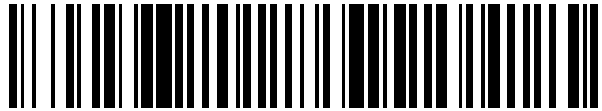


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 500 340**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2005 E 05766056 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.07.2014 EP 1765859**

54 Título: **Anexinas, derivados de las mismas, y variantes de la anexina-Cys, al igual que usos de diagnóstico y terapéuticos de las mismas**

30 Prioridad:

**07.07.2004 US 886262**

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

**30.09.2014**

73 Titular/es:

**MOSAMEDIX B.V. (100.0%)  
MONNIKENDIJK 4  
4474 ND KATTENDIJK, NL**

72 Inventor/es:

**REUTELINGSPERGER, CHRIS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

**ES 2 500 340 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

Anexinas, derivados de las mismas, y variantes de la anexina-Cys, al igual que usos de diagnóstico y terapéuticos de las mismas

5

Antecedentes de la invención

[0001] La presente invención se refiere en general al campo de las anexinas. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos para tratar y diagnosticar una materia administrando compuestos a un objetivo específico usando anexinas, variantes de anexinas, y derivados de las mismas.

10

[0002] Los tratamientos genéticos y farmacológicos de enfermedades se basan en la administración de compuestos farmacológicamente activos a células enfermas donde los compuestos actúan preferiblemente intracelularmente. Los tratamientos terapéuticos actuales emplean la administración sistémica de un fármaco, donde el fármaco circula a través del cuerpo entero antes de alcanzar su objetivo deseado. Este método de administración de fármacos produce la dilución sistémica del compuesto. Como resultado, el paciente necesita concentraciones mayores del fármaco para conseguir la eficacia terapéutica favorecedora. Mayores concentraciones de fármaco aumentan de forma natural cualquier efecto secundario tóxico no deseado de los compuestos farmacológicamente activos. Además, mayores concentraciones aumentan generalmente el coste de cualquier medicamento.

15

20

[0003] Para eludir estos problemas se han diseñado sistemas de administración regional de fármacos que varían desde aplicaciones locales hasta fármacos específicos. La administración regional, no obstante, es frecuentemente insuficiente porque no garantiza la administración a una célula específica. Para actuar eficazmente, muchos fármacos, tal como los quimioterapéuticos y los agentes fotodinámicos, deben entrar en una célula enferma. Se han descrito diferentes sistemas que se pueden utilizar para administrar compuestos a una célula.

25

Péptidos que penetran en la célula o Dominios de transducción proteínica

[0004] Los péptidos que penetran en la célula ("CPP") o Dominios de transducción proteínica ("PTD") forman una clase de péptidos capaces de traspasar la membrana plasmática de las células eucariotas, (Lindgren, et al., Trends Pharmacol. Sci. 21:99-103 (2000)). Muchos CPP/PTDs son derivados de proteínas de origen vírico más grandes. Los CPP/PTDs también pueden ser diseñados intencionadamente (United States Patent No. 6,495,663). El mecanismo por el que los CPP/PTDs se translocan sobre la membrana no se comprende en su totalidad pero parece ser independiente de la energía. Se ha reconocido el uso potencial de CPP/PTDs en la administración de fármacos y se han publicado ejemplos de conjugados entre CPP/PTDs y carga tal como pequeñas entidades químicas, péptidos, y proteínas (Schwarze, et al., Trends Pharmacol. Sci. 21:45-48 (2000); US Patent No. 6,472,507). El inconveniente de los CPP/PTDs es su actividad lítica a altas concentraciones (Scheller, et al., J. Pept. Sci. 5:185-94 (1999)). Además, los CPP/PTDs no tienen capacidad específica y no discriminan entre células sanas y enfermas. Por lo tanto, los efectos secundarios tóxicos de los compuestos farmacológicos no se ven disminuidos por su conjugación con los CPP/PTDs. Más bien, los complejos formados por CPP o PTD y un compuesto farmacológico penetrarán tanto en células saludables como en células enfermas. Se ha intentado agregar la funcionalidad de especificidad conjugando CPP/PTDs con anticuerpos específicos para antígenos en tumores. La desventaja de este método, no obstante, es que la función de especificidad del anticuerpo deteriora los CPP/PTDs como resultado de la conjugación (Niesner, et al., Bioconjug Chem. 13:729-36 (2002)).

30

35

40

45

Ligandos para Receptores de membrana plasmática

[0005] Se han descrito diferentes vías pinocíticas a través de las cuales las células son capaces de interiorizar compuestos del entorno. Una de las vías pinocíticas comprende la endocitosis mediada por receptor-ligando (Conner, et al., Nature 422:37-44 (2003)). Cuando el ligando se enlaza al receptor, el complejo entero se interioriza en pequeñas vesículas intracelulares, que viajarán a través de la célula dependiendo del complejo receptor-ligando implicado. Esta ruta se puede emplear para introducir fármacos en una célula mediante el acoplamiento del fármaco o el vehículo de transporte del fármaco, como liposomas a un ligando específico para receptores de superficie que muestran endocitosis sobre ligamiento. Algunos ejemplos de tales ligandos que inducen internalización son ligandos para el receptor de hFGF (US Patent No. 6,551,618), ligandos para el receptor de asialoglicoproteína (US Patent No. 5,885,968), y ligandos para el receptor de transferencia (US Patent No. 6,511,967, US Patent No. 5,154,924, Qian, et al., Pharmacol. Rev. 54:561-87 (2002)). Este tipo de internalización, en la mayoría de los casos, no consigue una función de especificidad óptima para la administración de fármacos. Por otra parte, datos recientes muestran que la internalización a través de la ruta de receptor-ligando puede suprimir la acción farmacológica del fármaco interiorizado (Sato, et al., Pharm. Res. 19:1736-44 (2002)).

50

55

60

[0006] Un compuesto que se puede usar como agente de especificidad y agente de capturado es la anexina A5. Para detectar la anexina A5 ligada a la superficie, ésta ha sido conjugada con compuestos indicadores. En el pasado, los conjugados de anexina A5 se preparaban haciendo reaccionar compuestos indicadores con grupos amino y grupos hidroxilo presentes en la molécula de anexina A5. La anexina A5, no obstante, tiene más de un grupo amino y más de un grupo hidroxilo. Como resultado, el acoplamiento químico con estos grupos funcionales

65

5 produce mezclas de los diferentes complejos estequiométricos de anexina A5 y el compuesto indicador. El resultado de estos procedimientos de acoplamiento es aleatorio y contiene complejos que no tienen capacidad para enlazarse con aminofosfolípidos porque un conjunto de los aminoácidos reactivos está implicado en la unión fosfolípida. Estos problemas perjudican la calidad de los conjugados de anexina A5. Para mejorar la calidad, la mezcla del conjugado de anexina A5 ha sido separada por técnicas de purificación adicionales.

10 [0007] En un intento para mejorar la anexina A5 para la conjugación, el único grupo sulfhidrilo en la anexina A5, que viene proporcionado por un residuo de cisteína en la posición 315, ha sido acoplado con una única cadena de uroquinasa en un intento de remediar los problemas con los grupos amino e hidroxilo mencionados anteriormente (US Patent No. 5,632,986). Los complejos de anexina A5 y uroquinasas dirigen las uroquinasas a lugares intravasculares para aumentar la actividad fibrinolítica local. El grupo sulfhidrilo, no obstante, se aloja en la molécula y se requiere el despliegue paulatino de la anexina A5 inducido por urea para exponer el grupo sulfhidrilo a la superficie de la proteína. Este procedimiento se utiliza para permitir que la conjugación tenga lugar. No obstante, se requiere la replegación posterior de la anexina A5 para recuperar las capacidades de unión fosfolípida de la anexina A5. Los procedimientos de replegado no son eficaces al cien por cien y normalmente generan una mezcla inefectiva de moléculas de anexina vinculantes y no vinculantes.

20 [0008] US Patent No. 5,632,986 también describe la introducción química de múltiples grupos sulfhidrilo con sulfosuccinimidilo 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC") en la molécula de anexina A5 con fines de conjugación. Este procedimiento genera los mismos problemas experimentados con el procedimiento empleado con los grupos amino e hidroxilo mencionados anteriormente. US Patent No. 5,632,986 describe además una variante de anexina A5 con un N-terminal extendido de diez aminoácidos que consta de un residuo de cisteína para permitir la conjugación con un compuesto indicador. Estas variantes tienen 329 aminoácidos, de los cuales dos son cisteínas. Estas variantes pueden plantear el problema de formar puentes disulfuro intramoleculares, y de este modo perjudicar la capacidad de la anexina A5 para enlazarse con fosfolípidos.

30 [0009] Los compuestos bioactivos también han sido conjugados con anexina A5 mediante preparaciones recombinantes de quimeras de anexina A5 y los compuestos bioactivos (Tait, et al., Journal of Biological Chemistry 270:21594-99 (1995), US Patent No. 5,632,986). US Patent No. 6,323,313 describe variantes de la anexina A5 con la extensión de la parte N-terminal de la anexina A5 con un conjunto extra de aminoácidos de los cuales uno es un residuo de cisteína. Los aminoácidos extra con el residuo de cisteína se introducen con el propósito de quelar espontáneamente el radionucleido <sup>99m</sup>Tc para de esta manera eliminar la necesidad de conjugación química para marcar radioactivamente la anexina A5. Esto sólo es posible para compuestos que muestran fijación espontánea y no covalente a los grupos sulfhidrilo. El problema con este tipo de interacción es la capacidad de revertir la reacción de quelado, es decir, el compuesto fijado puede disociarse de la variante de anexina A5. El índice de disociación depende de diferentes factores, tal como el compuesto y los aminoácidos que captan el compuesto.

#### 40 Resumen de la invención

45 [0010] Conforme a una forma de realización de la invención se proporciona un complejo nuevo y mejorado que tiene al menos un compuesto farmacéutico y una anexina, donde la anexina se enlaza al menos a un aminofosfolípido y facilita la interiorización del compuesto farmacéutico en una célula. Se pueden usar diferentes anexinas y derivados de las mismas conforme a esta invención. Además, en el complejo se puede usar una variante de anexina nueva y mejorada. Tal variante de la anexina es una proteína que se pliega para proporcionar una configuración donde la anexina tiene un lado convexo y un lado cóncavo. El lado convexo se utiliza para enlazar con al menos un fosfolípido y el lado cóncavo está compuesto por aminoácidos, donde al menos un aminoácido en el lado cóncavo es un residuo de cisteína. En una forma de realización alternativa, la proteína consta de un derivado de la variante de la anexina, donde al menos otro aminoácido natural se sustituye con un aminoácido diferente y donde la sustitución de aminoácido no afecta esencialmente a la capacidad de la variante para enlazarse al menos a un fosfolípido cargado negativamente y a enlazarse al menos a un compuesto farmacéutico, portador, o enlazador cruzado. Otra forma de realización de esta invención se refiere a un método para crear el complejo anteriormente descrito incluyendo el acoplamiento de la anexina al menos a un compuesto farmacéutico o al menos a un portador de al menos un compuesto farmacéutico, bien directamente o indirectamente por un enlazador cruzado.

60 [0011] Otra forma de realización de la invención es un dispositivo para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos que incluyen un soporte sólido y al menos una anexina, donde la anexina es fijada covalentemente al soporte, bien directa o indirectamente, y donde la anexina captura células y partículas derivadas de la célula que expresan fosfolípidos en una de sus superficies provenientes de los fluidos del sujeto. Además, la invención incluye, como otra forma de realización, un método para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos que incluye el contacto de fluidos del sujeto con el dispositivo anteriormente descrito y la detección de la presencia de células o partículas celulares asociadas al dispositivo.

65 [0012] Otra forma de realización de la presente invención es un equipo que incluye al menos un complejo de los anteriormente descritos y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. La variante de la

anexina, el complejo, el dispositivo y el equipo de la invención son tal y como se define en las reivindicaciones anexas.

5 [0013] Una puesta en práctica de la presente invención se refiere a la administración un compuesto farmacéutico a una célula diana que incluye administrar una composición terapéutica del complejo descrito anteriormente. Más específicamente esta forma de realización abarca un método para tratar o prevenir una enfermedad, donde el compuesto farmacéutico es un compuesto terapéutico eficaz para tratar o prevenir la enfermedad.

10 [0014] Otra puesta en práctica de la presente invención se refiere a la administración de un compuesto farmacéutico a una célula diana que se utiliza para detectar la presencia o ausencia de células o partículas de células que expresan fosfolípidos. Además, el método para administrar un compuesto farmacéutico a una célula diana se puede usar para prevenir e investigar una enfermedad.

15 [0015] Para una mejor comprensión de la presente invención, junto con otros objetos de la misma, se hace referencia a la descripción siguiente, tomada conjuntamente con los dibujos anexos, y su alcance se señala en las reivindicaciones anexas.

#### 20 Breve descripción de los dibujos

[0016] La figura 1 ilustra SEC ID nº 1. Esta secuencia es la secuencia del aminoácido de la anexina a5 humana. Los aminoácidos se dan en el código de una letra. Los aminoácidos subrayados forman la superficie cóncava de la molécula de anexina A5 como se basó sobre la estructura 3D dilucidada por Huber, et al., EMBO J 9:3867-74 (1990a). Las formas de realización de esta invención incluyen proteínas que poseen esta secuencia con uno de los aminoácidos subrayados sustituido por un residuo de cisteína.

