

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 530 228**

51 Int. Cl.:

A61K 51/08 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01T 1/161 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.08.2009 E 09810266 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.12.2014 EP 2328622**

54 Título: **Anexinas radiomarcadas**

30 Prioridad:

26.08.2008 EP 08162959

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

27.02.2015

73 Titular/es:

**MOSAMEDIX B.V. (100.0%)
Monnikendijk 4
4474 ND Kattendijke, NL**

72 Inventor/es:

**REUTELINGSPERGER, CHRISTIAAN PETER
MARIA y
MOONEN, PETER JOZEF JACOBUS**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 530 228 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 radiomarcadas

5 Campo de la invención

[0001] La invención se refiere a moléculas de anexina que tienen sitios de unión para metales pesados, en particular metales radiactivos. La invención además se refiere al uso de moléculas de anexina radiomarcadas en la formación de imágenes de diagnóstico.

10

Antecedentes

[0002] La formación de imágenes moleculares de la fosfatidilserina biomarcadora (PS) *in vivo* es importante para el diagnóstico de enfermedades y la evaluación de la eficacia de la terapia. Los agentes detectores de PS eficaces son anexina A5 y sus variantes. La anexina A5 marcada con tecnecio puede ser inyectada en un sujeto y, después, se puede realizar una Tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT) para evaluar el biomarcador PS. Para valorar el biomarcador PS sensiblemente y específicamente es obligatorio que el complejo entre tecnecio y anexina A5 sea estable *in vivo* y sea rápidamente sacado de la circulación sanguínea.

[0003] Los complejos actuales de tecnecio y anexina A5 se basan en la unión química de Tc (tecnecio) con un sitio no-específico de la molécula de anexina. Por ejemplo, JP2006-316004 divulga un compuesto obtenido mediante la unión de 4'-aminometil-N,N'-trimetileno-dibenzohidroxamida con anexina V a través de un enlazador, este compuesto es capaz de complicar el tecnecio. WO 98/48699 divulga un complejo en el cual Tc99m está unido a la anexina vía succinimidílico nicotinato hidracino (HYNIC). Tales complejos padecen de estabilidad insuficiente. Además, no es posible dirigir el marcador a un sitio específico de las anexinas, especialmente un sitio que no interfiera con su perfil de afinidad. Jung et al. J. Nucl. Med. 2008 49 (Suplemento 1):304P, se refiere a una molécula de anexina recombinante marcada con I-124 para formar imágenes de apoptosis utilizando un pequeño animal PET (tomografía de emisión de positrón).

30 Resumen de la invención

[0004] La presente invención proporciona una variante de anexina nueva con una extensión de su terminal N que contiene residuos de histidina para permitir la formación de complejos estables entre un radionucleido tal como el tecnecio y la anexina y que contiene un residuo de cisteína para permitir el acoplamiento a un agente farmacológico o de diagnóstico. La invención también concierne a tales anexinas que llevan un radionucleido, es decir a anexinas radiomarcadas. La invención además proporciona complejos de anexina radiomarcada para usar en diagnósticos y terapia.

40 Descripción de la invención

[0005] Así, la invención se refiere a una anexina radiomarcada, la cual comprende un mínimo de 2 y un máximo de 20 residuos de histidina en sus terminales N, así como también uno o más residuos de cisteína en el lado cóncavo de la molécula, tal como se define en la reivindicación 1. En particular, la anexina de la invención comprende un mínimo de 3, preferiblemente al menos 4 residuos de histidina en su terminal N. El número máximo no es muy estricto, y prácticamente éste puede ser hasta 12, o preferiblemente hasta 10 o incluso hasta 8 residuos de histidina en la terminal N.

[0006] Preferiblemente, los residuos de histidina son contiguos, es decir sin otros aminoácidos entremedias, o con solo un aminoácido entremedias. Este particularmente se aplica a dos o tres residuos de histidina. Así, las secuencias parciales preferidas en las terminales N incluyen H-H; H-H-H; H-X-H; H-X-H-H; H-H-X-H; H-X-H-H; o H-X-H-H. Un aminoácido de intervención X, si está presente en todo caso, no es un aminoácido apolar grande tal como Phe, Tyr, Leu, Ile o Val, o Met o Cys. Preferiblemente, los aminoácidos de intervención, si están presentes en todo caso, son seleccionados de Gly, Ala, Ser, Lys, y Arg, y en casos de dos o más X, estos pueden ser diferentes. De la forma más preferible, la variante de anexina de la invención comprende al menos 3 residuos de histidina contiguos a su terminal N, especialmente al final del todo.

