y 2 horas después de la administración del anticuerpo en tres experimentos separados. Los resultados se muestran en la Fig. 1.

Un marcado incremento progresivo de la absorción hepática de la anexina V radiomarcada se observó a las una y dos horas, correspondiente a un 148% y a un 372% de los valores de control, respectivamente, tal y como se determinó mediante el análisis de las imágenes de las regiones de interés (ROI) ilustradas en la Fig. 1. La absorción esplénica se elevó de manera transitoria hasta un 140% de los valores de control en una hora después del tratamiento cayendo hasta el 110% a las dos horas. La absorción renal cayó al 40% a una y dos horas después del tratamiento.

Otro grupo de ratones (control) fue inyectado con 90 μCi de ovoalbúmina con HYNIC con Tc99m (MW = 43 kd; 2 μg de proteína) a las 0, 1 y 2 horas después del tratamiento con el anticuerpo Jo2. Tal y como se muestra en la Fig. 2, estos animales demostraron un incremento inicial de la absorción hepática en una hora (127%) el cual permaneció sin modificaciones a las dos horas (131%) después del tratamiento con el anticuerpo anti-Fas. La absorción esplénica de la ovoalbúmina radiomarcada permaneció sin modificaciones a partir de los valores de control después del tratamiento. La solución renal de la ovoalbúmina marcada se incrementó en un 138% en una hora y se liberó al 131% de los valores de control a las dos horas después del tratamiento.

Un tercer grupo de ratones fue tratado de la forma expuesta y coinjectado con anexina V marcada con Tc99m y albúmina de suero humano (HSA) marcada con I¹²⁵ a las 0, 1 y 2 horas en tres experimentos separados. Los animales de los diferentes experimentos fueron sacrificados después de cada punto marcado correspondiente y fueron sometidos a un estudio de biodistribución. Los resultados, expresados como porcentajes de dosis inyectadas por gramo de tejido (% ID / gm), se muestran en la Tabla 1 de abajo. Los datos fueron proporcionales a los obtenidos mediante el análisis de las imágenes ROI tanto para la anexina V radiomarcada como para la HSA.

Tabla 1

Ensayo de Biodistribución de la Anexina V radiomarcada y de HSA			
% de I.D. / gm de Anexina V con Tc99m	Controles (N = 6)	Ratones Tratados con Anti-Fas (10 μg / ratón)	
		1 hr. (N = 8)	2 hr. (N = 6)
Hígado	11,7 ± 1,35	15,0 ± 3,5 *	41,6 ± 10,0 **
Riñón	187,9 ± 21,8	127,7 ± 42,6 *	64,9 ± 37,5 **
Bazo	12,1 ± 1,08	20,8 ± 7,8 *	17,5 ± 7,55 (N.S.)

(continúa)

% de I.D. / gm de HSA con I^{125}	Controles (N = 4)	Ratones Tratados con Anti-FAS (10 μ g / ratón)	
		1 hr. (N = 6)	2 hr. (N = 5)
Ensayo de Biodistribución de la Anexina V radiomarcada y de HSA			
% de I.D. / gm de Anexina V con Tc99m	Controles (N = 6)	Ratones Tratados con Anti-FAS (10 μ g / ratón)	
		1 hr. (N = 8)	2 hr. (N = 6)
Hígado	3,87 \pm 0,76	6,92 \pm 1,81 *	6,87 \pm 1,2 **
Riñón	4,6 \pm 0,89	6,0 \pm 0,42 *	5,84 \pm 0,88 *
Bazo	3,52 \pm 0,67	3,75 \pm 0,86 *	3,42 \pm 0,56 (N.S.)
Peso del Órgano (gramos)	Controles (N = 6)	Ratones Tratados con Anti-FAS	
		1 hr. (N = 8)	2 hr. (N = 6)
Hígado	1,02 \pm 0,086	1,41 \pm 0,37 **	1,32 \pm 0,25 *
Riñón	0,33 \pm 0,061	0,34 \pm 0,082 (N.S.)	0,34 \pm 0,048 (N.S.)
Bazo	0,11 \pm 0,023	0,12 \pm 0,02 (N.S.)	0,11 \pm 0,018 (N.S.)
TOTAL DEL CUERPO	19,5 \pm 1,1	20,7 \pm 2,2 (N.S.)	19,3 \pm 1,6 (N.S.)
* Considerablemente ($p < 0,05$) diferente de los valores de control.			
** Muy considerablemente ($p < 0,001$) diferente de los valores de control.			
N.S. No considerablemente diferente de los valores de control.			
N.B. Comparaciones estadísticas de los valores medios fueron llevadas a cabo con una prueba bilateral.			

