

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 630 013**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

A61L 31/16 (2006.01)

A61K 38/49 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.02.2009** **PCT/GB2009/000454**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.08.2009** **WO09103977**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.02.2009** **E 09713277 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017** **EP 2254589**

54 Título: **Compuestos y procedimientos para la prevención o tratamiento de reestenosis**

30 Prioridad:

22.02.2008 US 30803 P

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

17.08.2017

73 Titular/es:

ANNEXIN PHARMACEUTICALS AB (100.0%)
Norrullsgatan 6
11329 Stockholm, SE

72 Inventor/es:

PETTERSSON, KNUT;
FROSTEGARD JOHAN y
CAMBER, OLA

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 630 013 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

Compuestos y procedimientos para la prevención o tratamiento de reestenosis

Campo de la invención

5 La invención se refiere a usos para la profilaxis o tratamiento de reestenosis, tales como reestenosis después de injerto de derivación y o intervenciones basadas en catéter percutáneo coronario o periférico con el objetivo de restablecer el flujo sanguíneo al tejido isquémico.

Antecedentes de la invención

10 La enumeración o análisis de un documento aparentemente publicado previamente en esta memoria descriptiva no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica de los conocimientos generales comunes.

15 La cardiopatía isquémica (IHD) es normalmente el resultado de la aterosclerosis en las arterias coronarias. La aterosclerosis es una enfermedad de la íntima arterial y comienza como deposición focal de material lipídico y células inflamatorias. Cuando estas lesiones con carga de lípidos se hacen avanzadas, pueden convertirse en estenosantes (es decir, causan el estrechamiento del vaso sanguíneo) y, por lo tanto, pueden limitar el flujo sanguíneo a partes del miocardio. La aterosclerosis se produce también en otras arterias y puede conducir a la estenosis en los vasos especialmente a las piernas, el cerebro y los riñones. Esta limitación del flujo sanguíneo puede causar dolor isquémico, como angina de pecho y claudicación intermitente.

20 Otra consecuencia de la aterosclerosis es que las lesiones pueden volverse inestables y romperse, dando lugar a la formación de un trombo arterial en el sitio de ruptura. Este trombo compromete gravemente el suministro de oxígeno al tejido aguas abajo y, a menos que el trombo se resuelva, conduce al infarto del tejido isquémico (infarto de miocardio, ictus, etc.). El infarto de miocardio y el ictus son las dos causas más comunes de muerte en todo el mundo.

25 Restablecer el suministro de sangre normal al tejido isquémico es el objetivo agudo más importante para el tratamiento de trastornos isquémicos, lo que puede conseguirse mediante medicación o por intervención. En pacientes con eventos trombóticos arteriales agudos como el infarto agudo de miocardio, es importante restablecer el flujo sanguíneo al tejido isquémico lo más rápidamente posible, con el fin de reducir las consecuencias del evento trombótico, y la intervención quirúrgica es común en esta situación. Los pacientes con angina de pecho estable u otros trastornos isquémicos que no pueden ser adecuadamente controlados con fármacos también pueden ser tratados quirúrgicamente.

30 Las intervenciones quirúrgicas, tales como la revascularización coronaria, se realizan mediante injerto de derivación (tal como, injerto de revascularización aortocoronaria, CABG) o por intervenciones basadas en catéter. En el caso de la cirugía de derivación, tal como CABG, se expone una arteria mamaria, se extrae su extremo distal de la mama y se sutura en una posición distal al segmento estenosado de la arteria coronaria, permitiendo así la perfusión del tejido isquémico. Si no se puede usar la arteria mamaria, o si se requieren múltiples derivaciones, el cirujano utilizará venas de las piernas (injertos venosos). En este caso, un segmento de vena se retira y se coloca de la aorta a una posición distal a la estenosis.

40 Durante intervenciones basadas en catéter, tales como PCI (intervención coronaria percutánea), un catéter de globo se inserta típicamente a través de una arteria femoral y se guía en el segmento estenótico, donde el balón es inflado y el segmento estenótico se dilata así. Esto también se conoce como angioplastia con balón. Otros procedimientos que se realizan durante la PCI pueden incluir la implantación de una endoprótesis vascular, o aterectomía, tal como la aterectomía rotacional o láser (eliminación del material de la placa ateromatosa). Para mejorar la eficacia de la intervención, se puede usar un catéter de endoprótesis vascular para implantar una endoprótesis vascular. En este caso, el catéter también colocará una endoprótesis vascular de metal para soportar la pared arterial para mantener los calibres del lumen.

45 Las intervenciones destinadas a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico pueden dar lugar a reestenosis, causada por la formación de una neoíntima o un engrosamiento de la neoíntima. La causa subyacente es una lesión del músculo liso vascular y la interrupción de la integridad del revestimiento endotelial. El proceso también está caracterizado por la presencia y la actividad de las células inflamatorias y comorbilidades eventuales que padece el paciente. Los mecanismos moleculares subyacentes de los procesos de desarrollo de la estenosis primaria y la reestenosis secundaria son diferentes, pero hay una considerable superposición entre los dos.

55 El injerto de derivación es una intervención eficaz, pero una complicación común es la denominada reestenosis, el rápido desarrollo de una neoíntima que conducirá a la formación de una nueva estenosis en el vaso de injerto, dando lugar a menudo a la necesidad de realizar un procedimiento de revascularización de repetición. Esto es especialmente común en los injertos de vena, donde aproximadamente el 15 % de los injertos se ocluyen durante el primer año, y en 10 años el 50 % de los vasos de injerto son estenóticos (Motwani y Topol, 1998). El fracaso del injerto venoso puede considerarse como una enfermedad inflamatoria inducida por lesiones, incluyendo la infiltración

y activación de macrófagos y la activación de las células del músculo liso medial (Zhang *et al.*, 2004).

También después de la PCI la reestenosis es una complicación común. Es más común realizar un procedimiento de revascularización de repetición después de PCI que después de CABG; las tasas absolutas a los 5 años fueron del 46,1 % después de la angioplastia con balón, 40,1 % después de la PCI con endoprótesis vasculares y 9,8 % después de la CABG (Bravata *et al.*, 2007).

La proliferación de células del músculo liso de un fenotipo de síntesis de matriz es un factor importante en el proceso que conduce a la formación de la neointima. Un reciente desarrollo que reduce eficazmente la reestenosis es la denominada endoprótesis vascular de elución de fármaco (DES). Estas endoprótesis vasculares están revestidas con polímeros que contienen agentes citostáticos (por ejemplo, rapamicina), que inhiben eficazmente la respuesta proliferativa a la intervención quirúrgica. En los pacientes que reciben DES, la reestenosis ocurre típicamente con una incidencia por debajo del 4 %. Sin embargo, las endoprótesis DES no se integran completamente en la pared del vaso, y se asocian con un mayor riesgo de formación de trombos, que no pueden controlarse eficazmente con fármacos. De hecho, la ventaja de la DES en cuanto a la reestenosis no conduce a una mejora significativa en el pronóstico del paciente, ya que el mayor riesgo de trombosis compensa este efecto. De hecho, ahora hay recomendaciones para usar DES con precaución, y se han publicado recomendaciones para aumentar la terapia antitrombótica (Smith *et al.*, 2006).

Las lesiones reestenóticas son lesiones inflamatorias que presentan al menos superficialmente similitudes con las lesiones ateroscleróticas primarias. Las células dominantes son células de músculo liso, pero también macrófagos/células de espuma y linfocitos T están presentes en las lesiones de reestenosis. CABG y PCI son tratamientos eficaces para la estenosis, y ha habido alguna ventaja en los enfoques médicos para limitar las complicaciones asociadas a la intervención, pero los tratamientos eficaces que previenen la reestenosis eficazmente mejorarán aún más el tratamiento. Incluso en el caso de DES, sería una ventaja si las endoprótesis vasculares pudieran recubrirse con un agente antirreestenótico eficaz que no condujera a un mayor riesgo para la formación de trombos arteriales.

A partir del sumario anterior, se hace evidente que un tratamiento eficaz que reduce la formación de reestenosis es una oportunidad terapéutica para afecciones en las que se realizan procedimientos de revascularización, independientemente de si la técnica utilizada para obtener revascularización es un injerto de derivación o dilatación con balón del segmento estenosado del vaso, con o sin colocación de la endoprótesis vascular.

La Anexina A5 es una proteína endógena que se une a fosfolípidos cargados tales como fosfatidilserina (PS) (Cederholm y Frostegard, 2007). La Anexina A5 es un potente agente antitrombótico (Thiagarajan y Benedict, 1997), y se propone que la Anexina A5 por unión a la PS expuesta puede formar un "escudo protector" que puede inhibir los efectos de PS en la formación de trombosis (Rand, 2000).

Se ha demostrado que además de los efectos antiplaquetarios y anticoagulantes de la Anexina A5, esta proteína y un análogo de la misma, la dianexina dimérica de la Anexina A5, es eficaz en la prevención de la lesión por perfusión en el hígado (Teoh *et al.*, 2007), y mejoró el resultado de trasplantes de hígado de rata (Shen *et al.*, 2007). Curiosamente, en ambos estudios los tratamientos se asociaron con una reducción de la actividad inflamatoria en el endotelio hepático, medida como expresión reducida de las moléculas de adhesión, es decir, la Anexina A5 tiene efectos antiinflamatorios. Se sugirió que la dianexina mejoró la supervivencia de los trasplantes de hígado por un efecto antitrombótico que condujo a mantener el suministro de sangre al hígado (Shen *et al.*, 2007). Se ha sugerido anteriormente que la Anexina A5 puede utilizarse para estabilizar las lesiones ateroscleróticas en las arterias coronarias de los pacientes, lo que debería reducir el riesgo de infarto de miocardio en estos pacientes (Cederholm *et al.*, 2005; documento WO 2005/099744).

Sumario de la invención

La invención es como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Un primer aspecto de la invención proporciona una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para su uso en la profilaxis o tratamiento de reestenosis.

Un segundo aspecto de la invención proporciona una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para su uso en el tratamiento de estenosis en un paciente, en la que el paciente se somete a una intervención para el tratamiento de estenosis y la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención.

Un tercer aspecto de la invención proporciona un uso de una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de reestenosis.