[0007] El término "anexina" se refiere a cualquier proteína capaz de unirse a fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina (PS) en una manera calcio-dependiente, y partes de la denominada familia de la anexina. Estas sustancias tienen la propiedad de unirse a fosfolípidos cargados negativamente, preferiblemente con una constante de disociación menor que 10^{-6} M en presencia de iones Ca^{2+} . La familia cubre muchos miembros; información sobre la misma y sobre la proteína y secuencias de nucleótidos pueden por ejemplo encontrarse en <http://www.structuralchemistry.-org/annexins/seq/search.php>. Una alineación de secuencias de varias anexinas se puede encontrar también en WO 2007/069895. Un ejemplo preferido es anexina A5, con la secuencia de aminoácido de la SEC ID N°: 7 (figura 1), pero otras anexinas también pueden usarse para producir y utilizar las variantes de anexina de la invención. Por ejemplo, anexinas A4 y A8 también pueden usarse. Donde se hace referencia a la secuencia de aminoácidos y las posiciones de anexina A5, este también se aplica a las otras anexinas,

especialmente anexinas humanas, por elección de la posición correspondiente. Las posiciones correspondientes son conocidas por los expertos en la materia y pueden ser fácilmente identificadas, por ejemplo utilizando el triplete DAE (Asp-Ala-Glu) en posiciones 19-21 de A5, que se conserva sobre más anexinas, con desviaciones menores en algunas anexinas, por ejemplo a DAQ en A4, A9 y A10. Las anexinas pueden proceder de cualquier especie, preferiblemente ave o mamífero, de forma más preferible mamífero, de la forma más preferible humano.

[0008] Las anexinas de tipo salvaje solo tienen un número limitado de residuos de histidina, y nunca dos o más sin o solo otro aminoácido entremedias (H-H o H-X-H). Por ejemplo, las anexinas de mamífero de tipo salvaje A5 solo contienen residuos de His en posiciones 97, 204 y 266. Por lo tanto, la presencia de entre 2 y 20 residuos de histidina con un máximo de una interviniendo otros aminoácidos es una característica única de las variantes de anexina de la presente invención.

[0009] Como se utiliza en este caso, el terminal N de las variantes de anexina comprende la secuencia ascendente del residuo de ácido glutámico (E) en la posición 16 de la SEC ID N°: 7, o regiones correspondientes en otras anexinas. En particular, las variantes de anexina de la invención tienen las secuencias de terminal N n° 1-6, en orden creciente de preferencia:

X1-ERADAETLRKAMK (SEC ID N°.1)
 X2-GFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°.2)
 X3-DFFGDFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°.3)
 X4-TVTFDFGDFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°.4)
 X5-LRGTVTDFGDFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°.5)
 X6-AQVLRGTVTDFGDFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°.6)

Donde:

Cada X1-X6 comprende entre 2 y 20 residuos de histidina separados por no más de un residuo de aminoácido, y

X1 representa una secuencia de al menos 15 aminoácidos;

X2 representa una secuencia de al menos 12 aminoácidos;

X3 representa una secuencia de al menos 9 aminoácidos;

X4 representa una secuencia de al menos 6 aminoácidos;

X5 representa una secuencia de al menos 3 aminoácidos;

X6 representa una secuencia de al menos 2 aminoácidos.

[0010] Aquí, la parte que empieza con el primer E (Glu) de la SEC ID N°: 1 (= posición 16 en SEC ID n° 7) puede ser diferente en otras anexinas. Por ejemplo, es AMEDAQTLRKAMK en A4 humana, y PDPDAETLYKAMK en A8 humana. Se permiten intercambios de aminoácidos únicos en aquella parte que corresponde con otras anexinas, por ejemplo un intercambio de Glu (E) en la posición 16 por Ala (A) o Pro (P).

[0011] La variante de anexina lleva uno o varios, preferiblemente de uno hasta tres, residuos de cisteína, de la forma más preferible solo un residuo de cisteína, en el lado cóncavo de la molécula de anexina. El lado cóncavo de la molécula de anexina corresponde con los aminoácidos subrayados en la Figura 1 (SEQ ID. N° 7). Así, el residuo de cisteína está presente preferiblemente en una de las posiciones 1-19, 24, 28,46-64,86-89,118-135, 150,157-170, 202-219, 245-248, y 280-294 de anexina A5 o posiciones correspondientes de otras anexinas.

[0012] Al mismo tiempo, la variante de anexina no lleva residuos de cisteína en el lado convexo de la molécula. Esto significa que por ejemplo en la anexina A5, el (único) residuo de cisteína en posición 315 es preferiblemente sustituido por otro aminoácido, tal como Ser, Ala o Val. Se pueden encontrar detalles acerca de las posiciones de la molécula de cisteína y la forma de introducirlas en WO 2006/003488.