Ejemplo 2

5 Formación de Imágenes *In Vivo* del Rechazo de Aloiinjertos Cardíacos

La anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc fue preparada de manera sustancialmente igual a la descrita con anterioridad. La formación de imágenes y los estudios de biodistribución fueron conducidos de la misma forma expuesta, excepto cuando se especifique de modo distinto.

- 10 Unas ratas ACI adultas macho (250 a 350 g) recibieron aloinjertos cardíacos heterotópicos a partir de donantes de PVG (obtenidos de Harlan - Sprague - Dawley) fueron sometidos a anastomosis sobre la aorta abdominal y la vena cava inferior del huésped de acuerdo con una modificación de la técnica de Ono y Lindsey (Woodley, *et al.*, 1993, incorporada en la presente memoria por referencia). Isoinjertos cardiacos singénicos de donantes de ACI fueron, así mismo, trasplantados sobre los abdómenes de ratas ACI huésped. Los aloinjertos cardiacos de PVG en receptores ACI utilizando el modelo expuesto empiezan a experimentar rechazo entre 4 y 5 días después del trasplante de
- 15 todos los animales recibieron de 700 a 900 μCi de anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc (de 10 a 20 μg proteína / kg) a través de la vena de la cola y se tomaron imágenes 1 hora más tarde. Los animales fueron a continuación sacrificados, y los corazones originales y trasplantados fueron sometidos a un recuento de centelleo y a estudios isopatológicos.
- 20 Todos los aloinjertos cardiacos de PVG ($n = 4$) fueron fácilmente visualizados con la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc 5 días después del trasplante. Los isoinjertos cardiacos singénicos de API ($m = 3$) no presentaron actividad visible después de la inyección de la anexina con HYNIC con ^{99m}Tc con absorciones de radiofármacos idénticas a la actividad cardiaca natural tal y como fue confirmado mediante el recuento preciso de centelleo. El porcentaje de la total actividad corporal de los aloinjertos de PVG fue del 213% por encima de la actividad del isoinjerto de ACI ($P < 0,005$; utilizando una prueba bilateral) determinada por el análisis de las imágenes ROI. El ensayo de conteo preciso
- 25 de centelleo reveló un incremento 11 veces mayor de la absorción de la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc en aloinjertos de PVG en comparación con la actividad cardiaca natural.

Las secciones de los aloinjertos cardiacos de PVG 5 días después del trasplante mostraron una marcada infiltración celular inflamatoria mononuclear en todos los animales; no se observó ningún tipo de infiltración en corazones con isoinjertos o naturales. La infiltración rodeó áreas de la lesión miocárdica y estuvo asociado con la trombosis de los vasos miocárdicos. En el ejemplo de estas áreas, había una franca necrosis, sin tinción por la hematoxilina, pero en la periferia, había núcleos con cambios de apoptosis tal y como se confirmó mediante la tinción por TUNEL. La inmunotinción para la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc se observó en una pauta granular en miocitos cardiacos en la unión de las áreas inflamadas y necróticas; los núcleos de estas células fueron teñidos todavía con hematoxilina, lo que así mismo apunta a que se tratara de núcleos apoptóticos más que necróticos. La tinción con anti-anexina V fue mucho más extensa con términos de miocitos positivos y de la intensidad en comparación con la tinción TUNEL. La tinción con anti-anexina fue voluminosa y se agrupó en áreas francamente necróticas de acuerdo con lo esperado pero fue específica; ninguna tinción se observó en corazones de isoinjerto o naturales o en la tinción de corazones aloinjertados en los cuales se omitió el anticuerpo primario.

