

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 613 400**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/47** (2006.01)

**A61K 38/17** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.06.2010 PCT/NL2010/050334**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.12.2010 WO2010140886**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.06.2010 E 10727986 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.11.2016 EP 2437773**

54 Título: **Método para mejorar la fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina**

30 Prioridad:

**03.06.2009 EP 09161791**

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

**24.05.2017**

73 Titular/es:

**MOSAMEDIX B.V. (100.0%)**

**Monnikendijk 4**

**4474 ND Kattendijke, NL**

72 Inventor/es:

**REUTELINGSPERGER, CHRISTIAAN, PETER,  
MARIA;  
MOONEN, PETER, JOZEF, JACOBUS y  
VERMAIRE, ADRIAAN, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**TOMAS GIL, Tesifonte Enrique**

ES 2 613 400 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

Método para mejorar la fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina

5 [0001] La invención se refiere a medios y métodos para usar en mejorar la fagocitosis en células que exponen fosfatidilserina, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades que se caracterizan por inflamación crónica tales como aterosclerosis y enfermedades autoinmunes crónicas tal como lupus eritematoso sistémico (LES).

Antecedentes

10

[0002] La apoptosis representa un papel importante en la aterogénesis. Existe una correlación positiva entre el número de células apoptóticas en la placa y la inestabilidad de la placa. La fagocitosis de células apoptóticas es relevante en cuanto a la progresión de aterosclerosis hacia el fenotipo inestable.

15

La fagocitosis disminuida está asociada a la progresión acelerada de la placa aterosclerótica hacia el fenotipo inestable. La aterosclerosis, por lo tanto, se puede tratar con métodos que mejoran la fagocitosis de células apoptóticas.

[0003] Las células apoptóticas exponen fosfatidilserina (PS) en su superficie celular.

20

La anexina A5 (anxA5) se enlaza a PS expresada en la superficie de célula apoptótica. La anxA5 ligada a la célula apoptótica inhibe su fagocitosis por la protección del PS, siendo PS reconocido por el fagocito como una señal "cómeme" (Kenis et al. Exp. Cell Res. 312 (2006) 719-726; y referencias citadas allí).

[0004] Asano et al. J. Exp. Med. 200(4), 459-467 (2004) muestra que un mutante del glóbulo de grasa láctea con un mutación puntual en su motivo RGD, inhibe la fagocitosis de células apoptóticas y causa la producción de auto-anticuerpos después de la inyección en ratones.

25

[0005] Bérat et al., Biointerphases 2(4), 165-172 (2007) describen una variante de anexina A5 de rata donde Thr-163 se sustituye por Cys, y un oligopéptido sintético que contiene el motivo RGD (arginina-glicina-aspartato) y un residuo Cys se acopla al residuo Cys del mutante de anexina a través de un enlace de disulfuro.

30

Se ha descubierto que las matrices de estos conjugados de RGD de anexina promueven la adhesión de células endoteliales de vena safena humana.

Los autores sugieren que estos resultados puede abrir técnicas de transporte de célula y similares.

Las variantes de anexina donde el motivo RGD se fija a una parte central de la molécula por medio de un puente Cys-Cys (disulfuro) pueden tener la desventaja de insuficiente estabilidad en varios ambientes.

35

Descripción de la invención

[0006] Esta invención describe métodos para mejorar la fagocitosis usando variantes de anxA5 que enlazan con PS en la célula apoptótica y activan los fagocitos para sepultar la célula apoptótica en vez de inhibir la fagocitosis.

40

[0007] La estructura terciaria de AnxA5 está dispuesta en cuatro dominios y una cola N-terminal en el lado cóncavo de la molécula que conecta el dominio I y IV.

La cola N-terminal es opuesta al lado convexo de la molécula anxA5 que alberga los sitios de unión  $Ca^{2+}$ /fosfolípidos.

45

Por lo tanto, el lado cóncavo, y especialmente la cola N-terminal se puede mutar y conjugar a moléculas diferentes (por ejemplo proteínas o azúcares) sin interferencia con la capacidad de unión de PS.

[0008] Las variantes de anxA5 de la invención pueden así llevar una señal de inducción de fagocitosis en o como una extensión de su cola N-terminal o en otro lugar en el lado cóncavo.

La señal de inducción de fagocitosis puede ser uno o más, hasta veinte motivos RGD (arginina-glicina-aspartato).

50

Las variantes pueden ser derivados de anxA5 que tienen un motivo RGD en su cola N-terminal que activa los receptores de integrina del fagocito.

También derivados de anxA5 que llevan el dominio Fc de IgG o partes de los mismos activan receptores de IgG de los fagocitos.