[0013] Una variante de anexina de polihistidina especialmente preferida de la invención es la variante de anexina con la secuencia de aminoácido representada en la Figura 2 (SEC ID N°.8), o una variante que contiene 3, 4, 5, 7, 8, 9 o 10 residuos de terminal N de His, en vez de 6 tal como está representado. Las variantes más preferidas son aquellas con la secuencia de aminoácidos de la Fig. 2, donde uno de los aminoácidos está en posiciones 7-25, 30, 34, 52-70, 92-95, 124-141, 156, 163-176, 208-225, 251-254, y 286-300. Otras variantes preferidas son aquellas que contienen un residuo de Cys en uno de los aminoácidos en las posiciones mencionadas más arriba (7-25 etc.) de la Fig.2. En todas estas variantes, el residuo de cisteína en la posición 321 se sustituye por otro aminoácido, especialmente Ser, Thr, Ala o Val.

[0014] Otras sustituciones de aminoácido pueden estar presentes en las variantes de anexina y anexinas radiomarcadas de la invención. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido en una o más posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266 y 305-317 de anexina A5 (o las posiciones que son cada seis más altos en la variante de poli-His de anexina A5 de la Fig. 2) se pueden sustituir para inhibir internalización de la variante de anexina en la célula objetivo, si así se desea. Tal sustitución es preferiblemente una sustitución de un aminoácido polar por uno apolar, tal y como se describe en WO 2007/069895. Otras sustituciones de aminoácidos

también son permitidas, a condición de que no obstaculicen significativamente la unión de la anexina con la fosfatidilserina. Esta condición se considera que será cumplida si la sustitución es una sustitución por un aminoácido presente en la misma posición en otro tipo de anexina, especialmente si el otro tipo es anexina A4 de A8, o en una anexina del mismo tipo de otras especies.

5 [0015] Las adiciones o sustituciones de aminoácido deseadas se pueden realizar mediante técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica e ilustradas en los ejemplos de abajo. Los residuos de histidina se pueden introducir en el ADN codificando la variante de anexina de la invención mediante la sustitución de dos o más codones codificando los aminoácidos de terminal N por codones de codificación de histidina (CAU/CAT o CAC), por ejemplo sustitución de codones de terminal N A Q V (Ala-Gln-Val) de anexina A5 por tres codones de histidina.

10 [0016] Alternativamente, o adicionalmente, el gen de codificación de anexina se puede extender en su terminal N con dos o más, por ejemplo 3, 4, 5 o 6, codones de histidina. La extensión de moléculas de anexina como esta se conoce en la técnica. Por ejemplo, WO2005/086955 divulga una anexina humana V homodímero con una etiqueta 6-His, y Tabata et al., J. Biosc. Bioeng. 1001 (2006) 190-197, describe una anexina A2 etiquetada con 6-His. Los derivados de polihistidina se pueden producir mediante métodos recombinantes conocidos en la técnica. Estos son usados de forma convencional para fines de purificación y frecuentemente contienen aminoácidos adicionales que facilitan la eliminación de la etiqueta de polihistidina mediante proteólisis específica. En cambio, las variantes de polihistidina no son para ser proteolisadas, y preferiblemente no contienen tales sitios adicionales de proteólisis específica. Están disponibles comercialmente los vectores para producir identificativos de polihistidina, por ejemplo de Qiagen, Venlo, Holanda.

15 [0017] Si se desea, un codón para cualquiera de los aminoácidos subrayados en la Fig. 1, por ejemplo la codificación del codón de Phe en la posición 11, se puede sustituir por un codón de cisteína y/o el codón de Cys en posición 315 se puede sustituir por un codón de otro aminoácido, por ejemplo Scr. El gen de anexina modificado puede después ser expresado en un huésped adecuado para producir la variante de anexina deseada de la invención.

20 [0018] El residuo de cisteína puede utilizarse para acoplar agentes farmacológicos u otros agentes de diagnóstico a la anexina. Un enlazador tal como N-succinimidilo 3-(2-piridilditio) propionato, maleimidoacetato de N-succinimidilo, N-succinimidilo 3-maleimidopropionato, piridilo, grupos que contienen maleimida, grupos que contienen halógeno, pueden utilizarse para acoplar el agente al residuo Cys. El agente farmacológico puede por ejemplo ser seleccionado de una toxina, una enzima, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de estos, un inmunocombinado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente inductor de muerte celular, un agente inhibidor de muerte celular, un compuesto fibrinolítico. El (otro) compuesto de diagnóstico se puede seleccionar de, por ejemplo, un grupo fluorescente, un agente de contraste, un fotosensibilizador, un agente de ultrasonido etc. Se describen más detalles en WO 2006/003488.

25 [0019] La presencia de al menos dos residuos de histidina permite a la variante de anexina de la invención enlazar un radionucleido, especialmente un radionucleido metálico. Aquí, los residuos de histidina hacen de queladores multifuncionales para el radionucleido (metálico). Así, la invención también pertenece a una anexina radiomarcada, que es un complejo de una variante de anexina de sustituido de histidina como se ha descrito anteriormente y un radionucleido. El radionucleido es preferiblemente biocompatible y es preferiblemente seleccionado de Galio 67, Galio 68, Indio 111, Tecnecio 99m, Renio 188, Cobre 64 y Estaño 117m. De la forma más preferible, el radionucleido en la anexina radiomarcada según la invención es Tc^{99m} o Re¹⁸⁸, más especialmente Tc^{99m}.