25 La figura 2 es una forma de realización de la invención e ilustra SEC ID nº 2. Esta secuencia es la secuencia de aminoácidos de la variante de la anexina A5. Los aminoácidos se dan en el código de una letra. Esta secuencia difiere de la secuencia de la anexina A5 humana A5 (Maurer-Fogi, et al, Eur. J Biochem. 174:585-92 (1988)) en la posición 315, que contiene aquí un residuo de serina (indicado en negrita). La secuencia de la anexina A5 humana contiene un residuo de cisteína en la posición 315. Los aminoácidos subrayados forman la superficie cóncava de la molécula de anexina A5 como se basó sobre la estructura 3D dilucidada por Huber, et al., EMBO J 9:3867-74 (1990a). Las formas de realización de esta invención incluyen proteínas que poseen esta secuencia con uno de los aminoácidos subrayados sustituido por un residuo de cisteína.

30 Las figuras 3a, b, c y d son formas de realización de la invención e ilustran SEC ID nº 3, 4, 5 y 6. Estas secuencias son ejemplos de las variantes de la anexina dentro del campo de esta invención. Los aminoácidos en las posiciones 5, 7, 9 y 11, respectivamente, fueron sustituidos con residuos de cisteína (indicado en negrita).

35 La figura 4 es una forma de realización de la invención e ilustra SEC ID nº 7. Esta secuencia es un ejemplo de una de las variantes de la anexina dentro del campo de esta invención como se describe en el ejemplo 3.

40 La figura 5A es una forma de realización de la invención e ilustra la distribución de la población celular de células Jurkat antes del tratamiento con cuentas de anexina A5-Cys2.

La figura 5B es una forma de realización de la invención e ilustra la distribución de la población celular tras la disminución de la fosfatidilserina exponiendo células y partículas mediante el tratamiento con cuentas.

45 La figura 5C es una forma de realización de la invención y representa las células y partículas ligadas a las cuentas de anexina A5-Cys2 y que se liberan por ácido etilendiaminotetraacético ("EDTA") o ditiotreitolo ("DTT").

#### Descripción detallada de las formas de realización preferidas

50 [0017] Antes de describir detalladamente la presente invención, debe entenderse que esta invención no está limitada a composiciones particularmente ejemplificadas, formulaciones o parámetros de proceso, ya que éstos pueden variar. Se debe entender también que la terminología que se usa aquí es sólo con el propósito de describir formas de realización de la invención particulares y no se destina a limitarlas. Además, se debe mencionar que, tal y como se usa en la especificación y en las reivindicaciones anexas, las formas singulares "un" y "el" incluyen referencias plurales a menos que el contenido establezca claramente lo contrario. Así, por ejemplo, una referencia a "una partícula" incluye una mezcla de dos o más de dichas partículas, una referencia a "una [...] farmacéutica" incluye mezclas de dos o más de dichos agentes, y similares.

60 [0018] La presente invención proporciona composiciones para el tratamiento, diagnóstico, prevención, e investigación de enfermedades, tales como enfermedades neoplásicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, y enfermedades inflamatorias. Los métodos para este tipo de tratamiento, prevención o enfermedad incluyen la administración a sujetos de complejos farmacéuticos que están compuestos por anexinas y variantes de anexina acopladas a compuestos farmacéuticos o portadores. La presente invención también proporciona composiciones para administrar compuestos farmacéuticos a células diana de un sujeto para, por ejemplo, matarlas, tales como células tumorales, o para rescatarlas, tales como cardiomiocitos y neuronas.

65

[0019] Las células están revestidas de una membrana plasmática ("PM") que consiste en una bicapa de moléculas fosfolípicas y diferentes moléculas proteínicas. Varias moléculas fosfolípicas forman las unidades estructurales de la bicapa. Las moléculas están asimétricamente distribuidas sobre las dos capas, o láminas, de la membrana plasmática. La fosfatidilcolina por ejemplo está presente en ambas capas, mientras que la esfingomielina se puede encontrar sólo en la lámina externa frente al entorno. Los aminofosfolípidos, como la fosfatidilserina ("PtdSer"), por otro lado, están predominantemente presentes en la lámina interna frente al citosol de la célula (Zwaal, et al, Blood 89:1121-32 (1997)). Las translocasas aminofosfolípicas transportan la PtdSer de la capa externa a la capa interna, o lámina, de la membrana plasmática para crear una distribución asimétrica de PtdSer (Diaz, et al, J. Membr. Biol. 151: 1-9 (1996)). La arquitectura asimétrica de la PM es una característica de las células vivas. Éstas gastan energía para generar y mantener la distribución desigual de las especies de fosfolípido en sus membranas plasmáticas.

[0020] Una célula puede cambiar la arquitectura de los fosfolípidos de su PM bajo ciertas circunstancias, que conducen a la activación y perturbación de la célula. La muerte celular programada ("MCP") está asociada con la aparición de PtdSer en la lámina externa de la membrana plasmática (Fadok, et al, J. Immunol. 148:2207-16 (1992)). En base a la morfología y la bioquímica, se han identificado cuatro tipos de MCP: (1) apoptosis, (2) MCP tipo apoptosis, (3) MCP tipo necrosis, y (4) necrosis (Leist, et al, Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2:589-98 (2001)). Cada tipo viene acompañado por un cambio en la asimetría de la membrana plasmática caracterizada por la exposición de la PtdSer a la capa externa de la superficie celular. La exposición de la PtdSer en la capa externa de la membrana plasmática es un buen indicador de una multitud de estados activados y perturbados de una célula. La exposición de la PtdSer, no obstante, no está exclusivamente asociada a procesos celulares que culminan en la muerte celular. Se ha informado de la exposición transitoria y reversible de la PtdSer para diferentes tipos celulares, incluyendo células B activadas (Hammill, et al., Experimental Cell Research 251:16-21 (1999)), células de músculo indiferenciadas propensas a formar sincitio (Van der Eijnde, et al., J. Cell Sci. 114:3631-42 (2001)), células infectadas de clamidia (Goth, et al., Infect Immun. 69:1109-19 (2001)), células endoteliales de vasculatura tumoral (United States Patent No. 6,312,694), y macrófagos fagocitadores (Hamon, et al., Nat Cell Biol 2:399-406 (2000)). Además, se han encontrado diferentes procesos y condiciones celulares que se asocian con una expresión de la PtdSer en la lámina externa de la membrana plasmática. Estos incluyen la activación plaquetaria (Bever, et al., Eur. J. Biochem. 122:429-36 (1982)), el envejecimiento de glóbulos rojos (Schroit, et al., J. Biol. Chem. 260:5131-38 (1985)), la estimulación del sistema inmunológico (Martín, et al., Intern. Arch. Aller. Immunol. 123:249-58 (2000)); Hammill, et al., Exp. Cell. Res. 251:16-21 (1999)), la formación de sincitio de las células musculares (Van den Eijnde, et al., Eur. J. Cell Biol. 114:3631-42 (2001)), la formación de nuevos vasos sanguíneos en tumores (Ran, et al., Cancer Res. 62(21):6132-40 (2002)), y el crecimiento tumoral (Rao, et al., Thromb. Res. 67:517-31 (1992)).

[0021] Además, las células pueden disipar partes de ellas mismas de sus superficies dando como resultado micropartículas encapsuladas de membrana. Estas micropartículas tienen aminofosfolípidos expuestos en la capa externa de las superficies de las membranas (Dachary-Prigeflt, et al., 22:157-164 (1996), Casciola-Rosen, et al., Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A. 93: 1624-29 (1996)). Estas micropartículas han sido asociadas a enfermedades como infecciones (Satta; et al., Journal of Immunology 153:3245-55 (1994)), SIDA (Aupeix, et al., J Clin investen. 99(7):1546-54 (1997)), aterosclerosis (Mallat, et al., Circulation 99:348-53 (1999)), y síndromes coronarios agudos (Mallat, et al., Circulation 101:841-843 (2000)). Por lo tanto, los aminofosfolípidos en la superficie celular son indicadores de una variedad de estados activados y perturbados de una célula. Por otra parte, las micropartículas que presentan aminofosfolípidos expuestos reflejan una activación y perturbación celular distante. Por lo tanto, los fosfolípidos en la superficie de una membrana plasmática constituyen objetivos atractivos para multitud de fines incluyendo investigación, diagnóstico, prevención, y tratamiento de enfermedades, al igual que aislamiento y eliminación de células y micropartículas que contienen aminofosfolípidos. Preferiblemente, la PtdSer en la capa externa de una membrana plasmática constituye un objetivo para la investigación, diagnóstico, prevención, y tratamiento de enfermedades.

[0022] La presente invención se refiere a la capacidad de las anexinas para enlazarse a células de expresión de PtdSer y a inducir la internalización de parches de membrana que expresan PtdSer. Esta internalización resulta en la formación de vesículas intracelulares que contienen anexina. Las anexinas son capaces de inducir internalización in vivo e in vitro. El proceso de internalización difiere de las vías pinocíticas recientemente descubiertas (Conner, et al., Nature 422:37-44 (2003)) y resulta cuando una anexina cristaliza en la membrana fosfolípica (Oling, et al., J. Mol. Biol. 304:561-73 (2001)). La cristalización a la superficie de la membrana es una característica compartida de las anexinas (Gerke, et al., Physiol. Rev. 82:331-71 (2002)). La presente invención se refiere al uso de anexinas para abrir estos nuevos portales de entrada para transportar compuestos terapéuticos en una célula. La presente invención proporciona métodos para administrar un compuesto farmacológico a una célula diana y complejos que se componen de una anexina y uno o varios compuestos farmacológicos, tal como diagnóstico, prevención, y compuestos terapéuticos y tales como polímeros de ácidos nucleicos, entidades pequeñas de sustancias químicas, péptidos, polipéptidos y proteínas que deberían actuar dentro de las células enfermas bien para matarlas o bien para salvarlas.

[0023] Las anexinas constituyen una familia multigénica de proteínas que comparten características funcionales y estructurales. El polipéptido de anexina está organizado en dominios que forman el llamado pliegue de anexina en el espacio (Gerke, et al., Physiol. Rev. 82:331-71 (2002)). Los dominios contienen sitios de unión de calcio a través de los cuales puede ocurrir una interacción con membranas fosfolípicas. Una vez ligadas a una superficie del

fosfolípido, las anexinas pueden formar una red bidimensional a través de interacciones proteína-proteína. (Oling, et al., J. Mol. Biol. 304:561-73 (2001)). La importancia fisiológica de las anexinas es pobremente entendida pero se piensa que están relacionada con su actividad de unión de fosfolípido. Las anexinas no tienen una secuencia de señal y por lo tanto se piensa que juegan un papel dentro de la célula. Se ha informado de la localización extracelular de las anexinas pero se desconoce si esto ocurrió por un proceso selectivo o por un evento específico como la lisis celular.

[0024] En una forma de realización preferida, la anexina es anexina A5, un derivado de anexina A5, anexina A8, un derivado de anexina A8, o una combinación de las mismas. La anexina A5 es una proteína que se enlaza con fosfolípidos, como PtdSer, (Van Heerde, et al., Thromb. Haemost. 73:172-179 (1995), Seaton, et al., Biometals 11:399-404 (1998)). Una vez expresado en la superficie de la célula, la PtdSer actúa como receptor para la anexina A5, que se enlaza con afinidad alta y en una manera calcio-dependiente para estas especies de fosfolípido (Tait, et al., J. Biol. Chem. 264:7944-49 (1989); Andree, et al., J. Biol. Chem. 265: 4923-28 (1990)). Esta propiedad ha sido aprovechada usando la anexina A5 como herramienta para medir la MCP in vitro (Van Engeland, et al., Cytometry 31(1):1-9 (1998); US Patent No. 5,834,196; Martin, et al., J. Exp. Med. 182:1545-56 (1995); Koopman, et al., Blood, 84:1415-20 (1994); Homburg, et al., Blood 85:532-40 (1995); Vermes, et al., J. Immunol. Methods 184:39-51 (1995)), in vivo en animales (Van den Eijnde, et al., Cell Death Differentiation 4:311-316 (1997); Dumont, et al., Nat Med 7:1352-5 (2000); Blankenberg, et al., Proc. Natl. Acad. Sc. 95:6349-54 (1998); US Patent Application Serial No. 2002/0192162), y en humanos (Hofstra, et al., Lancet 356:209-212 (2000); Hofstra, et al., Jama 285:1841-2 (2001), Narula, et al., Nat. Med. 7:1347-52 (2001); US Patent No. 6,197,278). La anexina A5 también se ha usado para medir y capturar micropartículas (Mallat, et al., Circulation 99:348-53 (1999); (Mallat, et al., Circulation 101: 841-843 (2000); Nieuwland, et al., Circulation 96:3534-3541 (1997)). Se ha elaborado la capacidad de unión de un fosfolípido de anexina A5 como una función de objetivo para compuestos bioactivos directos tal como uroquinasa para células que exponen fosfolípidos (Tait, et al., Journal of Biological Chemistry 270:21594-99 (1995)).