En un conjunto separado, pero similar, de experimentos, unas ratas ACI (N = 6 en cada grupo) recibieron aloinjertos cardiacos heterotópicos a partir de donantes PGV. Los isoinjertos cardiacos procedentes de donantes API (n = 3 en cada grupo) fueron trasplantados a ratas ACI huéspedes. Ningún grupo recibió tratamiento después del rechazo de los trasplantes.

Grupos de ratas receptoras fueron sometidas a gammagrafía en los días 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 posteriores al trasplante. La anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc de 1,0 mCi fue inyectada 1 hora antes de la gammagrafía.

Los aloinjertos cardiacos de PVG fueron visualizados con facilidad con la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc 4 días después del trasplante. Los isoinjertos cardiacos de ACI no presentaron ninguna actividad visible después de la inyección de la anexina con HYNIC con ^{99m}Tc.

Un análisis de la región de interés fue utilizado para cuantificar la absorción de la anexina V - HYNIC con ^{99m}Tc. La absorción por el corazón trasplantado fue calculada como un porcentaje de la total absorción del cuerpo. Los resultados se representan en la Figura 3.

Inmediatamente después de la gammagrafía, los animales fueron sacrificados. Los corazones trasplantados fueron recogidos para su análisis. Se llevó a cabo una gradación histológica del rechazo agudo sobre secciones teñidas estándar de hematoxilina y eosina. El esquema de la gradación se muestra en la Tabla 2 inferior.

Tabla 2

Gradación histológica del rechazo agudo	
Grado 0	Ningún rechazo
Grado 1	Rechazo ligero
Grado 2	Rechazo Moderado
Grado 3	Rechazo Severo

Los núcleos apoptóticos fueron identificados en las secciones histológicas mediante la tinción TUNEL de la segmentación nuclear del ADN, utilizando un kit de peroxidasa comercialmente disponible (APOPTAG®, Oncor, Gaithersburg, MD). Tal y como se indica mediante los datos de la Tabla 3, la apoptosis aparece produciéndose en miocitos y células inflamatorias durante el rechazo de los aloinjertos cardiacos.

Tabla 3

Tinción TUNEL en Aloinjertos Cardiacos; Presencia de Núcleos Positivos Durante el Rechazo			
RECHAZO	INFLAMATORIO	CÉLULAS ENDOTELIALES	MIOCITOS
Grado 0	0	0	0
Grado 1	+	+	+
Grado 2	++	+	+
Grado 3	+	+	++

35

Tal y como se muestra mediante los datos de la Tabla 4, inferior, y el gráfico de la Figura 4, la absorción de la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc se correlaciona con los grados histológicos del rechazo agudo.

Tabla 4

Porcentaje de Absorción de la anexina V con HYNIC con ^{99m} Tc durante el Rechazo de los Aloinjertos Cardiacos		
RECHAZO	% DE ABSORCIÓN ± STDV	SINIFICACIÓN *
Grado 0	0,42 ± 0,17	
Grado 1	0,83 ± 0,31	P = 0,036 vs. Grado 0
Grado 2	1,43 ± 0,40	P = 0,008 vs. Grado 1
Grado 3	2,40 ± 0,53	P = 0,001 vs. Grado 2
* Prueba bilateral, variación desigual		

5 Ejemplo 3

Formación de Imágenes *in vivo* del Linfoma Tratado con Murina

la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc fue preparada de manera sustancialmente igual a la descrita con anterioridad. La formación de imágenes de los estudios de biodistribución fueron conducidos de la misma forma expuesta excepto cuando se especifique de manera distinta.