30 [0020] Los radionucleidos se pueden acoplar a las variantes de anexina que contienen histidina de una forma conocida en la técnica. Por ejemplo, la variante se puede contactar con un complejo de tricarbonilo del radionucleido tal como tecnecio o renio para producir una anexina enlazada de radionucleido. Para tricarbonilo Tc^{99m}, un equipo reactivo está comercialmente disponible (Mallinckrodt, Petten, Holanda).

35 [0021] La anexina radiomarcada se puede usar en un método de formación de imágenes de muerte celular en una célula nucleada dentro de una región de un sujeto mamífero *in vivo*. Tal método puede comprender:

- 40 (a) administración de dicha anexina radiomarcada al sujeto,
 (b) posicionamiento del sujeto en el campo de detección de un dispositivo detector de radiaciones, y
 (c) medición de la emisión de radiación del radionucleido en el sujeto, con el dispositivo detector de radiaciones, para construir una imagen de la emisión de radiación,

45 Donde dicha imagen es una representación de la muerte celular en dicha célula nucleada de dicho sujeto mamífero.

[0022] En el paso (a) de este método, una anexina radiomarcada (por ejemplo anexina V marcada con 99m-technecio) se administra al sujeto utilizando los protocolos estándares. Luego se permite un periodo de tiempo para conseguir la localización de la anexina radiomarcada en el sujeto. Luego, en el paso opcional (b), el sujeto se coloca en el campo de detección de un dispositivo detector de radiaciones. El sujeto se mantiene en una condición considerablemente inmovilizada mientras la radiación del radionucleido se mide utilizando el dispositivo detector de

radiación (paso c). Los datos obtenidos son luego procesados en una imagen de la emisión de radiación. La imagen obtenida así puede utilizarse para proporcionar al médico tratante un mapa o una localización de las áreas de muerte celular en el sujeto mamífero, o en la región del sujeto mamífero que ha sido analizada.

5 [0023] La anexina radiomarcada se puede administrar de diferentes maneras. En una forma de realización preferida, la anexina radiomarcada se administra por vía intravenosa. Alternativamente, se puede administrar intraperitonealmente. Otra opción es administrar la anexina marcada por vía intratecal. También, la anexina radiomarcada se puede administrar intrapleuramente. Otros métodos de administración comprenden administración intralinfática, o, alternativamente, administración intramuscular.

10 [0024] La dosificación de anexina radiomarcada para ser administrada depende del radionucleido usado, en el tejido del órgano que es el objetivo, y en las condiciones del diagnóstico y el sujeto. Preferiblemente, la anexina radiomarcada se administra en una cantidad que resulta en una dosis de entre aproximadamente 3 y aproximadamente 30 mCi. El tecnecio 99m se puede administrar a seres humanos adultos en dosis de hasta 15 [0025] aproximadamente 20 mCi. La dosis preferida para una única administración de Tc^{99m} es entre aproximadamente 5 y 20 mCi, preferiblemente entre 7.5 y 15 mCi. Las cantidades de otros radionucleidos se pueden determinar en consecuencia.

20 [0025] La cantidad de anexina radiomarcada para ser administrada (calculado en la base de la cantidad de anexina como tal) es preferiblemente al menos 0,3 µg/kg peso corporal, y por debajo de 300 µg/kg. Típicamente, la cantidad es inferior a aproximadamente 100 µg/kg. Preferiblemente, la cantidad es entre 0.5 y 20 µg/kg, de la forma más preferible entre 1 y 20 µg/kg.

25 [0026] Después de que la anexina radiomarcada se haya administrado, se le permite ser localizada en el tejido objetivo u órgano. Cuando se consigue un equilibrio o cuasiequilibrio entre anexina localizada y no localizada o no unida, normalmente entre 10 y 240 minutos, especialmente entre 20 y 120 minutos, la medición puede empezar. Si es necesario, el estado de localización como función de tiempo es seguido por la formación de imágenes de la señal de radiación de la anexina marcada. Donde el radionucleido es tecnecio 99m, la radiación será emisión y. WO 98/48699 da más información y ejemplos de la creación de imágenes de la muerte celular en un sujeto mamífero.

30 [0027] Los usos preferidos para anexinas radiomarcadas incluyen la detección de apoptosis inapropiada en estados de enfermedad, dónde ésta no es deseada, por ejemplo trastornos inmunológicos tal como Lupus, rechazo de trasplante, o en células expuestas a isquemia; y la detección de apoptosis insuficiente dónde ésta es deseada, por ejemplo, tumores o células infectadas por un virus. En particular, la muerte celular es provocada por necrosis.