55

[0009] Se prefiere que al menos uno o preferiblemente cada motivo RGD se flanquee por un aminoácido neutral, en particular un aminoácido seleccionado a partir de A, G, I, L, M, P, S, T y V.

[0010] La variante de anxA5 de la invención contiene al menos un motivo RGD en la cadena de anexina, es decir en la cadena polipeptídica lineal que constituye la molécula de anexina.

60

Así, el motivo RGD se puede insertar en la cadena polipeptídica de anexina o reemplazar uno o más, aminoácidos de la molécula de anexina, o ser fijados en el lado N-terminal de la molécula de anexina.

Por tanto, la variante de anexina puede ser, y, es producida preferiblemente por producción recombinante usando la célula huésped y se transforma con el ADN modificado adecuadamente.

65

[0011] Por ejemplo, la variante de anxA5 de la invención puede tener una o más secuencias RGD que sustituyen las secuencias de tres aminoácidos en la superficie cóncava de la proteína anxA5.

Los aminoácidos en la superficie cóncava anxA5 se muestran en cursiva en la secuencia ilustrada en la tabla 1 (SEC ID nº 1) e incluyen las posiciones de aminoácidos 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 150,157-170, 202-219, 245-248, y 280-294.

5 Por lo tanto uno o más motivos RGD están situados preferiblemente en el rango 1-19 46-64, 86-89, 118-135, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294, más preferiblemente en el rango 1-15, 46-58, 86-87, 118-134; (170), 245-248 y 280-294, indicados en **negrita cursiva** en la tabla 1.

En particular, las variantes de anxA5 según la invención tienen al menos una secuencia RGD que sustituye una secuencia de tres aminoácidos en el rango de 1-15, preferiblemente en el rango 1-10 de la tabla 1 (SEC ID nº 1).

10 Ejemplos adecuados de esta forma de realización incluyen secuencias 49-51 (sustitución de QE por GD), 17- 19 (A por G), 13- 15 (GF por RG) por sustitución adecuada de las secuencias nativas; en las dos últimas se prefiere que E en 16 se sustituya adicionalmente por un aminoácido neutral.

Ejemplos más adecuados incluyen 10-12 (DFP por RGD), 8-10 (VT por RG), 1-3 (AQV por RGD) y especialmente 5-7 (T por D).

15 Tabla 1

Secuencias de aminoácidos de anexina humana A5 (sin la metionina original). Los aminoácidos en cursiva se sitúan en el lado cóncavo. Los aminoácidos en **negrita cursiva** son aminoácidos preferidos para sustitución en el lado cóncavo. Las regiones subrayadas son regiones donde los aminoácidos se pueden sustituir para inhibir la internalización.

20

<b><i>AQVLRGTVTD</i></b>	<b><i>FPGFDERADA</i></b>	<b><i>ETLRKAMKGL</i></b>	<b><i>GTDEESILTL</i></b>	<b>40</b>
<b><i>LTSRSNAQRQ</i></b>	<b><i>EISAAFKTLF</i></b>	<b><i>GRDLLDDLKS</i></b>	<b><i>ELTGKFEKLI</i></b>	<b>80</b>
<b><i>VALMKPSRLY</i></b>	<b><i>DAYELKHALK</i></b>	<b><i>GAGTNEKVLT</i></b>	<b><i>EIIASRTPEE</i></b>	<b>120</b>
<b><i>LRAIKQVYEE</i></b>	<b><i>EYGSLEDDV</i></b>	<b><i>VGDTSGYYQR</i></b>	<b><i>MLVVLLQANR</i></b>	<b>160</b>
<b><i>DPDAGIDEAQ</i></b>	<b><i>VEQDAQALFQ</i></b>	<b><i>AGELKWGTDE</i></b>	<b><i>EKFITIFGTR</i></b>	<b>200</b>
<b><i>SVSHLRKVFD</i></b>	<b><i>KYMTISGFQI</i></b>	<b><i>EETIDRETSG</i></b>	<b><i>NLEQLLLAVV</i></b>	<b>240</b>
<b><i>KSIRSIPAYL</i></b>	<b><i>AETLYYAMKG</i></b>	<b><i>AGTDDHTLIR</i></b>	<b><i>VMVSRSEIDL</i></b>	<b>280</b>
<b><i>FNIRKEFRKN</i></b>	<b><i>FATSLYSMIK</i></b>	<b><i>GDTSGDYKKA</i></b>	<b><i>LLLLCGEDD</i></b>	<b>319</b>

[0012] Alternativa o adicionalmente, la variante de anxA5 de la invención puede tener una extensión en el N-término de la molécula, conteniendo dicha extensión una o más secuencias RGD.