[0025] La anexina A8 también es una proteína que se enlaza con fosfolípidos y de forma similar esto puede ser empleado según la presente invención. Por ejemplo, la anexina A8 se puede acoplar con un compuesto farmacéutico y emplearse para facilitar la internalización del compuesto. La secuencia de anexina A8 es bien conocida en la técnica, fue publicada por Hauptmann, et al. en Eur. J. Biochem. 185:63-71 (1989).

[0026] La presente invención aprovecha las propiedades de las anexinas y se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que la anexina A5 se enlaza con células de expresión de PtdSer e induce internalización y formación de vesículas intracelulares de los parches de membrana de expresión de PtdSer. Una forma de realización preferida se refiere a un complejo que tiene al menos un compuesto farmacéutico y una anexina, donde la anexina se enlaza por lo menos a un fosfolípido y facilita la internalización del compuesto farmacéutico en una célula. La anexina está preferiblemente plegada para proporcionar una configuración con un lado convexo que puede enlazarse con al menos un fosfolípido y un lado cóncavo compuesto de aminoácidos, donde al menos un aminoácido en el lado cóncavo es un residuo de cisteína. Además, el lado convexo preferiblemente no contiene un residuo de cisteína.

[0027] La presente invención también se basa, en parte, en observaciones de que las vesículas intracelulares contienen la anexina A5, que causa la internalización de los parches de membrana. La internalización de la anexina A5 ocurre no solo in vitro por células viables y apoptóticas con expresión reversible de PtdSer sino también in vivo, como demuestra un modelo de ratón de herida de isquemia/reperfusión del corazón que muestra cardiomiocitos que expresan PtdSer en la región en riesgo que interiorizan anexina A5 fluorescente, que fue administrada en la circulación sanguínea. Véanse los ejemplos 1 y 2. Además, un modelo de crecimiento de tumor en ratón muestra que las células tumorales interiorizan anexina A5 fluorescente, que fue administrada a la circulación sanguínea. La cantidad de anexina A5 fluorescente interiorizada por el tumor aumentó de tratar del tumor con fármacos citotóxicos.

[0028] La anexina A5 también transporta compuestos que se acoplan a fluorocromos. Los fluorocromos se pueden sustituir por compuestos terapéuticos o portadores que contienen compuestos terapéuticos. Véase el ejemplo 3. Los ejemplos demuestran que la anexina A5 se acopla a partículas paramagnéticas recubiertas de fosfolípidos de 1-10 µm de diámetro y transporta estas partículas en la célula. De estas conclusiones, alguien entendido en la materia entendería que la anexina A5 es capaz de inducir la internalización de compuestos cuyo tamaño oscila entre aproximadamente 100 Da en peso molecular y estructuras macromoleculares de un tamaño de aproximadamente 10 µm. Es posible que se puedan interiorizar incluso moléculas más grandes. Por consiguiente, la presente invención realiza preferiblemente composiciones de anexina A5 y compuestos terapéuticos o portadores que contienen compuestos terapéuticos que están enlazados covalentemente a la anexina A5. La formación de la vesícula intracelular provocada por la anexina A5 es llevada a cabo por mecanismos celulares diferentes a aquellos responsables de las vías pinocíticas conocidas, tal como la internalización de fase de fluido, la internalización mediada por receptor-ligando, y la internalización asociada a caveolas (Conner, et al., Nature, 422:37-44 (2003)).

[0029] La anexina A5 abre este nuevo portal en la célula gracias a su capacidad para formar una red bidimensional en la superficie de fosfolípido. La variante de la anexina A5, M23, que se enlaza a la PtdSer, carece de la capacidad para formar una red bidimensional en la superficie de los fosfolípidos y por lo tanto no abre este nuevo portal de introducción y permanece fuera de la célula in vivo e in vitro. El ejemplo 2 proporciona una prueba de esto

infundiendo M23 marcado fluorescentemente en un ratón, que sufría de herida de isquemia/reperfusión del corazón. A diferencia de la anexina A5 marcada fluorescentemente, la variante M23 no se interioriza por los cardiomiocitos en la región en riesgo sino que permanece fijada a la superficie sarcolemal de las células.

5 [0030] En una forma de realización preferida, la anexina usada en el complejo es una variante de la anexina. Las variantes de la anexina están relacionadas con las anexinas naturales, tal como la anexina A5, y sus derivados, como la anexina A5/Ser315, pero éstas están diseñadas para tener uno o varios residuos de cisteína en sitios de la molécula de anexina definidos y predeterminados. El residuo de cisteína habilita la anexina para conectarse químicamente con otro compuesto, por ejemplo, un compuesto farmacéutico, generando así un complejo. En una forma de realización preferida, la interacción produce un complejo estequiométrico de uno en uno. Específicamente, en una forma de realización preferida, la molécula de anexina tiene un residuo de cisteína diseñado y expuesto que puede conectarse químicamente con otro compuesto, dando como resultado un complejo. Es también preferible que el residuo de cisteína se diseñe en una ubicación específica, de modo que el compuesto no interfiera con las demás propiedades aglutinantes de la anexina. Como tal, el complejo conserva la propiedad de unión de fosfolípidos de la anexina y, más específicamente, la actividad biológica de la anexina de unirse a membranas que contienen fosfolípidos. Véanse los ejemplos 4-9. Además, el complejo conserva la capacidad de facilitar la internalización de un compuesto como se describe.

20 [0031] La cadena polipeptídica de anexina A5 humana, por ejemplo, contiene un conjunto de cuatro dominios homólogos (Maurer-Fogy, et al., Eur. J Biochem. 174:585-92 (1988)), soportando cada uno un pliegue de endonexina (Geisow, et al., Nature 320: 636-8 (1986)). Este diseño de pliegue de endonexina media la unión de la anexina a los fosfolípidos (Huber, et al., FEBS Lett 275:15-21 (1990b)). Las tres estructuras dimensionales de la anexina facilitan la organización de la cadena polipeptídica. Los dominios se pliegan como módulos diferentes orientando así los sitios de unión fosfolípida a un lado de la molécula (Huber, et al., EMBO J 9:3867-74 (1990a)). Este lado tiene forma convexa. El lado opuesto tiene una curvatura cóncava y alberga los primeros 19 residuos del extremo N-terminal de la anexina A5. Cuando la anexina A5 se liga a los fosfolípidos su superficie cóncava apunta hacia afuera desde la superficie del fosfolípido en la solución (Oling, et al., J Struct. Bid 133:55-63 (2001)). La SEC ID n°: 1 es la secuencia de aminoácido de anexina A5 humana y la SEC ID n°: 2 es la secuencia de aminoácidos de su variante, la anexina A5/Ser315.

30 [0032] Los aminoácidos en la superficie cóncava de la anexina A5 y la anexina A5/Ser315, están subrayados en las secuencias ilustradas en la figura 1 y la figura 2, e incluyen posiciones de aminoácido 1-19, 24, 28,46-64,86-89,118-135, 150,157-170,202-219,245-248, y 280-294. También se contemplan derivados de estas variantes. La anexina A5/Set315 es un derivado diseñado donde Cys315 se sustituye por Ser315 y es particularmente importante debido a su capacidad para evitar la posible formación del puente disulfuro intramolecular cuando una cisteína está diseñada en posiciones en el lado cóncavo de la molécula. Cys315 no está en el lado cóncavo de la molécula correctamente plegada, no obstante, durante la traslación ésta puede formar un puente disulfuro intramolecular con cisteína en posiciones superiores destruyendo así la posibilidad conectar químicamente un compuesto a la cisteína superior y destruyendo potencialmente la conformación biológicamente activa. Las variantes y derivados mantienen preferiblemente la capacidad de las anexinas para enlazarse con al menos un fosfolípido y para facilitar la internalización de un compuesto como se describe.

45 [0033] La invención está basada, en parte, en la aclaración de las estructuras terciarias de las anexinas y en las conclusiones de que las anexinas se enlazan con su superficie convexa a la membrana fosfolípida y apuntan con su superficie cóncava hacia afuera desde la superficie en la solución. Las formas de realización de esta invención incluyen variantes de la anexina, que tienen al menos un residuo de cisteína localizado en la superficie cóncava de la molécula. Esto ocurre preferiblemente por la sustitución de un aminoácido natural con un residuo de cisteína o alternativamente, la secuencia se puede diseñar mediante métodos recombinantes. Los expertos en la técnica conocerán métodos alternativos de fabricación estas variantes y derivados. En una forma de realización preferida, el lado convexo no contiene un residuo de cisteína. En otra forma de realización preferida, el residuo de cisteína del lado cóncavo no interfiere con la capacidad de la variante de la anexina de enlazarse con al menos un fosfolípido y de facilitar la internalización de un agente farmacéutico.

55 [0034] Las posiciones de aminoácido 1-19, 24, 28,46-64,86-89,118-135, 150,157-170,202-219,245-248, y 280-294 están específicamente identificadas debido a su orientación. Estos sitios son particularmente deseables porque se dirigen hacia afuera desde los sitios de unión fosfolípida en el lado convexo de la molécula de anexina que interactuarán con los fosfolípidos en la capa externa de la membrana plasmática de la célula. Se pueden sustituir uno o varios de estos aminoácidos por un residuo de cisteína. Los métodos para la producción de los aminoácidos modificados incluyen huéspedes eucarióticos tales como células de insectos y levaduras. Estos sistemas de expresión requieren de vectores de expresión eucarióticos. La secuencia de la variante de anexina A5 no se cambia para la expresión eucariótica. Alguien con habilidad en la materia reconocerá que el reemplazo de un aminoácido puede ocurrir mediante sustitución o la secuencia de aminoácidos se puede diseñar o crear para incluir el residuo de cisteína. El residuo de cisteína puede interactuar con un compuesto para formar un complejo. Un complejo en esta orientación se enlazará con membranas que contienen fosfolípidos y facilitan la internalización del compuesto farmacéutico en una célula. La internalización puede ocurrir in vivo o in vitro.

[0035] En una forma de realización preferida de la invención, la variante de anexina se puede enlazar con un fosfolípido, y preferiblemente un fosfolípido cargado negativamente o aminofosfolípido, con una constante de disociación de aproximadamente  $10^{-6}$  M o menos en presencia de iones  $\text{Ca}^{2+}$ . Los fosfolípidos conforme a esta invención están preferiblemente conectados a una membrana y se pueden seleccionar desde fosfatidilserina, cardiolipina, y ácido fosfatídico, por ejemplo. La membrana puede provenir de varias fuentes, incluyendo membranas celulares y micropartículas encapsuladas en membrana. Una célula es, por ejemplo, un cultivo celular, una célula tisular, una célula de órgano, un organismo, una célula animal, una célula mamífera, y una célula humana. Un sujeto es, por ejemplo, un organismo, un animal, un mamífero, o un humano.

[0036] En una forma de realización alternativa, la proteína comprende un derivado de la variante de la anexina, donde al menos otro aminoácido natural se sustituye con un aminoácido diferente y donde la sustitución del aminoácido no afecta esencialmente a la capacidad de la variante para enlazarse al menos a un fosfolípido cargado negativamente, para facilitar la internalización del compuesto farmacéutico en una célula, y para enlazar al menos un compuesto farmacéutico, portador, o enlazador cruzado.

[0037] Tal como se ha expuesto, la variante de la anexina descrita aquí se puede usar según los complejos, métodos, equipos, y dispositivos también descritos aquí. Por ejemplo, la variante de la anexina puede utilizarse para formar un complejo como se ha descrito anteriormente para la anexina A5 hecha de al menos un compuesto farmacéutico y una variante de la anexina, donde la variante de la anexina se enlaza por lo menos a un fosfolípido cargado negativamente y facilita la internalización del compuesto farmacéutico en una célula, y donde el compuesto farmacéutico está conectado químicamente bien directa o bien indirectamente a través de un portador, un enlazador cruzado, o ambos un portador y un enlazador cruzado a al menos un residuo de cisteína en la variante de la anexina o en la variante de la misma. La variante de la anexina tiene las propiedades anteriormente descritas, y el complejo tiene muchas de las mismas propiedades que el complejo descrito anteriormente y pueden usar los mismos compuestos farmacéuticos, portadores, enlaces, etc.

[0038] El compuesto que se conecta a las anexinas o variantes de las mismas puede ser un compuesto terapéutico, un compuesto de diagnóstico, un compuesto preventivo, o un compuesto de investigación, como se describe posteriormente. Alguien con habilidad en la materia reconocerá que hay muchos compuestos que son útiles en la invención reivindicada más allá de los compuestos terapéuticos, los compuestos de diagnóstico, los compuestos preventivos, y los compuestos de investigación. La lista descrita posteriormente es por lo tanto un ejemplo y los compuestos catalogados en esta especificación son formas de realización preferidas.

