

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 607 066**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 38/49 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61K 31/4365 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.04.2012 PCT/EP2012/056370**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.10.2012 WO12136819**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2012 E 12713969 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.09.2016 EP 2694538**

54 Título: **Procedimientos terapéuticos y profilácticos, usos y composiciones que comprenden anexina A5**

30 Prioridad:

05.04.2011 US 201161472002 P

05.04.2011 US 201161472013 P

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

29.03.2017

73 Titular/es:

ANNEXIN PHARMACEUTICALS AB (100.0%)

Box 56

247 26 Veberöd, SE

72 Inventor/es:

PETTERSSON, KNUT

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 607 066 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

Procedimientos terapéuticos y profilácticos, usos y composiciones que comprenden anexina A5

Campo de la invención

5 La invención se refiere a los usos nuevos y a composiciones para su uso en la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de una intervención quirúrgica, tales como las complicaciones después de la cirugía vascular, en especial la cirugía vascular periférica.

Antecedentes de la invención

10 La inclusión o discusión en la presente memoria descriptiva de un documento aparentemente publicado con anterioridad no debería necesariamente tomarse como una aceptación de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento común general.

15 Es bien sabido que las intervenciones quirúrgicas con frecuencia conducen a complicaciones. No es sorprendente que tales complicaciones sean más comunes tras las intervenciones mayores o de larga duración que tras las intervenciones rápidas y simples. El estado del paciente también es importante para el riesgo de complicaciones. Las intervenciones normalmente requieren alguna forma de anestesia y la misma anestesia puede conducir a complicaciones.

20 Las complicaciones peri- y posoperatorias pueden afectar al órgano u órganos que son el objetivo de la intervención, pero también pueden afectar otros órganos. Un ejemplo es el riesgo de trombosis venosa profunda que puede ser el resultado de la cirugía ortopédica tal como la cirugía artroplastia de cadera (Duggan. Am J Cardiovasc Drugs, 2012. 12(1): p. 57-72). Para hacer la cirugía más fácil o incluso posible, es común detener la circulación sanguínea al órgano que es el objetivo durante la intervención. Esto puede dar como resultado la lesión del órgano que es el objetivo, pero también complicaciones en otros órganos. Un ejemplo de esto es la lesión pulmonar después del bloqueo de la circulación sanguínea intestinal (Feinman. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010. 299(4): p. G833-43). El traumatismo mecánico durante la cirugía de un órgano que es el objetivo puede conducir a la muerte celular y a la lesión directa del órgano, pero esto también puede dar como resultado el daño en órganos distantes. 25 Uno de tales ejemplos es la liberación de mioglobina a partir del músculo esquelético que se lesiona durante la intervención quirúrgica que puede conducir a la lesión renal posquirúrgica.

30 Las complicaciones de las intervenciones varían en gravedad, desde una complicación menor a una muy seria, tal como la muerte. Las complicaciones posquirúrgicas también varían desde muy frecuentes a muy infrecuentes. Los ejemplos de complicaciones frecuentes son complicaciones después de intervenciones con el fin de restablecer el flujo sanguíneo en las extremidades de pacientes con isquemia en extremidades crítica, debida a la enfermedad arterial periférica, lo que conduce a la muerte o la amputación en hasta el 30 % de los pacientes al cabo de un mes tras la cirugía. Por el contrario, el infarto de hipófisis después de la cirugía de derivación cardiaca, que es una forma común de cirugía, se ha descrito en solo 4 pacientes (Zayour y Azar. Endocr Pract, 2006. 12(1): p. 59-62).

35 A partir de lo anterior, se hace evidente que es de gran necesidad un tratamiento preventivo que reduzca el riesgo y la incidencia de complicaciones peri- y posoperatorias después de la cirugía, en especial de la cirugía vascular.

40 La anexina A5 es una proteína endógena que se une a fosfolípidos cargados tales, como la fosfatidilserina (PS) (Cederholm y Frostegard (2007) Ann. NY Acad. Sci., 1108: 96-103). La anexina A5 es un potente agente antitrombótico (Thiagarajan y Benedict (1997) Circulation, 96(7): 2339-2347) y se propone que la anexina A5, mediante la unión a la PS expuesta, puede formar un 'capa protectora' que puede inhibir los efectos de la PS sobre la formación de trombosis (Rand (2000) Autoimmun., 15(2): 107-111).

45 Se ha demostrado que además de los efectos antiplaquetarios y anticoagulantes de la anexina A5, esta proteína y un análogo de la misma, el dímero de la anexina A5 dianexina, es eficaz en la prevención de la lesión por reperfusión en el hígado y que mejora el resultado en los trasplantes de hígado en rata (Shen y col. (2007) Am. J. Transplant., 7(11): 2463-2471). Cabe destacar que en estos estudios los tratamientos estaban asociados con la actividad inflamatoria reducida en el endotelio hepático, medida como expresión reducida de las moléculas de adhesión, es decir, la anexina A5 tiene efectos antiinflamatorios. Se ha sugerido que la dianexina mejoró la supervivencia en los trasplantes de hígado mediante un efecto antitrombótico que conduce al riego sanguíneo mantenido en el hígado (Shen y col. (2007) Am. J. Transplant., 7(11):2463-2471).

50 Se había sugerido anteriormente que la anexina A5 puede utilizarse en pacientes para estabilizar lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias, lo que debería reducir el riesgo de infarto de miocardio en estos pacientes (documento WO 2005/099744).

Adicionalmente, se había sugerido la anexina A5 como un tratamiento para diversas disfunciones vasculares, tales como la angina de pecho (documento WO 2009/077764), y para la prevención de la restenosis (documento WO 2009/103977).

Sumario de la invención

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas.

Se desvela en el presente documento un procedimiento para la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de intervenciones quirúrgicas, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, a un paciente que necesite tal tratamiento.