25 La extensión puede por ejemplo ser  $X^1\text{RGDX}^2$  o  $(X^1\text{RGDX}^2)_n$ , donde  $X^1$  y  $X^2$  puede ser cualquier serie de aminoácidos, siendo seleccionados los terminales a partir de A, G, I, L, M, P, S, T y V, preferiblemente a partir de A, G, P y S, y n puede ser de 1-19, preferiblemente 2-9, por ejemplo 2 o 3.

30 Preferiblemente sin embargo, cada  $X^1$  y  $X^2$  son uno o dos aminoácidos seleccionados a partir de A, G, I, L, M, P, S, T y V, preferiblemente a partir de A, G, P y S. Así, un ejemplo es una secuencia ARGD fijada al N-término (A) de las secuencias de la tabla 1 (SEC ID nº 1).

Otros ejemplos incluyen RGDAARGD, RGDAARGDAARGDA (SEC ID nº 3, 4) etc. extendidos en el N-término de la molécula anxA5.

35 Así, cuando la variante anxA5 contiene más de una secuencia RGD, cada par de secuencias de RGD es separado preferiblemente por 1-3 aminoácidos seleccionados a partir de A, G, I, L, M, P, S, T y V.

[0013] Como otra alternativa, una variante de anxA5 según la invención puede contener una o más secuencias de RGD que se fijan a un residuo de cisteína que sustituye un aminoácido en el lado N-terminal de la molécula de anexina, es decir en una de las posiciones 1-19 de la SEC ID nº 1 (tabla 1).

40 Con este fin, un residuo de cisteína se introduce en una de las posiciones anteriores por métodos conocidos en la técnica, por ejemplo como se describe en el documento WO 2006/003488, que se incorpora aquí por referencia.

Uno o más motivos RGD se pueden acoplar al grupo sulfhidrilo del residuo de cisteína por ejemplo por un enlazador.

El enlazador puede ser seleccionado por ejemplo de grupos que contienen maleimida, grupos que contienen halógenos, isotiocianato, un isocianato, un éster de imido, y un grupo de éster succinimidilo, al que está ligado por ejemplo etilendiamina.

45 Así en particular, el enlazador contiene un grupo amino, al que se puede ligar el motivo RGD, o los motivos  $X^1\text{RGDX}^2$  o  $(X^1\text{RGDX}^2)$  (véase arriba).

[0014] Se prefiere que en tales derivados de Cys, cualquier cisteína originalmente presente en una posición no cóncava,

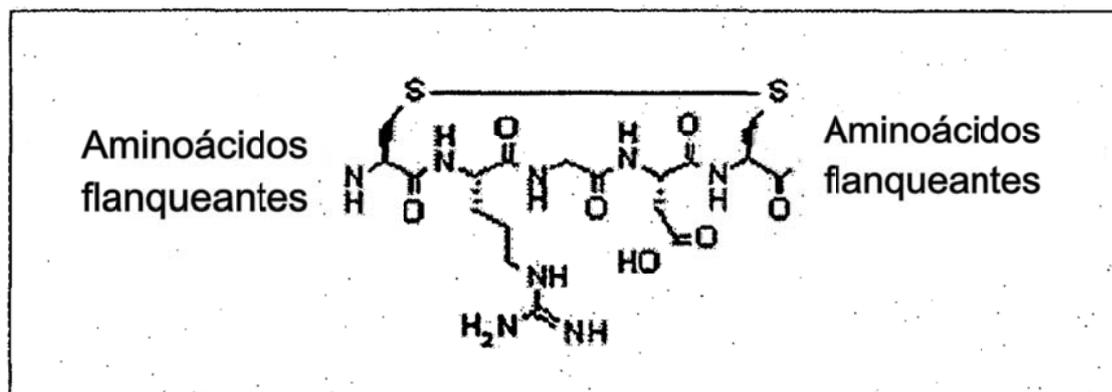
en particular en un sitio enterrado dentro de la molécula como indicado por subrayado en la tabla 1, se sustituya por otro aminoácido, tal como un residuo de alanina o serina; véanse los documentos WO 2006/003488 y WO 2007/069895. Esto se aplica específicamente al residuo de cisteína originalmente presente en la posición 315 de la molécula anxA5. Por lo tanto, se prefiere una variante de anxA5 en la que Cys-315 se ha sustituido por otro aminoácido, o ha sido eliminado.

[0015] Alternativa o adicionalmente a una secuencia recta que contiene RGD, la variante anxA5 puede contener una secuencia cíclica de RGD o una pluralidad de las mismas.