[0039] En una forma de realización preferida, el compuesto farmacéutico en el complejo está compuesto covalentemente bien directa o bien indirectamente a través de un portador, un enlazador cruzado, o tanto un portador y un enlazador cruzado a la anexina. La anexina puede enlazarse con más de un compuesto farmacéutico. Por ejemplo, un compuesto puede acoplarse a un grupo amino de la anexina y el otro compuesto puede acoplarse a un grupo sulfhidrilo de la anexina. Alternativamente, un liposoma portador que contenga una mezcla de compuestos farmacéuticos pueden acoplarse a un grupo amino o a un grupo sulfhidrilo de la anexina.

[0040] El término "compuesto farmacéutico" se usa generalmente para referirse a un compuesto que tiene actividad biológica. En una forma de realización preferida, el compuesto farmacéutico es seleccionado del grupo consistente en un compuesto terapéutico, un compuesto de diagnóstico, un compuesto preventivo, y una combinación de los mismos.

[0041] Los compuestos terapéuticos son, por ejemplo, una toxina, una enzima, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de los mismos, un inmunocnjugado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente de inducción de muerte celular, un agente de inhibición de muerte celular, un compuesto fibrinolítico, y una combinación de los mismos. Un ejemplo de toxinas son Dt, PE, P38, P40, ricina, abrina, toxina diftérica, toxina colérica, gelonina, exotoxina de Pseudomonas, toxina de Shigella, y proteína antivirica de hierba carmín. Un ejemplo de enzimas son peroxidases, alcalasas, y caspasas.

[0042] Los lípidos son, por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos, prenelenos, y esteroides. Un lípido se puede incrustar en la membrana de un liposoma. Un ejemplo de compuestos quimioterapéuticos son BiCNU, bleomicina, busulfano, CCNU, carboplatina, carboplatino, carmustina, cisplatina, cisplatino, clorambucil, 2-clorodeoxiadenosin, cladribina, citarabina, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorrubicina, docetaxel, doxorubicina, DTIC, etoposida, 5-fluorouracilo, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, melfalán, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, nitrógeno de mostaza, oxaliplatino, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, raltitrexed, semustina, tomudex, topotecán, vinblastina, vincristina, y vinorelbina. Los radionucleidos terapéuticos son, por ejemplo, yodo-131, renio-186, estroncio-89, e itrio-90. Algunos ejemplos de fotosintetizadores son ftalocianinas, rodoporfirinas, rododoclorinas, mesorodoclorinas, filloeritrina y sus derivados, porfirina y sus derivados, y compuestos metalopirílicos.

[0043] Algunos ejemplos de agente de inducción de muerte celular son inductores de apoptosis, inhibidores de quinasa, activadores de transición de permeabilidad mitocondrial, polinucleótidos que codifican para una proteína inductora de la muerte celular, activadores de transporte de iones a través de la membrana, polinucleótidos que son



un antisentido de los polinucleótidos que codifican para proteínas de inhibición de muerte celular, y proteínas inhibitoras del inhibidor de muerte celular y los polinucleótidos que interactúan con ellas. Algunos agentes de inhibición de muerte celular son, por ejemplo, inhibidores de apoptosis, inhibidores de caspasa, inhibidores de catepsina, inhibidores de transporte de iones a través de la membrana, inhibidores de transición de permeabilidad mitocondrial, factores de crecimiento, polinucleótidos que codifican para proteínas de inhibición de muerte celular, polinucleótidos que son un antisentido para polinucleótidos que codifican para proteínas inductoras de muerte celular, y proteínas inductoras del inhibidor de muerte celular y los polinucleótidos que interactúan con ellas.

[0044] Los compuestos de diagnóstico son, por ejemplo, un grupo fluorescente, un agente de contraste, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente de ultrasonido, y una combinación de los mismos. Ejemplos de grupos fluorescentes son fluoresceína isotiocianato ("FITC"), Oregon Green, Alexa, ficoeritrina, compuestos Cy, yoduro de propidio, 7-AAD, compuestos Sytox, y nanocristales, tal como seleniuro de cadmio, seleniuro de plomo, fosforo de indio, y arseniuro de galio. Algunos agentes de contraste son, por ejemplo, gadolinio, partículas magnéticas, partículas paramagnéticas, y burbujas de aire. Los fotosintetizadores son ftalocianinas, rodoporfirinas, rodocolorina, mesorodoclorinas, filloeritrina y sus derivados, porfirina y sus derivados, y compuestos metalopiróxicos. Algunos radionucleidos de diagnóstico son, por ejemplo, carbono-11, flúor-18, indio-111, yodo-123, yodo-131, nitrógeno-13, oxígeno-15, tecnecio-99m, circonio-89, y una combinación de los mismos.

[0045] Los compuestos farmacéuticos anteriormente descritos son ilustrativos. Aquellos expertos en la técnica conocerán otros compuestos que se pueden usar conforme a la invención descrita en esta especificación.

[0046] En una forma de realización preferida, las anexinas descritas aquí se pueden acoplar con enlazadores cruzados como se ha indicado anteriormente a portadores que contienen compuestos farmacéuticos tales como liposomas o dendrímeros. Un enlazador cruzado según la presente invención de manera enlaza covalentemente un compuesto farmacéutico o un portador de al menos un compuesto farmacéutico con al menos un aminoácido de la anexina, con al menos un grupo amino primario, o con al menos un grupo sulfhidrilo de un aminoácido de la anexina. En una forma de realización preferida, el enlazador cruzado reacciona con un grupo diferente del grupo amino del compuesto farmacéutico o el portador. El enlazador cruzado puede ser N-succinimidilo 3-(2-piridilditio)-propionato, N-succinimidilo maleimidoacetato, N-succinimidilo 3-maleimidopropionato, N-succinimidilo 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, piridilo, grupos que contienen maleimido, grupos que contienen halógeno, un isotiocianato, un isocianato, un imidoéster, y un grupo de éster succinimidílico.

[0047] Un portador conforme a esta invención es, por ejemplo, un liposoma, un dendrímero, un polímero, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, el portador es un polímero que puede encapsular compuestos farmacéuticos. Los liposomas pueden estar compuestos de bicapas lipídicas que encapsulan los compuestos farmacéuticos. Todos o parte de los lípidos pueden estar compuestos por fosfolípidos. Todos o parte de los lípidos o polímeros pueden proporcionar el grupo químico para reaccionar con unos o más de los grupos reactivos del enlazador cruzado o anexina para formar una conexión química con el compuesto farmacéutico. El grupo químico puede ser un grupo amino, un grupo sulfhidrilo, o un grupo hidroxilo. El portador lipídico se puede estabilizar por compuestos como colesterol y glicoles de polietileno. El portador lipídico puede variar en un tamaño de 20 nm a 10 µm de diámetro. El portador lipídico puede tener una estructura uni- o multilaminar. Un ejemplo de un liposoma portador es un liposoma de 100 nm consistente en fosfatidilcolina/fosfatidiletanolamina/colesterol en una proporción molar de 46/20/34 llevando la doxorubicina como agente citostático. Las cantidades apropiadas de los lípidos indicados en el cloroformo se mezclan en un tubo de vidrio. El solvente se evapora dejando los lípidos en una película seca en la pared de vidrio. Se añade una solución tamponada de pH >7.5 que contiene 50 mg/ml de doxorubicina y los lípidos se suspenden mezclando enérgicamente. La suspensión lipídica se extrude a través de un filtro que contiene poros de 100 nm de diámetro. La suspensión se extrude a través de un filtro que contiene poros de 100 nm de diámetro. Los liposomas extruidos tienen un tamaño de alrededor de 100 nm de diámetro y contienen doxorubicina. Se añade 1-10 mM SPDP a los liposomas extruidos. Esto resulta en una reacción entre el éster succinimidílico de SPDP y el grupo amino de fosfatidiletanolamina. El producto de la reacción se dializa en un tampón de pH <7.5 y se mezcla posteriormente con una variante de anexina A5 que contiene un residuo de cisteína en su lado cóncavo tal como Cys2-Anexina A5 o Cys7-Anexina A5. Esto resulta en una reacción entre la fracción de piridilo del grupo PDP fijado al liposoma y el grupo sulfhidrilo de la anexina A5. El resultado es un compuesto covalente entre la anexina A5 y la doxorubicina que contiene liposoma donde la anexina A5 ha conservado su actividad de unir fosfolípidos cargados completamente negativamente. Los expertos en la técnica conocerán otros enlazadores cruzados y portadores que pueden ser fácilmente utilizados según la presente invención.

[0048] Los excipientes conforme a esta invención son, por ejemplo, agua, cationes, aniones, proteínas estabilizantes, carbohidratos estabilizantes, y agentes quelantes. Los expertos en la técnica conocerán otros excipientes que se pueden incorporar en una composición farmacéutica, pero que no perjudiquen la actividad de la sustancia activa.

[0049] Las enfermedades conforme a esta invención están, por ejemplo, caracterizadas por la expresión de fosfolípidos en la capa externa de una membrana plasmática en dicho sujeto. Las enfermedades que pueden ser tratadas y diagnosticadas son, por ejemplo, enfermedades neoplásicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas, y una combinación de

las mismas. Las enfermedades específicas incluyen enfermedad oftálmica, enfermedad del tracto gastrointestinal, y artritis reumatoide.

5 [0050] En otra forma de realización, el complejo utiliza un derivado de anexina, por ejemplo, un derivado de la anexina A5. Los derivados de la anexina tienen una o varias sustituciones de aminoácidos, supresiones, adiciones, pero las sustituciones, supresiones o adiciones de aminoácidos no afectan esencialmente a la capacidad de la anexina para enlazar con al menos un fosfolípido, para facilitar la internalización del compuesto farmacéutico en una célula, y para enlazar con al menos un compuesto farmacéutico, portador, o enlazador cruzado. La naturaleza de los derivados conforme a la invención consiste en adiciones de aminoácidos en el extremo N-terminal y C-terminal y en sustituciones de aminoácidos fuera de las regiones de unión de fosfolípidos, por ejemplo, en el lado cóncavo de la molécula. Un derivado que es tanto ejemplar como de particular importancia es una anexina A5 donde Ser315 se sustituye por Cys315. Este derivado se identifica como "Anexina A5/Ser315". Aquellos con habilidad en la técnica saben hacer tales derivados. Por otra parte, los ejemplos describen cómo probar anexinas y derivados por su capacidad para enlazar con fosfolípidos, compuestos farmacéuticos, portadores, y enlazadores cruzados y para facilitar la internalización de un compuesto farmacéutico en una célula. Véase, por ejemplo, el ejemplo 1.

10 [0051] Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un método para administrar un compuesto farmacéutico a una célula diana. El método incluye administrar una composición del complejo de la anexina o la variante de la anexina y el compuesto farmacéutico, donde la anexina o la variante de la anexina se enlaza por lo menos con un fosfolípido y facilita la internalización del compuesto farmacéutico en la célula diana y donde el compuesto farmacéutico está químicamente enlazado bien directa o bien indirectamente a través de un portador, un enlazador cruzado, o a través tanto de un portador como de un enlazador cruzado a la anexina o la variante de la anexina, y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Este método puede utilizarse para tratar una enfermedad, diagnosticar una enfermedad, prevenir una enfermedad, o investigar una enfermedad según las formas de realización descritas posteriormente.

15 [0052] Otra forma de realización de la presente invención se refiere a un método para tratar a un sujeto en la necesidad de tratamiento de una enfermedad que incluya la administración de una composición terapéutica del complejo como se ha descrito anteriormente, donde el compuesto farmacéutico es un compuesto terapéutico y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. En una forma de realización preferida, los métodos emplean derivados de la anexina de esta invención para administrar compuestos bioactivos a sitios donde las células y/o las partículas residen con fosfolípidos expuestos. Estos sitios pueden ser tanto in vitro como in vivo. Los métodos incluyen administrar al sujeto una composición que consta de una cantidad terapéuticamente eficaz de complejo que está compuesta por al menos un compuesto terapéutico y un derivado de anexina.

20 [0053] La administración y dosificación de un medicamento terapéutico puede variar entre pacientes y son bien conocidas en el campo médico. La dosificación preferida dependerá de la enfermedad a tratar, el compuesto terapéutico o mezcla de compuestos, y el paciente entre otros factores. Las posibles vías de administración de los complejos son administración subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa. Los expertos en la técnica conocerán otras vías de administración. Los complejos pueden administrarse como un bolo o continuamente por infusión durante un periodo de tiempo más largo. Las dosis varían entre 0.1 pg/kg y 10 mg/kg en procedimientos de diagnóstico y entre 1 pg/kg y 100 mg/kg en procedimientos terapéuticos. Preferiblemente 1 pg/kg -1 mg/kg (diagnóstico) y 5 pg/kg - 50 mg/kg (terapéutico). Aquellos expertos en la técnica sabrían elegir las dosificaciones apropiadas para el sujeto y la situación en concreto. Se deben considerar los mismos principios cuando se determinan los rangos de dosificación de los compuestos de diagnóstico y preventivos.

25 [0054] En otra forma de realización de la invención, las anexinas pueden llevar compuestos bioactivos a las células endoteliales de vasculatura de tumor que exponen fosfolípidos. Las variantes de la anexina de la presente invención pueden utilizarse para conjugar los compuestos bioactivos para las cuestiones descritas en US Patent No. 6,312,694.

