

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 002**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.12.2006 PCT/NL2006/050315**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.06.2007 WO07069895**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.12.2006 E 06835695 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 1960790**

54 Título: **Derivados de anexina adecuados para la prefocalización en terapia y diagnóstico**

30 Prioridad:

12.12.2005 EP 05111982

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

15.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**REUTELINGSPERGER, CHRISTIAAN PETER
MARIA;
MOONEN, PETER y
VERMAIRE, AD**

74 Agente/Representante:

TOMAS GIL, Tesifonte Enrique

ES 2 617 002 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

Derivados de anexina adecuados para la prefocalización en terapia y diagnóstico

5 [0001] La presente invención se refiere generalmente al campo de las anexinas. Más particularmente, se refiere a composiciones y métodos para tratar y diagnosticar a un sujeto entregando compuestos a un objetivo específico utilizando anexinas nuevas, variantes de anexinas y derivados de las mismas que no forman trímeros y redes bidimensionales.

10 Antecedentes de la invención

15 [0002] Las células están recubiertas por una membrana plasmática ("MP") que consiste en una doble capa de moléculas fosfolípidas y diferentes moléculas proteínicas. Varias moléculas fosfolípidas forman los bloques constructivos de la doble capa. Las moléculas fosfolípidas se distribuyen asimétricamente sobre las dos valvas de la doble capa. La fosfatidilcolina, por ejemplo, está presente en ambas capas, mientras que la esfingomielina puede encontrarse sólo en la valva externa de cara al ambiente. Los aminofosfolípidos, tales como la fosfatidilserina ("PS"), por otro lado, están predominantemente presentes en la valva interna de cara al citosol de la célula (Zwaal and Schroit, Blood 89:1121-32 (1997)). Las aminofosfolípido translocasas transportan PS desde la capa, o valva, exterior hacia la interior de la membrana plasmática para crear una distribución asimétrica de PS. La arquitectura asimétrica de la MP es una característica de las células vivas. Gastan energía para generar y mantener la distribución desigual de las especies de fosfolípidos en sus MP.

25 [0003] Una célula puede cambiar la arquitectura fosfolípida de su MP bajo ciertas circunstancias, que llevan a la activación y la perturbación de la célula. La muerte celular programada ("MCP") está asociada con la aparición de PS en la valva externa de la MP (Fadok *et al.*, J. Immunol. 148:2207-16 (1992)). Basándose en la morfología y la bioquímica, al menos cuatro tipos de MCP se han identificado: (1) apoptosis, (2) MCP tipo apoptosis, (3) MCP tipo necrosis y necrosis. Cada de tipo está acompañado por un cambio en la asimetría de la MP caracterizado por la exposición de PS a la capa externa de la superficie celular. La exposición de PS en la capa externa de la MP es un buen indicio de una variedad de estados activados y perturbados de una célula. La exposición de PS, sin embargo, no está exclusivamente asociada a procesos celulares que culminan en la muerte celular. La exposición de PS transitoria y reversible se ha reportado para diferentes tipos de células, incluyendo células B activadas, células musculares no diferenciadas propensas a formar sincitio, células infectadas de clamidia, células endoteliales de vasculatura tumoral (patente estadounidense 6.312.694), y macrófagos que engullen (Kenis *et al.* J. Biol. Chem. 2004 279: 52623-9). Además, varios procesos celulares y condiciones se ha descubierto que están asociados con una expresión de PS en la valva externa de la MP. Estos incluyen la activación de plaquetas, el envejecimiento de los glóbulos rojos, la estimulación del sistema inmunológico, la formación de sincitio en las células musculares, la formación de vasos sanguíneos nuevos en los tumores (US 6.312.694) y el crecimiento tumoral (Rao *et al.*, Thromb. Res. 67:517-31 (1992)).

40 [0004] Además, las células pueden disipar partes de sí mismas de su superficie, dando como resultado micropartículas encapsuladas de membrana. Estas micropartículas tienen aminofosfolípidos tales como PS expuesta en la capa externa de las membranas. Estas micropartículas se han asociado a enfermedades tales como la infección, el SIDA, la aterosclerosis. Por lo tanto, los amino-fosfolípidos de la superficie celular son indicadores de una variedad de estados activados y perturbados de una célula. Además, micropartículas que muestran aminofosfolípidos expuestos reflejan activación y perturbación celular distante. Por lo tanto, los fosfolípidos de la superficie de una MP constituyen objetivos atractivos para una variedad de fines, incluyendo investigación, diagnóstico, prevención y tratamiento de enfermedades. Preferiblemente, PS de la valva externa de una MP constituye un objetivo para la investigación, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de enfermedades.

50 [0005] Los tratamientos farmacológicos y genéticos de enfermedades se basan en la administración de compuestos farmacológicamente activos a células enfermas donde los compuestos actúan preferiblemente intracelularmente. Los tratamientos terapéuticos actuales emplean la administración sistémica de un medicamento, donde el medicamento circula por todo el cuerpo antes de alcanzar su objetivo deseado. Este método de administración de fármacos produce dilución sistémica del compuesto. Como resultado, son necesarias concentraciones más altas del medicamento para conseguir una eficacia terapéutica. Esto se asocia a efectos secundarios tóxicos no deseados y costes aumentados de los fármacos.

60 [0006] Se aportan soluciones para estos problemas mediante sistemas de entrega de fármacos focalizada. El agente objetivo, que se acopla a los fármacos directa o indirectamente, guía a los fármacos hacia las células enfermas donde se acumulan.

65 [0007] Recientemente hemos descrito anexinas, derivados de las mismas y variantes de anexina-Cys como agentes focalizantes y de introducción en célula y sus usos para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico (WO 2006/003488, publicada el 12 enero de 2006). El objetivo predominante de las anexinas es la fosfatidilserina (PS), que está expuesta por las células que ejecutan la muerte celular programada o están sometidas a estrés tal como el estrés metabólico. Las anexinas, derivados y variantes de anexina-Cys como se describen en la WO 2006/003488 enlazan con la PS expuesta en la superficie celular y se internalizan posteriormente. La internalización produce una disminución de anexinas

enlazadas a la superficie. Este fenómeno desfavorece el uso de anexinas en procedimientos terapéuticos y de diagnóstico que emplean el concepto de la prefocalización.