10 Los linfomas de células B tratados con murina 38C13 (Maloney, *et al.*, 1985) fueron inoculados en ratones C3H.HeN (Harlan Breeders, Indianapolis) después de una inyección s.c. de 400 células tumorales suspendidas en 200 µl de un medio 1640 de RPMI (sin suero) en el flanco izquierdo. Catorce días después del implante los ratones fueron sometidos a un tratamiento con 100 µg / kg de ciclofosfamida inyectados por vía i.v. Los ratones fueron inyectados por vía i.v. con de 25 a 50 µg / kg de anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc (de 100 a 150 µCi / animal) 20 horas después de la administración de la ciclofosfamida. Se tomaron imágenes de los animales y fueron sacrificados una hora después de la inyección del radiofármaco después de la retirada del tumor para un recuento de centelleo y estudios histopatológicos.

Los implantes de tumores en el flanco no tratados (n = 8) fueron observados con facilidad mediante la formación de imágenes con el equipo de gammagrafía y tuvieron una absorción de la anexina V de un 365% por encima de la actividad del tejido blando, tal y como se muestra mediante el análisis de las imágenes ROI. Los tumores en el flanco tratados (n = 6) mostraron unos incrementos fácilmente visualizables en la actividad de la anexina V con HYNIC con ^{99m}Tc de un 78% por encima de los valores de control expresados con una actividad total del cuerpo por gramo de tumor (P < 0,05 utilizando una prueba bilateral para analizar su significación). Este resultado fue confirmado por el preciso conteo de centelleo en el cual los tumores tratados mostraron un incremento del 132% de absorción de la anexina V expresada como un porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tumor (P < 0,05) con una caída del 58% en peso (P < 0,05) en comparación con el control. La total actividad del cuerpo por gramo de tumor se aprecia mediante el análisis de las imágenes ROI correlacionadas de manera lineal con el porcentaje de la dosis inyectada por gramo de tumor determinado en el estudio de biodistribución (r² = 0,831). El análisis histológico demostró una apoptosis prácticamente completa (mayor de un 95%) de todos los linfoblastos en tumores tratados con menos de un 5% de células apoptóticas en los controles.