Un cuarto aspecto de la invención proporciona un uso de una Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estenosis en un paciente, en el que el paciente se somete a una intervención para el tratamiento de estenosis y la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención.

Un quinto aspecto de la invención proporciona una endoprótesis de elución de fármaco para el uso en la profilaxis o tratamiento de la reestenosis, en la que el fármaco es Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma.

5 También se divulga en el presente documento un procedimiento para fabricar una endoprótesis vascular para administrar Anexina A5 o un análogo funcional o una variante del mismo a un paciente, comprendiendo el procedimiento incorporar Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma en o sobre un cuerpo de endoprótesis vascular.

En cada uno de los aspectos primero a quinto de la invención, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma se selecciona de:

- a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
- 10 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
- c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
- d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neoíntima y que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;
- 15 e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
- f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

Se contempla que cualquier uso o composición que se describe en el presente documento puede implementarse con respecto a cualquier otro uso o composición descrita en el presente documento.

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

Estas y otras realizaciones de la invención se apreciarán y comprenderán mejor al considerarse junto con la siguiente descripción y los dibujos adjuntos. Debe entenderse, sin embargo, que la siguiente descripción, aunque indica diversas realizaciones de la invención y numerosos detalles específicos de la misma, se da a modo de ilustración y no de limitación.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Cuantificación de los leucocitos de la pared arterial en ratones transgénicos APOE*3-Leiden, alimentados con una dieta rica en colesterol, tres días después de la cirugía del manguito de la arteria femoral y tratamiento diario con vehículo o anexina humana recombinante A5. El porcentaje de leucocitos se expresa como media $\pm$ SEM.

30 *Figura 2.* Cuantificación de monocitos y macrófagos teñidos con AIA 31240 en la pared arterial en ratones transgénicos APOE*3-Leiden, alimentados con una dieta rica en colesterol, tres días después de la cirugía del manguito de la arteria femoral y tratamiento diario con vehículo o anexina humana recombinante A5. El porcentaje de macrófagos en el número total de células contadas (unidas al endotelio o infiltradas en el medio) se expresa como media $\pm$ SEM.

35 *Figura 3.* Cuantificación de células que expresan MCP-1 en la pared arterial en ratones transgénicos APOE*3-Leiden, alimentados con una dieta rica en colesterol, tres días después de la cirugía del manguito de la arteria femoral y tratamiento diario con vehículo o anexina humana recombinante A5. El porcentaje de células que expresan MCP-1 se expresa como media $\pm$ SEM.

40 *Figura 4.* Engrosamiento del injerto venoso de ratones transgénicos APOE*3-Leiden, alimentados con una dieta rica en colesterol, 28 días después de la cirugía de injerto de vena y tratamiento diario con vehículo, anexina humana o murina recombinante A5. El área entre el lumen y la adventicia se representa como media $\pm$ SEM (mm²). n.s.: no significativo.

45 *Figura 5.* Cuantificación del número de leucocitos en la pared del injerto venoso en ratones transgénicos APOE*3-Leiden, alimentados con una dieta rica en colesterol, 28 días después de la cirugía de injerto de vena y tratamiento diario con vehículo, anexina humana o murina recombinante A5. El número de células se expresa como media $\pm$ SEM.

Descripción detallada de la invención

50 Aquí, los inventores muestran que la Anexina A5 puede reducir la formación de una neoíntima en dos modelos de ratón de reestenosis. Por lo tanto, la Anexina A5 o análogos de la misma presentan una nueva modalidad de tratamiento con propiedades antirreestenóticas que pueden reducir el número de complicaciones relacionadas con la

reestenosis en pacientes sometidos a injerto de derivación o procedimientos de angioplastia para revascularización de tejido isquémico. No existen informes anteriores que demuestren que la Anexina A5 tiene propiedades antirreestenóticas. Por lo tanto, la Anexina A5 puede utilizarse para prevenir la reestenosis. La Anexina A5 se puede administrar sistémicamente y también puede usarse como un agente antirreestenótico en endoprótesis vasculares de elución de fármacos.

El primer aspecto de la invención proporciona Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para su uso en la profilaxis o tratamiento de reestenosis en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:

a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);

b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;

c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;

d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neoíntima y que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;

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

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

Por "profilaxis" se incluye la prevención, en particular la prevención del desarrollo de reestenosis, o la reducción del desarrollo de reestenosis (profilaxis primaria) y profilaxis secundaria, en la que ya se ha producido reestenosis, pero el paciente está protegido contra el empeoramiento de la afección, o la afección empeora más gradualmente o en un grado reducido. Por "tratamiento" se incluye el significado de que la reestenosis existente puede ser revertida, parcial o totalmente, en el paciente.

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

La reestenosis puede producirse después de una intervención destinada a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico, tal como un procedimiento de revascularización que se ha utilizado para tratar la estenosis de un vaso sanguíneo o la acumulación de placa ateromatosa en un vaso sanguíneo. La estenosis u obstrucción de un vaso debido a ateroma puede diagnosticarse por un médico de acuerdo con medios conocidos en la técnica. La estenosis coronaria se evalúa típicamente mediante angiografía coronaria o ultrasonido intravascular (IVUS). Esto último también se utiliza para cuantificar la placa arterial. Jasti *et al.* (2004) *Circulation* 110: 2831-2836 describen parámetros que pueden medirse mediante IVUS, y también angiografía coronaria cuantitativa. Los parámetros adecuados de una lesión diana y segmento de referencia que pueden medirse mediante IVUS son: (1) diámetros de lumen mínimo y máximo (mm); (2) área de sección transversal de la lumen mínimo (MLA, mm²); (3) placa más el área de la sección transversal del medio (CSA, mm²) igual al área de la sección transversal de la membrana elástica externa (EEM CSA) menos el MLA; (4) estrechamiento de la sección transversal (CSN), que se calculó como placa más el CSA medio dividido por el CSA de la EEM; (5) el segmento de referencia, que era la sección transversal de la arteria de aspecto normal situada proximal o distal a la estenosis; típicamente el promedio de las mediciones proximal y distal a la estenosis puede determinarse; y (6) estenosis del área (AS), calculada como la referencia-CSA de lumen-MLA de lesión x 100/referencia-CSA de lumen. El diámetro de lumen medio (MLD) de $\leq 2,8$ mm o área media del lumen de $\leq 5,9$ mm² fueron indicativos de una estenosis clínicamente significativa que justifica la intervención en este estudio. El experto en la técnica apreciará que pueden ser apropiados diferentes valores de corte para el diagnóstico de estenosis en diferentes vasos. Una reducción del lumen al 50 % del segmento de referencia se considera a menudo como una estenosis clínicamente relevante.

También se conocen medios no invasivos de diagnóstico de estenosis. Holte *et al.* (2007) *Cardiovascular ultrasound* 5: 33 describen la ecocardiografía Doppler transtorácica para la visualización directa de los segmentos coronarios y la evaluación de la reserva de flujo de la velocidad coronaria (CVFR). Mediante esta técnica, las estenosis coronarias típicamente muestran una aceleración de flujo local y una turbulencia expresada como solapamiento de color por Doppler de flujo de color y velocidades de flujo aceleradas a través de la estenosis. Para evaluar la gravedad de las estenosis, la aceleración del flujo se puede cuantificar comparando las velocidades de flujo en el sitio de solapamiento con las velocidades de flujo preestenótico no aceleradas aguas arriba más cercanas. Una relación de velocidad de flujo diastólico máxima a preestenótica mayor de 2,0 predice una estenosis significativa con alta sensibilidad y especificidad.

La estenosis no se limita a las arterias coronarias y puede aparecer en vasos sanguíneos cerebrales, así como en otras arterias periféricas tales como arterias renales y arterias de las extremidades. La estenosis puede ser diagnosticada en tales vasos de una manera similar al diagnóstico en vasos coronarios, o mediante ensayos funcionales tales tal como ejercicio en cinta ergométrica.

Típicamente, la reestenosis puede manifestarse en semanas, meses o años de la intervención dirigida a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico y, si no se trata, progresar en un periodo de tiempo de semanas, meses o años. La reestenosis puede o no ser diagnosticada durante el seguimiento después de la intervención, y puede primero ser notificada cuando da lugar a complicaciones clínicas tales como angina, trombosis o infarto. La reestenosis se diagnostica típicamente por un médico de acuerdo con los mismos medios utilizados para diagnosticar la estenosis. Típicamente, la reestenosis coronaria puede ser evaluada mediante angiografía coronaria, IVUS o por medios no invasivos tales como ecocardiografía Doppler transtorácica. También se utilizan parámetros clínicos similares a los descritos anteriormente en relación con el diagnóstico de estenosis para el diagnóstico de reestenosis. Una relación de velocidad de flujo diastólico máxima a preestenótica mayor de 2,0 determinada por ecocardiografía Doppler transtorácica puede ser indicativa de reestenosis, como se describe en Holte *et al.*, anteriormente. Hirata *et al.* (2006) J Amer. Soc. Echocardiography 19:165-191 describen el diagnóstico no invasivo de reestenosis mediante ecocardiografía Doppler transtorácica en pacientes 6 meses después de haber sufrido una PCI exitosa de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. La reestenosis de los vasos sanguíneos periféricos, tales como las arterias renales o de las articulaciones, puede ser diagnosticada mediante procedimientos similares, o mediante ensayos funcionales tal como el ejercicio en la cinta ergométrica.

De acuerdo con el primer aspecto de la invención, donde el uso profiláctico está destinado a prevenir o reducir el desarrollo de la reestenosis, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es típicamente para su administración en el momento de o poco antes de la intervención dirigida a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico. Por ejemplo, se puede administrar al menos 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos antes de la intervención o en el momento de la intervención. Típicamente, la administración de la Anexina A5 o su análogo funcional o variante continúa después de la intervención quirúrgica, por ejemplo, durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años después de la intervención. La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede proporcionarse mediante la administración repetida de formas de dosificación adecuadas, o por administración en una forma de liberación controlada, tal como en una endoprótesis vascular de elución de fármacos desplegada durante la intervención, o como una combinación de una o más formas de administración. Se apreciará que la duración exacta de la continuación de la administración de la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede elegirse para coincidir con el grado de riesgo de reestenosis en diferentes momentos después de la intervención. Por ejemplo, cuando se despliega una endoprótesis vascular de metal desnudo durante la intervención, la formación de neoíntima típicamente alcanza picos aproximadamente 6 meses después de la intervención, y luego regresa, mientras que cuando se despliega una endoprótesis vascular de elución de fármaco, la reestenosis tiende a desarrollarse más lentamente, pero continúa desarrollándose hasta 1 o 2 años o incluso más de 2 años después de la intervención (Ong y Serruys (2005) Curr Issues Cardiol 32: 372-377).