5 [0008] La prefocalización es una estrategia para dirigir un compuesto indicador para fines de diagnóstico y/o un medicamento para fines terapéuticos al tejido enfermo en un procedimiento multifase para reducir la señal de fondo y la carga tóxica sistémica respectivamente. El concepto de prefocalización emplea dos compuestos A y B que tienen una alta afinidad entre sí. El compuesto A abarca la función de focalización y el compuesto B contiene la función indicadora y/o terapéutica. En primer lugar, el compuesto A con la función de focalización se administra al sujeto. Después de un periodo de tiempo determinado, cuando el compuesto A circulante se elimina suficientemente, el compuesto B con el medicamento indicador y/o terapéutico se da al sujeto. El último compuesto se acumulará en los sitios en los que el compuesto A es retenido debido a su función de focalización. Esta estrategia reduce la cantidad de compuesto B que hay que administrar para obtener el efecto deseado. Además, eludirá las señales de fondo y los efectos secundarios tóxicos no deseados que están relacionados con el compuesto A si el medicamento indicador y/o terapéutico se acoplara directamente al compuesto A.

15 [0009] Ejemplos de combinaciones de compuestos A y B que tienen alta afinidad entre sí y que son adecuados para la prefocalización incluyen la combinación de estreptavidina/avidina y biotina, la combinación de ADN complementario y oligonucleótidos de ARN, ADN complementario y análogos de ARN tales como morfolinos (análogos de oligonucleótido sintéticos que contienen cadenas de morfolino-fosporodiimidato en vez de cadenas de deoxiribosa-fosfodiéster), ácidos nucleicos de péptido (análogos de oligonucleótidos sintéticos que contienen cadenas de N-aminoetil-glicina en vez de cadenas de deoxiribosa-fosfodiéster, PNA) y aptámeros (oligonucleótidos u oligopéptidos específicamente enlazantes), la combinación de anticuerpo y hapteno y la combinación de receptor y ligando. Estas combinaciones se han usado en la administración de radionúclidos para la formación de imágenes y terapia del cáncer mediante la estrategia de prefocalización (Sharkey et al, Clin. Cancer Res. 2005, 11:7109-21).

25 [0010] El requisito previo para la puesta en marcha exitosa de la estrategia de prefocalización es la accesibilidad del compuesto A al compuesto B. La internalización del compuesto A por la célula objetivo reduciría la eficacia de esta estrategia.

30 [0011] La solicitud de patente WO 2006/003488, describe que las anexinas, derivados de las mismas y variantes de anexina-Cys son internalizadas por células que exponen PS en su superficie. El mecanismo de internalización se basa en la formación de anexina-trímeros y la organización de los anexina-trímeros en redes bidimensionales grandes (Kenis et al. J. Biol. Chem. 2004 279: 52623-9). Este mecanismo, así, disminuye el uso eficaz de la anexina, derivados de la misma y variantes de anexina-Cys como partes objetivo del compuesto A en las estrategias de prefocalización.

35 [0012] Mira et al., J. Biol. Chem. 1997, 272: 10474-82, describen mutantes de anexina M1-M4, que afectan la unión de Ca^{2+} y su efecto en la inhibición de fosfolipasa A_2 citosólica.

Resumen de la invención

40 [0013] La invención se refiere a una variante de anexina tal y como se define en las reivindicaciones anexas. Además, la invención se refiere a una composición que comprende tal variante de anexina, para su uso en diagnóstico y terapia, al igual que a un método para detectar células que expresan fosfolípidos y a un kit que comprende la variante de anexina, tal y como se define en las reivindicaciones.

45 [0014] Conforme a una forma de realización de la invención, se proporcionan variantes de anexina que son adecuadas para las estrategias de prefocalización para el diagnóstico y el tratamiento de enfermedades. Estas variantes de anexina enlazan PS con suficiente afinidad y son incapaces de formar trímeros y redes bidimensionales en la superficie celular y, por lo tanto, no inducen su propia internalización.

50 [0015] Otra forma de realización de la invención se refiere a anexinas y variantes de las mismas que se derivatizan con compuestos A de afinidad para estrategias de prefocalización. Tales compuestos de afinidad incluyen biotina, compuestos que contienen uno o más grupos de biotina, estreptavidina, avidina, oligonucleótidos de ADN, oligonucleótidos de ARN, morfolinos, PNA, aptámeros, receptores, compuestos con alta afinidad para receptores e inmunoglobulinas o partes de los mismos. En la presente invención, el compuesto A de afinidad también se denomina compuesto reconocible (A) o compuesto A, con el mismo sentido.

55 [0016] Otra forma más de realización de la invención comprende anexinas, derivados de las mismas y variantes de anexina-Cys según la solicitud de patente WO 2006/003488 que se derivatizan con compuestos de afinidad A vía la conjugación al residuo de cisteína.

60 [0017] Una forma de realización de la invención se refiere al uso de compuestos de afinidad B que se conjugan con compuestos fluorescentes, radionúclidos, agentes de contraste MRI, agentes de contraste CT, citostáticos, y biológicos terapéuticos incluyendo citocinas, factores de complemento, toxinas e inmunoglobulinas en combinación con los derivados y complejos de anexina. Los compuestos de afinidad B tienen una alta afinidad con los compuestos de afinidad A de otras formas de realización de la invención. En la presente invención, el compuesto de afinidad B también

se denomina compuesto (B) que reconoce el compuesto A, o compuesto B de reconocimiento, o compuesto B, con el mismo sentido.

5 [0018] Una forma de realización de la presente invención es un kit que incluye al menos un complejo de derivado de anexina con compuesto A de afinidad anteriormente descrito y, opcionalmente, al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable.

10 [0019] Otra forma de realización de la divulgación se refiere a un método para administrar un compuesto farmacéutico a una célula objetivo que incluye la administración en primer lugar de un complejo de focalización de la composición que es ha descrito anteriormente y en segundo lugar un complejo terapéutico de la composición que se ha descrito anteriormente. Más específicamente, esta forma de realización abarca un método para tratar o prevenir una enfermedad, donde el compuesto farmacéutico es un compuesto terapéutico que es eficaz para tratar o prevenir la enfermedad.

15 [0020] Una forma de realización de la invención se refiere a un método para administrar un compuesto de diagnóstico a una célula objetivo que incluye la administración en primer lugar de un complejo de focalización de la composición que se ha descrito anteriormente y en segundo lugar de un complejo de diagnóstico de la composición que se ha descrito anteriormente. Más específicamente esta forma de realización abarca un método para diagnosticar una enfermedad y para determinar la eficacia de un tratamiento terapéutico, donde el compuesto de diagnóstico es un compuesto de formación de imágenes moleculares que se puede detectar mediante modalidades de formación de imágenes que comprenden formación de imágenes ópticas, formación de imágenes nucleares, MRI, CT y ultrasonido.

20 [0021] Para una mejor comprensión de la presente invención, junto con otros y más objetos de la misma, se hace referencia a la descripción siguiente, tomada conjuntamente con los dibujos anexos, y su alcance se señalará en las reivindicaciones anexas.