35 [0028] La anexina radiomarcada se puede usar en una variedad de ajustes clínicos donde la muerte celular apoptótica y/o necrótica debe ser monitoreada, tal como rechazo de trasplante de órganos y médula ósea o herida, enfermedades inflamatorias infecciosas y no infecciosas, enfermedad autoinmune, infarto de miocardio e infarto cerebral e isquemia, cardiomiopatías, condiciones ateroscleróticas, enfermedades degenerativas neuronales y neuromusculares, enfermedades de célula falciforme, @-talasemia, terapia contra el cáncer, SIDA, síndromes mielodisplásicos, y enfermedad hepática inducida por la toxina, etc. Las anexinas radiomarcadas son también útiles como una herramienta de investigación clínica para el estudio del sistema inmunológico normal, el desarrollo embrionario, y la tolerancia inmunológica y alergias.

45 [0029] La anexina radiomarcada V se puede usar, por ejemplo, para crear imágenes y cuantificar la muerte celular apoptótica en tejidos normales y malignos que están recibiendo tratamiento. La apoptosis de control con estudios de formación de imágenes en serie que usa anexina radiomarcada se puede usar para el análisis rápido y desarrollo de nuevos fármacos y terapias en una variedad de enfermedades. Además, los métodos se pueden utilizar para controlar el progreso del tratamiento, controlar el progreso de la enfermedad, o ambos. Además, estos se pueden utilizar para ayudar en la detección precoz de ciertas enfermedades.

50 [0030] La región del sujeto mamífero donde la muerte celular debe ser representada *in vivo*, puede ser cualquier parte, tejido u órgano del sujeto. En particular, dicha región es un órgano de dicho sujeto o una parte del mismo. En una forma de realización preferida de la invención, la región es la cabeza de dicho sujeto o una parte de la misma. 55 En otra forma de realización preferida, dicha región es el corazón de dicho sujeto o una parte del mismo. En otra forma de realización específica, dicha región está en el hígado de dicho sujeto o una parte del mismo. La región donde la (deseada) muerte celular debe ser representada puede ser especialmente un tumor en el sujeto mamífero o una parte del mismo. También, la región (de la no deseada) muerte celular puede ser un trasplante en el sujeto o una parte del mismo. Además, dicha región puede ser un sitio isquémico en dicho sujeto o una parte del mismo.

60 [0031] La formación de imágenes se puede realizar utilizando métodos y equipamiento conocidos en la técnica. Por ejemplo, el dispositivo detector de radiaciones es un dispositivo detector de emisión de positrón, en caso de utilización de por ejemplo Cu⁶⁴ como un radionucleido. Para radionucleidos con radiaciones gama, tal como Tc^{99m}, Sn^{117m} y Re¹⁸⁸, se pueden usar dispositivos de formación de imágenes de rayos gama. Las señales pueden ser detectadas, mejoradas y procesadas utilizando técnicas estándares. Por ejemplo, la tomografía computarizada de 65

emisión monofotónica (SPECT) se puede utilizar con los tipos de radionucleidos con emisión gama descritos aquí, por ejemplo, Tc^{99m}.

Ejemplo 1: *Anexina A5 con una extensión de terminal N de 6 residuos de histidina se enlaza con fosfatidilserina*

[0032] El final 5' del ADNc de anexina A5 fue extendido con 6 tripletes de nucleótido cada histidina de codificación (CAT o CAC) utilizando técnicas de clonación molecular estándares conocidas por una persona experta en el técnica. El ADNc de anexina A5 puede tanto codificar anexina de tipo salvaje humano A5 como una variante de la misma.

[0033] El ADNc extendido se clona en un vector de expresión procariótica adecuado para la producción de la anexina extendida de histidina A5 (His-anxA5) mediante bacterias. Otros sistemas de expresión tales como sistemas de expresión eucariótica también pueden usarse para producir la His-anxA5. El ADNc es luego clonado en un vector de expresión adecuado para sistemas de expresión eucariótica.

[0034] La His-anxA5 bacterianamente producida es purificada de los otros constituyentes bacterianos utilizando la propiedad de unión de metal de los residuos de histidina. La mezcla de proteínas se ajusta a 5-20 mM de imidazol y esta mezcla se aplica a la cromatografía de afinidad de cobalto o níquel. Después del lavado, el ligado His-anxA5 se eluye de la columna mediante un gradiente de 50 - 1000 mM de imidazol. El eluido His-anxA5 tiene una pureza alta (>90% puro) y se puede usar para análisis biológicos.

[0035] Las propiedades de unión de fosfatidilserina de His-anxA5 son comparables a la anexina A5 de tipo salvaje como la analizada por elipsometría (Andree et al. JBC 1990) y citometría de flujo de células apópticas (Van Genderen et al. Nature Prot. 2006,363). Por lo tanto, la extensión de la cola de terminal N de anexina A5 con 6 residuos de histidina no altera la propiedad biológica para enlazar a fosfatidilserina.