En otras realizaciones del primer aspecto de la invención, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración como profilaxis secundaria, para prevenir o reducir el empeoramiento de la reestenosis que ya ha ocurrido; o como un tratamiento, para invertir total o parcialmente la reestenosis que ya ha ocurrido. Típicamente, la Anexina A5 o su análogo funcional o variante se administra después del procedimiento de revascularización primaria y después del diagnóstico de reestenosis en el paciente. Típicamente, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma se proporciona mediante la administración repetida de formas de dosificación adecuadas. Típicamente, la administración se continúa durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años después del diagnóstico de reestenosis. También se prevé que se pueda llevar a cabo un nuevo procedimiento de revascularización como tratamiento para la reestenosis, y que la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede proporcionarse como un fármaco de liberación controlada, tal como en una endoprótesis vascular de elución de fármaco desplegada durante el procedimiento de revascularización adicional. Puede proporcionarse una combinación de una o más formas de administración.

Mediante la administración de una "cantidad terapéuticamente eficaz de Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma", se refiere a la administración de una cantidad que tiene un efecto beneficioso en la prevención o reducción del desarrollo de reestenosis, tratamiento de la reestenosis, o prevención o reducción del empeoramiento de la reestenosis existente. Cuando la Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma previene o reduce el desarrollo de reestenosis, típicamente, la reestenosis no es diagnosticable después del inicio de la administración, o se diagnostica más tarde de lo esperado (es decir, en comparación con su desarrollo en ausencia de la administración de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma), o se desarrolla menos rápidamente después del diagnóstico, o se desarrolla en un grado reducido después del diagnóstico, o hay una combinación de dos o tres entre un diagnóstico posterior, progresión más lenta y desarrollo reducido. Típicamente, la reestenosis será diagnosticable al menos 1 mes, al menos 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años después de lo que se espera en ausencia de administración de Anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma. Cuando, tras el diagnóstico de reestenosis, la progresión de la reestenosis es más lenta en el paciente al que se ha administrado la Anexina A5 o un análogo o variante funcional de la misma, esto típicamente da lugar a la necesidad de repetir el procedimiento de revascularización más tarde, típicamente, al menos 1 mes, al menos 3 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años más tarde de lo que esperado en ausencia de administración de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma. Típicamente, cuando se administra la Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma para tratar la reestenosis, los síntomas de la reestenosis desaparecen con el tiempo, de modo que la reestenosis ya no es diagnosticable a los 10 años, a los 5 años, 2 años, 1 año, 6

meses, 3 meses o 1 mes después de la administración. Cuando se administra Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para prevenir o reducir el empeoramiento de la reestenosis existente, esto da como resultado típicamente la necesidad de que tenga lugar más tarde un procedimiento de revascularización de repetición, típicamente, al menos 1 mes, al menos 3 meses, 6 meses, 1 años, 2 años, 5 años o 10 años más tarde de lo esperado en ausencia de administración de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma.

De manera adecuada, el efecto beneficioso de administrar Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma sobre reestenosis (por ejemplo, diagnóstico posterior, progresión más lenta y/o desarrollo reducido) se puede identificar determinando por IVUS el diámetro medio del lumen o el área media del lumen del vaso sanguíneo que está en riesgo o que ha sufrido reestenosis después de un procedimiento de revascularización, en un sujeto al que se ha administrado y/o se está administrando Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, y comparándolo con el mismo parámetro en un sujeto que se ha sometido al mismo tipo de procedimiento de revascularización en el mismo tipo de vaso sanguíneo en un período de tiempo similar anterior, pero que no ha recibido la Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma. Adecuadamente, el diámetro medio del lumen será de al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 75 %, 100 %, 125 %, 150 % o incluso el 200 % más grande en el sujeto tratado que en el sujeto que no ha sido tratado con Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, en un punto de tiempo de 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 4 meses, 6 meses, 9 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años después de que se haya realizado el procedimiento de revascularización, asumiendo que la administración de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma se inició en el momento de o antes del procedimiento de revascularización. Como alternativa, el área media del lumen será típicamente al menos un 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 7 %, 10 %, 15 %, 20 %, 45 %, 55 %, 70 %, 100 %, 225 %, 300 %, 400 %, 500 %, 600 % o incluso un 900 % más grande en el sujeto tratado que en el sujeto no tratado en cualquiera de los puntos de tiempo mencionados anteriormente.

Preferiblemente, el aumento de diámetro o área de lumen media apreciado anteriormente se observa a los 6 meses después del procedimiento de revascularización.

El experto en la técnica apreciará que pueden ser apropiados otros criterios de valoración para identificar un efecto terapéutico de la administración de Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma. Por ejemplo, el infarto de miocardio y/o la muerte son consecuencias comunes de la reestenosis. Los sujetos a los que se administró Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma pueden experimentar un riesgo reducido de infarto de miocardio, y/o sobrevivir durante más tiempo de lo esperado en ausencia de la administración de Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma.

Un efecto de la administración de Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma sobre la posibilidad de diagnosticar la reestenosis después de un procedimiento de revascularización puede determinarse mediante ensayos clínicos, típicamente implicando decenas, cientos o miles de pacientes (tales como 10, 50, 100, 1000 o 10000 o valores entre estos). Como alternativa, se pueden usar ensayos en animales, tales como los descritos a continuación en relación con el ensayo de análogos funcionales y variantes de Anexina A5 y en los Ejemplos.

Los sujetos que pueden beneficiarse de la profilaxis o tratamiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención incluyen sujetos que deben someterse a una intervención dirigida a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico, o a los sujetos en el momento de la intervención o posterior a la intervención. El paciente puede ser un sujeto sometido o que se ha sometido a un procedimiento de revascularización en la circulación coronaria o en un vaso periférico. Tal intervención puede ser una intervención quirúrgica o una intervención percutánea. Por ejemplo, el procedimiento puede ser un injerto de derivación, tal como un injerto de derivación aortocoronaria, o una intervención basada en un catéter, tal como una angioplastia con balón, con o sin implantación de una endoprótesis endovascular y con o sin aterectomía, tal como intervención coronaria percutánea o angioplastia. De forma adecuada, en el primer aspecto de la invención, la reestenosis está asociada a un injerto de derivación. En otras palabras, la reestenosis ha ocurrido, o está en riesgo de ocurrir, debido a un procedimiento de injerto de derivación. De forma adecuada, en el primer aspecto de la invención, la reestenosis está asociada a una intervención basada en catéter. En otras palabras, la reestenosis ha ocurrido, o está en riesgo de ocurrir, debido a una intervención basada en catéter. Adecuadamente, la reestenosis está asociada con la implantación de una endoprótesis endovascular, independientemente de que este procedimiento se haya realizado o no en el contexto de una intervención quirúrgica tal como un injerto de derivación, o una intervención basada en un catéter. Otros sujetos adecuados incluyen sujetos que han sido o se van a tratar para un aneurisma, tal como por injerto de endoprótesis vascular.

La Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma puede administrarse junto con uno o más agentes activos adicionales, tales como un producto terapéutico trombolítico tal como aspirina, clopidogrel, triclopídina, activador de plasminógeno tisular, urocinasa, o una enzima bacteriana tal como estreptocinasa. La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede coadministrarse con cualquiera de uno o más agentes activos adicionales, o puede administrarse por separado, simultánea o secuencialmente con tal agente o agentes. Típicamente, uno o más de estos agentes se usan para reducir el riesgo de trombosis, que puede obstruir los vasos sanguíneos, incluyendo los vasos sanguíneos con endoprótesis vascular. De manera adecuada, se comienza la terapia con triclopídina o clopidogrel antes de un procedimiento de revascularización que implica el despliegue de la endoprótesis vascular, y se continúa durante al menos tres, seis o incluso doce meses después del procedimiento (Ong y Serruys, anteriormente). Típicamente, la aspirina se administra concomitantemente con triclopídina o

clopidogrel y luego se continúa indefinidamente. El uso de aspirina junto con clopidogrel o triclopídina se denomina terapia antiplaquetaria dual. Regímenes similares de administración de fármaco antitrombótico pueden aplicarse antes y después de otros tipos de intervención.

5 La Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma puede administrarse por vía parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o local a partir de una endoprótesis vascular de elución de fármaco. Cuando un sujeto se ha implantado con una endoprótesis vascular, la Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma puede liberarse de la endoprótesis vascular (es decir, la endoprótesis vascular es una endoprótesis vascular de elución de fármaco) o al sujeto se le puede administrar Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma por otra de las rutas enumeradas anteriormente.

10 El segundo aspecto de la invención proporciona Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso en el tratamiento de estenosis en un paciente, en la que el paciente se somete a una intervención para el tratamiento de estenosis y la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención, en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:

a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);

15 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;

c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;

d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neoíntima y que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;

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

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

Puede producirse estenosis y se puede diagnosticar como se ha descrito anteriormente. Por "intervención para el tratamiento de la estenosis" se entiende cualquier intervención destinada a tratar la estenosis en un paciente. Las intervenciones de estenosis conocidas en la técnica incluyen intervenciones quirúrgicas, como injerto de vena, incluyendo injerto de derivación, tal como injerto de revascularización aortocoronaria, e intervenciones basadas en catéter, tales como angioplastia con balón con o sin implantación de una endoprótesis vascular y con o sin aterectomía, incluyendo intervención coronaria percutánea.

25 En el segundo aspecto de la invención, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención para el tratamiento de la estenosis. En otras palabras, la administración y la intervención se realizan por separado, simultánea o secuencialmente. Como se ha analizado en relación con el primer aspecto de la invención, la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede administrarse al menos 1 semana, 6 días, 5 días, 4 días, 3 días, 2 días, 1 día, 12 horas, 8 horas, 4 horas, 2 horas, 1 hora o 30 minutos antes de la intervención o en el momento de la intervención. Típicamente, la administración de la Anexina A5 o su análogo funcional o variante continúa después de la intervención quirúrgica, por ejemplo, durante al menos 1 semana, 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 6 meses, 1 año, 2 años, 5 años o 10 años después de la intervención.