El primer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, para su uso en la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de la intervención quirúrgica,

en el que la intervención quirúrgica comprende restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica y en el que, adicionalmente, la intervención quirúrgica provoca daño celular, isquemia y/o lesión por reperusión inmediatos en un órgano que es el objetivo,

en el que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y

en el que la anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma, se selecciona de:

- (a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1);
- (b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;
- (c) una variante alélica o genética de a) o b);
- (d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1;
- (e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
- (f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

Dicho de otro modo, el primer aspecto de la invención también proporciona el uso de la anexina A5 o de un análogo funcional o una variante de la misma, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de la intervención quirúrgica, en el que la intervención quirúrgica comprende restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica, y en el que adicionalmente la intervención quirúrgica provoca daño celular, isquemia y/o lesión por reperusión inmediatos en un órgano que es el objetivo,

en el que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y

en el que la anexina A5 o el análogo funcional o la variante de la misma, se selecciona de:

- (a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1);
- (b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;
- (c) una variante alélica o genética de a) o b);
- (d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1;
- (e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
- (f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

Se contempla que cualquier uso o composición descritos en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro uso o composición descrito en el presente documento.

El uso de la palabra "un" o "una", cuando se utiliza de forma conjunta con la expresión "que comprende" en las reivindicaciones y/o la memoria descriptiva, puede significar "un/una", pero también es consistente con el significado de "uno o más", "al menos uno" y "uno o más de uno".

Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y comprenderán mejor cuando se consideren de forma conjunta con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Debe entenderse que, sin embargo, la siguiente descripción, aunque indica diversas realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de las mismas, se proporcionan a modo de ejemplo y no limitativo. Dentro del ámbito de la invención pueden realizarse muchas sustituciones, modificaciones, adiciones y/o reordenamientos sin apartarse del espíritu de la misma, y la invención incluye a todas tales sustituciones, modificaciones, adiciones y/o rearrreglos.

Descripción de las figuras

La Figura 1 muestra los cambios en la LDH durante la isquemia y la reperusión en un modelo de rata *in vivo*, con y sin el pretratamiento con anexina A5, como se describe en el Ejemplo 1.

La **Figura 2** muestra los cambios en la inflamación del pulmón después de la isquemia intestinal en un modelo de rata *in vivo*, con y sin el pretratamiento con anexina A5, como se describe en el Ejemplo 2.

Descripción detallada de la invención

Aquí, los ejemplos presentados en el presente documento se señalan para ilustrar la utilidad de la anexina A5 para reducir la presencia de complicaciones posoperatorias después de la cirugía, mediante un análisis *in vivo* en un modelo de rata. Por lo tanto, la anexina A5 o los análogos funcionales y/o las variantes de la misma, presentan una nueva modalidad de tratamiento que puede reducir las complicaciones peri- y posoperatorias en pacientes que se someten a intervenciones quirúrgicas, tales como la cirugía vascular.

La presente solicitud describe un procedimiento para la prevención y/o la reducción de complicaciones peri- y posoperatorias después de la intervención quirúrgica, comprendiendo dicho procedimiento administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, a un paciente que necesita tal tratamiento.

El primer aspecto de la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de la anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, para su uso en la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de una intervención quirúrgica,

en el que la intervención quirúrgica comprende restricciones de la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica y en el que adicionalmente la intervención quirúrgica provoca daño celular, isquemia y/o lesión por reperfusión inmediatos en un órgano que es el objetivo,

en el que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y

en el que la anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma, se selecciona de:

(a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1);

(b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;

(c) una variante alélica o genética de a) o b);

(d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1;

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

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

El primer aspecto de la invención también proporciona el uso de la anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, en la fabricación de un medicamento para la prevención y/o la reducción de las complicaciones peri- o posoperatorias después de una intervención quirúrgica,

en el que la intervención quirúrgica comprende restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica, y en el que adicionalmente la intervención quirúrgica provoca daño celular, isquemia y/o lesión por reperfusión inmediatos en un órgano que es el objetivo,

en el que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y

en el que la anexina A5 o el análogo funcional o la variante de la misma, se selecciona de:

(a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1);

(b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;

(c) una variante alélica o genética de a) o b);

(d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1;

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

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

En una realización del primer aspecto de la presente invención, la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, se utiliza para la protección de un órgano peri- o posoperatoria. Por lo tanto, el paciente (preferentemente, un paciente humano) se trata para prevenir, reducir o mejorar el daño en órganos que se produce durante o después de una intervención quirúrgica, incluyendo la anestesia. La complicación peri- y posoperatoria se reduce en un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica. Como tal, el órgano (u órganos) a proteger están distantes del sitio de la intervención quirúrgica. En una realización adicional preferente, el órgano (u órganos) a proteger están distantes del sitio de intervención quirúrgica y además, no están afectados de forma directa por el procedimiento quirúrgico. En este contexto, "afectado de forma directa" puede incluir el efecto de uno, dos y los tres de isquemia, reperfusión y/o trombosis, como resultado de la cirugía. Por lo tanto, en una realización, el órgano (u órganos) a proteger por la presente invención no experimenta uno cualquiera o más, preferentemente todos, de daño celular, isquemia, reperfusión y/o trombosis inmediatos, como resultado de la intervención quirúrgica.

Por ejemplo, el Ejemplo 1 de la presente solicitud se refiere al uso de la anexina A5 para prevenir el daño hepático o renal después de una intervención quirúrgica que provoca isquemia y reperfusión en las extremidades inferiores; las intervenciones quirúrgicas que provocan isquemia y reperfusión en las extremidades inferiores que no tienen el efecto de provocar isquemia y reperfusión en el hígado y el riñón, pero, no obstante, una intervención quirúrgica en una extremidad inferior puede provocar daño orgánico en el riñón y en cualquier sitio. La presente solicitud describe

los procedimientos para prevenir, reducir o mejorar tal daño que puede producirse durante o después de una intervención quirúrgica realizada en, o que provoca isquemia y/o reperfusión en, las extremidades inferiores.