Tal secuencia cíclica de RGD puede tener la estructura cíclica c-X<sup>3</sup>RGD, donde X<sup>3</sup> puede representar uno, dos o tres aminoácidos, distintos de R y D, que contienen un aminoácido de enlace tales como K, N, Q, o uno que contenga triazol u otro aminoácido sintético que permita el acoplamiento a la molécula anxA5, por ejemplo a un residuo de cisteína de la misma. La síntesis de derivados de RGD cíclicos se describe por ejemplo por Kuijpers et al. Bioconjugado Chem. 2007, 18,1847-1854 y referencias citadas allí. RGD puede hacerse cíclico por ejemplo flanqueando el motivo RGD con una cisteína a ambos lados y oxidando las cisteínas para formar un puente de disulfuro. La fórmula debajo muestra un ejemplo de un péptido de 5-20 aminoácidos con un RGD cíclico que resultó cíclico por formación de puente de disulfuro de residuos de cisteína flanqueantes.

[0016] En una forma de realización, un péptido de 3-20 aminoácidos que contiene RGD o RGD cíclico se acopla a anexina A5 o variante de la misma por acoplamiento químico usando técnicas estándar tal como por ejemplo el acoplamiento a un grupo amino o un grupo sulfhidrilo presente en el polipéptido de anexina.

Una forma de realización preferida abarca anexina A5 o variantes de la misma que tienen RGD o RGD cíclico que contienen péptidos de 3-20 aminoácidos que se acoplan al lado cóncavo, especialmente el lado N-terminal, de la molécula de anexina.



[0017] En una forma de realización particular, la variante de anexina según la invención que contiene el motivo RGD es posteriormente modificada para inhibir la internalización en una célula.

En tal variante, uno o más aminoácidos en las hélices implicadas en las interacciones moleculares de invierno entre moléculas de anexina se sustituyen por aminoácidos diferentes.

Estos aminoácidos de sustitución se localizan en las posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266, y 305-317 en la anexina A5, y estas posiciones se subrayan en la tabla 1 (SEC ID n° 1).

Donde la variante de anexina contiene una o más de estas modificaciones, no se cumple la característica de la anexina de no ser interiorizada en una célula.

Así, la invención también comprende una variante de anexina que a) contiene una o más secuencias de RGD y b) contiene una o más modificaciones de aminoácido como se describe en este caso.

Tales derivados de anexina son descritos en el documento WO 2007/069895, que se incorpora aquí por referencia.

[0018] Modificaciones preferidas que inhiben internalización son sustituciones, especialmente sustituciones de aminoácidos polares por aminoácidos no polares. Así, aminoácidos preferidos para sustitución incluyen arginina (R), lisina (K), aspartato (D), glutamato (E), asparagina (N) y glutamina (Q).

Estos se puede sustituir p. Ej. por glicina (G), alanina (A), prolina (P), serina (S), treonina (T) y valina (V), especialmente A o G, o por un aminoácido no polar que se sitúa en la posición correspondiente de otra anexina (cf. Tabla 1). Ejemplos adecuados de aminoácidos sustituidos incluyen E21; K25 (p. Ej. por G, T), R62 (p. ej. G, A), D63 (p. ej. G, A, P), K69; D91; K96; H97; K100; E137 (p. ej. A, G, V), D138; D139; N159 (p. ej. A, G, S), R160; R206; K207; Q219; D225; R226; D264; K308; K309.

En esta forma de realización particular se prefiere tener al menos dos, o incluso al menos tres, sustituciones en regiones diferentes, por ejemplo R62A + E137G, o K69A + K100A + N159S etc., para reducir más la trimerización de la anexina en el sitio de la célula.

[0019] En la forma de realización descrita anteriormente, donde la variante anxA5 contiene un residuo de cisteína en

una de las posiciones cóncavas 1-19, 24, 28,46-64,86-89,118-135,149-150,157-170,203-219,245-248 y 280-294, dicha cisteína permite el acoplamiento a uno o más motivos RGD como se ha descrito anteriormente.

[0020] En moléculas que ya contienen uno o más motivos RGD, por ejemplo por sustitución adecuada o extensión, dicho residuo de cisteína puede ser una función adecuada para el acoplamiento a una molécula diagnóstica o terapéutica, p. ej., como se describe en el documento WO 2006/003488.

Diagnósticos adecuados son sondas ópticas tales como por ejemplo fluorocromos en la región visible, casi infrarroja e infrarroja y sondas nucleares como los ejemplos <sup>99m</sup>Tc, <sup>68</sup>Ga, <sup>64</sup>Cu, <sup>111</sup>In, <sup>124</sup>I, y <sup>18</sup>F.