30 La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma se administra con el fin de prevenir o reducir el desarrollo de la reestenosis después del tratamiento de estenosis. Por lo tanto, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma tiene un efecto beneficioso en la prevención o reducción del desarrollo de la reestenosis, como se ha descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

Los sujetos adecuados y grupos de pacientes que pueden beneficiarse del procedimiento del segundo aspecto de la invención, rutas y dosis adecuadas de administración, y terapias adyuvantes adecuadas, son como se ha descrito anteriormente en relación con el primer aspecto de la invención.

35 Se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma para la profilaxis o tratamiento de la reestenosis. El tercer aspecto de la invención proporciona el uso de la Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de la reestenosis, en el que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona de:

a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);

50 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;

c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;

d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neoíntima y que es más del

50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;

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

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

- 5 La profilaxis y el tratamiento de la reestenosis son como se describe en relación con el primer aspecto de la invención.

Una composición farmacéutica para su uso de acuerdo con el tercer aspecto de la invención puede comprender, por lo tanto, la Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma en mezcla con un adyuvante, diluyente o vehículo farmacéutica o veterinariamente aceptable, que se seleccionará típicamente con respecto a la ruta de administración prevista y la práctica farmacéutica estándar. La composición puede estar en forma de aplicaciones de liberación inmediata, retardada o controlada. Preferiblemente, la formulación es una dosis unitaria que contiene una dosis o unidad diaria, una subdosis diaria o una fracción apropiada de la misma, del principio activo.

Las frases "farmacéutica o farmacológicamente aceptables" se refieren a composiciones que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción adversa cuando se administran a un animal, tal como, por ejemplo, un ser humano, según sea apropiado. La preparación de tales composiciones farmacéuticas es conocida por los expertos en la técnica a la luz de la presente divulgación, como se ilustra por Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. Mack Printing Company, 1990. Además, para administración animal (por ejemplo, humana), se entenderá que las preparaciones deben cumplir con los estándares de esterilidad, pirogenicidad, seguridad general y pureza según lo requiere la FDA Office of Biological Standards.

Como se usa en el presente documento, el "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, tensioactivos, antioxidantes, conservantes (por ejemplo, agentes antibacterianos, agentes antifúngicos), agentes isotónicos, sales, conservantes, fármacos, estabilizadores de fármaco, excipientes, agentes de desintegración, tales como materiales y combinaciones de los mismos, como se conocerá por un experto en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier vehículo convencional es incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas o farmacéuticas.

Las composiciones farmacéuticas para su uso de acuerdo con la invención pueden o no estar destinadas a, y, por lo tanto, formularse de una manera adecuada para administración parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular o subcutánea, o administración a partir de una endoprótesis vascular de elución de fármacos, o pueden administrarse mediante técnicas de infusión. Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con varios de los otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización. Las composiciones farmacéuticas se pueden utilizar mejor en forma de una solución acuosa estéril que puede contener otras sustancias, por ejemplo, suficientes sales o glucosa para hacer la solución isotónica con la sangre. Las soluciones acuosas pueden estar adecuadamente tamponadas (preferiblemente a un pH de 3 a 9), si es necesario. La preparación de formulaciones farmacéuticas adecuadas en condiciones estériles se logra fácilmente mediante técnicas farmacéuticas estándar bien conocidas por los expertos en la técnica.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para su administración a un paciente, tal como un paciente humano, sobre la base de un nivel de dosificación diaria puede ser de 0,01 a 1000 mg de Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma por adulto (por ejemplo, de aproximadamente 0,001 a 20 mg por kg del peso corporal del paciente, tal como de 0,01 a 10 mg/kg, por ejemplo, más de 0,1 mg/kg y menos de 20, 10, 5, 4, 3 o 2 mg/kg, tal como aproximadamente 1 mg/kg), administrada en dosis individuales o divididas. Las dosis adecuadas para incluir en endoprótesis vasculares de elución de fármacos se analizan a continuación en relación con el quinto aspecto de la invención.

En cualquier caso, el médico determinará la dosis real que será la más adecuada para cualquier paciente individual y variará con la edad, el peso y la respuesta del paciente particular. Las dosificaciones anteriores son ejemplares del caso medio. Por supuesto, pueden existir casos individuales en los que se justifican intervalos de dosificación más altos o más bajos y tales están dentro del alcance de esta invención.

Para uso veterinario, se administra un compuesto de la invención como una formulación adecuadamente aceptable de acuerdo con la práctica veterinaria normal y el cirujano veterinario determinará el régimen de dosificación y la ruta de administración que serán los más apropiados para un animal en particular.

Un quinto aspecto de la invención proporciona una endoprótesis de elución de fármacos para su uso en la profilaxis o tratamiento de reestenosis, en la que el fármaco es una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:

a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);

b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;

c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neointima;

d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neointima y que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;

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

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

Una endoprótesis vascular es una estructura utilizada para mantener un vaso sanguíneo en una posición abierta, y típicamente se despliega durante intervenciones basadas en catéter. Las endoprótesis de elución de fármacos contienen, además de un cuerpo de endoprótesis vascular, al menos un fármaco y típicamente también un recubrimiento que permite la elución controlada del fármaco. Los cuerpos de endoprótesis vascular típicos son al menos parcialmente flexibles o articulados (es decir, los segmentos de anillo expansibles adyacentes están conectados por enlaces que se articulan uno con relación al otro) a lo largo de sus longitudes de manera que puedan avanzar a través de la vasculatura. Además, deberán tener una resistencia mecánica suficiente después de su expansión, con el fin de aumentar mecánicamente la resistencia de la pared luminal y mantener así la permeabilidad del lumen. Los cuerpos de las endoprótesis vasculares son típicamente tubulares y tienen una estructura de malla. Los cuerpos de endoprótesis vascular adecuados se desvelan en el documento US 6.602.282 (Cesionario Avantec Vascular Corporation). Las endoprótesis vasculares que tienen segmentos de anillo expansibles unidos por enlaces sigmoideos y vigas axiales se describen en el documento WO 99/17680 (Localmed Inc). Las endoprótesis vasculares que comprenden anillos expansibles que incluyen puntales y bisagras donde las bisagras están configuradas para tener diferentes fuerzas de apertura se describen en la patente de Estados Unidos. n.º 5.922.020 (Localmed Inc). Las endoprótesis vasculares típicas tendrán una longitud en el intervalo de aproximadamente 5 mm a 100 mm, siendo usualmente de aproximadamente 8 mm a 50 mm. El pequeño diámetro (radialmente plegado) de las endoprótesis vasculares cilíndricas estará usualmente en el intervalo de aproximadamente 0,5 mm a 10 mm, estando más usualmente en el intervalo de 0,8 mm a 1,25 mm. El diámetro expandido estará usualmente en el intervalo de aproximadamente 1,5 mm a 50 mm, estando preferiblemente en el intervalo de aproximadamente 2,5 mm a 30 mm.

El cuerpo de la endoprótesis vascular puede fabricarse a partir de cualquier material adecuado, incluyendo acero inoxidable, titanio, níquel o aleaciones, tales como aleaciones de cobalto-cromo, o combinaciones de los mismos. Los materiales particularmente adecuados incluyen metales maleables, tales como acero inoxidable de la serie 300, o metales elásticos, tales como aleaciones superelásticas y de memoria de forma, por ejemplo, aleaciones de Nitinol®, aceros inoxidables de resorte y similares. Es posible que los segmentos de cuerpo puedan formarse a partir de combinaciones de estos metales, o combinaciones de estos tipos de metales y otros materiales no metálicos. Los cuerpos de endoprótesis vascular también pueden estar hechos de un material biorreabsorbible o biodegradable. Un cuerpo de endoprótesis vascular biodegradable adecuado está hecho de un poliéster tal como polilactida, como se describe en Vogt *et al.* (2004) European Heart Journal 25: 1330-40. Este cuerpo de endoprótesis vascular se utilizó como la plataforma para eluir paclitaxel, que fue capaz de hacerlo durante un período de más de dos meses desde el despliegue.

La Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se incorpora sobre o en el cuerpo de la endoprótesis vascular por un procedimiento adecuado para permitir su liberación gradual después del despliegue de la endoprótesis vascular

Blindt *et al.* (1999) Int J Artif Organs 22: 843-853 describen un procedimiento de moldeo de endoprótesis vasculares de polímeros biorreabsorbibles tales como poli-D-L-lactida, que se denominan CESP (expansión controlada de polímeros saturados). El procedimiento CESP se caracteriza por la exposición de un polímero amorfo a un gas inerte a alta presión, tal como dióxido de carbono, que tiene un efecto plastificante, que permite preparar polilactidas a una temperatura próxima a la temperatura ambiente. La baja temperatura del procedimiento constituye una ventaja clave para los polímeros térmicamente sensibles y permite la incorporación de aditivos farmacéuticos térmicamente sensibles durante el procedimiento de moldeo. La cinética de liberación del fármaco puede ser regulada por diferentes tamaños de poro del material. El procedimiento CESP se utilizó por Vogt *et al.*, anteriormente para fabricar una endoprótesis vascular de elución de poli-D-L-lactida paclitaxel.

La Anexina A5 o el análogo funcional o una variante de la misma también se puede incorporar sobre el cuerpo de la endoprótesis vascular recubriendo el cuerpo de la endoprótesis vascular después de que se haya formado. En esta realización, el cuerpo de la endoprótesis vascular está recubierto con la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma y típicamente también un material adicional, tal como un polímero adecuado para permitir la liberación lenta de la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma. Típicamente, en esta realización, el cuerpo de la endoprótesis vascular comprende un metal, como se ha descrito anteriormente. Sin embargo, también se puede aplicar un revestimiento en el caso de cuerpos de endoprótesis vascular bioerosionables o biodegradables, incluso si éstos incluyen también la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma incorporada en la fase de moldeo.