Descripción detallada de la invención

30 [0022] La presente invención se basa en parte en la búsqueda dirigida para identificar los aminoácidos que están implicados en las interacciones intermoleculares entre moléculas de anexina. El modelado y ensamblaje molecular de las estructuras de cristal disponibles en la base de datos de proteínas (PDB, 1AVR y ANX) reveló aminoácidos que están implicados en la formación de trímeros. Estos aminoácidos se encuentran en las hélices IA, ID, IIA, IID, IIIC, IIID e IVE y en las extensiones que conectan las hélices IC e ID, IIE e IIIA, IIIC e IIID, IIID e IIIE, e IVA e IVB (para localización de estas hélices en la molécula de anexina A5 véase Huber *et al.* EMBO J. 12:3867-74 (1990)). Las variantes de anexina de una de las formas de realización de la invención tienen uno o más aminoácidos sustituidos en las hélices IA, ID, IIA, IID, IIIC, IIID e IVE y en las extensiones que conectan las hélices IC e ID, IIE e IIIA, IIIC e IIID, IIID e IIIE, e IVA e IVB para debilitar su capacidad para formar trímeros y una red bidimensional en la superficie celular y consecuentemente para debilitar su internalización en la célula. Las variantes de anexina permanecerán más largas en la superficie celular y son, así, adecuadas para estrategias de prefocalización.

40 [0023] Así, la invención se refiere generalmente a una variante de anexina, a) que enlaza con al menos un fosfolípido, en particular con fosfatidilserina (PS), y b) que no es internalizada en una célula. El término "anexina" se refiere a cualquier proteína capaz de enlazar con fosfolípidos, especialmente fosfatidilserina, y miembros de la denominada familia de anexina. La familia cubre muchos miembros; se puede encontrar información sobre los mismos y sobre las secuencias de proteína y de nucleótidos por ejemplo en <http://snoops.bch.ed.ac.uk/annexins/seq/-search.php>. A modo de ejemplo, se hace referencia aquí a la anexina A5, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 1, pero otras anexinas se pueden utilizar igualmente para producir y utilizar las variantes de anexina de la invención. Algunas de las anexinas, tales como A1, A6, A7 y A11 1 tienen extensiones largas en el N-término. Estas partes se cree que son menos relevantes para fines de la invención. A continuación, se hace referencia a la secuencia de aminoácidos y las posiciones de la anexina A5, pero lo que se aplica a A5 también se aplica a las otras anexinas, especialmente las anexinas humanas, eligiendo la posición correspondiente encontrada con el alineamiento de cualquier anexina.

50 [0024] Variantes de anexina específicas según la invención tienen secuencias de aminoácidos según SEC ID N°:1, que se modifican para inhibir la internalización en una célula en que uno o más aminoácidos en las hélices y las extensiones de conexión indicadas anteriormente se reemplazan por aminoácidos diferentes. Estos aminoácidos 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. Donde la variante de anexina contiene una o más de estas modificaciones, la característica de la anexina que no es internalizada en una célula se considera como cumplida. Así, la invención también comprende una variante de anexina que a) se enlaza a al menos un fosfolípido y b) contiene una o más de las modificaciones de aminoácidos tal y como se han descrito en este caso.

60 [0025] Modificaciones preferidas son las sustituciones, especialmente sustituciones de aminoácidos polares por aminoácidos no polares. Así, los aminoácidos preferidos para sustitución incluyen arginina (R), lisina (K), aspartato (D), glutamato (E), asparagina (N) y glutamina (Q). Se pueden sustituir por ejemplo por alanina (A) o glicina (G), o por un aminoácido no polar que está situado en la posición correspondiente de otra anexina. Ejemplos adecuados de aminoácidos sustituidos incluyen E21, K25 (por ejemplo por G, T), R62 (por ejemplo G, A), D63 (por ejemplo G, A,

P), K69, D91, K96, H97, K100, E137 (por ejemplo A, G, V), D138, D139, N159 (por ejemplo A, G, S), R160, R206, K207, Q219, D225, R226, D264, K308, K309. Las modificaciones M1-M4, en las posiciones E71, D143, E227 y D302, son menos preferidas según la invención.

5 [0026] 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.

10 [0027] Las variantes de anexina según la invención pueden comprender además una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos, donde las sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no afectan sustancialmente a la capacidad de la variante de anexina para enlazar con al menos un fosfolípido, y para enlazar con al menos un compuesto A reconocible, y donde las sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos no afectan sustancialmente a la internalización inhibida del compuesto A reconocible en una célula.

15 [0028] La sustitución debe ser de manera que la anexina aún se enlace suficientemente con el fosfolípido. Unión suficiente se refiere a una disociación constante de aproximadamente 10^6 M o menos en presencia de iones de Ca^{2+} .

20 [0029] La invención se refiere además a moléculas de anexina o variantes tal y como se han definido anteriormente a las que un compuesto A reconocible está ligado, donde la variante de anexina no es internalizada por la célula objetivo. El compuesto A reconocible puede por ejemplo ser una biotina o un complejo de biotinas múltiples. Otros ejemplos adecuados incluyen avidina o estreptavidina, un oligonucleótido o un análogo de oligonucleótido resistente a la nucleasa en forma de un compuesto de morfolino o un PNA o un aptámero.

25 [0030] En otra forma de realización, el compuesto A reconocible es un receptor o una parte del mismo, o un ligando receptor o una parte del mismo. Otros ejemplos de compuestos A reconocibles incluyen un anticuerpo o un fragmento del mismo, por ejemplo un nanocuerpo - un anticuerpo truncado de origen tipo camello-, o un antígeno.

30 [0031] El compuesto reconocible se puede unir a la anexina por métodos conocidos de por sí. Un método consiste en la unión de manera covalente del compuesto reconocible a aminoácidos específicos, posiblemente en forma derivatizada. Especialmente adecuada es la unión a un residuo de cisteína de la anexina, por ejemplo en el caso de biotina, que se puede derivatizar con un grupo de maleimida. Para no interferir con las propiedades funcionales de la anexina, el aminoácido al que el compuesto reconocible está acoplado se localiza en los lados cóncavos de la molécula de anexina. Éstos están representados por símbolos de aminoácidos en cursiva en la SEC ID N.º: 1. Además, estas posiciones pueden o no estar situadas en las regiones seleccionadas anteriormente para evitar la trimerización y la internalización de la anexina. Así los sitios preferidos son las extensiones 1-15, 46-58, 86-87, 118-134, (170), 245-248 y 280-294 de la anexina A5 y las extensiones correspondientes en otras anexinas, pero las posiciones

35 [0032] (16-19, 24, 28, 59-64, 88-89, 135, 157-169, 203-219) también se pueden usar para introducir los residuos de cisteína.