30 [0055] Otra forma de realización de la invención se refiere a un método para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos, e incluye administrar una composición eficaz compuesta por al menos un complejo como se describe anteriormente, donde el compuesto farmacéutico es un compuesto de diagnóstico y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, y además detectar la presencia del compuesto de diagnóstico. El paso de detección puede ser, pero no se limita a, la tomografía óptica, la tomografía SPECT, la tomografía PET, la tomografía MRI, la tomografía TAC, y la ultrasonografía.

35 [0056] Una forma de realización de esta invención se refiere a un método para crear el complejo descrito anteriormente, que incluye acoplar la anexina o la variante de la anexina a al menos un compuesto farmacéutico o al menos un portador de al menos un compuesto farmacéutico, bien directa o indirectamente por un enlazador cruzado. Por ejemplo, una anexina, tal como anexina A5, una variante, o derivado, se acopla covalentemente a un compuesto farmacéutico o un portador de compuestos farmacéuticos por un enlazador cruzado bifuncional que enlaza covalentemente un compuesto farmacéutico o por un portador de compuestos farmacéuticos. El enlazador cruzado se puede elegir del grupo de enlazadores cruzados que reaccionan con grupos amino primarios tales como enlazadores cruzados con un isotiocianato, un isocianato, un imidoéster o un grupo de éster succinimidílico. Estos

grupos pueden reaccionar con grupos amino primarios de aminoácidos de la anexina A5. Preferiblemente los enlazadores cruzados tienen heterofuncionalidad para reaccionar con un grupo diferente del grupo amino del compuesto farmacéutico o portador. Algunos ejemplos de tales enlazadores cruzados heterobifuncionales son N-succinimidilo 3-(2-piridilditio) propionato ("SPDP"), maleimidoacetato de N-succinimidilo ("AMAS"), N-succinimidilo 3-maleimidopropionato ("BMPS"), y N-succinimidilo 4-(N-maleimidometilo) ciclohexano-1-carboxilato ("SMCC").

[0057] Como otro ejemplo, una anexina, tal como la anexina A5, una variante de la misma, o un derivado, se acopla covalentemente a un compuesto farmacéutico o a un portador de compuestos farmacéuticos por un enlazador cruzado bifuncional que se enlaza covalentemente con un grupo sulfhidrilo de un aminoácido de anexina A5 en un lado y con un grupo reactivo en el compuesto farmacéutico o portador por otro lado de manera que conecta la anexina A5 con el compuesto farmacéutico o portador de compuestos farmacéuticos. El grupo sulfhidrilo se puede introducir químicamente al reaccionar la anexina A5 con compuestos, como SPDP, y posteriormente con un agente reductor, como DTT. El grupo sulfhidrilo puede también ser introducido en la anexina A5 a través de técnicas de la biología molecular que producen variantes de la anexina con un único residuo de cisteína en el lado cóncavo de la molécula. El enlazador cruzado se puede elegir del grupo de enlazadores cruzados que reaccionan con grupos sulfhidrilo, tales como enlaces cruzados con piridilo, grupos que contienen maleimida o halógeno, grupos amino primarios tales como enlazadores cruzados con un isotiocianato, un isocianato, un imidoéster o un grupo de éster succinimidílico. Estos grupos pueden reaccionar con grupos sulfhidrilo de aminoácidos de anexina A5. Preferiblemente los enlazadores cruzados tienen heterofuncionalidad para reaccionar con un grupo diferente al grupo sulfhidrilo del compuesto farmacéutico. Algunos ejemplos de tales enlazadores cruzados heterobifuncionales son SPDP, AMAS, BMPS, y SMCC.

[0058] El puente que enlaza los grupos reactivos del enlazador cruzado puede insertar varias funciones tales como enlaces divisibles. Los enlaces divisibles se pueden elegir de manera que la separación entre la anexina A5 y un compuesto farmacéutico o un portador de compuestos farmacéuticos ocurra preferiblemente en tejidos predeterminados y células. Los enlaces divisibles pueden ser enlaces disulfuro o secuencias peptídicas, que son divididos por enzimas activadas tales como factores de coagulación, factores fibrinolíticos, caspasas, catepsinas, metaloproteasas, y elastasas.

[0059] Otra forma de realización de la invención incluye un dispositivo caracterizado por un soporte sólido y anexina o variantes de las mismas descritas aquí, fijadas al soporte para captar y eliminar células y partículas derivadas de célula que exponen fosfolípidos de fluidos. Los soportes sólidos conforme a esta invención son, por ejemplo, metales, sales metálicas, materiales magnéticos, polímeros de monómeros orgánicos, y polímeros de carbohidratos. El dispositivo se usa para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos e incluye un soporte sólido y al menos una anexina o variantes de la misma, donde la anexina está fijada al soporte covalentemente, bien directa o indirectamente, y donde la anexina capta células y partículas derivadas de célula que expresan fosfolípidos en una de sus superficies de membrana de fluidos del sujeto. Un sujeto es preferiblemente un organismo, un animal, un mamífero, o un humano.

[0060] Además, la invención se puede usar en un método para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos que incluye conectar las células del sujeto con el dispositivo anteriormente descrito y detectar la presencia de las células del sujeto asociadas al dispositivo. El paso de detección puede ser, pero no se limita a, la tomografía óptica, la tomografía SPECT, la tomografía PET, la tomografía MRI, la tomografía TAC, y la ultrasonografía. En el contexto de esta solicitud, los términos "diagnóstico" o "detección" se pueden usar de forma intercambiable, mientras que diagnóstico normalmente se emplea para definir un estado histológico específico del tejido, mientras que detección normalmente se emplea para localizar un tejido, lesión, u organismo como ya sea presente o ausente. Además, como se ha descrito anteriormente, es bien conocido que la presencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos es indicativo de enfermedad.

[0061] El dispositivo de soporte sólido de anexina se puede usar para la medición y/o aislamiento de células y partículas que exponen fosfolípidos en y/o de una solución biológica. WO 00/10673 es una referencia que describe un dispositivo con anexina A5 inmovilizada a una superficie para captar células y partículas que exponen fosfolípidos. La anexina A5, anexina A8, variantes, y derivados de la presente invención se pueden inmovilizar en un soporte sólido para crear tal dispositivo.

[0062] Otra forma de realización de la presente invención es un equipo que incluye al menos un complejo anteriormente descrito y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Se puede proporcionar la proteína con el compuesto terapéutico, de diagnóstico, preventivo, o de investigación como un equipo para uso humano o mamífero en un vehículo de inyección farmacéuticamente aceptable, preferiblemente una solución salina tamponada con fosfato ("PBS") con un pH y concentración fisiológicos. La preparación preferiblemente será estéril, especialmente si se destina para su uso en humanos. Los componentes opcionales de tales equipos incluyen estabilizadores, tampones, reactivos de etiquetado, radionucleidos, compuestos paramagnéticos, y jeringas convencionales, columnas, viales y similares. Adicionalmente, el equipo puede incluir contenedores y jeringas u otros dispositivos de administración.

[0063] Una forma de realización de la invención incluye métodos para prevenir la aparición de una enfermedad o impedir el progreso de una enfermedad en un sujeto en riesgo de padecerla. En una forma de realización preferida, los métodos emplean anexinas o variantes de anexina de esta invención para administrar compuestos bioactivos en sitios donde residen células y/o partículas con fosfolípidos expuestos.

5 Estos sitios pueden ser tanto in vitro como in vivo. Los métodos incluyen la administración de una composición compuesta por una cantidad eficaz de complejo que compuesta por al menos un compuesto y una anexina o variante de anexina.

10 [0064] Una forma de realización de la invención incluye métodos para investigar una enfermedad. En una forma de realización preferida, los métodos emplean anexinas o variantes de anexina de esta invención para administrar los compuestos de investigación en sitios donde residen células y/o partículas con fosfolípidos expuestos. Estos sitios pueden ser tanto in vitro como in vivo. Los métodos incluyen la administración de una composición compuesta por una cantidad eficaz de complejo que consta de al menos un compuesto y una anexina o variante de anexina.

15 [0065] Son posibles diferentes estructuras alternativas, funciones, y operaciones dentro del campo de la invención.

[0066] Dada la divulgación de la presente invención, un experto en la materia apreciaría que pudiera haber otras formas de realización y modificaciones dentro del campo y espíritu de la invención. Por consiguiente, toda modificación alcanzable por los expertos en la materia de la presente divulgación dentro del campo y espíritu de la presente invención se debe incluir como otra forma de realización de la presente invención. Todos los ejemplos, métodos y/o composiciones descritos y reivindicados aquí pueden ser hechos y llevados a cabo sin excesiva experimentación a consecuencia de la presente divulgación.

25 [0067] Será evidente para los expertos en la técnica que las composiciones con compuestos que están estructuralmente y funcionalmente relacionados se pueden sustituir por composiciones con los compuestos descritos aquí.

[0068] Los siguientes ejemplos son meramente destinados a ser ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

30

### Ejemplos

35 Ejemplo 1. Introducción de la anexina A5-FITC y la anexina A5-Alexa568 en células in vivo e in vitro.

[0069] Anexina A5 se puede purificar de tejidos de animal como se describe por Funakoshi, et al, bioquímica, 26:5572-78 (1987) o de bacterias, que se transforman con un ADNc que codifica para anexina A5, como describe Maurer-Fogy, et al, Eur. J. Biochem, 174:585-92 (1988). Se pueden acoplar compuestos fluorescentes a aminas de la anexina A5 usando procedimientos conocidos por expertos en la técnica. En este ejemplo, acoplamos FITC y Alexa568-succinimidilester a anexina A5 para producir anexina A5-FITC y anexina A5-Alexa568, respectivamente.

45 [0070] Se activaron células Jurkat cultivadas (ATCC) para expresar PtdSer en su superficie estimulándolas con anticuerpos anti-Fas (clone 7Cl 1, Beckman/Coulter, Mijdrecht, Países Bajos). Esto se llevó a cabo en presencia de 1-20 µg/ml de anexina A5 marcada fluorescentemente. Las células Jurkat fueron analizadas para localizar la anexina A5 marcada fluorescentemente por el microscopio confocal láser de barrido (CSLM, Bio Rad laboratories) después de 1-3 horas de estimulación.

50 [0071] La anexina A5 marcada fluorescentemente estaba localizada en vesículas intracelulares que fueron bien unidas a o bien separadas de la membrana plasmática. La localización intracelular dependía de la presencia de iones Ca<sup>2+</sup> y cuatro dominios funcionales de unión Ca<sup>2+</sup>/fosfolípidos de la anexina A5.

[0072] Las células HeLa (ATCC) fueron incubadas con 1-20 µg/ml de anexina A5 marcada fluorescentemente durante 1-24 horas en condiciones de reposo. Las células HeLa fueron analizadas usando CSLM para localizar la anexina A5 marcada fluorescentemente. La anexina A5 marcada fluorescentemente estaba presente en vesículas intracelulares dispersas a través del citosol de la célula. La localización intracelular en las células HeLa también dependía de la presencia de iones Ca<sup>2+</sup> y cuatro dominios funcionales de unión Ca<sup>2+</sup>/fosfolípidos de la anexina A5.

60 [0073] Se infligió una herida de isquemia/reperfusión en el corazón de un ratón vivo según Dumont, et al, Nat. Med. 7:1352-55 (2001). Se inyectó la anexina A5 marcada fluorescentemente en la vena caudal durante la fase de reperfusión. Al final del periodo de reperfusión el corazón fue extirpado, fijado, diseccionado y las secciones fueron analizadas por CSLM. Los cardiomiocitos en la región en riesgo habían interiorizado la anexina A5 marcada fluorescentemente en vesículas intracelulares dispersas en el citosol. La internalización dependía de la presencia de cuatro dominios funcionales de unión Ca<sup>2+</sup> /fosfolípidos en la molécula de anexina A5.

65

[0074] Se inyectaron células tumorales (células de carcinoma de pulmón de Lewis o células de carcinoma de colon) en ratones vía subcutánea. Cuando los tumores subcutáneos eran mayores de 5 mm de tamaño, se inyectó anexina A5 marcada fluorescentemente en la vena caudal del ratón. Se captó la imagen de la absorción de la anexina A5 marcada fluorescentemente por el tumor utilizando el dispositivo de tomografía óptica como describe Dumont, et al., Nat. Med. 7:1352-55 (2001). Posteriormente se extirparon los tumores, se fijaron, se diseccionaron y las secciones fueron analizadas por CSLM. La anexina A5 marcada fluorescentemente estaba presente en vesículas intracelulares en el citosol de las células tumorales. La localización intracelular dependía de la presencia de cuatro dominios funcionales de unión  $Ca^{2+}$  /fosfolípidos en la molécula de anexina A5.

5  
10 Ejemplo 2. Internalización de la anexina A5 es llevada a cabo por la formación de la red bidimensional y alojada por un nuevo portal de entrada.