Asimismo, el Ejemplo 2 de la presente solicitud se refiere al uso de la anexina A5 para prevenir el daño pulmonar después de la intervención quirúrgica que provoca isquemia y reperfusión en el intestino; las intervenciones quirúrgicas que provocan isquemia y reperfusión en el intestino no tienen el efecto de provocar isquemia y reperfusión en los pulmones, pero, no obstante, una intervención quirúrgica en el intestino puede provocar daño orgánico en los pulmones. La presente solicitud describe los procedimientos para prevenir, reducir o mejorar el daño en los pulmones que puede producirse durante o después de una intervención quirúrgica realizada en, o que provoca isquemia y/o reperfusión en, el intestino.

- 5
- 10 Existe un gran número de ejemplos conocidos en la técnica de intervenciones quirúrgicas en una parte del cuerpo que provocan daño orgánico indirecto en otras partes del cuerpo. Antes de la presente invención, no había modo eficaz de prevenir el daño orgánico indirecto que seguía durante, o después, de algunas intervenciones quirúrgicas. Así, por ejemplo, como resultado de un procedimiento quirúrgico realizado en, o que provoca isquemia y/o reperfusión en, el intestino, el paciente sobrevivía al acontecimiento isquémico inicial y se producían complicaciones indirectas posoperatorias que provocaban daño orgánico en los pulmones, entonces el experto en la materia solo podía ser capaz de tratar el daño orgánico en los pulmones después de que el daño hubiese ocurrido, por ejemplo mediante ventilación pulmonar y/o fármacos antiinflamatorios. Si, por ejemplo, como resultado del procedimiento quirúrgico realizado en, o que provoca isquemia y/o reperfusión en, una extremidad inferior, el paciente sobrevivió al acontecimiento isquémico inicial y se producían complicaciones indirectas posoperatorias que provocaban daño orgánico en el riñón, entonces el experto en la materia solo podía ser capaz de tratar el daño orgánico en el riñón después de que el daño hubiese ocurrido, por ejemplo mediante hemodilución, diálisis o, si era necesario, el trasplante.
- 15
- 20

El objetivo de la presente invención es utilizar anexina A5 para tratar/prevenir este tipo de daño orgánico indirecto después de la cirugía/anestesia.

- 25 En una realización, el tipo de daño orgánico a tratar no es trombosis y/o los efectos corriente abajo de la misma. Por lo tanto, las reivindicaciones de la presente solicitud no están destinadas a abarcar el uso de la anexina A5 para tratar o prevenir la trombosis en ningún órgano.

Por lo tanto, en una realización, el primer aspecto de la presente invención se refiere al uso de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, para la protección de órganos peri- o posoperatoria para prevenir el daño orgánico en un órgano, en el que el paciente se somete a una intervención quirúrgica (incluyendo anestesia) que es en un sitio que está distante del órgano que se va a proteger del daño, y en el que el órgano a proteger del daño no experimenta uno o más (incluyendo todos) de isquemia, reperfusión y trombosis, o cualquier otro efecto directo como resultado de la intervención quirúrgica.

- 30
- 35 Por ejemplo, en una realización el paciente puede ser un paciente de edad avanzada (por ejemplo, de una edad de aproximadamente, o mayor de, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 o más años de edad) en quien incluso la anestesia puede en ocasiones ser suficiente para provocar daño orgánico (tal como el daño y el infarto de miocardio) en un sitio distante del sitio de administración del anestésico. Por consiguiente, en un aspecto de la presente invención, puede utilizarse la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, para prevenir el daño orgánico, tal como el daño y/o infarto de miocardio, en un paciente de edad avanzada que se trata, o que se va a tratar, o que se ha tratado con un anestésico.
- 40

En otra realización ejemplar, los pacientes que padecen diabetes pueden experimentar isquemia crítica de las extremidades y pueden tener una tasa de incidencia de acontecimientos cardíacos más elevada que los pacientes que no son diabéticos. Por consiguiente, en otro aspecto de la presente invención, la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, se puede utilizar para prevenir el daño orgánico, tal como el daño cardíaco, en un paciente con diabetes con isquemia crítica de extremidades, por ejemplo cuando se lo trata mediante una intervención quirúrgica.

- 45
- Normalmente, el paciente es un paciente humano. Como alternativa, el paciente puede ser un animal no humano, tal como un animal doméstico (por ejemplo, gato, perro, conejo, vaca, oveja, cerdo, ratón u otro roedor).

Las complicaciones peri- y posoperatorias pueden producirse después de cualquier forma de intervención quirúrgica. Los distintos tipos de intervenciones quirúrgicas en donde la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, puede utilizarse para prevenir y/o reducir las complicaciones posoperatorias, están ejemplificadas por, pero sin limitación, cirugía cardiovascular, tal como cirugía cardíaca y derivación cardiopulmonar, cirugía vascular, tal como cirugía vascular periférica, cirugía pulmonar, cirugía del sistema digestivo, tal como gastrectomía o colectomía, cirugía obstétrica, tal como cesáreas, cirugía ortopédica, tal como artroplastias, en especial artroplastias de cadera, cirugía plástica, trasplantes, tal como trasplantes de riñón, trasplantes de corazón, trasplantes de hígado y trasplantes de pulmón, así como cirugía traumatológica y amputaciones.

- 50
- 55 Como se discute anteriormente, las complicaciones peri- y posoperatorias son más comunes tras las intervenciones mayores y de larga duración que después de las intervenciones rápidas y simples. En una realización del primer

aspecto de la presente invención, la duración de la intervención quirúrgica puede ser al menos de, o mayor de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180 o 240 minutos.

5 Las intervenciones quirúrgicas en donde puede utilizarse la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, de acuerdo con la invención, incluyen intervenciones que comprendan restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante parte (tal como, al menos, o mayor de, la mitad) o toda la duración de la intervención.

Las intervenciones quirúrgicas en donde la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma se puede utilizar de acuerdo con la invención, incluyen adicionalmente intervenciones en donde la intervención provoca daño celular inmediato (es decir lesión física) en el órgano que es el objetivo.