Aunque la invención ha sido descrita con referencia a procedimientos y formas de realización específicas, debe apreciarse que pueden llevarse a cabo diversas modificaciones y cambios sin apartarse de la invención, la cual se define en las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 1.- Uso de una anexina marcada con un radionúclido biocompatible para la preparación de un agente diagnóstico apropiado para la formación de imágenes *in vivo* de células nucleadas, dentro de una región de una persona, presentando una fosfatidilserina expuesta, comprendiendo la utilización:
- 5 a) la administración a la persona de la anexina marcada con un radionúclido biocompatible;
- b) la colocación de la persona dentro del campo de detección de un dispositivo detector de radiaciones; y
- c) la medición de la emisión de radiaciones provenientes del radionúclido en la persona, para construir una imagen de la emisión de las radiaciones;
- 10 en la que dicha imagen es una representación de una fosfatidilserina expuesta sobre dicha célula nucleada en el interior de una región de dicha persona.
- 2.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el radionúclido se selecciona entre el grupo consistente en Yodo 123, Yodo 131, Galio 67, Indio 111, Flúor 18, y Tecnecio 99 m (Tc99m).
- 3.- El uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el radionúclido es Tecnecio 99 m (Tc99m).
- 15 4.- El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el Tc99m está unido a la anexina por medio de hidrazino nicotinamida (HYNIC).
- 5.- El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que la cantidad de anexina marcada con Tc99m administrada se traduce por una dosis de aproximadamente 5 mCi y aproximadamente 20 mCi.
- 6.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho dispositivo detector de radiaciones es un dispositivo detector de rayos gamma y dicha emisión de radiaciones es una emisión de rayos gamma.
- 20 7.- El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que dicho dispositivo de detección de rayos gamma es un equipo de gammagrafía.
- 8.- El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la medición de la emisión de rayos gamma para construir la imagen se lleva a cabo entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 2 horas después de la administración de la anexina marcada.
- 25 9.- El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la medición de la emisión de rayos gamma para construir la imagen se lleva a cabo aproximadamente 1 hora después de la administración de la anexina marcada.
- 10.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho dispositivo detector de radiaciones es un dispositivo detector de la emisión de positrones.
- 11.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha emisión de radiaciones es medida utilizando un dispositivo detector de emisión de positrones.