Agentes terapéuticos adecuados son compuestos que inhiben la actividad de proteasa tales como por ejemplo compuestos químicos o péptidos que inhiben metaloproteasas matriciales.

Otros tratamientos adecuados son compuestos que inhiben la activación de plaquetas y coagulación sanguínea tales como por ejemplo heparina o derivados de bajo peso molecular de la misma. Agentes terapéuticos adecuados son también radioisótopos que tienen emisión beta tales como por ejemplo <sup>186</sup>Re y <sup>90</sup>Y, los ejemplos sirven al fin de indicación y no implican una limitación de posibilidades.

[0021] Como medios alternativos para suministrar la variante de anexina con un diagnóstico o especie metálica terapéutica, la variante de anexina A5 de la invención puede comprender ventajosamente de 2 hasta 10 residuos de aminoácidos en su N-término, permitiendo la asociación con diagnósticos metálicos o tratamientos.

Tales aminoácidos son especialmente residuos de histidina, al menos dos de dichos residuos de histidina que son colindantes o separados por no más de otro aminoácido.

El diagnóstico metálico o terapia puede ser por ejemplo un radionúclido, tales como galio 67, galio 68, indio 111, tecnecio 99m, renio 188, cobre 64 y estaño 117m.

Un ejemplo es una variante de anexina de la invención, por ejemplo que lleva un motivo RGD dentro de o fijada a su región de aminoácidos 1-15, que además contiene 3-6 residuos de histidina fijados al lado N-terminal de la alanina en la posición 1, a la que está asociado uno de los metales.

Variantes de anexina que contienen residuos de histidina y sus complejos metálicos y usos son descritos en el documento WO 2010/024673.

[0022] Aparte de las sustituciones y adiciones anteriormente descritas, la variante anxA5 de la presente invención puede contener otras sustituciones, deleciones o inserciones en la secuencia como representado en la tabla 1 (SEC ID n.º 1).

Tales sustituciones, deleciones o inserciones pueden ser especialmente sustituciones conservadoras como ocurre cuando se compara la secuencia de anx5 de la tabla 1 con la de otras especies animales, por ejemplo rata, ratón, mono, vaca u otro, o con aquella de otras anexinas, tales como anxA1, anxA4, anxA8, anxA9, etc., estas secuencias son accesibles fácilmente (por ejemplo a través de <http://www.structuralchemistry.org/annexins/seq/search.php>).

[0023] Sin embargo, se prefiere que además de las extensiones en el lado N-terminal o cadenas laterales descritas anteriormente, la secuencia de aminoácidos de la variante de anxA5 de la invención tenga al menos 80% de identidad de aminoácidos y al menos un 90% de aminoácidos en similitud con la secuencia de la SEC ID No: 1, más preferiblemente al menos 90% identidad de aminoácido y al menos 95% de similitud de aminoácidos, de la forma más preferible 95-99.7% de identidad de aminoácidos y especialmente 97-99.7% de similitud de aminoácidos.

Se prefiere que la variante de anxA5 esté basada en anxA5 humana, es decir, que tenga los grados anteriores de identidad con la secuencia humana (tabla 1, SEC ID n.º 1), y en particular así en las áreas convexas (las partes no subrayadas de la tabla 1), especialmente una identidad de aminoácidos en la región 29-45 de al menos 90% (al menos 15 de 17), más preferiblemente al menos 95% (16/17), de la forma más preferible 100% (todos los 17 aminoácidos idénticos).

[0024] La variante de anxA5 descrita aquí se puede usar en métodos, equipos, dispositivos y composiciones farmacéuticas, como también se ha descrito aquí. Una forma de realización de la invención se refiere a un método para tratar un sujeto en la necesidad de tratamiento de una enfermedad que incluye la administración de una composición terapéutica de la variante anteriormente descrita que contiene opcionalmente al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La administración y dosificación de una composición terapéutica puede variar entre pacientes y se conocen bien en la ciencia médica. La dosificación preferida dependerá de la enfermedad que está siendo tratada, el compuesto terapéutico o mezcla de compuestos, y el paciente entre otros factores.

Las posibles formas de suministro de los complejos son la administración subcutánea, intramuscular, intraperitoneal e intravenosa.

Los expertos en la técnica conocerán otras formas de suministro.

Los complejos se pueden administrar como un bolo o continuamente por infusión cubriendo un periodo de tiempo más largo.

Las dosis varían de 0,1 µg/kg a 100 mg/kg (la variante de anxA sobre el peso corporal) en procedimientos de diagnóstico y 1 µg/kg a 100 mg/kg en procedimientos terapéuticos.