10 Las complicaciones peri- y posoperatorias que pueden prevenirse y/o reducirse a través de los usos y/o las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención son complicaciones que aparecen en el órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica. Como se discute anteriormente, la intervención quirúrgica (incluyendo la anestesia) normalmente es en un sitio que está distante del órgano que es el objetivo que se va a proteger del daño peri- y posoperatorio, y preferentemente el órgano que se va a proteger no experimenta uno o más (incluyendo todos) de isquemia, reperfusión y trombosis, o cualquier otro efecto directo, como resultado de la intervención quirúrgica.

15 Las complicaciones peri- y posoperatorias que pueden prevenirse y/o reducirse a través de los usos y/o de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, se ejemplifican por, pero sin limitación, complicaciones cardiovasculares, tales como infarto de miocardio, insuficiencia cardiaca congestiva, ictus y AIT (accidente isquémico transitorio), isquemia posoperatoria de las extremidades, complicaciones renales, tales como disfunción renal y nefritis, lesión del hígado, complicaciones gastrointestinales tales como enfermedad intestinal isquémica, complicación pulmonar tal como embolia pulmonar.

20 Dependiendo de la naturaleza y el emplazamiento de la intervención quirúrgica, el órgano en que la complicación peri- y posoperatoria se previene y/o reduce, en conformidad con una realización del primer aspecto de la presente invención, puede seleccionarse de uno cualquiera o más de los siguientes órganos -

- Uno o más órganos del abdomen o la pelvis, tal como glándulas suprarrenales; apéndice; vejiga; vesícula biliar; intestino grueso; intestino delgado; riñón; hígado; páncreas; bazo; estómago; en la pelvis masculina la próstata y/o los testículos; en la pelvis femenina los ovarios y/o el útero;
- Uno o más órganos del tórax, tal como corazón; pulmón; esófago; timo; pleura;
- 30 • Uno o más órganos en la cabeza y/o el cuello, tal como el cerebro (incluyendo núcleos basales cerebrales; tronco encefálico o parte del mismo, por ejemplo el bulbo raquídeo, el mesencéfalo, la protuberancia; el cerebelo; la corteza cerebral; el hipotálamo; el sistema límbico o parte del mismo, por ejemplo la amígdala);
- Ojo;
- Glándula hipofisiaria;
- 35 • Glándula tiroides y paratiroides.

40 Las complicaciones peri- y posoperatorias son bien conocidas para el experto en la materia y están bien caracterizadas en la técnica. Una complicación peri- y posoperatoria que puede tratarse o prevenirse en conformidad con la presente invención puede, por ejemplo, incluir una pérdida parcial o total de la función medible de uno o más órganos. Los medios y procedimientos para la medición de la función orgánica pueden variar de órgano a órgano y son bien conocidos para los expertos en la materia. La función orgánica o el daño orgánico pueden, por ejemplo, establecerse mediante la medición de marcadores conocidos en la técnica para la función o el daño de un órgano de interés, en muestras obtenidas a partir del paciente. Por ejemplo, los niveles plasmáticos de la lactato deshidrogenasa (LDH) y la mioglobina pueden utilizarse como una medida de la lesión del órgano que es el objetivo; los niveles de la aspartato aminotransferasa (ASAT) son un marcador adecuado para la lesión del hígado (tal como durante la isquemia y reperfusión); los niveles séricos de las troponinas específicas cardiacas o el ECG para la lesión cardiaca; los niveles de proteinuria para la medida de la lesión del riñón y el número de glóbulos blancos en los pulmones o las pruebas de capacidad funcional pulmonar pueden utilizarse para medir la lesión aguda del pulmón (tal como después de la isquemia intestinal).

50 En una composición farmacéutica y el uso de acuerdo con el primer aspecto de la invención que están destinados a prevenir o reducir las complicaciones peri- y posoperatorias, la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, normalmente se administra en el momento de, o poco después de, la intervención quirúrgica. Por ejemplo, puede administrarse al menos 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora o 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3, 2, 1, o menos de 1 minuto antes de la intervención quirúrgica, o en el momento de la intervención quirúrgica. Normalmente, la administración de la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, es continua tras la intervención quirúrgica, por ejemplo durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años tras la intervención. La anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, se puede proporcionar mediante administración repetida de formas de dosificación adecuadas o mediante la administración de una forma de liberación controlada, o como una combinación de una o más formas de administración. Se apreciará que la duración exacta de la continuación de la administración de la

anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, puede elegirse para que coincida con el grado de riesgo de complicaciones peri- y posoperatorias en distintos momentos tras la intervención quirúrgica.

5 En otras realizaciones del primer aspecto de la invención, la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, se administra como una profilaxis secundaria, para prevenir o reducir el empeoramiento de las complicaciones peri- y posoperatorias que ya se han producido o como un tratamiento para invertir de forma completa o parcial las complicaciones peri- y posoperatorias que ya se han producido.

Normalmente, la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, se proporciona mediante la administración repetida de formas de dosificación adecuadas. Normalmente, la administración se continúa durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años tras la intervención quirúrgica.

10 Mediante la administración de una "cantidad terapéuticamente eficaz de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma", los inventores quieren decir administrar una cantidad que tiene un efecto beneficioso en la prevención y/o reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias, o en la prevención y/o reducción del empeoramiento de complicaciones peri- y posoperatorias existentes. Cuando la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, previene y/o reduce las complicaciones peri- y posoperatorias normalmente, después del inicio de la administración las complicaciones peri- y posoperatorias no se observan, o se observan más tarde de lo que se esperaría (es decir, en comparación con su desarrollo en ausencia de la administración de la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma) o se desarrollan de forma menos rápida, o se desarrollan hasta un grado reducido, o hay una combinación de evolución más lenta y de desarrollo reducido.

20 Normalmente, las complicaciones posoperatorias se verían al menos 1 hora, 6 horas, 12 horas, 1 día, 1 semana, 2 semanas, 1 mes, al menos 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años más tarde que lo que se habría esperado en ausencia de la administración de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma. Normalmente, cuando la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, se administra para prevenir y/o reducir las complicaciones posoperatorias existentes, los síntomas de las complicaciones posoperatorias desaparecen con el tiempo, de forma que las complicaciones posoperatorias ya no se observan a los 10 años, a los 25 5 años, 2 años, 1 año, 6 meses, 3 meses, 1 mes, 2 semanas, 1 semana, 12 horas, 6 horas después de la administración.