Adecuadamente, cuando el cuerpo de la endoprótesis vascular está recubierto, hay al menos uno, dos, tres o más

revestimientos. El documento US 2006/0083772 (DeWitt *et al.*) describe composiciones de recubrimiento adecuadas y su uso en la aplicación de un agente bioactivo a una superficie de un dispositivo médico implantable, tal como una endoprótesis vascular, de una manera que permita que el agente bioactivo sea liberado del revestimiento *in vivo*. La composición comprende una pluralidad de polímeros compatibles que tienen propiedades diferentes que pueden permitir que se combinen entre sí para proporcionar una combinación óptima de propiedades tales como durabilidad, biocompatibilidad y cinética de liberación. La composición de revestimiento descrita en el documento US 2006/0083772 comprende uno o más agentes bioactivos en combinación con una pluralidad de polímeros, incluyendo: (a) un primer componente polimérico que comprende un polímero seleccionado del grupo que consiste en (i) copolímeros de etileno con otros alquilenos, (ii) polibutenos, (iii) copolímeros que contienen grupos aromáticos, (iv) polímeros que contienen epiclorhidrina, (v) poli(alquilen-co-alquil(met)acrilatos), y (vi) polímeros y copolímeros no aromáticos derivados de diolefina; y (b) un segundo componente polimérico que comprende uno o más polímeros seleccionados del grupo que consiste en poli(alquil(met)acrilatos) y poli(met)acrilatos aromáticos), donde "(met)" incluye dichas moléculas tanto en la forma acrílica como metacrílica (correspondiente a los acrilatos y/o metacrilatos, respectivamente). Los criterios para la selección de polímeros y ensayos *in vitro* para determinar la velocidad de liberación de un agente activo también se desvelan en el documento US 2006/0083772. Además, el documento US 2006/0083772 divulga el pretratamiento de endoprótesis vasculares mediante revestimiento con materiales tales como silano y/o un polímero del dímero de bajo peso molecular de para-cloro-xilileno (ParyleneTM C; Speciality Coating Systems (Indianápolis)), con el fin de mejorar la adherencia de capas de polímero posteriores. También se puede incluir una capa de revestimiento superior para mejorar la biocompatibilidad, proteger contra la delaminación y/o reducir las velocidades iniciales de elución de fármacos para proporcionar tiempos de elución más largos.

El documento US2005/0037052 (Medtronic Vascular, Inc.) divulga las endoprótesis vasculares de elución de fármacos que tienen revestimientos de entre 1 μm y 1000 μm de espesor. En una configuración, el revestimiento que contiene fármaco se aplica directamente a la superficie del dispositivo o sobre una capa de imprimación polimérica tal como parileno. Dependiendo de la velocidad de solubilidad y del perfil deseado, el fármaco es completamente soluble dentro de la matriz polimérica, o se dispersa uniformemente en todas partes. La concentración de fármaco presente en la matriz polimérica varía del 0,1 % en peso al 80 % en peso. En otra configuración, se aplica una barrera polimérica sin fármaco, o una capa protectora sobre el revestimiento que contiene el fármaco. El recubrimiento que contiene el fármaco sirve como depósito de fármaco. Generalmente, la concentración de fármaco presente en el depósito varía de aproximadamente el 0,1 % en peso hasta tanto como el 100 %. El revestimiento de barrera participa en el control de las velocidades de liberación del fármaco en al menos tres formas. En primer lugar, si la capa de barrera tiene una constante de solubilidad diferente del revestimiento que contiene el fármaco subyacente, la difusividad del fármaco a través de la capa de barrera se regula en función de los factores de solubilidad del revestimiento de barrera. Cuanto más miscible está el fármaco en la capa de barrera, más rápido se eluirá de la superficie del dispositivo y viceversa. Esta configuración de revestimiento se denomina comúnmente recubrimiento de depósito. En segundo lugar, el revestimiento de barrera puede comprender una red porosa donde el revestimiento actúa como un tamiz molecular. Cuanto más grandes sean los poros en relación con el tamaño del fármaco, más rápido se eluirá el fármaco. Además, las interacciones intramoleculares también determinarán las velocidades de elución. Por último, aunque el grosor del revestimiento es generalmente un factor menor en la determinación de las velocidades de liberación del fármaco totales y del perfil, es sin embargo un factor adicional que puede usarse para ajustar los revestimientos. Básicamente, si todos los demás factores físicos y químicos permanecen sin cambios, la velocidad a la que un fármaco dado se difunde a través de un revestimiento dado es inversamente proporcional al espesor del revestimiento. Es posible utilizar los revestimientos de liberación controlada descritos en el documento US2005/0037052 con una capa protectora. Por ejemplo, el documento US2005/0037052 divulga una endoprótesis vascular metálica que tiene una capa de imprimación de parileno aplicada a su superficie de metal desnudo. Sobre la capa de imprimación se aplica un revestimiento polimérico liberador de fármaco o una mezcla de polímeros. Sobre el recubrimiento que contiene el fármaco se aplica una capa protectora de polímero. La capa protectora puede servir opcionalmente como una barrera de difusión para controlar adicionalmente la liberación del fármaco, o proporcionar un fármaco separado. La capa protectora puede ser simplemente un polímero biocompatible aplicado a la superficie de la endoprótesis vascular para proteger la endoprótesis vascular y no tiene ningún efecto sobre las velocidades de elución. El documento US2005/0037052 también divulga procedimientos para revestir una endoprótesis vascular con las diversas composiciones poliméricas.

Cuando se usa un polímero en el recubrimiento, puede ser un polímero duradero o un polímero biodegradable. El polímero puede seleccionarse entre poliuretanos, polietilentereftalato, copolímero de PLLA-ácido poliglicólico (PGA) (PLGA), polímeros y copolímeros de policaprolactona, polialcanoato tales como copolímero de poli(hidroxibutirato/hidroxivalerato), poli(vinilpirrolidona), politetrafluoroetileno, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(éteruretano-urea), siliconas, acrílicos, epóxidos, poliésteres, uretanos, parlenos, polímeros de polifosfazeno, fluoropolímeros, poliamidas, poliolefinas y mezclas de los mismos.

La endoprótesis vascular puede además recubrirse con una capa de un material antitrombótico que comprende o consiste en uno o más agentes seleccionados entre polisacáridos, heparina, gelatina, colágeno, alginato, ácido hialurónico, ácido alginico, carragenano, condroitina, pectina, quitosano, y sus derivados y copolímeros. Adecuadamente, estos agentes pueden incorporarse en una capa superior biocompatible, como se describe en el documento US 2006/0083772.

Las endoprótesis vasculares de elución de fármacos adecuados pueden prepararse usando los procedimientos de recubrimiento y los materiales descritos anteriormente. Pueden realizarse ensayos *in vitro* para evaluar los perfiles de liberación de fármacos en medio acuoso, como se describe en los documentos US2005/0037052 y US 2006/0083772. De manera adecuada, una endoprótesis vascular de elución de fármacos de acuerdo con el quinto aspecto de la invención deber liberar la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma durante un periodo de al menos 1 día, al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 5 días, 10 días, 20 días, 30 días, 40 días, 50 días, 60 días, 70 días, 80 días, 90 días o incluso 100 o 150 días después del despliegue. De manera adecuada, no se libera más del 60 %, 70 %, 80 % o el 90 % en el primer tercio del período durante el cual la endoprótesis vascular libera la Anexina A5 o su análogo funcional o variante.

Una cantidad adecuada de Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma puede estar en el intervalo de aproximadamente un microgramo a aproximadamente 10 miligramos (mg) de agente bioactivo por cm² del área superficial eficaz del dispositivo, y típicamente entre aproximadamente 5 µg y aproximadamente 10 mg, más típicamente entre aproximadamente 1 µg y aproximadamente 1 mg. En Vogt *et al.*, anteriormente, la endoprótesis vascular tenía un área superficial de 87 mm² y contenía 170 µg de paclitaxel.

También se divulga en el presente documento un procedimiento para fabricar una endoprótesis vascular para administrar Anexina A5 o un análogo funcional o una variante del mismo a un paciente, que comprende incorporar Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma en o sobre un cuerpo de endoprótesis vascular. Se describen procedimientos adecuados para incorporar un fármaco en o sobre un cuerpo de endoprótesis vascular en Blindt *et al.* (1999) Int J Artif Organs 22: 843-853, los documentos US2005/0037052 y US 2006/0083772.

El procedimiento para fabricar una endoprótesis vascular puede comprender a) proporcionar un cuerpo de endoprótesis vascular que tiene una superficie, y b) aplicar un recubrimiento sobre al menos una porción de dicha superficie, en el que dicho recubrimiento comprende Anexina A5 o un análogo funcional o una variante de la misma. Adecuadamente, la superficie luminal, o la superficie transluminal o ambas superficies están recubiertas. Se describen procedimientos de recubrimiento de un cuerpo de endoprótesis vascular, y composiciones de revestimiento adecuadas en los documentos US2005/0037052 y US 2006/0083772. Pueden emplearse procedimientos conocidos en la técnica tales como inmersión, pulverización, deposición por ultrasonidos o por vacío para aplicar un revestimiento de una solución de un material en un disolvente adecuado. El documento US2005/0037052 describe que un gradiente de porosidad en el recubrimiento se puede lograr por separación de fases, tal como por adición de un no disolvente a la solución polimérica. Cuanto mayor sea la cantidad de no disolvente, mayor será el grado de separación de fase y mayor será la porosidad en la película. La capa próxima a la superficie de la endoprótesis vascular puede formularse con la mayor cantidad de no disolvente para exhibir la mayor porosidad. A continuación se pueden formular capas sucesivas de soluciones de fármaco-polímero con cantidades decrecientes de no disolvente que proporcionarán un sistema de recubrimiento con una porosidad progresivamente más baja.

El procedimiento para fabricar una endoprótesis vascular puede comprender el moldeo de una endoprótesis vascular a partir de una composición que comprende un polímero y Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma. Un procedimiento para moldear una endoprótesis vascular a partir de una mezcla de un polímero y un compuesto de fármaco se divulga en Blindt *et al.* (1999) Int J Artif Organs 22: 843-853.