Los rangos preferidos son 1 µg/kg - 1 mg/kg (diagnóstico) y 5 µg/kg - 50 mg/kg (terapéutico).

[0025] La variante de anxA5 como se ha descrito anteriormente es adecuada para el uso en estimular la fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina en su superficie, en particular células apoptóticas.

Así, la variante de anxA5 se puede usar en el tratamiento de una enfermedad en mamíferos, incluyendo seres humanos, que comprende el aumento de fagocitosis como un efecto deseado de tratamiento.

Tales enfermedades incluyen enfermedades asociadas a la placa aterosclerótica y especialmente la placa aterosclerótica avanzada que lleva un riesgo aumentado de rotura vascular tales como placas indicadas por clasificación AHA tipo II, III, IV, V y IV. El efecto del tratamiento será una ralentización de la progresión de la placa y al mismo tiempo una reducción del riesgo de la rotura,

[0026] El término eferocitosis (de effero = enterrar, llevar a la tumba) fue acuñada por Henson et al. para la eliminación fagocítica de células apoptóticas (Gardai SJ, McPhillips KA, Frasch SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al., Cell 2005; 123: 321-334).

La enfermedad obstructiva pulmonar crónica (COPD) se asocia a eferocitosis defectuosa en modelos humanos y animales (S. Hodge et al., Am. J. Respiratory Cell and Molecular Biology, vol.37, pp 748-755, 2007; Vandivier et al., Chest, June 2006 vol. 129, No. 6, 1673-1682).

Las células apoptóticas pueden sufrir necrosis secundaria y así perpetuar la inflamación.

Las administraciones de dosis bajas del antibiótico macrólido azitromicina a pacientes con COPD se han utilizado para mejorar la capacidad fagocítica de macrófagos alveolares como un nuevo enfoque para complementar las terapias existentes (Hodge et al., American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, Vol. 178, pp 139-148, 2008).

Por lo tanto, la variante de anxA5 será útil en el tratamiento de COPD estimulando la eliminación de células apoptóticas.

[0027] La variante de anxA5 según la invención se puede usar en un método para estimular la fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina en su superficie, comprendiendo este método la administración a un sujeto en la necesidad del mismo, la variante de anxA5 en una composición farmacéuticamente aceptable.

Tal composición se puede administrar a través de infusión intravenosa de una solución o a través de la inhalación de una formulación farmacéutica de suministro de aerosol.

[0028] Las variantes de anxA5 de la invención son particularmente útiles para tratar condiciones en las que la fagocitosis es defectuosa y las respuestas inflamatorias juegan un papel central.

Por lo tanto, la invención se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis, aterosclerosis, enfermedades pulmonares obstructivas crónicas (COPD), incluyendo bronquitis crónica, y emfisema, y enfermedades autoinmunes crónicas tales como lupus eritematoso sistémico (LES), enfermedades inflamatorias del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y enfermedad celíaca, psoriasis, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, miastenia grave, síndrome de Sjögren, etc.

Descripción de las figuras

[0029]

La Figura 1A muestra un histograma del análisis de citometría de flujo de células MCF-7 incubadas con anxA5-FITC; figura 1B muestra el histograma de células MCF-7 incubadas con RGD-anxA5-FITC producido según el Ejemplo 1.

La incubación de células MCF-7 con RGD-anxA5-FITC dio como resultado una unión aumentada de RGD-anxA5-F a células MCF-7.

La Figura 2 muestra que AnxA5 inhibe y RGD-anxA5 estimula la fagocitosis de células Jurkat apoptóticas por células THP-1 diferenciadas.

## Ejemplos

[0030] Se realizan variantes de AnxA5 que llevan una señal inductora de fagocitosis en la cola N-terminal.

Las variantes pueden contener además un residuo de cisteína en la cola N-terminal bien como parte de una extensión de la cola, o dentro de la cola por reemplazo de glutamina en la posición 2.

### Ejemplo 1: Producción de la variante de anexina A5 que tiene un motivo RGD

[0031] El ADNc de anexina humana A5 se preparó a partir de una genoteca de ADNc de glóbulos blancos de un voluntario sano con técnicas estándar conocidas en la técnica. La secuencia de ADNc codificó la secuencia de aminoácidos presentada en la tabla 1.

Los cebadores se diseñaron para mutar la anexina A5 mediante técnicas de PCR de manera que el ADNc resultante codificaba la secuencia de aminoácidos de la tabla 1 con la excepción de la sustitución de T (Thr), codificada por ACN (N = T, C, A o G), en la posición 7 por D (Asp), codificada por GAY (Y = T o C).