Ejemplo 2: *El marcado radioactivo de anexina extendida de histidina A5*

[0036] La His-anxA5 fue marcada con el radionucleido Tecnecio^{99m} utilizando el equipo Isolink comercialmente disponible y siguiendo las instrucciones del fabricante de Isolink (Mallinckrodt, Petten, Holanda). El análisis por cromatografía de exclusión de tamaño (BioSep-SEC-S3000) mostró que tanto la pureza de radiosustancia química como el rendimiento de radiosustancia química de His-anxA5 marcada con tecnecio^{99m} fue mayor que 95%. El alto rendimiento y la pureza evitan la necesidad de los pasos de purificación siguientes al marcado radioactivo.

Ejemplo 3: *Estabilidad de la anexina extendida de histidina radiomarcada. A5*

[0037] La His-anxA5 fue radiomarcada con Tecnecio^{99m} tal y como se describe en el ejemplo 2. La His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} fue incubada en plasma de sangre durante 1-24 horas a 37°C. El análisis posterior reveló que la His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} es estable en plasma sanguíneo y ni descompone ni causa transquelación de proteínas plasmáticas, por ejemplo transfiere el isótopo de Tecnecio^{99m} para otras proteínas plasmáticas. Esta estabilidad es extremadamente importante para su uso como un agente nuclear en las tecnologías de formación de imágenes nucleares.

[0038] **Ejemplo 4:** *Unión de His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} a células apoptóticas in vitro.* His-anxA5 fue radiomarcada con Tecnecio^{99m} tal y como se describe en el ejemplo 2. Las células del linfoma T (células Jurkat) fueron cultivadas *in vitro* y desencadenadas para ejecutar apoptosis y exponer fosfatidilserina. Las células Jurkat tratadas fueron mezcladas con His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}, incubadas durante 5-30 minutos y centrifugadas a un granulado. El sobrenadante fue separado de las células. Parte de las células fueron resuspendidas en el tampón que contiene calcio (0.5-10 mM CaCl₂) y medidas para radioactividad. Parte de las células fue resuspendida en el tampón que contiene EDTA (1-10 mM EDTA) y centrifugadas de nuevo. El sobrenadante resultante fue medido para radioactividad. Estos análisis demostraron que His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} tiene propiedades biológicas para enlazar de una manera calcio-dependiente con células apoptóticas y fosfatidilserina que son comparables a la anexina A5.

Ejemplo 5: *Formación de imágenes nucleares de apoptosis utilizando His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} en un modelo de apoptosis de hígado de ratón*

[0039] Los ratones fueron tratados con inyección intravenosa de anticuerpo anti-Fas o cicloheximida para inducir apoptosis de hígado. 30-120 minutos después de la inyección del inductor de apoptosis, His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} fue inyectada por vía intravenosa. His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} fue preparada como se describe en el ejemplo 2. 30 - 240 minutos después de la inyección de His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}, se realizó un análisis SPECT. A continuación, el hígado se tomó para analizar mediante autorradiografía y tinción inmunohistoquímica de la caspasa 3. Los resultados demuestran que es posible formar imágenes de la muerte celular de forma no invasiva utilizando His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}.

Ejemplo 6: *Formación de imágenes nucleares de apoptosis utilizando His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} en un modelo de cáncer de un ratón.*

5 [0040] A los ratones se les inyectó células Daudi o células Granta519 en la ijada. Después de 4-6 semanas, tumores
visibles se habían desarrollado. A los ratones se les inyectó por vía intravenosa His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}
que fue preparado como se describe en el ejemplo 2. La aceptación de His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m} por
10 parte del tumor fue medida de forma no invasiva mediante un SPECT. Los ratones fueron luego tratados con un
citostático tal como doxorubicina y ciclofosfamida. 24 - 72 horas siguientes al tratamiento los ratones fueron
inyectados por vía intravenosa His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}. La aceptación por parte del tumor fue evaluada
de forma no invasiva mediante un SPECT. Los resultados demostraron que la eficacia de la terapia anti-tumor se
puede evaluar de forma no invasiva utilizando His-anxA5 marcada con Tecnecio^{99m}.

Listado de secuencias

15 [0041]

<110> MosaMedix B.V.