- 30 12.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, y que incluye así mismo la repetición de las etapas (b) y (c) a intervalos seleccionados, en la que dicha repetición es eficaz para realizar el seguimiento a lo largo del tiempo de la intensidad de la emisión de las radiaciones procedentes de la región.
- 13.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, la cual incluye así mismo la repetición de las etapas (b) y (c) a intervalos seleccionados, en la que dicha repetición es eficaz para efectuar un seguimiento a lo largo del tiempo de los cambios de la localización de la emisión de las radiaciones en la región.
- 35 14.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho dispositivo detector de radiaciones es una cámara de formación de imágenes de 3 dimensiones.
- 15.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha anexina es la anexina V.
- 40 16.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad de la anexina marcada administrada es inferior a aproximadamente 300 µg de proteína / kg; o entre aproximadamente 1 µg de proteína / kg y 10 µg de proteína / kg.
- 17.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la anexina marcada es administrada por vía intravenosa, por vía intraperitoneal, por vía intralumbal, por vía intrapleural, por vía intralinfática o por vía intramuscular.
- 45 18.- El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicha región está en un órgano de dicha persona o en cualquier porción del órgano, en la cabeza de dicha persona o en cualquier porción de la cabeza, en el corazón de dicha persona o en cualquier porción del corazón, en el hígado de dicha persona o en cualquier porción del hígado, en los pulmones de dicha persona o en cualquier porción de los pulmones, en el bazo de dicha persona o en cualquier porción del bazo, en la médula ósea o en cualquier porción de la médula ósea, en un tumor de dicha

persona o en cualquier porción de dicho tumor, en un trasplante de dicha persona o en cualquier trasplante, o en una zona isquémica de dicha persona o en cualquier porción de la zona isquémica.

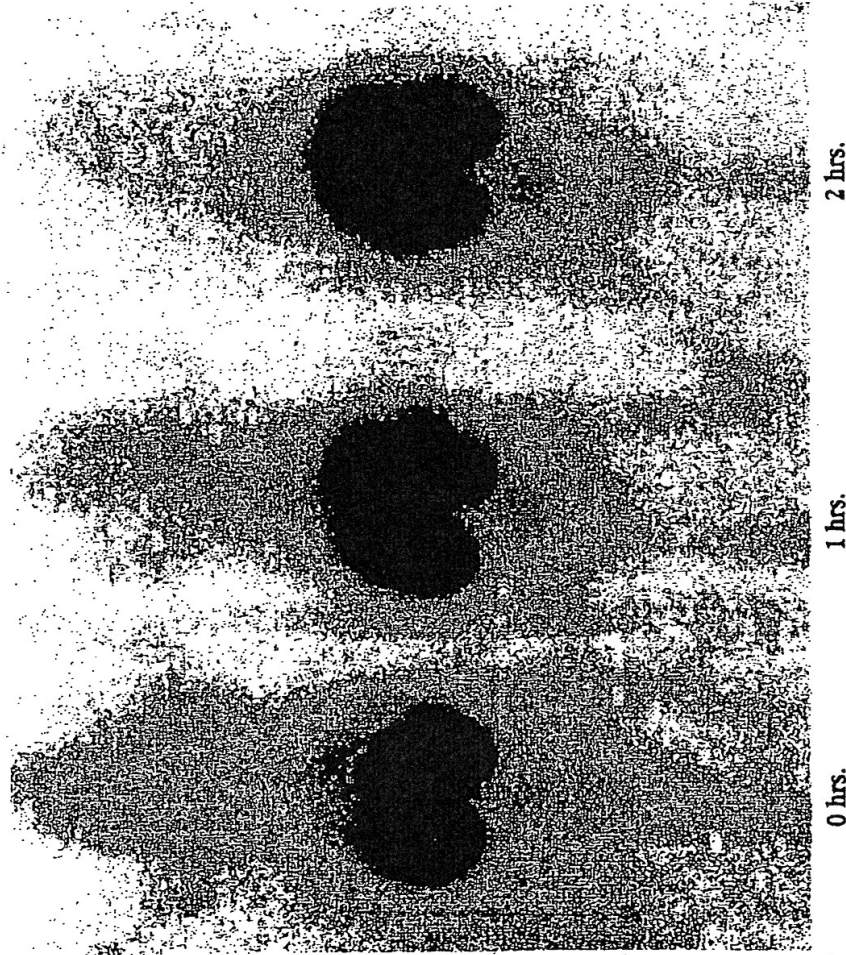
5 19.- El uso de acuerdo con la reivindicación 15, en la que dicha región no está afectada por ninguna cualquiera de las siguientes circunstancias: un rechazo o una lesión de un trasplante de órgano, un rechazo o una lesión de un trasplante de médula ósea, una enfermedad inflamatoria infecciosa, una enfermedad inflamatoria no infecciosa, una enfermedad autoinmune, un infarto cerebral y de miocardio y una isquemia, cardiopatías, una enfermedad aterosclerótica, enfermedades degenerativas neuronales y neuromusculares, prepancitosis, talasemia β , tratamiento del cáncer, SIDA, síndromes mielodisplásicos, y una enfermedad del hígado inducida por una toxina.