El experto en la materia apreciará que pueden ser apropiados distintos criterios para identificar un efecto terapéutico de la administración de la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma. Por ejemplo, el infarto de miocardio y/o la muerte son complicaciones posoperatorias comunes después de la cirugía vascular periférica. Los sujetos a los que se les administra la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, pueden estar aquejados de infarto de miocardio con una incidencia más baja, y/o sobrevivir durante un tiempo más prolongado de lo que se esperaría en ausencia de la administración de la anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma.

35 Se puede determinar una demostración adicional del efecto de la administración de la anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, sobre las complicaciones posoperatorias después de las intervenciones quirúrgicas, mediante experimentos clínicos que normalmente implican decenas, centenas o miles de pacientes (tal como 10, 50, 100, 1000 o 10000 o valores entre estos). Como alternativa, se pueden utilizar experimentos en animales, tal como los descritos a continuación en relación con el análisis de los análogos funcionales y variantes de la anexina A5, y en los ejemplos.

40 La anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma, que puede administrarse junto con uno o más agentes activos adicionales, tal como un producto terapéutico trombolítico tal como aspirina, clopidogrel, ticlopidina, activador tisular del plasminógeno, uroquinasa o una enzima bacteriana, tal como estreptoquinasa; un producto terapéutico analgésico tal como un opiáceo, un producto terapéutico antiféccioso tal como un betalactámico, una tetraciclina, un anfenicol o un aminoglucósido. La anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma, se puede coadministrar con cualquiera de uno o más agentes activos adicionales, o puede administrarse de forma separada, simultánea, o secuencial con tal agente (o agentes). Normalmente, se utiliza uno o más de estos agentes para reducir el riesgo de trombosis, la cual que puede ocluir los vasos sanguíneos, incluyendo los vasos sanguíneos con que portan estents. Convenientemente, la terapia se inicia con ticlopidina o clopidogrel, antes del procedimiento de revascularización que implica el uso de estents, y se continúa durante al menos tres, seis o incluso doce meses tras el procedimiento (Ong y Serruys, 2005). Normalmente, se administra aspirina de forma conjunta con ticlopidina o clopidogrel y después se continúa de forma indefinida. El uso de aspirina junto con clopidogrel o ticlopidina se denomina terapia antiplaquetaria dual. Pueden aplicarse regímenes similares de administración de fármacos antitrombóticos antes y después de otros tipos de intervención.

La anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma, puede administrarse por vía parenteral, vía intravenosa, vía intrarterial, vía intraperitoneal, vía intramuscular o vía subcutánea, o vía local.

55 Una composición farmacéutica de acuerdo con el primer aspecto de la invención puede comprender anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma, en combinación con un adyuvante, diluyente o transportador aceptable de forma farmacéutica o veterinaria, que normalmente se seleccionará con respecto a la vía pretendida de administración y a la práctica farmacéutica convencional. La composición puede estar en forma de aplicaciones de

liberación inmediata, retardada o controlada. Preferentemente, la formulación es una dosificación unitaria que contiene una dosis diaria o unitaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

La frase "farmacéutica o farmacológicamente aceptable" se refiere como apropiadas a composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra desfavorable cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida por los expertos en la materia a la luz de la presente divulgación, como se ejemplifica en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18^a Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para la administración a animales (por ejemplo, el ser humano), se entenderá que las preparaciones deben satisfacer estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza como requieren la FDA Office of Biological Standards.

- 5
- 10 Como se utiliza en el presente documento, "transportador farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármacos, excipientes, agentes disgregantes, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como podría saber un experto en la materia. Se contempla el uso de cualquier transportador convencional en las
- 15 composiciones terapéuticas o farmacéuticas, a menos que sea incompatible con el principio activo.

- Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden, o pueden no, estar destinadas para, y por lo tanto formuladas de una manera adecuada para, la administración parenteral, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, o la administración a partir de un estent de elución medicamentosa, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse
- 20 incorporando los compuestos activos en las cantidades necesarias en el disolvente apropiado con diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según se necesite, seguido de esterilización. Las composiciones farmacéuticas pueden utilizarse mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, sales o glucosa suficientes para hacer la solución isotónica con la sangre. Si es necesario, las soluciones acuosas pueden tamponarse de forma adecuada (preferentemente hasta un pH de desde 3 hasta 9). La
- 25 preparación de las formulaciones farmacéuticas adecuadas en condiciones estériles se realiza de forma fácil mediante técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas para los expertos en la materia.

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

- En cualquier caso, el médico determinará la dosificación precisa que sea la más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son
- 35 ejemplares del caso promedio. Puede haber, por supuesto, casos individuales en donde se ameriten intervalos de dosificación más elevados o más bajos y tales casos están dentro del ámbito de la presente invención.

Para el uso veterinario, se administra un compuesto de la invención como una formulación aceptable de forma adecuada en conformidad con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la vía de administración que será más apropiada para un animal particular.

- 40 La anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma mencionada en relación con el primer aspecto de la invención puede seleccionarse de:

- (a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1);
- (b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;
- (c) una variante alélica o genética de a) o b);
- 45 (d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % o 99 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1;
- (e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
- (f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

- 50 En realizaciones particulares, el análogo funcional o variante de la anexina A5 de acuerdo con la invención es más del 90 %, o preferentemente más del 95 % o 99 % idéntica a la anexina A5 humana, la SEQ ID NO: 1.