La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma en referencia a respecto a cualquiera de los aspectos primero a quinto de la invención se selecciona de:

a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);

b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;

c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neointima;

d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de la neointima y que es más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, tal como más del 80 %, 85 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % o 99 % idéntica a la anexina humana A5, SEQ ID NO:1;

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

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

En realizaciones particulares, el análogo funcional o variante de la Anexina A5 de acuerdo con la invención es más del 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, tal como más del 80 %, 85 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % o del 99 % idéntica a la Anexina humana A5, SEQ ID NO:1.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina como se indica a continuación. En primer lugar, se compara una secuencia de aminoácidos con, por ejemplo, la SEQ ID NO:1 utilizando el programa BLAST 2 Sequences (BI2seq) de la versión autónoma de BLASTZ que contiene BLASTN versión 2.0.14 y BLASTP versión 2.0.14. Esta versión autónoma de BLASTZ se puede obtener en el sitio web del Centro Nacional de

Información sobre Biotecnología del gobierno de Estados Unidos en ncbi.nlm.nih.gov. Las instrucciones que explican cómo usar el programa BL2seq se pueden encontrar en el archivo léeme que acompaña a BLASTZ. BL2seq realiza una comparación entre dos secuencias de aminoácidos utilizando el algoritmo BLASTP. Para comparar dos secuencias de aminoácidos, las opciones de BL2seq se ajustan como se indica a continuación: -i se ajusta a un archivo que contiene la primera secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq1.txt); -j se establece en un archivo que contiene la segunda secuencia de aminoácidos a comparar (por ejemplo, C:\seq2.txt); -p está configurado para blastp; -o se ajusta a cualquier nombre de archivo deseado (por ejemplo, C:\output.txt); y todas las demás opciones se dejan en su configuración predeterminada. Por ejemplo, se puede utilizar el siguiente comando para generar un archivo de salida que contenga una comparación entre dos secuencias de aminoácidos: C:\BL2seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt. Si las dos secuencias comparadas comparten homología, entonces el archivo de salida designado presentará aquellas regiones de homología como secuencias alineadas. Si las dos secuencias comparadas no comparten homología, entonces el archivo de salida designado no presentará secuencias alineadas. Una vez alineado, el número de coincidencias se determina contando el número de posiciones donde se presenta un nucleótido o residuo de aminoácido idéntico en ambas secuencias.

El porcentaje de identidad se determina dividiendo el número de coincidencias por la longitud de la secuencia expuesta en una secuencia identificada seguida de la multiplicación del valor resultante por 100. Por ejemplo, si se compara una secuencia con la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 (la longitud de la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1 es 320) y el número de coincidencias es 288, entonces la secuencia tiene un porcentaje de identidad de 90 (es decir, $288 \div 320 \times 100 = 90$) con respecto a la secuencia expuesta en la SEQ ID NO:1.

Por lo tanto, un análogo o variante funcional de Anexina A5 puede ser una proteína en la que en una o más posiciones ha habido inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, conservativas o no conservativas, con la condición de que dichos cambios produzcan una proteína cuyas propiedades básicas funcionen de manera equivalente a la Anexina A5 no se hayan modificado significativamente. "Significativamente" en este contexto significa que un experto en la técnica pretende significar que las propiedades de la variante pueden ser todavía diferentes pero no serán obvias sobre las de la proteína original.

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

Tales variantes pueden fabricarse usando los procedimientos de ingeniería de proteínas y mutagénesis dirigida a un sitio que se conocen bien en la técnica.

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

La PEGilación es un procedimiento bien conocido por los expertos en la técnica en el que se modifica un polipéptido o compuesto peptidomimético (para los fines de la presente invención, la Anexina A5 o el análogo funcional o variante) de manera que una o más moléculas de polietilenglicol (PEG) se unan covalentemente a la cadena lateral de uno o más aminoácidos o derivados de los mismos. Es una de las moléculas más importantes que alteran las técnicas de química estructural (MASC). Pueden utilizarse otras técnicas de MASC; dichas técnicas pueden mejorar las propiedades farmacodinámicas de la molécula, por ejemplo, prolongando su semivida *in vivo*. Se forma un conjugado de PEG-proteína activando primero el resto de PEG de manera que reaccione con, y se acople a, la proteína o compuesto peptidomimético de la invención. Los restos de PEG varían considerablemente en peso molecular y conformación, siendo los restos tempranos (PEG monofuncionales, mPEG) lineales con pesos moleculares de 12 kDa o menos, y siendo los restos posteriores de pesos moleculares aumentados. PEG2, una innovación reciente en tecnología PEG, implica el acoplamiento de un mPEG de 30 kDa (o menos) a un aminoácido de lisina (aunque la PEGilación puede extenderse a la adición de PEG a otros aminoácidos) que se hace reaccionar adicionalmente para formar una estructura ramificada que se comporta como un mPEG lineal de peso molecular mucho mayor (Kozlowski *et al.*, (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429). Los procedimientos que pueden usarse para unir covalentemente las moléculas de PEG a polipéptidos se describen adicionalmente en Roberts *et al.*, (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476, Bhadra *et al.*, (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29, Kozlowski *et al.*, (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224, y Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417 y las referencias a las que se hace referencia en los mismos.

Las ventajas de la PEGilación para el polipéptido o compuesto peptidomimético de la invención incluyen una depuración renal reducida que, para algunos productos, da como resultado una adsorción más sostenida después de la administración, así como una distribución restringida, conduciendo posiblemente a concentraciones plasmáticas más constantes y sostenidas y, por lo tanto, un aumento en la eficacia clínica (Harris *et al.*, (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551). Las ventajas adicionales pueden incluir la reducción de la inmunogenicidad del compuesto terapéutico (Reddy, (2001) *Ann Pharmacother* 34, 915 - 923), y una toxicidad inferior (Kozlowski *et al.*, (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429).

El análogo o variante funcional de Anexina A5 puede ser una proteína de fusión que comprende la secuencia de

Anexina A5 o una variante de la misma. Por lo tanto, por ejemplo, la Anexina A5 o una variante de la misma puede fusionarse con una o más secuencias de polipéptido de unión de fusión para prolongar la semivida de la molécula dentro del sistema circulatorio de un paciente y/o añadir funcionalidad adicional a la molécula.

Un análogo "funcional" o variante de Anexina A5 puede ser capaz de unirse a fosfatidilserina en una membrana biológica, preferiblemente a un nivel que sea al menos el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente el 100 % del mostrado por la Anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1) en las mismas condiciones. Un procedimiento adecuado para medir la unión de Anexina A5 a fosfatidilserina en una membrana biológica es conocido en la técnica (Vermes, I., *et al.*, A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods, 1995. 184(1): pág. 39-51).

Un análogo "funcional" o variante de la Anexina A5 puede, adicionalmente o como alternativa, poseer al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente un 100 % de la actividad terapéutica de Anexina A5 humana (SEQ ID NO: 1) cuando se usa con la misma dosificación (es decir, equivalente molar), para profilaxis o tratamiento de reestenosis de acuerdo con el primer aspecto de la invención. En este contexto, se puede determinar la actividad terapéutica de un análogo "funcional" o variante de Anexina A5, en comparación con la de Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1), comparando la capacidad de una cantidad molar equivalente del análogo funcional o variante y de la Anexina A5 humana para tratar o proporcionar profilaxis para la reestenosis como se ha descrito anteriormente, y/o mediante ensayos en animales, tal como utilizando la metodología expuesta en los siguientes ejemplos.

Un ensayo adecuado es como se indica a continuación: 1. Mantener los ratones ApoE*3 Leiden en una dieta ligeramente hipercolesterolémica durante 3 semanas antes de la cirugía; 2. un día antes de la cirugía y para el resto del procedimiento, tratar a los ratones por inyección intraperitoneal de 1 mg/kg de pc/día de Anexina A5, o una cantidad de equivalente molar del análogo funcional o variante de la Anexina A5, o vehículo en solitario; 3. Aplicar un manguito a la vena femoral con un tubo de polietileno de calibre fino no constrictivo; 4. Sacrificar a los ratones tres días después de la colocación del manguito, y examinar la composición vascular en la lesión arterial. 5. Comparar los resultados obtenidos en los ratones tratados con Anexina A5 con los tratados con el análogo funcional o variante de Anexina A5 y los ratones no tratados. Los parámetros relevantes son: la capacidad del tratamiento con el análogo o variante de la Anexina A5 para reducir el porcentaje de células unidas al endotelio identificables como leucocitos, en comparación con el grupo no tratado; la capacidad del tratamiento con el análogo o variante de la anexina A5 para reducir el porcentaje de células en los medios identificables como leucocitos, en comparación con el grupo no tratado. En cualquier caso, el análogo o variante de anexina A5 puede tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente un 100 % del efecto de la Anexina A5 en la reducción de cualquiera o ambos de estos efectos.

Otro ensayo adecuado es como se indica a continuación: 1. Mantener los ratones ApoE*3 Leiden en una dieta rica en grasas durante 3 semanas antes de la cirugía; 2. Un día antes de la cirugía, o el día de la cirugía, y durante el resto del procedimiento, tratar los ratones por inyección intraperitoneal de 1 mg/kg de pc/día de Anexina A5, o una cantidad de equivalente molar del análogo funcional o variante de la Anexina A5, o vehículo en solitario; 3. Injertar la vena cava inferior de un hermano de camada en la arteria carótida común; 4. Sacrificar los ratones 28 días después del injerto venoso, y examinar la composición vascular y las dimensiones del injerto de vena. 5. Comparar los resultados obtenidos en los ratones tratados con Anexina A5 con los tratados con el análogo funcional o variante de Anexina A5 y los ratones no tratados. Los parámetros relevantes son: la capacidad del tratamiento con el análogo o variante de la anexina A5 para reducir el número de leucocitos en la pared del injerto de vena, en comparación con el grupo no tratado; la capacidad del tratamiento con el análogo o variante de anexina A5 para reducir el engrosamiento del injerto venoso, es decir, el área de la neoíntima de sección transversal longitudinal, en comparación con el grupo no tratado. En cualquier caso, el análogo o variante de anexina A5 puede tener al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 % o aproximadamente un 100 % del efecto de la Anexina A5 en la reducción de cualquiera o ambos de estos efectos.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones particulares de la invención.