40 [0033] Además se prefiere que cualquier residuo de cisteína naturalmente presente fuera de estas extensiones, especialmente los que están presentes en las partes donde los aminoácidos son sustituidos según la invención para fines de evitar la trimerización, sean sustituidos por otros aminoácidos. Tales otros aminoácidos pueden ser un aminoácido pequeño neutro tal como G, A o S, o un aminoácido que está presente en la misma posición de otra anexina. Por ejemplo, C107 de anexina A4 se puede sustituir idóneamente por V o A, C201 de anexina A3 (y los equivalentes en muchas otras anexinas) se pueden sustituir por G o A, y C315 en la anexina A5 (y los equivalentes en muchas otras anexinas) se pueden sustituir por V, A o S. El C292 de anexina A8 no necesita ser sustituido ya que está en una posición adecuada para la derivatización. Las sustituciones de aminoácidos se pueden realizar por técnicas recombinantes bien conocidas en la técnica e ilustradas en los ejemplos más adelante.

50 [0034] Así la invención se refiere a una variante de anexina, que contiene un residuo de cisteína en una de las posiciones de aminoácidos 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 149-150, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294, y no contiene un residuo de cisteína fuera de estas posiciones, y que además contiene la sustitución de uno o más aminoácidos Lys, Arg, Gln, Asn, Glu, Asp o His en las posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266 y 305-317 por Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Ser, Thr, Met, Pro, Phe o Tyr, preferiblemente Gly, Ala, Val o Ser; aquí se aplican las posiciones de aminoácidos correspondientes en otras anexinas. Las anexinas pueden ser las proteínas como tales, o los conjugados con espaciadores y/o compuestos reconocibles. El(los) residuo(s) de cisteína se puede(n) sustituir, por ejemplo por un grupo reconocible (A).

60 [0035] Los complejos de la variante de anexina y el compuesto A reconocible se pueden usar en un método terapéutico o de diagnóstico para focalizar un medicamento o un agente de diagnóstico a un sitio específico, en particular a células que exponen PS. En tal método, una composición que contiene el complejo de la variante de anexina y el compuesto A reconocible se administra primero a un sujeto para el que tal método terapéutico o de diagnóstico está destinado, seguido de la administración al sujeto de una composición que comprende al menos un complejo que comprende un compuesto B que reconoce y se enlaza con el compuesto A y un compuesto de diagnóstico o terapéutico. El compuesto B es especialmente un homólogo específico del compuesto A, por ejemplo estreptavidina o avidina, en el caso de que el compuesto A sea biotina. Asimismo, el compuesto B puede ser biotina o un complejo de múltiples biotinas,

especialmente si el compuesto A es estreptavidina o avidina. El compuesto B también puede ser un oligonucleótido, un morfolino, un PNA o un aptámero que tiene alta afinidad para el homólogo de oligonucleótido, morfolino, PNA u aptámero unido a la molécula de anexina como se ha descrito anteriormente. También puede ser un receptor o una parte del mismo, donde el compuesto A es el ligando del receptor, o viceversa. También el compuesto puede ser un antígeno para un anticuerpo como compuesto A o fragmento del mismo o viceversa.

[0036] El agente de diagnóstico que se puede usar en el método de diagnóstico de la invención, se puede seleccionar de un grupo fluorescente, un radionucleido, un agente de contraste MRI, un agente de contraste CT, un agente de ultrasonido y una combinación de los mismos. Ejemplos adecuados de grupos fluorescentes son fluoresceínas, Alexas, Ficoeritrinas, Compuestos Cy, Nanocristales y una combinación de los mismos. Ejemplos adecuados de radionúclidos incluyen Carboy-11, Fluorina-18, Indio-111, Yodo-123, Yodo-131, Nitrógeno-13, Oxígeno-15, Tecnecio-99m, Zirconio-89, Ga-67, Ga-68, Cu-64 y una combinación de los mismos, que se incorporan en moléculas adecuadas unidas al compuesto B o en el propio compuesto B. Un agente de contraste MRI se puede seleccionar de gadolinio, partículas magnéticas y partículas paramagnéticas.

[0037] Compuestos terapéuticos que se pueden usar en el método terapéutico de la invención pueden ser, por ejemplo, una toxina, una enzima, inhibidores enzimáticos, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de los mismos, un inmunoconjugado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionucleido, un agente de inducción de muerte celular, un agente de inhibición de muerte celular, un compuesto fibrinolítico y una combinación de los mismos. La toxina se puede seleccionar de Dt, PE, P38, P40, ricina, abrina, toxina diftérica, toxina del cólera, gelonina, pseudomonas, exotoxina, toxina Shigella, proteína antivírica de hierba carmín y una combinación de los mismos. Ejemplos de enzimas que se pueden acoplar al compuesto B incluyen peroxidases, alcalasas, caspasas y una combinación de las mismas. Los lípidos se pueden seleccionar por ejemplo de fosfolípidos, ácidos grasos, terpenos, esteroides y una combinación de los mismos. El lípido se puede introducir en la membrana de un liposoma.

[0038] Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen BiCNU, bleomicina, busulfano, CCNU, carboplatina, carmustina, cisplatina, cisplatino, clorambucil, 2-colrodeoxiadenosina, cladirabina, citarabina, ciclofosfamida, dacarbazina, daunorubicina, docetaxel, doxorubicina, DTIC, etoposida, 5-flourouracil, fludarabina, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, melfalán, metotrexato, mitramicina, mitomicina, mitoxantrona, mostaza de nitrógeno, oxaliplatino, paclitaxel, plicamicina, procarbazona, raltritexed, semustina, tomudex, topotecan, vinblastina, vincristina, vinorelbina y combinaciones de los mismos.

[0039] Ejemplos de fotosintetizadores incluyen ftalocianinas, rodoporfirinas, rododolorina, mesorododolorinas, filloeritrina y sus derivados, porfirina y sus derivados, compuestos metalopirólicicos y combinaciones de los mismos.

[0040] Agentes de inducción de muerte celular que pueden ventajosamente usarse en el método de la invención se pueden seleccionar del grupo de inductores de apoptosis, inhibidores de quinasa, activadores de permeabilidad mitocondrial, activadores de transición, polinucleótidos que codifican para una proteína de inducción de muerte celular, activadores de transporte de iones a través de la membrana, polinucleótidos que son un antisentido para polinucleótidos que codifican para proteínas de inducción de muerte celular, polinucleótidos que interactúan con e inhiben proteínas de inhibición de muerte de célula y una combinación de los mismos.