La variante se denomina A5 T7D, y su secuencia se representa en la SEC ID nº 2.

[0032] El ADNc de anexina A5-T7D se clonó en un vector de expresión bacteriano con técnicas estándar conocidas en la técnica. E. coli transformada con los vectores de expresión bacterianos resultantes se cultivaron en un fermentador.

La variante de anexina A5-T7D producida por la bacteria fue aislada y purificada a partir de lisatos de E. coli con técnicas de cromatografía estándar conocidas por los expertos en la técnica.

[0033] La variante de anexina A5-T7D purificada apareció como una banda homogénea con un peso molecular

aparente de alrededor de 34kDa en SDS-PAGE y mostró actividad de unión completa de fosfatidilserina dependiente de calcio medida por la técnica de resonancia de superficie de plasmónica usando el sistema BiaCore.

**Ejemplo 2: Efecto de la variante de anexina A5 que tiene un motivo RGD**

5

[0034] Para demostrar que la sustitución T7D da lugar a un motivo funcional de RGD en células anxA5 MCF-7 (figura 1) y células THP-1 se incubaron con anxA5 marcada con fluoresceína o T7D anxA5 marcada con fluoresceína. Las células MCF-7 y células THP-1 expresan  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ .

10

Datos preliminares confirman que la incorporación de RGD (arginina-glicina-ácido aspártico) en la cola N-terminal de anxA5 aumenta la unión a las células que expresan  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$ , lo que indica que RGD se expone para la interacción con el receptor de integrina (véase figura 1).

15

[0035] Además, el efecto de anxA5 o T7D anxA5 en la fagocitosis de células apoptóticas fue estudiado mediante la adición de anxA5 o T7D anxA5 a una mezcla de células THP-1 (fagocitos) y células Jurkat estimuladas con anti-fas (células apoptóticas). AnxA5 inhibe la fagocitosis de células apoptóticas posiblemente por la protección del PS expresado en la superficie apoptótica.

20

Por la introducción de RGD en la cola N-terminal de la inhibición de anxA5 se invierte en la potenciación de fagocitosis (véase figura 2). Por lo tanto la conclusión general de los datos preliminares es que RGD en la cola N-terminal de anxA5 estimula la fagocitosis de células apoptóticas posiblemente a través de la activación de receptores de integrina del fagocito.

[0036] La Figura 2 muestra que AnxA5 inhibe y RGD-anxA5 estimula la fagocitosis de células Jurkat apoptóticas por células THP-1 diferenciadas.

25

**Ejemplo 3: Producción de la variante de anexina A5 que tiene un motivo RGD y un residuo Cys en el N-término**

[0037] El ADNc de anexina humana A5 se mutó de la manera descrita en el ejemplo 1, con la otra sustitución de Q, (Gln) codificado por GAR (R = A o G), en la posición 2 por C (Cys), codificado por TGY (Y = T o C). La variante se designa como A5 Q2C T7D.

30

[0038] La cisteína de esta variante se puede usar para el acoplamiento de diagnósticos de terapias. La variante se puede mutar adicionalmente por sustitución de Cys-315 por p. ej. Ser o Ala.

35

<110> MosaMedix B.V.

<120> Método para mejorar la fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina

5 <130> P6025099PCT

<160> 2

<170> Versión de PatentIn 3.3

10 <210> 1  
<211> 319  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 1

15

20

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu Glu Lys

			180					185					190			
Phe	Ile	Thr	Ile	Phe	Gly	Thr	Arg	Ser	Val	Ser	His	Leu	Arg	Lys	Val	
		195					200					205				
Phe	Asp	Lys	Tyr	Met	Thr	Ile	Ser	Gly	Phe	Gln	Ile	Glu	Glu	Thr	Ile	
	210					215					220					
Asp	Arg	Glu	Thr	Ser	Gly	Asn	Leu	Glu	Gln	Leu	Leu	Leu	Ala	Val	Val	
225					230					235					240	
Lys	Ser	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Ala	Tyr	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Tyr	Tyr	
				245					250					255		
Ala	Met	Lys	Gly	Ala	Gly	Thr	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Ile	Arg	Val	Met	
			260					265					270			
Val	Ser	Arg	Ser	Glu	Ile	Asp	Leu	Phe	Asn	Ile	Arg	Lys	Glu	Phe	Arg	
		275					280					285				
Lys	Asn	Phe	Ala	Thr	Ser	Leu	Tyr	Ser	Met	Ile	Lys	Gly	Asp	Thr	Ser	
	290					295					300					
Gly	Asp	Tyr	Lys	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Cys	Gly	Glu	Asp	Asp		
305					310					315						