Ejemplo 1: Modelo de injerto de vena de ratón

En un modelo de ratón de CABG se toma un injerto de vena de un ratón donante. En un ratón receptor, una arteria carótida se libera del tejido circundante, y el flujo sanguíneo se detiene mediante la colocación de dos pinzas arteriales. A continuación, el vaso se secciona entre las dos pinzas arteriales y el injerto venoso se sutura para encajar entre los dos extremos de arteria. Cuando se termina este procedimiento, se retiran las pinzas y se restaura el flujo sanguíneo. Se publica una descripción detallada del procedimiento (Zou *et al.*, 1998)

Una vez transcurridas 4 semanas, se ha formado una neoíntima en el injerto de vena. La dimensión de la neoíntima se mide histológicamente después de la terminación de los ratones. Si los ratones utilizados son hiperlipidémicos, por ejemplo, ApoE (-/-) a los que se les administra una dieta con alto contenido en grasa o ratones apoE*3-Leiden

que también reciben una dieta rica en grasas, la neointima se desarrollará más rápidamente que en ratones normales. En tales ratones, las lesiones pueden alcanzar un estado tan grave que se puede observar evidencia de erosión endotelial, hemorragia intraplaca y diseminación, es decir, consecuencias similares que pueden producirse en los pacientes.

- 5 Las dimensiones de la neointima en injertos de vena de ratón pueden reducirse significativamente mediante tratamiento con Anexina A5. Una inyección diaria de 1 mg de Anexina A5/kg de pc por vía intraperitoneal reducirá la neointima en al menos el 20 %, mostrando la eficacia del tratamiento.

Ejemplo 2: Modelo de manguito perivascular de ratón

- 10 Un manguito colocado alrededor de la arteria femoral de un ratón conducirá al rápido desarrollo de una neointima. Este modelo se ha utilizado como modelo de la formación neointima causada por la PCI, y se ha utilizado para evaluar los efectos de los fármacos anti-reestenóticos (Pires *et al.*, 2006). Las lesiones neointimales contendrán células musculares lisas, pero también habrá reclutamiento de células blancas circulantes en las lesiones, especialmente si el procedimiento se realiza en ratones hiperlipidémicos. El desarrollo de las lesiones es rápido, y una lesión significativa se observa ya dentro de una semana.
- 15 Las dimensiones de la neointima en injertos de vena de ratón pueden reducirse significativamente mediante tratamiento con Anexina A5 y/o el porcentaje del número total de células unidas al endotelio y/o presentes en el medio que son identificables como leucocitos, tales como macrófagos, pueden disminuir significativamente. Una inyección diaria de 1 mg de Anexina A5/kg de peso corporal por vía intraperitoneal puede reducir la neointima en al menos un 20 %, mostrando la eficacia del tratamiento.
- 20 **Sumario.** Un efecto no deseado de las intervenciones quirúrgicas dirigidas a restablecer el flujo sanguíneo normal al tejido isquémico es la reestenosis del vaso que ha sido dilatado por PCI o en los vasos de injerto utilizados para derivar el segmento arterial estenosado. En modelos animales de reestenosis, se encontró sorprendentemente que la Anexina A5 redujo el desarrollo de la reestenosis.

Ejemplo 3: Modelo de manguito perivascular de ratón - resultados experimentales

- 25 La angioplastia con globo (con o sin colocación de endoprótesis vascular) es una manera común de restablecer el flujo sanguíneo a, por ejemplo, miocardio isquémico en pacientes con angina de pecho o infarto de miocardio. El procedimiento desencadena una inflamación en el segmento del vaso dilatado, que puede conducir a la reestenosis, es decir, el segmento del vaso dilatado se vuelve estenótico debido al desarrollo de una denominada neointima. Este fenómeno puede llevar a la necesidad de un procedimiento de vascularización repetida en como mucho el 30-50 % de los pacientes dentro de los 3 a 12 meses si no se coloca una endoprótesis vascular en el segmento del vaso dilatado. Una endoprótesis vascular de metal desnudo puede reducir la tasa de reestenosis, pero como mucho el 15-30 % puede necesitar revascularización dentro en 3 - 12 meses.

- 35 La colocación de un manguito de plástico perivascular alrededor de la arteria femoral en un ratón es un modelo experimental de una formación de neointima dirigida por inflamación, es decir, es un modelo de reestenosis. Se ensayó si la Anexina A5 podría afectar a la formación de neointima en este modelo.

Experimentos

- Los ratones ApoE*3 Leiden machos recibieron una dieta ligeramente hipercolesterolémica durante 3 semanas antes del procedimiento experimental, que continuó hasta el final del período experimental. Un día antes de la cirugía los ratones se asignaron al azar a uno de los grupos de tratamiento en base al colesterol plasmático, los niveles de triglicéridos y el peso corporal. El tratamiento con 1 mg/kg de pc/día de Anexina A5 (inyección intraperitoneal) se inició un día antes de la colocación del manguito y continuó diariamente durante el período experimental. El día 0 se realizó una cirugía, es decir, se colocó un manguito no constrictivo alrededor de cada arteria femoral de los ratones. Los ratones fueron sacrificados 3 días después de la colocación del manguito.

Procedimiento quirúrgico de colocación del manguito

- 45 Los ratones se anestesiaron antes de la cirugía mediante administración intraperitoneal de una combinación de midazolam (5 mg/kg, Roche, Woerden, Países Bajos), medetomidina (0,5 mg/kg, Orion, Espoo, Finlandia) y fentanilo (0,05 mg/kg, Janssen, Berchem, Bélgica). Este cóctel de anestésicos da narcosis completa durante al menos una hora. Después de afeitar el lado interno de ambas patas y desinfectar el área quirúrgica con alcohol (70 %) se realizó una incisión longitudinal de 1 cm en el lado interno de la pata. A continuación, se diseccionó una longitud de 3 mm de la arteria femoral libre del nervio femoral y de la vena femoral. La arteria femoral se enrolló con una ligadura de seda 6/0 (0,7 métrica B/BRAUN, Tuttlingen, Alemania) para una maniobra cuidadosa de la arteria. Se abrió longitudinalmente y se envolvió libremente alrededor de la arteria femoral una tubería de polietileno de calibre fino no restrictivo (Portex, Kent, Reino Unido, diámetro interior de 0,40 mm, diámetro exterior de 0,80 mm y una longitud aproximada de 2 mm). El manguito se cerró con dos nudos de ligadura de seda 6/0. La piel se cerró con una sutura continua. Después de la cirugía, la anestesia se antagonizó por vía subcutánea con Atipamezol y Flumazenil. Los animales se colocaron en una jaula limpia en la parte superior de una almohadilla calentadora

durante al menos 4 horas.

Sacrificio de los animales

Para el análisis histológico, los animales se sacrificaron 3 días después de la colocación del manguito. Después de la anestesia (midazolam/medetomidina/fentanilo) y el muestreo de sangre, se abrió el tórax y se realizó una perfusión a presión suave (100 mmHg) con formaldehído al 3,7 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) (peso/volumen) durante 5 minutos por punción en el ventrículo izquierdo. Después de la perfusión, se recogió la arteria femoral con manguito, se fijó durante la noche en formaldehído al 3,7 % en PBS (peso/volumen) y se incrustó en parafina. Se tomaron cortes transversales en serie (5 µm de espesor) de toda la longitud del segmento de la arteria femoral con manguito para el análisis histológico.

Muestreo de sangre

Se recogió sangre en tubos capilares de K₂EDTA (Microvette, Sarstedt, Alemania) de la cola (un día antes de la cirugía para la aleatorización) o por la vena cava (sacrificio). Los tubos capilares se mantuvieron frescos a 4 °C durante media hora seguido de centrifugación a 6000 RPM (1200 G) durante 10 minutos en una centrífuga enfriada a 4 °C. Posteriormente, el plasma se dividió en alícuotas para un análisis adicional. En el sacrificio, el plasma se dividió en alícuotas en tubos de polipropileno de 1,5 ml (Eppendorf), una muestra de 20 µl para el análisis de colesterol y triglicéridos y el resto del plasma para análisis de reserva. Las muestras se almacenaron a -80 °C.

Se determinaron los niveles de colesterol y triglicéridos totales en las muestras de plasma tomadas un día antes de la cirugía y en el sacrificio. El colesterol plasmático total se midió enzimáticamente con el kit 1489437 (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos) y las concentraciones totales de triglicéridos se midieron con el kit 148872 (Roche Diagnostics, Almere, Países Bajos).

Composición vascular

La composición vascular se analizó por inmunocitoquímica y análisis histomorfométrico con respecto al número de leucocitos (dilución de anticuerpos anti-CD45 1:200, Pharmingen, San Diego, Estados Unidos), monocitos y macrófagos (dilución de tinción de macrófagos AIA 31240 1:3000, Accurate Chemical, Wesbury, Estados Unidos) y las células que expresan el factor de necrosis tumoral alfa (dilución de tinción del factor de necrosis tumoral alfa 1:200, BioLegend, San Diego, CA, Estados Unidos) y la proteína quimiotáctica 1 de monocitos (dilución de tinción de proteína 1 quimiotáctica de monocitos 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, Estados Unidos) en las arterias femorales con manguito.

Resultados

Composición vascular de las lesiones de la arteria femoral con manguito

El porcentaje del número total de células unidas al endotelio identificadas como leucocitos disminuyó significativamente en un 71,3 % ($p = 0,015$) a $9,69 \pm 8,9$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($34,2 \pm 3,0$ %). El porcentaje del número total de células en el medio identificadas como leucocitos disminuyó significativamente en un 69,0 % ($p = 0,031$) a $6,1 \pm 2,6$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($19,55 \pm 4,6$ %) (figura 1).

Monocitos y macrófagos

El porcentaje del número total de células unidas al endotelio identificadas como macrófagos disminuyó significativamente en un 51,4 % ($p = 0,014$) a $11,9 \pm 2,3$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($24,5 \pm 3,5$ %). El porcentaje del número total de células en el medio identificadas como macrófagos disminuyó significativamente en un 87,3 % ($p = 0,018$) a $1,8 \pm 0,9$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($14,2 \pm 5,5$ %) (figura 2).

El porcentaje del número total de células unidas al endotelio identificadas como células que expresan MCP-1, tales como células inflamatorias y SMC disminuyó significativamente en un 31,0 % ($p = 0,003$) a $33,9 \pm 3,1$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($49,1 \pm 2,2$ %). El porcentaje del número total de células en el medio identificadas como células que expresan MCP-1 disminuyó significativamente en un 52,7 % ($p = 0,001$) a $14,7 \pm 2,8$ % en el grupo tratado con Anexina A5 recombinante humana en comparación con el grupo de vehículo ($31,1 \pm 1,8$ %) (figura 3). El número de células que expresan TNFα también se redujo significativamente en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo de control.