[0041] Ejemplos de radionúclidos terapéuticos incluyen ^{32}P , ^{89}Sr , ^{90}Y , ^{103}Pd , ^{125}I , ^{131}I , ^{137}Cs , ^{153}Sm , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{192}Ir , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{86}Y , ^{105}Rh , ^{111}In , $^{114\text{m}}\text{In}$, ^{124}I , ^{149}Pm , ^{166}Ho , ^{169}Yb , ^{177}Lu , ^{211}At , ^{213}Bi , ^{225}Ac .

[0042] Los compuestos terapéuticos y de diagnóstico pueden estar unidos al compuesto B por métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, cuando el compuesto terapéutico o de diagnóstico es una proteína, se puede acoplar a través de un residuo de lisina o de arginina, opcionalmente después de la activación utilizando bromuro de cianógeno u otros métodos químicos o físicos. Si el compuesto es un lípido, tal como fosfatidiletanolamina, se puede acoplar al grupo amino utilizando métodos conocidos en la técnica. Si el compuesto es un polinucleótido se puede acoplar por ejemplo a grupos hidroxilo de los mismos utilizando métodos conocidos en la técnica. Si el compuesto es un radionúclido, se puede acoplar bien directa o indirectamente por acoplamiento de un quelador al compuesto B que quela el radionúclido de elección.

[0043] El complejo también puede usarse para la detección de la presencia o ausencia de células o partículas celulares que expresan fosfolípidos que comprenden:

- administración a un sujeto una composición que comprende al menos un complejo que comprende un compuesto A reconocible y una anexina o una variante de anexina, y;
- administración a un sujeto una composición que comprende al menos un complejo que comprende un compuesto B que reconoce el compuesto A y un agente de diagnóstico, y;
- someter a un sujeto a un paso de detección tal como formación de imágenes ópticas, formación de imágenes SPECT, formación de imágenes PET, formación de imágenes MRI, formación de imágenes CT y formación de imágenes de ultrasonido.

5 [0044] La invención también se refiere a un equipo de diagnóstico adecuado para la realización del método de diagnóstico como se ha descrito anteriormente, que comprende al menos un complejo de una variante de anexina y un compuesto A de afinidad, y opcionalmente un complejo de un compuesto (indicador) detectable y un compuesto de afinidad B, y opcionalmente diluyentes y además componentes necesarios para llevar a cabo un método de diagnóstico. Preferiblemente, el complejo de la variante de anexina y el complejo del compuesto detectable se preparan separadamente.

10 [0045] La invención también se refiere a un equipo farmacéutico adecuado para la realización del método terapéutico como se ha descrito anteriormente, que comprende al menos un complejo de una variante de anexina y un compuesto A de afinidad combinado con un excipiente farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente un complejo de un compuesto terapéutico y un compuesto de afinidad B, y opcionalmente diluyentes y otros componentes necesarios para llevar a cabo un método terapéutico. Preferiblemente, el complejo de la variante de anexina y el complejo del compuesto terapéutico se preparan separadamente.

15 [0046] La presente invención proporciona composiciones para el tratamiento, diagnóstico, prevención e investigación de enfermedades, tales como enfermedades neoplásicas, enfermedades neurodegenerativas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades autoinmunes y enfermedades inflamatorias. Los métodos incluyen la administración a sujetos de complejos de focalización que comprenden anexinas y variantes de anexina y complejos de diagnóstico y terapéuticos que comprenden agentes de formación de imágenes moleculares y compuestos farmacéuticos respectivamente.

20 [0047] La presente invención se refiere a la capacidad de las anexinas para enlazar a células de expresión de PS. La presente invención se refiere al uso de anexinas en la prefocalización de métodos para diagnosticar y tratar enfermedades. Se sabe que las anexinas son absorbidas por el hígado, bazo y riñones y por el sistema retículo-endotelial de la médula ósea. La inyección de anexinas conjugadas a compuestos de diagnóstico y compuestos terapéuticos dará lugar a altas señales de fondo y efectos secundarios tóxicos no deseados respectivamente. Por lo tanto, la presente invención proporciona métodos donde las anexinas no serán conjugadas a compuestos de diagnóstico tales como grupos fluorescentes, radionúclidos, agentes de contraste MRI, agentes de contraste CT y agentes de ultrasonido ni a compuestos terapéuticos tales como una toxina, una enzima, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de la misma, un inmunoconjugado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionúclido, un agente de inducción de muerte celular, un agente de inhibición de muerte celular, un compuesto fibrinolítico antes de su administración en el sujeto. En su lugar, la presente invención proporciona métodos donde las anexinas se pueden acoplar a compuestos A reconocibles, que son seleccionados del conjunto que comprende pero no está restringido a biotina, biotinas múltiples, estreptavidina, avidina, ADN, ARN, morfolinós, PNAs, aptámeros, receptores y ligandos y anticuerpos de receptores. La presente invención proporciona métodos para entregar un diagnóstico o un compuesto terapéutico a una célula objetivo entregando un complejo de una anexina y un compuesto A reconocible a la célula objetivo y entregando posteriormente un complejo de un compuesto B que reconoce el compuesto A y un compuesto de diagnóstico o un compuesto terapéutico a la célula objetivo. Las anexinas conjugadas serán administradas al sujeto. Después de un periodo de tiempo, por ejemplo entre 1 h y 24 h, el complejo de diagnóstico o el terapéutico con el compuesto B, que tiene una alta afinidad con el compuesto A, será inyectado en el mismo sujeto. El compuesto B se acumulará en sitios donde las anexinas conjugadas con el compuesto A están enlazadas a las superficies celulares.

45 [0048] Las anexinas constituyen una familia multigénica de proteínas que comparten características estructurales y funcionales. El polipéptido de anexina está organizado en dominios que forman el denominado pliegue de anexina en el espacio (Gerke and Moss, *Physiol. Rev.* 82:331-71 (2002)). Los dominios contienen sitios de unión al calcio a través de los cuales una interacción con las membranas de fosfolípidos se puede producir. Una vez unidas a una superficie de fosfolípidos las anexinas pueden formar una red bidimensional a través de interacciones de proteína-proteína (Oling *et al.*, *J. Mol. Biol.* 304: 561-73 (2001)). Los significados fisiológicos de las anexinas son poco conocidos pero se piensa que están relacionados con su actividad de unión a los fosfolípidos. Las anexinas no tienen una secuencia señal y se cree por lo tanto que desempeñan un papel en la célula. La localización extracelular de las anexinas se ha descrito pero se desconoce si ha sucedido por un proceso selectivo o por un evento específico tal como la lisis celular. Según la WO 2006/003488, las anexinas y las variantes de anexina-Cys inducirán su propia internalización después de la unión a PS expresada en la superficie celular. El fenómeno de internalización reduce la eficacia de la estrategia de prefocalización. La presente invención se refiere a las anexinas que no son internalizadas por las células objetivo. Para encontrar variantes de anexina que sean menos internalizadas el mecanismo de internalización fue inspeccionado en una de sus relaciones de estructura-función. La internalización se induce por la formación de trímeros de anexina que forman una red bidimensional en la doble capa fosfolípida (Kenis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 279:52623-9 (2004)). Los trímeros de anexina surgen de interacciones no covalentes entre moléculas de anexina.