- La identidad porcentual entre las dos secuencias de aminoácidos se determina como sigue. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos con, por ejemplo, la SEQ ID NO: 1, utilizando el programa BLAST 2 Sequences (BL2seq) a partir de la versión autónoma de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión autónoma de BLASTZ puede obtenerse a partir del sitio web del National Center for
- 55 Biotechnology Information del gobierno de Estados Unidos, en ncbi.nlm.nih.gov. Las instrucciones que explican cómo utilizar el programa BL2seq pueden encontrarse en el archivo "léame" adjunto a BLASTZ. BL2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de BL2seq se ajustan como sigue: -i se ajusta a un archivo que contiene la primera

secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se ajusta a un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p se ajusta a blastp; -o se ajusta a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt) y todas las otras opciones se dejan con sus ajustes predeterminados. Por ejemplo, para generar un archivo de resultado que contenga una comparación entre las dos secuencias de aminoácidos puede utilizarse el siguiente comando: C:\BI2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo denominado archivo de resultado presentará las regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo denominado de resultado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineadas, la cantidad de coincidencias se determina mediante el recuento de la cantidad de posiciones en donde esté presente un nucleótido o resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias.

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

Por lo tanto, un análogo funcional o variante de la anexina A5, como se define en la Reivindicación 1 y la Reivindicación 2, puede ser una proteína en la que ha habido inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos en una o más posiciones, ya sea conservativas o no conservativas, a condición de que tales cambios den como resultado una proteína cuyas propiedades básicas para funcionar de una manera equivalente a la anexina A5 no hayan cambiado de forma significativa. "De forma significativa" en este contexto significa que un experto en la materia diría que las propiedades de la variante pueden seguir siendo distintas pero no serían no obvias sobre las de la proteína original.

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

Tales variantes pueden prepararse utilizando los procedimientos de ingeniería de proteínas y de mutagénesis dirigida que son bien conocidos en la técnica.

El análogo funcional o variante de la anexina A5 de acuerdo con la invención, puede ser un dímero de anexina A5 (tal como dianexina) o un análogo funcional o una variante de la misma, o puede ser una anexina A5 PEGilada o un análogo funcional o una variante de la misma. La dianexina A5 y la anexina A5 PEGilada se desvelan en el documento WO 02/067857.

La PEGilación es un procedimiento bien conocido para los expertos en la materia, en el que un polipéptido o compuesto peptidomimético (para los fines de la presente invención, la anexina A5 o el análogo funcional o variante) se modifica de forma que una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) se unen de forma covalente a la cadena lateral de uno o más aminoácidos o derivados de los mismos. Esta es una de las técnicas de química estructural para la modificación de moléculas (QEMP) más importantes. Pueden utilizarse otras técnicas QEMP; tales técnicas pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de la molécula, por ejemplo extendiendo su semivida *in vivo*. Un conjugado PEG-proteína se forma primer lugar activando radical PEG de forma que reaccionará con, y se acoplará a, la proteína o compuesto peptidomimético de la invención. Los radicales PEG varían de forma considerable en peso molecular y conformación, con los primeros radicales (los PEG monofuncionales; los PEGm) siendo lineales con pesos moleculares de 12 kDa o menos, y los últimos radicales siendo de pesos moleculares aumentados. PEG2, una innovación reciente de la tecnología PEG, implica el acoplamiento de un PEGm de 30 kDa (o menos) a un aminoácido lisina (aunque la PEGilación puede ampliarse a la adición de PEG a otros aminoácidos), que adicionalmente se hace reaccionar para formar una estructura ramificada que se comporta como un PEGm lineal de un peso molecular mucho mayor (Kozlowski y col., 2001). Los procedimientos que pueden utilizarse para unir de forma covalente las moléculas de PEG a polipéptidos se describen adicionalmente en Roberts y col. (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476; Bhadra y col. (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29; Kozlowski y col. (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224 y Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417, y las referencias a las que se hace referencia allí.

Las ventajas de la PEGilación incluyen el aclaramiento renal reducido que, para algunos productos, da como resultado una absorción más sostenida tras la administración, así como una distribución restringida, que posiblemente conduce a concentraciones plasmáticas más constantes y sostenidas, y por lo tanto a un aumento de la eficacia clínica (Harris y col. (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551). Las ventajas adicionales pueden incluir la inmunogeneidad reducida del compuesto terapéutico (Reddy (2001) *Ann Pharmacother*, 34, 915 - 923), y una toxicidad más baja (Kozlowski y col. (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429).

El análogo funcional o variante de la anexina A5 puede ser una proteína de fusión que comprende la secuencia de la anexina A5 o una variante de la misma. Por lo tanto, por ejemplo la anexina A5 o una variante funcional de la misma, puede fusionarse a una o más secuencias polipeptídicas compañeras de fusión, de forma que se extienda la semivida de la molécula en el sistema circulatorio del paciente y/o se añada funcionalidad adicional a la molécula.

Un análogo "funcional" o variante de la anexina A5, puede tener la capacidad de unirse a la fosfatidilserina en una

membrana biológica, preferentemente a un nivel que es al menos del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente el 100 % de que presenta la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1) en las mismas condiciones. Se conoce en la técnica un procedimiento adecuado para medir la unión de la anexina A5 a la fosfatidilserina en una membrana biológica (Vermes y col. (1995) J Immunol Methods, 184(1): p. 39-51).

- 5 Un análogo “funcional” o variante de la anexina A5 puede, de forma adicional, o de forma alternativa, poseer al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente el 100 % de la actividad terapéutica de la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1) cuando se utiliza en la misma (es decir equivalente molar) dosificación, para la profilaxis o el tratamiento de la restenosis en conformidad con el primer aspecto de la invención. En este contexto puede determinarse la actividad terapéutica de un análogo “funcional” o variante de la anexina A5, en comparación con la de la anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1), comparando la capacidad de una cantidad equivalente molar del análogo funcional o variante y de la anexina A5 humana para tratar, o proporcionar profilaxis, de la restenosis como se describe anteriormente, y/o mediante experimentos con animales, tal como utilizando la metodología expuesta en los siguientes ejemplos.

Ejemplos

- 15 Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención. Los expertos en la materia deben apreciar que las técnicas desveladas en los ejemplos que siguen representan técnicas que el inventor ha descubierto que funcionan bien en la práctica de la invención y, por lo tanto, se puede considerar como que constituyen modos preferentes para su práctica. Sin embargo, los expertos en la materia deben apreciar, a la luz de la presente divulgación, que pueden hacerse muchos cambios en las realizaciones específicas que se desvelan y aún obtener un resultado semejante o similar, sin separarse del ámbito de la invención.