20 <120> anexinas radiomarcadas

<130> P6023132EP

<160> 8

25 <170> Versión de patentIn 3.3

<210> 1

<211> 13

<212> PRT

30 <213> Artificial

<220>

<223> Terminal N es una secuencia de al menos 15 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina
separados por no más de un residuo de aminoácido

35 <400> 1

Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 16

40 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

45 <223> Terminal N es una secuencia de al menos 12 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina
separados por no más de un residuo de aminoácido

<400> 2

Gly Phe Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
1 5 10 15

<210> 3

<211> 19

50 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

ES 2 530 228 T3

<223> Terminal N es una secuencia de al menos 9 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina separados por no más de un residuo de aminoácido

<400> 3

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

5

Ala Met Lys

<210> 4

<211> 22

10

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> Terminal N es una secuencia de al menos 6 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina separados por no más de un residuo de aminoácido

<400> 4

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

Leu Arg Lys Ala Met Lys
20

20

<210> 5

<211> 25

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

25

<223> Terminal N es una secuencia de al menos 3 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina separados por no más de un residuo de aminoácido

<400> 5

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

Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys
20 25

30

<210> 6

<211> 28

<212> PRT

<213> Artificial

35

<220>

<223> Terminal N es una secuencia de al menos 2 aminoácidos e incluye entre 2 y 20 residuos de histidina separados por no más de un residuo de aminoácido

<400> 6

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
20 25

<210> 7

<211> 319

<212> PRT

5 <213> homo sapiens

<400> 7

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 305 Asp Tyr Lys Lys Ala 310 Leu Leu Leu Leu Cys 315 Gly Glu Asp Asp
 His 1 His His His His 5 His His Ala Gln Val 10 Leu Arg Gly Thr Val 15 Thr Asp
 Phe Pro Gly Phe 20 Asp Glu Arg Ala 25 Asp Ala Glu Thr Leu Arg 30 Lys Ala
 Met Lys Gly 35 Leu Gly Thr Asp Glu 40 Glu Ser Ile Leu Thr 45 Leu Leu Thr
 Ser Arg 50 Ser Asn Ala Gln Arg 55 Gln Glu Ile Ser Ala 60 Ala Phe Lys Thr
 Leu 65 Phe Gly Arg Asp Leu 70 Leu Asp Asp Leu Lys 75 Ser Glu Leu Thr Gly 80
 Lys Phe Glu Lys Leu 85 Ile Val Ala Leu Met 90 Lys Pro Ser Arg Leu Tyr 95
 Asp Ala Tyr Glu 100 Leu Lys His Ala Leu 105 Lys Gly Ala Gly Thr 110 Asn Glu
 Lys Val 115 Leu Thr Glu Ile Ile Ala 120 Ser Arg Thr Pro Glu 125 Glu Leu Arg
 Ala Ile 130 Lys Gln Val Tyr Glu 135 Glu Glu Tyr Gly Ser 140 Ser Leu Glu Asp
 Asp 145 Val Val Gly Asp Thr 150 Ser Gly Tyr Tyr Gln 155 Arg Met Leu Val Val 160
 Leu Leu Gln Ala Asn 165 Arg Asp Pro Asp Ala 170 Gly Ile Asp Glu Ala Gln 175
 Val Glu Gln Asp 180 Ala Gln Ala Leu Phe 185 Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp 190
 Gly Thr Asp 195 Glu Glu Lys Phe Ile 200 Thr Ile Phe Gly Thr 205 Arg Ser Val
 Ser His 210 Leu Arg Lys Val Phe 215 Asp Lys Tyr Met Thr 220 Ile Ser Gly Phe

ES 2 530 228 T3

Gln Ile Glu Glu Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln
 225 230 235 240
 Leu Leu Leu Ala Val Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu
 245 250 255
 Ala Glu Thr Leu Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His
 260 265 270
 Thr Leu Ile Arg Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn
 275 280 285
 Ile Arg Lys Glu Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met
 290 295 300
 Ile Lys Gly Asp Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu
 305 310 315 320
 Cys Gly Glu Asp Asp
 325