60 **Ejemplo 1: producción de variantes de anexina A5-2D que tienen uno o más aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137,138 y 159 sustituidos por alanina y glicina.**

65 [0049] El ADNc de anexina humana A5 fue obtenido 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 SEC ID N.º: 1. Los cebadores fueron diseñados para mutar anexina A5 por técnicas de

PCR de manera que el ADNc resultante codificaba la secuencia de aminoácidos de SEC ID N.º: 1 con la excepción de las siguientes sustituciones, que fueron realizadas singularmente, pero también en combinaciones de los mismos en el ADNc: R62A, K69A, K100A, E137A, D138G y N159A. La anotación emplea el código de una sola letra para aminoácidos y la posición numérica en la secuencia de aminoácidos donde la sustitución ocurre con la izquierda al número que presenta el aminoácido original y derecha al número que presenta el sustituto. El ADNc de anexina A5-2D fue clonado en un vector de expresión bacteriano con técnicas estándar conocidas en la técnica. *E. coli* transformado con los vectores de expresión bacterianos resultantes se dejó crecer en un fermentador. Las variantes de anexina A5-2D que fueron producidas por las bacterias fueron aisladas y purificadas de los lisatos de *E. coli* con técnicas de cromatografía estándar conocidas por personas expertas en la técnica.

[0050] La variante de anexina A5-2D purificada apareció como una banda homogénea de alrededor de 34kDa en el SDS-PAGE y mostró actividad de unión de fosfatidilserina calcio-dependiente completa según se midió por la técnica de resonancia de superficie de plasmón utilizando BiaCore.

Ejemplo 2: producción de variantes de anexina A5-2D que tienen uno o más aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137,138 y 159 sustituidos por alanina y glicina y que tienen glutamina en la posición 2 sustituida por cisteína.

[0051] El ADNc de anexina A5-2D fue preparado como se describe en el ejemplo 1 de la presente invención. Cebadores fueron diseñados para mutar ADNc de anexina A5-2D por técnicas de PCR de manera que el ADNc resultante codificaba la secuencia de aminoácidos de una variante de anexina A5-2D con la excepción de que la glutamina de aminoácido en la posición 2 fue sustituida por la cisteína de aminoácido.

[0052] La variante de anexina purificada A5-2D-Cys2 apareció como una banda homogénea de alrededor de 34kDa en el SDS-PAGE y mostró actividad de unión a fosfatidilserina calcio-dependiente completa según se midió por técnica de resonancia de superficie de plasmón utilizando BiaCore.

Ejemplo 3: producción de variantes de anexina A5-2D que tienen uno o más aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137,138 y 159 sustituidos por alanina y glicina y que tienen glicina en la posición 165 sustituida por cisteína.

[0053] El ADNc de anexina A5-2D fue preparado como se describe en el ejemplo 1 de la presente invención. Cebadores fueron diseñados para mutar ADNc de anexina A5-2D por técnicas de PCR de manera que el ADNc resultante codificaba la secuencia de aminoácidos de una variante de anexina A5-2D con la excepción de que la glicina de aminoácido en la posición 165 fue sustituida por la cisteína de aminoácido.

[0054] La variante de anexina A5-2D-Cys165 purificada apareció como una banda homogénea de alrededor de 34kDa en el SDS-PAGE y mostró actividad de unión a fosfatidilserina calcio-dependiente completa según se midió por técnica de resonancia de superficie de plasmón utilizando BiaCore.

Ejemplo 4: unión de variantes de anexina A5-2D que tienen uno o más aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137,138 y 159 sustituidos por alanina y glicina para las bicapas de fosfolípidos.

[0055] Este ejemplo demuestra que la variante de anexina A5-2D tiene una capacidad calcio-dependiente para enlazar con PS de las bicapas de fosfolípidos como la anexina A5 pero carece de la capacidad para formar una red bidimensional en la superficie de fosfolípidos y no se internaliza en una célula.

[0056] La unión de anexina A5-2D a una bicapa de fosfolípidos que contiene PS fue estudiada por elipsometría (Andree *et al.*, J. Biol. Chem. 265:4923-4928 (1990)). En ausencia de calcio la variante de anexina A5-2D no enlazó con la superficie de fosfolípidos mediante el aumento de la concentración de calcio, se observó un aumento en la unión similar a la isoterma de unión calcio-dependiente de anexina A5.

[0057] Anexina A5-2D ligada a una superficie de fosfolípidos fue analizada por microscopía electrónica (Mosser *et al.*, J. Mol. Biol. 271:241-5 (1991)). A diferencia de la anexina A5, la variante de anexina A5-2D no formaba una red bidimensional ordenada.

[0058] Las células Jurkat se co-incubaron con anexina fluorescente A5-2D o anexina fluorescente A5, y el estímulo apoptótico. Las células fueron analizadas para la localización de la anexina fluorescente A5-2D o la anexina fluorescente A5 por microscopía láser de escaneado confocal (Kenis *et al.*, J. Biol. Chem. 279:52623-9 (2004)). La anexina A5 fue internalizada. La anexina A5-2D no fue internalizada pero permaneció unida a la membrana plasmática.

Ejemplo 5: el acoplamiento de biotina activada por maleimida a la variante de anexina A5-2D que tiene aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137, 138 y 159 sustituidos por alanina y glicina y que tiene glutamina en la posición 2 y cisteína en la posición 315 sustituidas por cisteína y serina respectivamente.

[0059] La variante de anexina A5-2D fue preparada como se describe en el ejemplo 2. La cisteína fue retirada en la posición 315 e incorporada en la posición 2 con el objetivo de poder acoplar compuestos fácilmente a la variante de anexina A5-2D mediante química tior sin que afecte a la actividad de unión a PS de la variante de anexina A5-2D.

5 [0060] Se disolvió biotina EZ-Link PEO-maleimida activada (Pierce) en 25 mM HEPES/-NaOH, pH 7,0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA a una concentración de 10 mM. 3,4 mg/ml variante de anexina A5-2D fue dializada en 25 mM de HEPES/NaOH, pH 7,0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA. 200 μ l de solución de biotina se añadió a 1 ml de variante de anexina A5-2D. La mezcla fue incubada durante 120 minutos a 37°C y luego dializada en 25 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA.