20.- Un kit para la formación de imágenes *in vivo* de una muerte celular el cual incluye:

- 10 a) un frasco cerrado herméticamente que contiene anexina marcada con HYNIC;
- b) un frasco cerrado herméticamente que contiene una disolución de tricina Sn preparada y mantenida bajo N_2 ;
- c) unas instrucciones para fabricar la anexina marcada con Tc99m utilizando la anexina marcada con HYNIC y por la disolución de tricina Sn junto con el Tc99m; y
- 15 d) unas instrucciones para la administración de la anexina con Tc99m para la formación de imágenes *in vivo* de áreas de una muerte celular.

21.- Un kit para la formación de imágenes *in vivo* de una muerte celular de acuerdo con la reivindicación 20, incluyendo anhídrido carbónico sólido contenido en el kit para mantener el kit a $-70^\circ C$.

20 22.- Un kit para la formación de imágenes *in vivo* de una muerte celular de acuerdo con las reivindicaciones 20 o 21, en el que la anexina marcada con HYNIC está liofilizada.

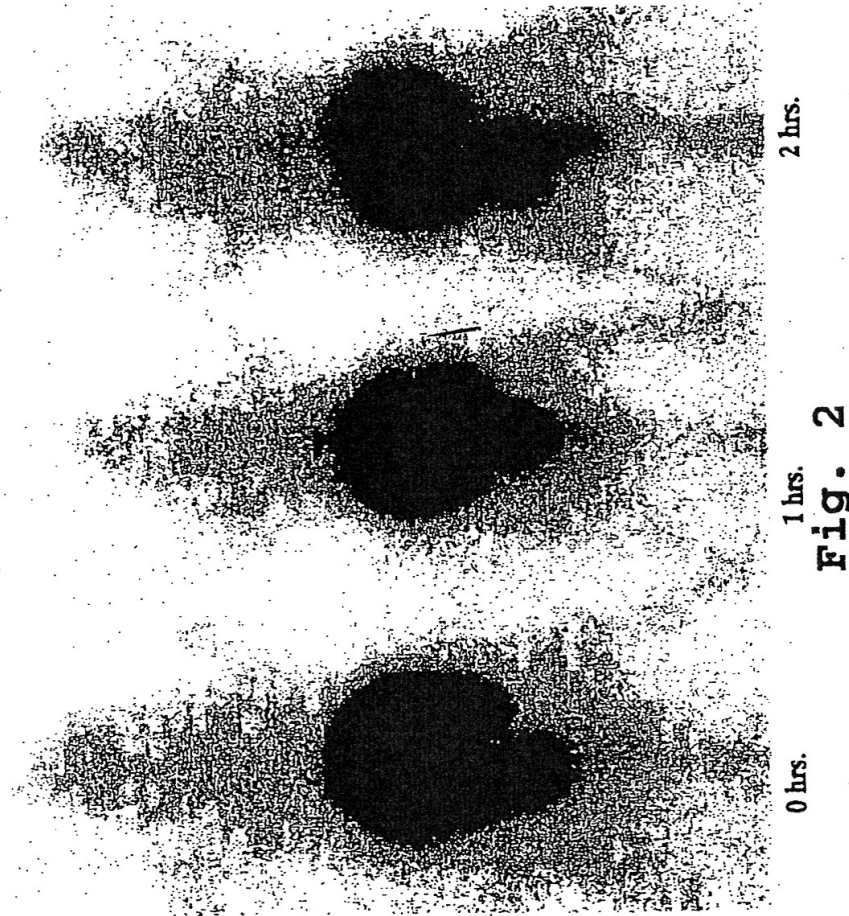


2 hrs.

1 hrs.

0 hrs.

Fig. 1



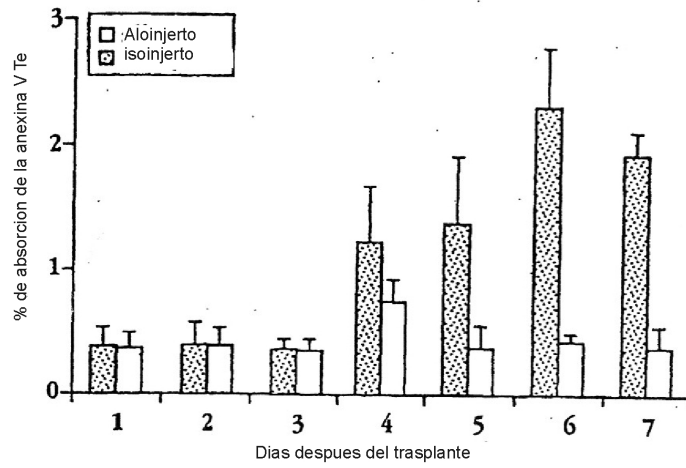


Fig. 3

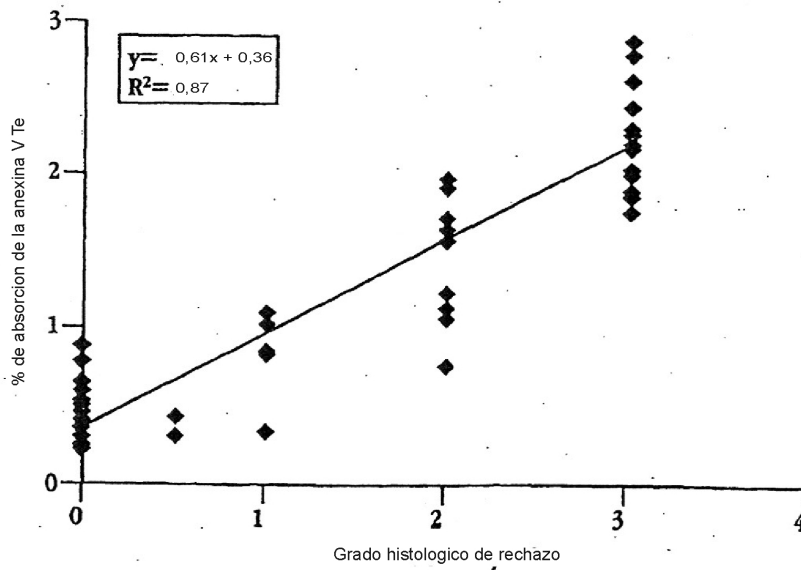


Fig. 4