5 <210> 2  
 <211> 319  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
 <220>  
 10 <223> T7D mutante de anexina humana 5  
 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Variante de anexina A5, que comprende al menos una (1) y no más de veinte (20) secuencias de RGD en la cadena de anexina.
2. Variante de anexina A5 según la reivindicación 1, que comprende más de una secuencia RGD, siendo separado cada par de secuencias de RGD por 1-3 aminoácidos seleccionados a partir de A, G, I, L, M, P, S, T y V.
- 10 3. Variante de anexina A5 según la reivindicación 1 o 2, donde al menos una secuencia RGD sustituye secuencias de tres aminoácidos dentro de la gama 1-19, 46-64, 86-89, 118-135, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294 de la SEC ID nº 1.
- 15 4. Variante de anexina A5 según la reivindicación 3, donde al menos una secuencia RGD sustituye una secuencia de tres aminoácidos en la gama 1-15, preferiblemente en la gama 1-10 de la SEC ID nº 1.
5. Variante de anexina A5 según la reivindicación 1 o 2, donde al menos una secuencia RGD se localiza en una extensión de secuencia de aminoácidos en el N-término de la molécula de anexina A5.
- 20 6. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones 1-2 y 5, donde al menos una secuencia RGD es parte de una secuencia cíclica que contiene 3-20 aminoácidos.
7. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde al menos un aminoácido seleccionado a partir de D, E, K, R, N, Q en las posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266, y 305-317, se sustituye por un aminoácido seleccionado a partir de G, A, P, S, T y V.
- 25 8. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene adicionalmente un residuo de cisteína en una de las posiciones 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 149-150, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294, donde dicho residuo de cisteína se acopla opcionalmente a una molécula diagnóstica o terapéutica.
- 30 9. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende además de 2 hasta 10 residuos de histidina en su N-término, donde al menos dos de dichos residuos de histidina están adyacentes o separados por no más de otro aminoácido, y opcionalmente están ligados a un radionucleido.
- 35 10. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para usar en la estimulación de fagocitosis de células que exponen fosfatidilserina en su superficie.
11. Variante de anexina A5 según la reivindicación 10, para usar en el tratamiento de una enfermedad en mamíferos, incluyendo seres humanos, que comprende el aumento de fagocitosis como un efecto deseado del tratamiento.
- 40 12. Variante de anexina A5 según la reivindicación 10 o 11, para usar en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria crónica, incluyendo una enfermedad autoinmune crónica.
13. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para usar en el tratamiento de la placa aterosclerótica.
- 45 14. Variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones 10-12, para usar en el tratamiento de COPD, lupus erimatoso sistémico o artritis reumatoide.
- 50 15. Composición útil para administrar agentes terapéuticos a células y/o tejidos que experimentan apoptosis, que comprenden una variante de anexina A5 según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un portador, diluyente y/o excipiente farmacéuticamente aceptable,.

55

Fig 1a

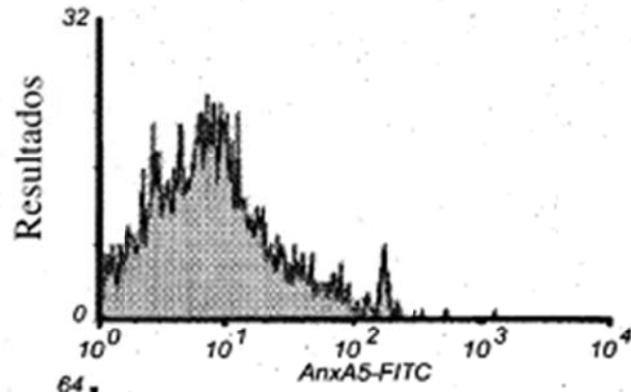


Fig 1b

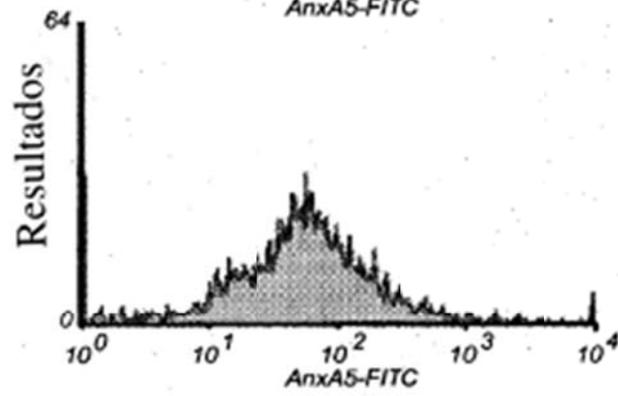


Fig 2