10

[0061] El conjugado resultante fue ensayado en su actividad de unión a PS por elipsometría y evaluado para la accesibilidad del grupo de biotina usando avidina (Pierce). La anexina biotinilada A5-2D no mostró ninguna unión a PS deteriorada, mientras que la avidina se unió fácilmente a la anexina biotinilada A5-2D en la superficie de fosfolípidos.

15

Ejemplo 6: el acoplamiento de avidina activada con maleimida a la variante de anexina A5-2D que tiene los aminoácidos en las posiciones 62, 69, 100, 137, 138 y 159 sustituidos por alanina y glicina y que tienen glutamina en la posición 2 y cisteína en la posición 315 sustituidos por cisteína y serina respectivamente.

20

[0062] La variante de anexina A5-2D fue preparada como se describe en el ejemplo 2. La cisteína fue retirada en la posición 315 e incorporada en la posición 2 con el objetivo de poder acoplar compuestos fácilmente a la variante de anexina A5-2D mediante química de tior sin afectar a la actividad de unión a PS de la variante de anexina A5-2D.

25

[0063] Avidina Immunopure (Pierce) fue disuelta en 25 mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl a una concentración de 8 mg/ml. 1 Mg de Sulfo-SMCC (Pierce) se añadió a la solución de avidina y la mezcla fue incubada durante 60 minutos a temperatura ambiente. El exceso de agente de reticulación fue retirado por filtración en gel en una columna PD10 (GE-Amersham/- Pharmacia). La avidina activada con maleimida se añadió a 1 mg/ml de variante de anexina A5-2D que fue dializada en 25 mM HEPES/NaOH, pH 7,0, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA. La mezcla fue incubada durante 120 minutos a 37°C.

30

[0064] El conjugado entre avidina y la variante de anexina A5-2D fue evaluado en su capacidad para enlazar con PS por elipsometría. El conjugado no mostró ningún deterioro de las propiedades de unión de PS.

Ejemplo 7: un procedimiento para visualizar un tumor *in vivo* usando variante de anexina A5-2D y prefocalización.

35

[0065] Las variantes de anexina A5-2D que tienen una cisteína en la posición 2 o 165 fueron diseñadas y producidas como se presentan en los ejemplos 2 y 3, respectivamente. Las variantes de Cys-anexina A5-2D fueron biotiniladas utilizando maleimida-biotina como se describe en el ejemplo 5. La anexina biotinilada A5-2D fue inyectada por vía intravenosa en un ratón que tenía un tumor. Los niveles de anexina biotinilada A5-2D circulante disminuyeron bien por aclaramiento espontáneo de tiempo transcurrido o por aclaramiento forzado con por ejemplo avidina administrada por vía intravenosa. Estreptavidina conjugada con una sonda de formación de imágenes moleculares tal como por ejemplo un compuesto fluorescente o un radionúclido fue inyectada por vía intravenosa. El ratón fue luego sometido a formación de imágenes utilizando un generador de imágenes óptico de cuerpo entero si se usó estreptavidina conjugada con una sonda fluorescente o utilizando un generador de imágenes SPECT, PET, SPECT/CT o PET/CT si se usó estreptavidina conjugada con un radionúclido.

40

[0066] Este procedimiento de visualización se puede aplicar para la localización y la cuantificación de tumores y metástasis y para determinar la eficacia de una terapia antitumoral.

50

Ejemplo 8: un procedimiento para visualizar placas ateroscleróticas inestables *in vivo* utilizando la variante de anexina A5-2D y prefocalización.

55

[0067] Se diseñaron y produjeron variantes de anexina A5-2D que tienen una cisteína en la posición 2 o 165 como se presentan en los ejemplos 2 y 3, respectivamente. Las variantes de Cys-anexina A5-2D fueron biotiniladas utilizando maleimida-biotina como se describe en el ejemplo 5. La anexina biotinilada A5-2D fue inyectada por vía intravenosa en un ratón con lesiones ateroscleróticas. Los niveles de anexina A5-2D biotinilada circulante disminuyeron bien por aclaramiento espontáneo de tiempo transcurrido o por aclaramiento forzado con por ejemplo avidina administrada por vía intravenosa. Estreptavidina conjugada con una sonda de formación de imágenes moleculares tal como por ejemplo un compuesto fluorescente o un radionúclido fue inyectada por vía intravenosa. El ratón fue luego sometido a formación de imágenes utilizando un generador de imágenes óptico de cuerpo entero si se usó estreptavidina conjugada con una sonda fluorescente o utilizando un generador de imágenes SPECT, PET, SPECT/CT o PET/CT si se usó estreptavidina conjugada con un radionúclido.

60

[0068] Este procedimiento de visualización se puede aplicar para localizar placas ateroscleróticas inestables y distinguir placas ateroscleróticas inestables de placas ateroscleróticas estables. El procedimiento de visualización se puede aplicar para determinar la eficacia de los fármacos que estabilizan las placas ateroscleróticas inestables.

65

Ejemplo 9: un procedimiento para tratar un tumor *in vivo* utilizando la variante de anexina A5-2D y prefocalización.

5 [0069] Las variantes de anexina A5-2D que tienen una cisteína en la posición 2 o 165 se diseñaron y produjeron como se presentan en los ejemplos 2 y 3, respectivamente. Las variantes de Cys-anexina A5-2D fueron biotiniladas utilizando maleimida-biotina como se describe en el ejemplo 5. La anexina biotinilada A5-2D fue inyectada por vía intravenosa en un ratón con un tumor. Los niveles de anexina biotinilada A5-2D circulante disminuyeron bien por aclaramiento espontáneo de tiempo transcurrido o por aclaramiento forzado con por ejemplo avidina administrada por vía intravenosa.
10 La estreptavidina conjugada con un compuesto anti-cáncer tal como por ejemplo doxorubicina y cisplatina, o conjugada con un portador de compuestos anti-cáncer tales como por ejemplo liposomas que encapsulan por ejemplo doxorubicina y cisplatina se inyectó por vía intravenosa.

15 [0070] Este procedimiento terapéutico de prefocalización se puede aplicar para entregar localmente los fármacos anti-cáncer en el tumor.

Ejemplo 10: un procedimiento para tratar placas ateroscleróticas inestables *in vivo* utilizando la variante de anexina A5-2D y prefocalización.

20 [0071] Se diseñaron y produjeron variantes de anexina A5-2D que tienen una cisteína en la posición 2 o 165 como se presentan en los ejemplos 2 y 3, respectivamente. Las variantes de Cys-anexina A5-2D fueron biotiniladas utilizando maleimida-biotina como se describe en el ejemplo 5. Anexina biotinilada A5-2D fue inyectada por vía intravenosa en un ratón con lesiones ateroscleróticas. Los niveles de anexina A5-2D biotinilada circulante disminuyeron bien por aclaramiento espontáneo de tiempo transcurrido o por aclaramiento forzado con por ejemplo avidina administrada por vía intravenosa. Estreptavidina conjugada con compuesto estabilizante de placa aterosclerótica tal como por ejemplo
25 estatinas y compuestos anti-inflamatorios, o conjugada con un portador de compuestos estabilizantes de placa aterosclerótica tal como por ejemplo liposomas que encapsulan por ejemplo estatinas y compuestos anti-inflamatorios se inyectó por vía intravenosa.