[0075] La anexina A5 se organiza en la superficie de los fosfolípidos en series (red bidimensional) de trímeros por interacciones proteína-proteína (Oling, et al., J. Struct. Biol. 133:55-63 (2001)). Los dominios 2 y 3 se implican en las interacciones dentro de y entre los trímeros. Para investigar la función de estos dominios tenemos inactivada la función de unión  $Ca^{2+}$  /fosfolípidos de estos dominios mediante la mutagénesis dirigida al sitio del ADNc de la anexina A5 (dominio 2: L228A, y dominio 3: D303N según Mira, et al., J. Biol Chem. 272(16):10474-82 (1997)). Esta variante, M23, se expresó en E.Coli y fue purificada esencialmente según el método descrito por Maurer-Fogy, et al., Eur. J. Biochem. 174:585-92 (1988).

[0076] Se acopló el isotiocianato de fluoresceína o Alexa568-succinimidiléster (Molecular Probes, Eugene) a las aminas de M23 según los protocolos estándar conocidos por personas expertas en la técnica.

[0077] La formación de redes bidimensionales en la superficie de los fosfolípidos fue evaluada mediante un análisis FRET (transferencia de energía de resonancia de fluorescencia). Las cuentas paramagnéticas (1-4  $\mu$ m de diámetro) que fueron recubiertas con una bicapa de fosfolípidos que contiene PtdSer fueron incubadas con mezclas de anexina A5-FITC y anexina A5-Alexa568 o mezclas de M23-FITC y M23-Alexa568. La intensidad de la fluorescencia de las cuentas fue posteriormente medida por citometría de flujo (Coulter Epics XL-MLC™) utilizando una excitación de 488 nm y rangos de emisión de entre 515-530 nm (F11) y >600 nm (F13). Los perfiles F11 y F13 de distintas mezclas de proteínas marcadas con FITC y Alexa568 mostraron que la anexina A5 se enlaza a las cuentas y forma interacciones proteína-proteína bien estructuradas que muestran FRET. El M23 se enlaza a las cuentas, no obstante, sin formar interacciones proteína-proteína bien estructuradas como las mostradas por la ausencia de FRET.

[0078] Los experimentos in vitro e in vivo como se describen tras el ejemplo 1 fueron todos realizados con M23-FITC y M23-Alexa568. Los resultados de estos experimentos demuestran que el M23 se enlaza con células in vitro e in vivo sin estar interiorizado en las vesículas intracelulares, lo que indica que la formación de la red bidimensional de anexina A5 en la superficie celular es necesaria para la internalización.

[0079] Además se investigaron las células HeLa en el mecanismo a través del cual la anexina A5 induce su internalización. Las células HeLa fueron incubadas con 1-20  $\mu$ g de anexina A5-Alexa568 y amarillo luciferino o FITC-transferente o un inhibidor de caveolas para investigar la fase de internalización de fluido, la internalización mediada por receptor y la internalización mediada por caveolas, respectivamente. Los análisis de las células HeLa con CSLM mostraron que la anexina A5 se interioriza a través de un mecanismo diferente de estos mecanismos conocidos, lo que constata un nuevo portal de introducción a la célula abierto por la anexina A5.

Ejemplo 3. La anexina A5 transporta grandes estructuras macromoleculares a la célula.

[0080] La anexina A5 induce la internalización de compuestos tales como compuestos fluorescentes como se mostró en los ejemplos 1 y 2. Para probar si la anexina A5 también lleva estructuras macromoleculares grandes en la célula, construimos una variante de la anexina A5 con la glutamina en la posición 2 sustituida por una cisteína y la cisteína en la posición 315 sustituida por una serina. Este variante (Cys2-anexina A5) fue diseñada porque nos permite acoplar estructuras macromoleculares a la anexina A5 sin perjudicar su capacidad para enlazarse con PtdSer y para establecer interacciones anexina A5-anexina A5 en la superficie celular. El extremo N-terminal de la anexina A5 es apical a sus sitios de unión de fosfolípidos y no interactúa con los dominios 2 y 3 (Huber, et al., EMBO J. 9:3867-74 (1990)).

[0081] Este ejemplo describe el acoplamiento de cuentas paramagnéticas (1-4  $\mu$ m de diámetro) a Cys2-anexina A5. Las cuentas paramagnéticas (PVE-12, Chemagen) fueron recubiertas con fosfolípidos que contenían 1-20% moles de fosfatidiletanolamina ("PtdE"). Las cuentas fueron activadas con SPDP (Pierce Chemical Company) para producir PtdE activado, que reacciona con grupos sulfhidrilo. La Cys2-anexina A5 fue incubada con las cuentas activadas con SPDP según los protocolos estándar conocidos por personas expertas en la técnica para producir cabezas recubiertas de fosfolípidos a las que se acopló covalentemente la Cys2-anexina A5 (cuentas de Cys2-anexina A5). Las cuentas de Cys2-anexina A5 contenían anexina A5 que todavía era capaz de enlazarse a PtdSer y a células que expresan PtdSer.

[0082] Las cuentas Cys2-anexina A5 fueron incubadas con el marcador fluorescente lipófilico CM-Dil (Molecular Probes, Eugene). Las células HeLa fueron incubadas con las cuentas de Cys2-anexina A5 impregnadas durante 1-24 horas. Posteriormente las células fueron analizadas con CSLM. Los resultados muestran que la Cys2-anexina A5 unida covalentemente transporta las cuentas grandes a las células probando así que la anexina A5 es capaz de abrir el nuevo portal de introducción para estructuras macromoleculares grandes.

Ejemplo 4: La producción de la variante de anexina A5-Cys2 cuya glutamina de aminoácido en la posición 2 se sustituye por cisteína de aminoácido.

[0083] El ADNc de anexina A5 humana fue obtenido a partir de la genoteca de ADNc de un leucocito de un voluntario sano con técnicas estándar conocidas por personas expertas en la materia. La secuencia de ADNc codificó la secuencia de aminoácidos presentada en la figura 1. Los cebadores fueron diseñados para mutar el ADNc de la anexina A5 mediante técnicas PCR de manera que el ADNc resultante codificó la secuencia de aminoácidos de la figura 1 con la excepción que la glutamina de aminoácido en la posición 2 fue sustituida por la cisteína de aminoácido. El ADNc resultante codificó la variante anexina A5-Cys2.

[0084] El ADNc de anexina A5-Cys2 fue clonado en el vector bacteriano de expresión pCPSD con técnicas estándar conocidas por personas expertas en la materia. E.Coli fueron transformadas con el plásmido resultante y cultivadas en el fermentador Bioflo 3000. La anexina A5-Cys2 fue aislada y purificada de la E.Coli con técnicas estándar de intercambio de iones y cromatografía de permeación en gel conocida por personas expertas en la técnica.

[0085] La anexina purificada A5-Cys2 mostraba una banda homogénea de alrededor de 34 kDa en SDS-PAGE y presentaba una actividad de unión completa de fosfatidilserina como se midió por elipsometría (Andree, et al., J Biol Chem 265:4923-4928 (1990)).

Ejemplo 5. El acoplamiento de la variante de anexina A5-Cys2 a cuentas magnéticas.

[0086] Este ejemplo representa un procedimiento de acoplamiento general y conveniente donde una variante de anexina de las formas de realización de esta invención se acopla a una cuenta (para)magnética, que contiene grupos de tiol activado. Este ejemplo se efectuó con Dynabeads M-450 de Dynal no revestidas, albúmina de suero de Sigma, el enlazador cruzado SPDP divisible y heterobifuncional de Pierce y la variante de anexina A5-Cys2 recombinante.

Activación de las cuentas magnéticas:

[0087] Este ejemplo usa cuentas M-450, albúmina de suero para revestir las cuentas y SPDP para activar el revestimiento proteico de las perlas. M-450 perlas se pueden sustituir por cualquier cuenta (para)magnética. La albúmina de suero se puede sustituir por cualquier proteína o cualquier compuesto de carbohidrato. El SPDP se puede sustituir por cualquier reactivo de enlazador cruzado que tiolata el revestimiento de las cuentas.

[0088] Las cuentas se lavan colocando de un frasco de microfuga que contiene 1 ml de cuentas M-450 en el recipiente magnético, aspirando el sobrenadante y resuspendiendo las cuentas en tampón de 1 ml (25 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, y 1 mM EDTA). Se repite este procedimiento de lavado varias veces. Después del último lavado, las cuentas se resuspenden en un tampón de 1 ml que contiene 100 mg/ml de albúmina de suero. El frasco es rotado verticalmente preferiblemente durante 120 minutos a temperatura ambiente. Esto provoca que las cuentas se recubran de albúmina. Las cuentas son posteriormente lavadas varias veces con un tampón de 1 ml por cada lavado para eliminar la albúmina sobrante. La albúmina en las cuentas se tiola resuspendiendo las cuentas en un tampón de 1 ml que contiene 150 µg/ml de SPDP. Esta suspensión se rota verticalmente preferiblemente durante 60 minutos a temperatura ambiente. El SPDP no-reaccionado es posteriormente eliminado lavando las cuentas 4 veces con un tampón de 1 ml por cada lavado. El procedimiento de activación produce cuentas magnéticas con un revestimiento de albúmina que tienen ditiogrupos activados expuestos, los cuales reaccionan espontáneamente con proteínas que tienen grupos sulfhidrilo disponibles en la superficie de la proteína para formar un enlace covalente entre la proteína y el revestimiento de albúmina de las cuentas.

Enlace covalente entre las cuentas magnéticas activadas y la variante de anexina:

[0089] Estos ejemplos describen el acoplamiento de la variante de anexina A5-Cys2. La variante de anexina A5-Cys2 se puede sustituir por cualquier variante que forme parte de las formas de realización de esta invención.

[0090] Las cuentas magnéticas activadas (ver sección arriba) son recogidas utilizando el recipiente magnético. La solución se aspira y las cuentas se resuspenden en un tampón de 1 ml que contiene 5 mg de la variante de anexina A5-Cys2. La mezcla reactiva es rotada verticalmente preferiblemente durante 60 minutos a temperatura ambiente. La reacción es posteriormente detenida lavando las cuentas varias veces con un tampón de 1 ml por cada lavado. Las cuentas resultantes tienen unida la variante de anexina A5-Cys2 de manera covalente, que es capaz de enlazarse con fosfolípidos ácidos y membranas celulares, que tienen fosfolípidos ácidos expuestos como las células apoptóticas, cuerpos apoptóticos, y micropartículas derivadas de membrana.

Prueba de las cuentas de anexina A5-Cys2:

[0091] Las células Jurkat (106 a células/ml de medio de cultivo) se desencadenan con 20 ng/ml de anticuerpos anti-Fas para ejecutar la apoptosis durante 4 horas a 37°C. 1 ml de células Jurkas activadas son posteriormente incubadas con 50 µl de cuentas de anexina V-Cys2 en presencia de 2,5 mM de iones  $Ca^{2+}$  en un tubo de microfuga durante 15 minutos a temperatura ambiente. El tubo se coloca en el recipiente magnético para separar las cuentas de la solución. Las cuentas se lavan íntegramente con un tampón de unión (25 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ ). Finalmente las cuentas se resuspenden bien en un tampón de EDTA (25 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, y 10 mM EDTA) o bien en un tampón de DTT (25 mM Hepes/NaOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM  $CaCl_2$ , y 10 mM DTT). Las cuentas son posteriormente retiradas de la solución. Las soluciones se mezclan con la anexina V-FITC y yoduro de propidio y son evaluadas por citometría de flujo.

[0092] La figura 5A ilustra la distribución de la población celular de las células Jurkat antes del tratamiento con las cuentas de anexina A5-Cys2. La figura 5B ilustra la distribución de la población celular después de la disminución de las células y partículas que exponen PtdSer debida al tratamiento con cuentas. La figura 5C representa las células y partículas que se enlazaron a las cuentas de anexina A5-Cys2 y se liberan por EDTA o DTT.

Ejemplo 6. El acoplamiento de la variante de anexina A5-Cys2 a la ficoeritrina de proteína fluorescente.

[0093] Este ejemplo representa un procedimiento de acoplamiento general y conveniente en el que una variante de la anexina de las formas de realización de esta invención se acopla a una proteína con propiedades fluorescentes. Este ejemplo se llevó a cabo con ficoeritrina ("PE") de Molecular Probes, el enlazador cruzado divisible y heterobifuncional SPDP de Pierce y la variante recombinante de la anexina A5-Cys2.

[0094] La PE se dializa en un tampón de borato a pH 8.5 y se ajusta a 1 mg/ml. Se disuelve el SPDP en DMSO a una concentración de 6.2 mg/ml. Se añaden 25 µl de la solución de SPDP a 1 ml de la PE dializada. Se deja actuar la reacción 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla reactiva es posteriormente dializada en el tampón de fosfato sódico a pH 7.2. La anexina A5-Cys2 se diluye en la solución de PE a una concentración de 2 mg/ml. Se deja reaccionar la mezcla 60 minutos a temperatura ambiente. Se purifica el conjugado de anexina A5-Cys2-PE por cromatografía de filtración en gel. Se analiza la propiedad de unión de fosfatidilserina del conjugado de anexina A5-Cys2-PE con elipsometría. Este análisis muestra que las propiedades aglutinantes de la fosfatidilserina no se ven alteradas por reticular la anexina A5-Cys2 a una proteína tal como PE, que es aproximadamente 6 veces el tamaño de la anexina A5-Cys2.