Ejemplo 1: Modelo de rata de cirugía de las extremidades posteriores

El objetivo de los experimentos descritos en este ejemplo es realizar una intervención quirúrgica en ratas en un órgano periférico para el cual se detiene la circulación sanguínea durante la cirugía.

- 25 Para este fin, se anestesian ratas y se coloca una ligadura alrededor de la aorta abdominal inferior. Los hilos se pasan a través de un catéter PE50 y se ocluye la circulación sanguínea empujando los hilos a través del catéter de forma que se aprieta la aorta y se detiene la circulación sanguínea. Después, apretando el catéter se fija la sutura en la posición cerrada. En este experimento, no se realiza una intervención principal, pero durante el periodo de oclusión se expone la arteria femoral izquierda y se cierra de forma suave, para mimetizar un traumatismo obtenido durante la cirugía. Cuarenta y cinco minutos tras la detención de la circulación sanguínea la aorta se abre otra vez y se restituye la circulación sanguínea.

Este protocolo experimental se realiza como un ejemplo de una intervención quirúrgica reproducible. Se toman muestras de sangre a partir de un catéter permanente antes de detener la circulación sanguínea a las extremidades posteriores y 180 minutos después de restablecer la circulación sanguínea. Se administra a las ratas anexina A5 por vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg, o placebo, al menos 10 minutos antes de la anestesia.

- 35 Se utilizan los niveles plasmáticos de la lactato deshidrogenasa (LDH) y de la mioglobina como una medida de la lesión del órgano que es el objetivo. Estas proteínas son intracelulares pero se liberan a partir de células musculares que están lesionadas. También es bien sabido que la mioglobina es un caso común de fallo renal, de modo que el nivel de mioglobina también es una medida del riesgo de una complicación en un órgano que no es el objetivo.

- 40 En todos los animales los niveles plasmáticos eran bastante elevados ya en el tiempo 0, lo que muy probablemente refleja que las mismas anestesia y cirugía son traumáticas, y están asociadas con la lesión tisular. En animales operados de forma simulada (es decir, animales que tienen la ligadura colocada alrededor de la aorta, pero que no se sometieron a isquemia) hubo una notable caída durante el periodo experimental. Sin embargo, como se observa en la Figura 1, en los animales no tratados (placebo) los niveles plasmáticos de LDH continuaron aumentando, mientras que en los animales a los que se administró anexina A5 antes de la isquemia hubo en cambio una ligera reducción de los niveles de LDH.

- 45 Cabe destacar que los inventores también encontraron un aumento de la aspartato aminotransferasa (ASAT), un marcador de lesión hepática durante la isquemia y la reperusión (pero no en las ratas operadas de forma simulada), lo que indica que el procedimiento provocó lesión hepática. Hubo un aumento tanto en las ratas tratadas con placebo como en las tratadas con anexina A5, pero el tratamiento con anexina A5 redujo el aumento. Adicionalmente, se encontró un gran aumento de los niveles de mioglobina en el 25 % de las ratas tratadas con placebo, pero no en las ratas tratadas con anexina A5.

Este experimento muestra que la anexina A5 puede limitar las complicaciones peri- y posoperatorias.

Ejemplo 2.

La lesión por isquemia/reperfusión (I/R) intestinal es una afección grave resultante de la isquemia mesentérica aguda, el choque hemorrágico, traumático o septicémico, o las quemaduras severas y algunos procedimientos quirúrgicos incluyendo el trasplante del intestino delgado o la cirugía aórtica abdominal. La insuficiencia multiorgánica, incluyendo la lesión pulmonar aguda (LPA) y su forma grave, el síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA), es una complicación común de las lesiones por I/R intestinales y contribuye a su elevada tasa de mortalidad (Ding R y col. (2012), *Inflammation* 35(1):158-66).

Este ejemplo analiza la hipótesis de que la anexina A5 puede prevenir o reducir la lesión en los pulmones después de la cirugía intestinal. La lesión pulmonar aguda se indujo mediante isquemia-reperfusión intestinal. Brevemente, se anestesiaron ratas Sprague-Dawley (aproximadamente 250 g), se realizó una laparotomía y se identificó la arteria mesentérica superior, y se ocluyó por debajo del tronco celiaco con una micropinza. La isquemia intestinal se confirmó por la palidez del yeyuno y del íleo. Después de 45 min. Se inició la reperfusión retirando la pinza y se confirmó mediante la recuperación de color del intestino. Se instiló en la cavidad peritoneal solución salina (0,5 ml) precalentada (37 °C) antes de cerrar con una sutura. Los animales se sacrificaron dos horas más tarde mediante exsanguinaciones. Una hora antes de la isquemia se administró a las ratas anexina A5 1 mg/kg por vía intravenosa o placebo.

Al finalizar, el tejido pulmonar se aisló y se fijó en solución de formalina para el procesamiento y los análisis histopatológicos adicionales. Todas las muestras se procesaron desde formalina a través de alcoholes graduados, de xileno a cera de parafina y posteriormente se incluyeron en cera de parafina. Se cortaron cortes de 5 µm a partir de la muestra y se colocaron en portaobjetos Superfrost Plus. Se tiñeron para demostrar los glóbulos blancos y los linfocitos utilizando un anticuerpo, CD45, en un ensayo de inmunohistoquímica (IHQ) y posteriormente se exploraron de forma digital mediante OracleBio. Después, se analizó la imagen explorada utilizando el programa informático Definer's Tissue Studio 3.0. El análisis de las imágenes mostró que el tratamiento con la anexina A5 redujo la cantidad de glóbulos blancos (Figura 2), lo que demuestra que la anexina A5 redujo la lesión pulmonar aguda después de la isquemia intestinal.