30 [0072] Este procedimiento terapéutico de prefocalización se puede aplicar para entregar compuestos estabilizantes de placa aterosclerótica localmente en las placas ateroscleróticas.

Listado de secuencias

[0073]

<110> Nexins Research B.V.

5 <120> Derivados de anexina adecuados para la prefocalización en terapia y diagnóstico

<130> P6006243EP

10 <140> EP05111982.4

<141> 2005-12-12

<160> 1

15 <170> Versión de PatentIn 3.3

<210> 1

<211> 319

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

ES 2 617 002 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 617 002 T3

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

1. Variante de anexina:

- 5 a) que enlaza con al menos un fosfolípido;
 b) que no es internalizada en una célula, donde uno o más aminoácidos seleccionados de los aminoácidos polares Glu, Gln, Asp, Asn, Arg y Lys de las hélices IA, ID, IIA, IID, IIIC, IIID e IVE y de las extensiones que conectan las hélices IC e ID, IIE e IIIA, IIIC e IIID, IIID e IIIE, e IVA e IVB se sustituyen por aminoácidos no polares;
 10 c) que enlaza con un compuesto reconocible.

2. Variante de anexina según la reivindicación 1, donde la anexina comprende SEC ID N.º: 1 para anexina A5 o las secuencias correspondientes para otras anexinas, donde dicho uno o más aminoácidos polares son sustituidos por aminoácidos no polares.

15 3. Variante de anexina según la reivindicación 2, donde uno o más aminoácidos están localizados en las posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266 y 305-317, o las secuencias correspondientes para otras anexinas.

20 4. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde al menos dos de dichos aminoácidos polares son sustituidos por un aminoácido no polar.

5. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde el compuesto reconocible se selecciona de una o más biotinas, avidina o estreptavidina, oligonucleótidos o morfolinós, aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos, receptores o partes de los mismos, ligandos de receptores o partes de los mismos, anticuerpos o fragmentos de los mismos y antígenos.

6. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, donde la anexina está enlazada a través de un residuo de cisteína en una de las posiciones de los aminoácidos 1-15, 46-58, 86-87, 118-134, 162-167, 245-248 y 280-294 de anexina A5, y la anexina no tiene un residuo de cisteína en las posiciones 20-23, 25-27, 29-45, 65-85, 90-117, 136-148, 151-156, 171-202, 220-244, 249-279 y 295-319 de anexina A5.

7. Variante de anexina que enlaza con al menos un fosfolípido donde la anexina comprende SEC ID N.º: 1 para anexina A5 o las secuencias correspondientes para otras anexinas, donde uno o más aminoácidos seleccionados de Glu, Gln, Asp, Asn, Arg, Lys y His en las posiciones 16-29, 59-74, 88-102, 135-145, 156-169, 202-231, 259-266 y 305-317, o las secuencias correspondientes para otras anexinas, son sustituidos por Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Ser, Thr, Met, Pro, Phe o Tyr, y donde uno de los aminoácidos en las posiciones 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 149-150, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294 ha sido sustituido por un residuo de cisteína, que es sustituido opcionalmente, y donde ningún residuo de cisteína está presente fuera de dichas posiciones 1-19, 24, 28, 46-64, 86-89, 118-135, 149-150, 157-170, 203-219, 245-248 y 280-294.

8. Composición que comprende al menos una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método para entregar un compuesto de diagnóstico a una célula objetivo de un sujeto, dicho método comprende:

- 45 a) administración al sujeto de dicha composición que comprende al menos una variante de anexina,
 y
 b) administración al sujeto de una composición que comprende al menos un complejo de un compuesto (B) que reconoce y enlaza con el compuesto reconocible (A) enlazado a la variante de anexina y un compuesto de diagnóstico.

50 9. Composición según la reivindicación 8, donde el agente de diagnóstico se selecciona del grupo que consiste en un grupo fluorescente, un radionúclido, un agente de contraste MRI, un agente de contraste CT, un agente de ultrasonido, y una combinación de los mismos.

55 10. Composición que comprende al menos una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un método para entregar un compuesto farmacéutico a una célula objetivo de un sujeto, dicho método comprende:

- 60 a) administración al sujeto de dicha composición que comprende al menos una variante de anexina,
 y
 b) administración al sujeto de una composición que comprende al menos un complejo de un compuesto (B) que reconoce y enlaza con el compuesto reconocible (A) enlazado con la variante de anexina y un compuesto farmacéutico.

65 11. La composición según la reivindicación 10, donde el compuesto farmacéutico se selecciona del grupo que consiste en una toxina, una enzima, un inhibidor enzimático, un lípido, un carbohidrato, una inmunoglobulina o un fragmento de

la misma, un inmunocombinado, un compuesto quimioterapéutico, un fotosintetizador, un radionúclido, un agente de inducción de muerte celular, un agente de inhibición de muerte celular, un compuesto fibrinolítico y una combinación de los mismos.

- 5 12. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 8-11, donde el compuesto de reconocimiento (B) se selecciona de estreptavidina o avidina, biotina o un complejo de múltiples biotinas, un oligonucleótido o un morfolino, aptámeros y ácidos nucleicos peptídicos, un receptor o una parte del mismo, un ligando de receptor o una parte del mismo, un anticuerpo o un fragmento del mismo y un antígeno.
- 10 13. Método para la detección de la presencia o ausencia de células o partículas de células que expresan fosfolípidos que comprende:
- 15 a) administración a un sujeto de una composición que incluye una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 donde el compuesto reconocible es un compuesto reconocible A,
y
b) administración a un sujeto de una composición que comprende al menos un complejo que comprende un compuesto B que reconoce el compuesto A y un agente de diagnóstico,
y
20 c) someter a un sujeto a un paso de detección seleccionado del grupo que consiste en la formación de imágenes ópticas, formación de imágenes SPECT, formación de imágenes PET, formación de imágenes MRI, formación de imágenes CT y formación de imágenes por ultrasonido.
14. Equipo que comprende:
- 25 a) al menos una variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7; y,
b) un compuesto de diagnóstico o terapéutico capaz de reconocer la variante de anexina.
15. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en diagnóstico *in vivo*.
- 30 16. Variante de anexina según cualquiera de las reivindicaciones 1-7 para su uso en terapia.