Ejemplo 7. El acoplamiento de la variante de anexina A5-Cys2 a la fosfatidiletanolamina que se introduce en la membrana de un liposoma.

[0095] Este ejemplo representa un método general para fijar una función de objetivo de fosfatidilserina a un sistema de administración de medicamentos de liposomas. Este ejemplo ilustra, por otra parte, que las estructuras que son mayores que 100 veces el tamaño de la anexina A5-Cys2 se pueden acoplar a la anexina A5-Cys2 a través de química de tiol sin perjudicar sus propiedades aglutinantes de fosfatidilserina. Este ejemplo se efectuó con dioleoilfosfatidiletanolamina ("PtdEth"), dioleoilfosfatidilcolina ("PtdChol"), y colesterol ("Chol") de Avanti Polar Lipids, el enlazador cruzado divisible y heterobifuncional SPDP de Pierce y la variante recombinante de la anexina A5-Cys2. Se prepara una suspensión de liposomas a 5 mg/ml (PtdChol:PtdEth:Chol a fracción molar de 8:10:1:1) en un tampón de fosfato sódico de 0.1 M a pH 7.5. Se pueden usar otros lípidos aparte de PtdEth si contienen un grupo amino libre en su grupo de cabezas hidrofílicas. Se disuelve el SPDP a una concentración de 6.2 mg/ml en DMSO. Se pueden usar otros enlazadores cruzados heterobifuncionales si contienen grupos reactivos hacia grupos amino y fracciones sulfhidrilo. Se añaden 50 µl de la solución de SPDP a 1 ml de la suspensión de liposoma. Se deja reaccionar la mezcla 30 minutos a temperatura ambiente. La mezcla es posteriormente dializada contra 0.1 M fosfato sódico a pH 7.2. Se diluye la anexina A5-Cys2 en la suspensión de liposoma a una concentración de 2 mg/ml. Se deja reaccionar la mezcla 60 minutos a temperatura ambiente. Los conjugados de anexina A5-Cys2-liposoma son purificados de la anexina A5-Cys2 no-reaccionada mediante centrifugado. Se analiza la propiedad de unión de la fosfatidilserina del conjugado anexina A5-Cys2-liposoma mediante elipsometría. Este análisis muestra que las propiedades aglutinantes de la fosfatidilserina no se ven alteradas por reticular la anexina A5-Cys2 a la gran estructura del liposoma.

Ejemplo 8. Doxorrubicina de objetivo cargó liposomas con la variante de anexina A5-Cys2.

[0096] Este ejemplo representa un método general para fijar una función de objetivo de célula apoptótica a liposomas portadores de citostáticos. El ejemplo se llevó a cabo con distearoilfosfatidilcolina, colesterol, y distearoilfosfatidiletanolaminopolietilenoglicol (2000)-maleimida ("PtdPE-PEGM"). Los lípidos provenían de Avanti Polar Lipids Inc. (USA, Alabaster AL35007). Se prepararon los liposomas compuestos por PtdChol/[PtdEPE-PEGM]/Chol en una proporción 50/20/30 (% molar) mediante la hidratación de una película lipídica seca en 250 mM sulfato de amonio a pH 5.5. Los liposomas multilaminares fueron extruidos a un tamaño final de alrededor de 100 nm. El sulfato de amonio externo fue sustituido con 10% sacarosa mediante diálisis. Los liposomas fueron cargados

con doxorubicina siguiendo un mecanismo por concentración como se describe en (Lasic, et al., Biochem. Biophys. Acta 1239:145-56 (1995)). La doxorubicina que no fue absorbida por los liposomas fue eliminada mediante diálisis.

5 [0097] Los liposomas cargados de doxorubicina fueron dializados contra el tampón Hepes a pH 7.2. Se añadió la anexina A5-Cys2 y se incubó la mezcla para permitir una reacción química entre la maleimida y el grupo sulfhidrilo de Cys2. El complejo resultante fue analizado para unirlo a una superficie de fosfolípido sintético que contiene fosfatidilserina y a células Jurkat apoptóticas.

10 Ejemplo 9. La anexina A5-Cys2 se dirige a la doxorubicina portadora de liposomas con función de tomografía.

15 [0098] Este ejemplo representa un método general para fijar una función de objetivo de célula apoptótica a liposomas portadores de citostáticos. Además un agente de diagnóstico es una fijación covalente a los liposomas para monitorizar el tráfico de los liposomas in vivo mediante tomografía. El ejemplo se llevó a cabo con distearoilfosfatidilcolina, colesterol, distearoilfosfatidil-etanolamina-polietileno glicol (2000)-maleimida (PtdPE-PEGM) y distearoilfosfatidil-etanolamina-polietileno glicol (2000)-amina (PtdPE-PEGA). Los lípidos provenían de Avanti Polar Lipids Inc. (USA, Alabaster AL35007). Los liposomas compuestos por PtdChol/PtdEPE-PEGM/PtdEPE-PEGA/Chol en una proporción 40/20/10/30 (% molar) fueron preparados mediante hidratación de una película de lípido seco en 250 mM sulfato de amonio a pH 5.5. Los liposomas multilaminares fueron extruidos hasta tener un tamaño final de alrededor de 100 nm. El sulfato de amonio externo fue sustituido por 10% sacarosa mediante diálisis. Los liposomas fueron cargados con doxorubicina siguiendo un mecanismo por concentración como se describe en (Lasic, et al., Biochim Biophys Acta, 1239:145-56 (1995)). La doxorubicina que no fue absorbida por los liposomas fue eliminada mediante diálisis. Los liposomas cargados de doxorubicina fueron dializados contra el tampón Hepes a pH 7.4. Los liposomas fueron mezclados con agentes de diagnóstico que reaccionan con el grupo amino. Algunos ejemplos son sondas fluorescentes con grupos de isotiocianato o grupos succinimidilo (para la tomografía óptica), Gd-DTPA (para la tomografía MRI), y sondas radionucleares (para la tomografía nuclear). En este ejemplo, usamos FITC. Los liposomas cargados de doxorubicina fueron mezclados con FITC. La mezcla fue incubada para permitir una reacción entre el grupo amino y el FITC. El FITC desacoplado fue eliminado mediante diálisis. Los liposomas cargados de doxorubicina fueron dializados contra el tampón Hepes a pH 7.2. Se añadió la anexina A5-Cys2 y se incubó la mezcla para permitir una reacción química entre la maleimida y el grupo sulfhidrilo del Cys2. Se analizó el complejo resultante para unirlo a la superficie de un fosfolípido sintético que contiene fosfatidilserina usando elipsometría y a células Jurkat apoptóticas usando citometría de flujo.

35 [0099] Se hace referencia a un número de publicaciones y patentes en la presente solicitud respecto a sus divulgaciones.

Listado de secuencias

[0100]

40 <110> REUTELINGSPERGER, CHRIS

<120> Anexinas, derivados de las mismas, y variantes de la anexina-Cys, al igual que usos de diagnóstico y terapéuticos de las mismas

45 <130> 082671-0180

<140> 10/886,262

<141> 2004-07-07

50 <160> 7

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

55 <211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

60



ES 2 500 340 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 2  
 <211> 319  
 <212> PRT

5

ES 2 500 340 T3

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr  
 20 25 30  
 Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln  
 35 40 45  
 Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu  
 50 55 60  
 Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys  
 85 90 95  
 His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile  
 100 105 110  
 Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr  
 115 120 125  
 Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr  
 130 135 140

5

ES 2 500 340 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 3

Ala Gln Val Leu Cys Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

10

ES 2 500 340 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 4

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

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

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

ES 2 500 340 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5  
<211> 319  
<212> PRT  
5 <213> Homo sapiens

<400> 5

ES 2 500 340 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 6  
 <211> 319  
 <212> PRT

5

ES 2 500 340 T3

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Cys Pro Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr  
 20 25 30  
 Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln  
 35 40 45  
 Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu  
 50 55 60  
 Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys  
 85 90 95  
 His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile  
 100 105 110  
 Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr  
 115 120 125  
 Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr  
 130 135 140  
 Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln  
 165 170 175  
 Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys  
 180 185 190  
 Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val  
 195 200 205  
 Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile  
 210 215 220  
 Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr  
 245 250 255

ES 2 500 340 T3

Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met  
 260 265 270  
 Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg  
 275 280 285  
 Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser  
 290 295 300  
 Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Ser Gly Glu Asp Asp  
 305 310 315

<210> 7  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 7

Ala Cys Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe Asp Glu  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu Gly Thr  
 20 25 30  
 Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn Ala Gln  
 35 40 45  
 Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg Asp Leu  
 50 55 60  
 Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys Leu Ile  
 65 70 75 80  
 Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu Leu Lys  
 85 90 95  
 His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr Glu Ile  
 100 105 110  
 Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln Val Tyr  
 115 120 125  
 Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly Asp Thr  
 130 135 140  
 Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala Asn Arg  
 145 150 155 160  
 Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp Ala Gln  
 165 170 175  
 Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys  
 180 185 190  
 Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg Lys Val  
 195 200 205



ES 2 500 340 T3

Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu Thr Ile  
 210 215 220  
 Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala Val Val  
 225 230 235 240  
 Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr  
 245 250 255  
 Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg Val Met  
 260 265 270  
 Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu Phe Arg  
 275 280 285  
 Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp Thr Ser  
 290 295 300  
 Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Ser Gly Glu Asp Asp  
 305 310 315

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Variante de anexina compuesta por: un lado convexo que puede enlazarse con al menos un fosfolípido; y un lado cóncavo, donde al menos un aminoácido en el lado cóncavo ha sido sustituido por un residuo de cisteína, dicho al menos un aminoácido en el lado cóncavo siendo seleccionado de los aminoácidos correspondientes a las posiciones 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 150, 157-170, 202-219, 245-248, y 280-294 de la SEC ID nº 1.
- 10 2. Variante de anexina según la reivindicación 1, donde el lado convexo no contiene ningún residuo de cisteína.
- 15 3. Variante de anexina según la reivindicación 2, donde la anexina está compuesta por la SEC ID nº 2, que está modificada para contener el residuo de cisteína.
- 20 4. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, donde la variante de anexina está compuesta además por una o varias sustituciones de aminoácidos, deleciones, o adiciones con sustituciones de aminoácidos, deleciones o adiciones que no afectan esencialmente a la capacidad de la variante de anexina para enlazarse a al menos un fosfolípido.
- 25 5. Complejo compuesto por: al menos un compuesto farmacéutico; y una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y donde el compuesto farmacéutico está químicamente enlazado bien directa o bien indirectamente a través de un portador, un enlazador cruzado, o tanto un portador como un enlazador cruzado, al residuo de cisteína de la variante de anexina.
- 30 6. Complejo según la reivindicación 5, donde el enlazador cruzado es seleccionado del grupo consistente en el N-succinimidilo 3- (2-piridilditio) propionato, maleimidoacetato de N-succinimidilo, N-succinimidilo 3-maleimidopropionato, N-succinimidilo 4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato, piridilo, grupos que contienen maleimida, grupos que contienen halógeno, un isotiocianato, un isocianato, un imidoéster, y un grupo de éster succinimidílico.
- 35 7. Complejo según la reivindicación 5 o 6, donde el portador es seleccionado del grupo que consiste en un liposoma, un dendrímero, un polímero, y una combinación de los mismos.
- 40 8. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-7, donde el compuesto farmacéutico es seleccionado del grupo consistente en un compuesto terapéutico, un compuesto de diagnóstico, un compuesto preventivo, un compuesto de investigación, y una combinación de los mismos.
- 45 9. Complejo según la reivindicación 8, donde el compuesto terapéutico es seleccionado del grupo que consiste en una toxina, una enzima, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de los mismos, un inmunocombinado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente de inducción de muerte celular, un agente de inhibición de muerte celular, un compuesto fibrinolítico, y una combinación de los mismos.
- 50 10. Complejo según la reivindicación 8, donde el compuesto de diagnóstico es seleccionado del grupo que consiste en un grupo fluorescente, un agente de contraste, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente de ultrasonido, y una combinación de los mismos.
- 55 11. Método para elaborar un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-10, que consta del acoplamiento la variante de anexina al compuesto farmacéutico o por lo menos a un portador del compuesto farmacéutico, bien directa o indirectamente mediante un enlazador cruzado, donde el enlazador cruzado enlaza químicamente el compuesto farmacéutico o el portador a la variante de anexina.
- 60 12. Dispositivo para detectar la presencia o ausencia de fosfolípidos, que está compuesto por: un soporte sólido, y al menos una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde la variante de anexina está químicamente enlazada al soporte, bien directa o indirectamente, por el residuo de cisteína; y donde la variante de anexina puede enlazarse a al menos un fosfolípido expresado en la capa externa de una membrana plasmática.
- 65 13. Dispositivo según la reivindicación 12, donde el soporte sólido se hace de un material seleccionado del grupo que consiste en metales, sales metálicas, materiales magnéticos, polímeros de monómeros orgánicos, y polímeros de carbohidratos.
14. Método para detectar la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos, que comprenden: contactar células con el dispositivo según la reivindicación 12 o 13, y detectar la presencia o ausencia de las células o partículas celulares asociadas al dispositivo.
15. Método según la reivindicación 14, donde el paso de detección es seleccionado del grupo consistente en la tomografía óptica, tomografía SPECT, tomografía PET, tomografía MRI, tomografía TAC, y ultrasonografía.