Referencias

Se mencionan las siguientes referencias en la medida en que proporcionan detalles sobre procedimientos y otros detalles ejemplares suplementarios a los expuestos en el presente documento:

- Sol. PCT WO 02/067857
 Sol. PCT WO 2005/099744
 Sol. PCT WO 2009/077764
 Sol. PCT WO 2009/103977.
 Bhadra y col. (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29
 Cederholm y Frostegard (2007) *Ann. NY Acad. Sci.*, 1108:96-103.
 Cederholm y col. (2005) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25(1):198-203.
 Ding R y col. (2012), *Inflammation* 35(1):158-66
 Duggan. *Am J Cardiovasc Drugs*, 2012. 12(1): p. 57-72.
 Feinman. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2010. 299(4): p. G833-43.
 Harris y col. (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551
 Kozlowski y col. (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224
 Kozlowski y col. (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429
 Ong y Serruys (2005) *Curr Issues Cardiol* 32: 372-377
 Rand (2000) *Autoimmun.*, 15(2):107-111.
 Reddy (2001) *Ann Pharmacother*, 34, 915 - 923
 Roberts y col. (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476
 Shen y col. (2007) *Am. J. Transplant.*, 7(11):2463-2471.
 Smith Jr. y col. (2006) *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(1):216-235.
 Teoh y col. (2007) *Gastroenterology*, 133(2):632-646.
 Thiagarajan y Benedict (1997) *Circulation*, 96(7):2339-2347.
 Vermes y col. (1995) *J Immunol Methods*, 184(1): p. 39-51
 Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417
 Vogt y col. (2004) *European Heart Journal* 25: 1330-40.
 Zayour y Azar. *Endocr Pract*, 2006. 12(1): p. 59-62.
 Zhang y col. (2004) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(12):2277-2283.

Listado de secuencias

<110> Athera Biotechnologies AB

<110> Knut Pettersson

ES 2 607 066 T3

<120> Procedimientos terapéuticos y profilácticos, usos y composiciones

<130> ATHBE/P50909PC

5

<150> US 61/472013

<151> 05-04-2011

<150> US 61/472002

10

<151> 05-04-2011

<160> 1

<170> PatentIn versión 3.3

15

<210> 1

<211> 320

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

20

<220>

<221> misc_feature

<223> Anexina A5 humana

25

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 607 066 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, para su uso en la prevención y/o reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias tras una intervención quirúrgica,
- 5 en la que la intervención quirúrgica comprende restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica, y en la que adicionalmente la intervención quirúrgica provoca daño celular inmediato, isquemia y/o lesión por reperfusión en el órgano que es el objetivo,
- 10 en la que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y
- 10 en la que la anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona de:
- (a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1);
 - (b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;
 - (c) una variante alélica o genética de a) o b);
 - (d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del
 - 15 95 % idéntica a la anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;
 - (e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - (f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
2. Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, para su uso en la prevención y/o reducción de las complicaciones peri- y posoperatorias después de una intervención quirúrgica,
- 20 en la que la intervención quirúrgica comprende restricciones en la circulación sanguínea de los órganos durante la intervención quirúrgica y en la cual, adicionalmente, la intervención quirúrgica provoca daño celular inmediato, isquemia y/o lesión por reperfusión en un órgano que es el objetivo,
- 25 en la que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación de un órgano que no es el objetivo de la intervención quirúrgica, y
- 25 en la que la anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona de:
- (a) la anexina A5 humana (SEQ ID NO:1);
 - (b) un ortólogo de mamífero de la anexina A5 humana;
 - (c) una variante alélica o genética de a) o b);
 - (d) un análogo funcional de la anexina que es una proteína que es más del 90 %, o preferentemente más del
 - 30 95 % idéntica a la anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;
 - (e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - (f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la intervención quirúrgica comprende la cirugía ortopédica, tal como la artroplastia.
- 35
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la intervención quirúrgica comprende la cirugía vascular periférica.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, o el producto para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la intervención quirúrgica comprende la cirugía cardíaca.
- 40
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 5, o el producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la intervención quirúrgica no provoca daño celular inmediato, isquemia y/o lesión por reperfusión a, y/o trombosis en, el órgano en el cual la complicación peri- o posoperatoria se previene y/o reduce.
- 45
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación seleccionada de una complicación renal, una complicación pulmonar, una complicación gastrointestinal.
- 50
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 6, o el producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en la que la complicación peri- o posoperatoria es una complicación cardiovascular.
9. La composición farmacéutica para su uso, o el producto para su uso, de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la complicación peri- o posoperatoria se selecciona de infarto de miocardio, enfermedad cardíaca congestiva, ictus, AIT e isquemia de las extremidades posoperatoria.
- 55
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 3 a 9, o el producto para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, concebida para la administración parenteral, intravenosa, intrarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, o a la administración local a partir de

un estent de elución medicamentosa.

Fig 1

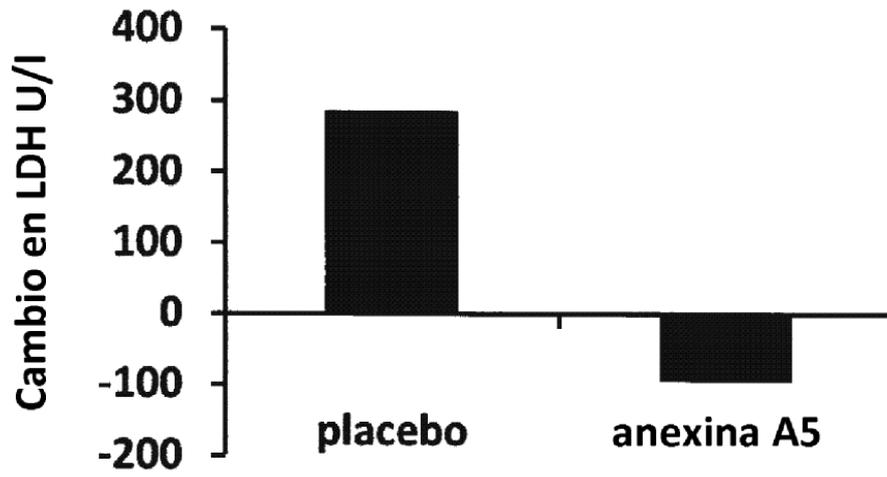


Fig 2