REIVINDICACIONES

- 5 1. Anexina radiomarcada, donde una molécula de anexina comprende un mínimo de 2 y un máximo de 20 residuos de histidina en su terminal N, como mínimo dos de los residuos mencionados de histidina son adyacentes o están separados por no más de un aminoácido y están ligados a un radionucleido, no más de un aminoácido que no es fenilalanina, tirosina, leucina, isoleucina, valina, metionina o cisteína, y en el cual la molécula de anexina lleva uno o más residuos de cisteína en el lado cóncavo de la molécula de anexina y no contiene residuos de cisteína en el lado convexo de la molécula de anexina.
- 10 2. Anexina radiomarcada según la reivindicación 1, donde el radionucleido es seleccionado del grupo consistente en galio 67, galio 68, indio 111, tecnecio 99m, renio 188, cobre 64 y estaño 117m.
- 15 3. Anexina radiomarcada según la reivindicación 2, donde el radionucleido es Tecnecio^{99m}.
4. Anexina radiomarcada según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende de 3 hasta 10 residuos de histidina en su terminal N.
- 20 5. Anexina radiomarcada según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dichos residuos de histidina son localizados más arriba del residuo de Glu en la posición 16 de la SEC ID N°: 7.
6. Anexina radiomarcada según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que tiene la secuencia de terminal N:
- 25 X4-TVTDFFPGFDERADAETLRKAMK (SEC ID N°:4)
- Donde X4 comprende dichos residuos de histidina y representa una secuencia de al menos 6 aminoácidos.
- 30 7. Anexina marcada radiactivamente según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde cualquiera de los aminoácidos en 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 N°: 7 se sustituye por un residuo de cisteína.
8. Anexina radiomarcada según cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde dicho residuo de cisteína se acopla a un agente farmacológico.
- 35 9. Variante de anexina con la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 8, donde uno de los aminoácidos en posiciones 7-25, 30, 34, 52-70, 92-95, 124-141, 156, 163-176, 208-225, 251-254 y 286- 300 se sustituye por un residuo de cisteína y el residuo de cisteína en la posición 321 se sustituye por otro aminoácido, y donde el residuo de cisteína sustituida en una de las posiciones 7-25, 30, 34, 52-70, 92-95, 124-141, 156, 163-176, 208-225, 251-254 y 286-300 es opcionalmente acoplada a un agente farmacéutico o de diagnóstico.
- 40 10. Anexina radiomarcada según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que se acopla a un agente farmacológico o de diagnóstico, para usar en el diagnóstico y/o terapia.
- 45 11. Anexina radiomarcada según la reivindicación 10, para usar en la creación de imágenes de la muerte celular en una célula nucleada dentro de una región de un sujeto mamífero *in vivo*.
12. Anexina radiomarcada según la reivindicación 10 o 11, donde dicho uso comprende:
- 50 (a) administración de dicha anexina radiomarcada al sujeto,
- (b) si es pertinente, posicionar al sujeto en el campo de detección de un dispositivo detector de radiaciones, y
- (c) medición de la emisión de radiación del radionucleido en el sujeto, con el dispositivo detector de radiaciones, para construir una imagen de la emisión de radiación,
- donde dicha imagen es una representación de la muerte celular en dicha célula nucleada de dicho sujeto mamífero.
- 55 13. Anexina radiomarcada según la reivindicación 10 u 11, para uso según la reivindicación 12, donde la cantidad de anexina marcada administrada es de entre aproximadamente 1 y 10 µg de anexina proteína/kg.
14. Anexina radiomarcada según la reivindicación 11, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-13, donde dicha región está en la cabeza de dicho sujeto o en una parte de la misma, o en el corazón de dicho sujeto o en una parte del mismo, o en el hígado de dicho sujeto o una parte del mismo.
- 60 15. Anexina radiomarcada según la reivindicación 11, para uso según cualquiera de las reivindicaciones 11-14, donde dicha región está en un tumor en dicho sujeto o una parte del mismo, o en un trasplante en dicho sujeto o una parte del mismo, o en un sitio isquémico en dicho sujeto o una parte del mismo.
- 65

FIG. 1. (SEC ID N°7)

10 20 30 40
AQVLRGTVTD FPGFDERADA ETLRKAMKGL GTDEESILTL

 50 60 70 80
LTSRSNAQRQ EISAAFKTLF GRDLLDDLKS ELTGKFEKLI

 90 100 110 120
VALMKPSRLY DAYELKHALK GAGTNEKVL EIIASRTPEE

 130 140 150 160
LRAIKQVYEE EYGSLEDDV VGDTSGYYQR MLVVLLQANR

 170 180 190 200
DPDAGIDEAQ VEQDAQALFQ AGELKWGTDE EKFITIFGTR

 210 220 230 240
SVSHLRKVFD KYMTISGFQI EETIDRETSG NLEQLLAVV

 250 260 270 280
KSIRSIPAYL AETLYYAMKG AGTDDHTLIR VMVSRSEIDL

 290 300 310 319
FNIRKEFRKN FATSLYSMIK GDTSGDYKKA LLLLCGEDD

FIG. 2 (SEC ID N°8)

 16 26 36 46
HHHHHH AQVLRGTVTD FPGFDERADA ETLRKAMKGL GTDEESILTL

 56 66 76 86
LTSRSNAQRQ EISAAFKTLF GRDLLDDLKS ELTGKFEKLI

 96 166 116 126
VALMKPSRLY DAYELKHALK GAGTNEKVLT EIIASRTPEE

 136 146 156 166
LRAIKQVYEE EYSSLEDDV VGDTSGYYQR MLVVLLQANR

 176 186 196 206
DPDAGIDEAQ VEQDAQALFQ AGELKWTDE EKFITIFGTR

 216 226 236 246
SVSHLRKVFD KYMTISGFQI EETIDRETSG NLEQLLAVV

 256 266 276 286
KSIRSIPAYL AETLYYAMKG AGTDDHTLIR VMVSRSEIDL

 296 366 316 325
FNIRKEFRKN FATSLYSMIK GDTSGDYKKA LLLLCGEDD