16. Composición o equipo que comprende al menos un complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-10 y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 17. Complejo según cualquiera de las reivindicaciones 5-10, donde el compuesto farmacéutico es un compuesto terapéutico, para usar en el tratamiento o prevención de una enfermedad seleccionada entre enfermedades neoplásicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes, y enfermedades inflamatorias.

**Figura 1. SEC ID nº 1 – Anexina A5/Cys315**

10 <u>AOVLRGTVTD</u>	20 <u>FPGFDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 <u>LTSRSNAORO</u>	60 <u>EISAAPKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGRFEKLI
90 VALMKPSRLY	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVL T	120 EIIASRTPEE
130 <u>LRAIKQVYEE</u>	140 <u>EYGSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWGTDE	200 EKFITIFGTR
210 <u>SVSHLRKVPD</u>	220 <u>KYMTISGFQI</u>	230 EETIDRETS G	240 NLEQLLAVV
250 KSIR <u>SIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLIR	280 VMVSRSEIDL
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLCGEDD

Figura 2. SEC ID nº 2 – Anexina A5/Ser315

10 <u>AQVLRGTVTD</u>	20 <u>FPGDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 LTSRS <u>NAORQ</u>	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGKFEKLI
90 VALMK <u>PSRLY</u>	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVLT	120 EIIASRT <u>PEE</u>
130 <u>LRAIKQVYEE</u>	140 <u>EYGSSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWGTDE	200 EKFITIFGTR
210 SV <u>HLRQVFD</u>	220 <u>KYMTISGFQI</u>	230 EETIDRETSG	240 NLEQLLAVV
250 KSIR <u>SIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLIR	280 VMVSRSEID <u>L</u>
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLSGEDD

Figura 3a. SEC ID nº 3 – Anexina A5/Ser315/Cys5

10 <u>AQVLCGTVTD</u>	20 <u>FPGFDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 LTSRSNAORO	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGKFEKLI
90 VALMKPSRLY	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVLT	120 <u>EIIASRTPEE</u>
130 <u>LRAIKQVYEE</u>	140 <u>EYGSSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWGTDE	200 EKFITIFGTR
210 <u>SVSHLRKVFED</u>	220 <u>KYMTISGFQI</u>	230 EETIDRETSQ	240 NLEQLLAVV
250 <u>KSIRSIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLIR	280 VMVSRSEIDL
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLSGEDD

Figura 3b. SEC ID nº 4 – Anexina A5/Ser315/Cys7

10 <u>AOVLRGCVTD</u>	20 <u>FPGFDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 <u>GTDEESILTL</u>
50 <u>LTSRNAORQ</u>	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 <u>ELTGKFEKLI</u>
90 <u>VALMKPSRLY</u>	100 <u>DAYELKHALK</u>	110 <u>GAGTNEKVLV</u>	120 <u>EIASRTPEE</u>
130 <u>LRAIKOVYEE</u>	140 <u>EYGSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 <u>VEQDAQALFQ</u>	190 <u>AGELKWTGDE</u>	200 <u>EKFITIFGTR</u>
210 <u>SVSHLRKVFD</u>	220 <u>KYMTISGFOI</u>	230 <u>EETIDRETSG</u>	240 <u>NLEQLLAVV</u>
250 <u>KSIRSIPAYL</u>	260 <u>AETLYYAMKG</u>	270 <u>AGTDDHTLIR</u>	280 <u>VMVSRSEIDL</u>
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 <u>GDTSGDYKKA</u>	319 <u>LLLLSGEDD</u>

Figura 3c. SEC ID nº 5 – Anexina A5/Ser315/Cys9

10 <u>AQVLRGTVCD</u>	20 <u>FPGDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 <u>LTSRSNAORO</u>	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGKFEKLI
90 <u>VALMKPSRLY</u>	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVLV	120 EILASRTPEE
130 <u>LRAIKQVYEE</u>	140 <u>EYGSSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWGTDE	200 EKFITIFGTR
210 <u>SVSHLRKVFD</u>	220 <u>KYMTISGFOI</u>	230 EETIDRETSG	240 NLEQLLAVV
250 <u>KSIRSIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLIR	280 VMVSRSEIDL
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLSGEDD



Figura 3d. SEC ID nº 6 – Anexina A5/Ser315/Cys11

10 <u>AOVLRGTVTD</u>	20 <u>CPGFDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 <u>LTSRSNAORO</u>	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGKFEKLI
90 <u>VALMKPSRLY</u>	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVLT	120 <u>EIIASRTPEE</u>
130 <u>LRAIKQVYEE</u>	140 <u>EYGSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWTDE	200 EKFITIFGTR
210 <u>SVSHLRKVF</u>	220 <u>KYMTISGFQI</u>	230 EETIDRETSG	240 NLEQLLAVV
250 <u>KSIRSIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLIR	280 <u>VMVSRSEIDL</u>
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLSGEDD

Figura 4. SEC ID nº 7 – Anexina A5/Ser315/Cys2

10 <u>ACVLRGTVTD</u>	20 <u>FPGFDERADA</u>	30 <u>ETLRKAMKGL</u>	40 GTDEESILTL
50 <u>LTSRSNAORQ</u>	60 <u>EISAAFKTLF</u>	70 <u>GRDLLDDLKS</u>	80 ELTGKFEKLI
90 <u>VALMKPSRLY</u>	100 DAYELKHALK	110 GAGTNEKVL T	120 <u>EIIASRTPEE</u>
130 <u>LRAIKOVYEE</u>	140 <u>EYGSSLEDDV</u>	150 <u>VGDTSGYYQR</u>	160 <u>MLVVLLQANR</u>
170 <u>DPDAGIDEAQ</u>	180 VEQDAQALFQ	190 AGELKWTDE	200 EKFITIFGTR
210 <u>SVSHLRKVPD</u>	220 <u>KYMTISGFQI</u>	230 EETIDRETSG	240 NLEQLLAVV
250 <u>KSIRSIPAYL</u>	260 AETLYYAMKG	270 AGTDDHTLR	280 <u>VMVSRSEIDL</u>
290 <u>FNIRKEFRKN</u>	300 <u>FATSLYSMIK</u>	310 GDTSGDYKKA	319 LLLLSGEDD

Figura 5A

Perfil de población de células Jurkat antes del tratamiento con cuentas de anexina A5-Cys 2

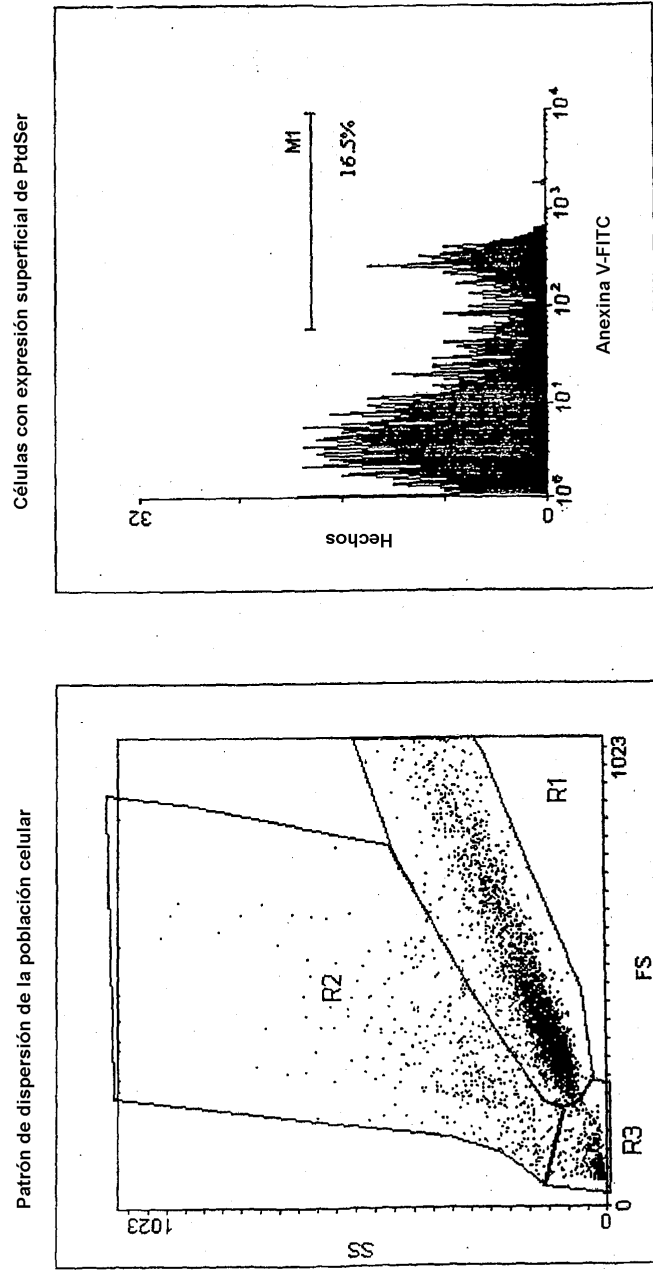


Figura 5B

Perfil de la población de células Jurkat después de ser disminuidas con cuentas de anexina A5-Cys2

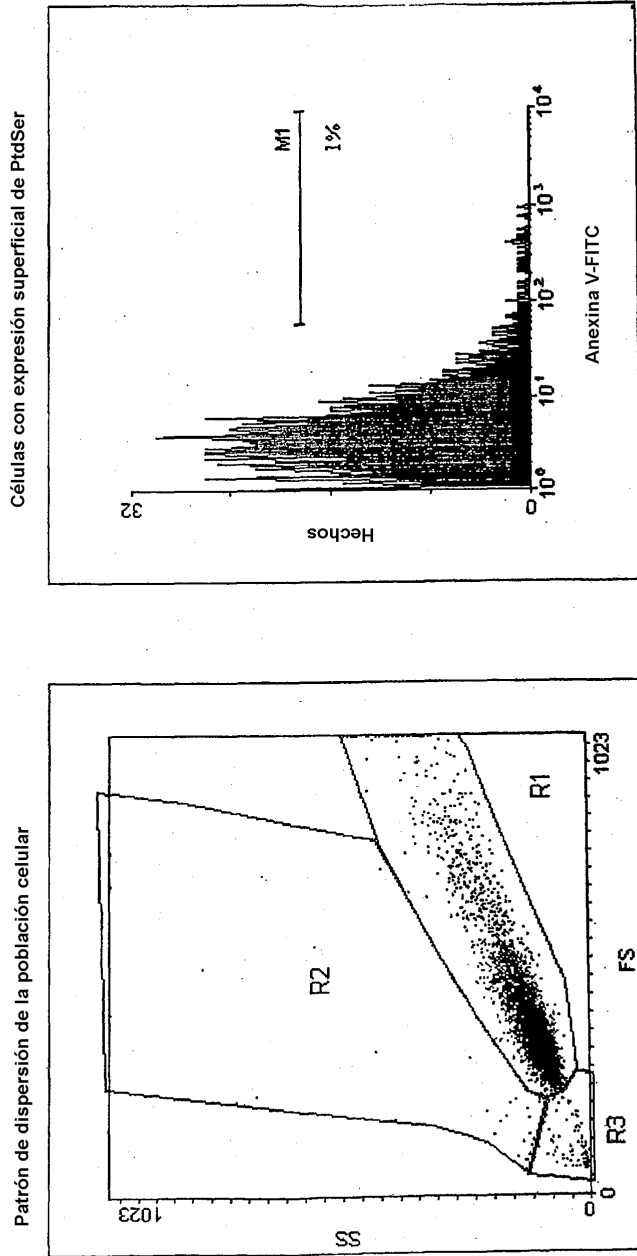
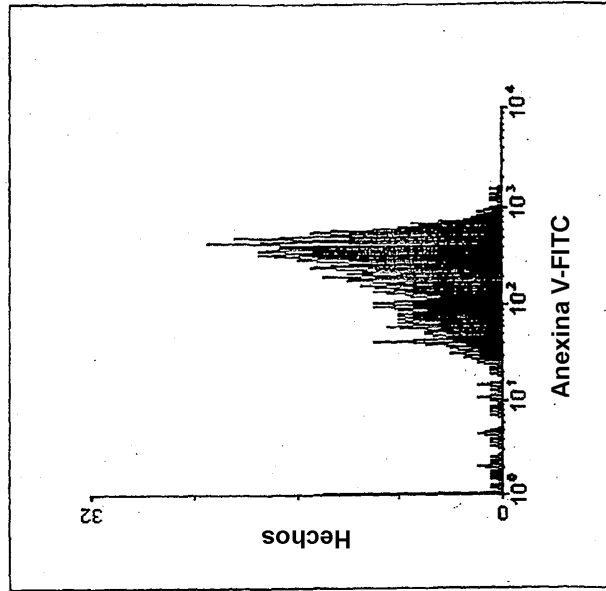


Figura 5C

Perfil de la población de células Jurkat que se enlazó con las cuentas de anexina A5-Cys2 y se liberó con EDTA

Células con expresión superficial de PtdSer



Patrón de dispersión de la población celular