Conclusión

Estos experimentos demuestran claramente los efectos antiinflamatorios de la Anexina A5 en este modelo de enfermedad vascular inducida por inflamación. La inflamación (medida como acumulación de leucocitos en la pared del vaso) se inhibió notablemente por el tratamiento con Anexina A5. Además, la Anexina A5 también podría reducir

significativamente el número de células inflamatorias que se activaron, ya que menos células se tiñeron positivas para la citocina proinflamatoria MCP-1. Los resultados apoyan firmemente que la anexina A5 es un tratamiento eficaz para la prevención de la reestenosis después de la angioplastia con balón (con o sin colocación de endoprótesis vascular)

5 **Ejemplo 4: Modelo de injerto de vena de ratón - resultados experimentales**

El injerto venoso, la derivación de un segmento vascular estenosado, es un procedimiento para restablecer el flujo sanguíneo a un órgano que se ha vuelto isquémico. La aplicación más común es la colocación de un llamado injerto de revascularización aortocoronaria (CABG). Hoy en día este procedimiento es común para restablecer el flujo sanguíneo al miocardio isquémico en pacientes donde la ubicación de la estenosis no es adecuada para la intervención basada en catéter. Cuando se coloca un injerto de vena en la circulación arterial, su morfología adoptará la presión arterial más alta y los caudales sanguíneos en la circulación arterial. Aunque este procedimiento es eficaz, y ha rescatado a muchas personas con enfermedad coronaria, se asocia con un riesgo de reestenosis, un proceso en el que la vena injertada desarrolla una neointima que obstruirá el flujo sanguíneo. Se investigó si la Anexina A5 puede afectar la formación de neointima en un modelo de ratón de CABG. En este experimento, que tuvo una duración de 28 días, se usaron tanto Anexina A5 humana como murina. Esto se debe a que una proteína humana puede dar lugar a una reacción inmune no específica en ratones que podría enmascarar un posible efecto del tratamiento.

Experimentos

Los ratones ApoE*3 Leiden machos se alimentaron con una dieta rica en grasas y rica en colesterol para inducir hipercolesterolemia. La dieta contenía el 0,05 % de colato (para mejorar la absorción intestinal de colesterol y suprimir la síntesis de ácidos biliares, ambos conduciendo a niveles de colesterol plasmático aumentado) y el 1 % de colesterol (así como el 20 % de caseína, el 1 % de cloruro de colina, el 0,2 % de metionina y el 15 % de manteca de cacao, el 40,5 % de sacarosa, el 10 % de almidón de maíz, el 1 % de aceite de maíz, el 5,1 % de celulosa y el 5,1 % de mezcla mineral). Recibieron la dieta tres semanas antes de la cirugía y la dieta continuó durante todo el experimento. A los ratones se les dio agua potable que se acidificó a pH 2,8 con HCl. Todos los animales recibieron alimento y agua *ad libitum* durante todo el experimento.

Tratamiento

En este estudio se realizaron experimentos con tres grupos de tratamiento diferentes. Los grupos fueron los siguientes:

- 30 - Grupo control, vehículo receptor solamente (solución salina tamponada con fosfato (PBS)) y que se somete a cirugía de injerto venoso.
- Grupo de tratamiento I, sometido a cirugía de injerto venoso y que recibe Anexina A5 recombinante humana a una concentración de 1 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal, comenzando el día de la cirugía.
- 35 - Grupo de tratamiento II, sometido a cirugía de injerto venoso y que recibe Anexina A5 recombinante murina a una concentración de 1 mg/kg/día mediante inyección intraperitoneal, comenzando el día de la cirugía.

Procedimiento quirúrgico de injerto de vena

Los ratones se anestesiaron antes de la cirugía mediante administración intraperitoneal de una combinación de midazolam, medetomidina y fentanilo. Este cóctel de anestésicos da narcosis completa durante al menos una hora. Después de afeitar el área del cuello y desinfectar el área quirúrgica con alcohol (70 %) se realizó una incisión longitudinal de 1 cm en el lado frontal del cuello. La arteria carótida común derecha se diseccionó libre de su entorno desde la bifurcación en el extremo distal hacia el extremo proximal. El vaso se ligó dos veces con una ligadura de seda 8,0 (B/BRAUN, Tuttlingen, Alemania) y se diseccionó entre los lazos medios. Se colocó un manguito sobre ambos extremos después de lo cual se extravasaron los manguitos y se ligaron con una ligadura de seda de 8,0. Los hermanos de camada se usaron como donantes para la vena cava inferior. La vena cava inferior cuidadosamente cosechada se conservó temporalmente en una solución de NaCl al 0,9 %, que contenía 100 U/ml de heparina a 4 °C, para prevenir la coagulación y se interpuso entre los extremos de la arteria. Las conexiones se ligaron junto con una sutura de seda 8,0. Las pulsaciones confirmaron el éxito del injerto. Después de la cirugía, la anestesia se antagonizó por vía subcutánea con Atipamezol (2,5 mg/kg, Roche, Woerden, Países Bajos) y Flumazenil (0,5 mg/kg Orion, Espoo, Finlandia). Los animales se colocaron en una jaula limpia en la parte superior de una almohadilla calentadora durante al menos 4 horas.

Sacrificio de los animales

El sacrificio se realizó como se describe en el Ejemplo 3, excepto que el injerto de vena, en lugar de la arteria con manguito, se recogió, se fijó, se seccionó y se tiñó.

Muestreo de sangre

Se realizaron un muestreo de sangre y análisis de colesterol y triglicéridos totales como se describe en el Ejemplo 3.

Análisis del engrosamiento de injerto venoso

5 El engrosamiento de injerto de vena se cuantificó utilizando 6 secciones en serie de cortes perpendiculares igualmente espaciados del injerto de vena.

Leucocitos

La composición vascular se analizó por inmunocitoquímica y análisis histomorfométrico. Los leucocitos se identificaron por reactividad contra anticuerpos anti-CD45 (Pharmingen, San Diego, Estados Unidos) y se cuantificaron como el número de células positivas por campo de alta potencia.

10 Resultados**Engrosamiento de injerto de vena**

15 Para estudiar el papel de la Anexina A5 en el engrosamiento de injerto de vena, la Anexina A5 recombinante humana o murina (1 mg/kg, disuelta en 150 µl de vehículo) se administró a diario a través de inyección intraperitoneal a los diferentes grupos (n = 10 ratones por grupo). Se usó un grupo de vehículo en solitario como grupo de control (n = 10 ratones). Se cuantificó el engrosamiento de injerto de vena medio, mediante la medición del área entre el lumen y la adventicia, para cada grupo 28 días después de la cirugía. El engrosamiento de injerto de vena se disminuyó significativamente en un 48 % con respecto a $0,13 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ (p = 0,006) y en un 40 % con respecto a $0,15 \pm 0,01 \text{ mm}^2$ (p = 0,018) en grupos tratados con anexina A5 recombinante humana y murina, en comparación con el grupo de vehículo ($0,25 \pm 0,05 \text{ mm}^2$) (figura 4).

20 Se observó un área luminal mayor en los grupos tratados con anexina A5 recombinante humana ($0,44 \pm 0,03 \text{ mm}^2$, p = 0,126) y murina ($0,41 \pm 0,04 \text{ mm}^2$, p = 0,886), en comparación con el grupo de vehículo ($0,38 \pm 0,03 \text{ mm}^2$).

Leucocitos

25 El número de leucocitos en la pared del injerto de la vena se contó después de 28 días como marcador de inflamación y dio como resultado una disminución significativa en el número de leucocitos del 45,8 % en la anexina A5 recombinante humana ($28,8 \pm 2,3$ células, p = 0,003) y del 41,8 % en los grupos tratados con Anexina A5 murina recombinante ($30,9 \pm 3,0$ células, p = 0,025) en comparación con el grupo vehículo ($53,1 \pm 6,1$ células) (figura 5).

Conclusión

30 El rápido desarrollo de una neoíntima en injertos venosos es un problema clínico que da como resultado reestenosis, es decir, el lumen de la vena injertada se reduce y el flujo sanguíneo queda restringido. Este estudio demuestra claramente que el tratamiento con Anexina A5, utilizando la Anexina A5 humana o murina, redujo eficazmente el crecimiento de la neoíntima en los injertos venosos y evitó el estrechamiento del lumen. El rápido desarrollo de una neoíntima es un proceso impulsado por la inflamación, y es probable que los efectos beneficiosos de la Anexina A5 estuvieran vinculados a los efectos antiinflamatorios del tratamiento (observado como una reducción en la acumulación de leucocitos en los injertos, y como se muestra en ejemplo 3). Tanto la anexina A5 humana como la
35 murina proporcionaron resultados similares, mostrando que la Anexina A5 humana no desencadenó ninguna reacción inmunitaria no específica en los ratones que pudiera haber enmascarado los efectos del tratamiento. Los resultados apoyan firmemente que la Anexina A5 es un tratamiento eficaz para la prevención de la reestenosis del injerto venoso.

40 Todas las composiciones y/o procedimientos desvelados y reivindicados en el presente documento pueden fabricarse y ejecutarse sin experimentación excesiva a la luz de la presente divulgación.

Referencias

PCT Appln. WO 02/067857

PCT Appln. WO 2005/099744

US 6,602,282 (Assignee Avantec Vascular Corporation).

45 WO 99/17680 (Localmed Inc).

U.S. Pat. No. 5,922,020 (Localmed Inc).

US 2006/0083772 (DeWitt *et al.*)

US2005/0037052 (Medtronic Vascular, Inc.)

- Bhadra *et al.*, (2002) *Pharmazie* 57, 5 - 29
- Blindt *et al.* (1999) *Int J Artif Organs* 22: 843-853
- Bravata *et al.*, *Ann. Intern. Med.*, 147(10):703-716, 2007.
- Cederholm and Frostegard, *Ann. NYAcad. Sci.*, 1108:96-103, 2007.
- 5 Cederholm *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 25(1):198-203, 2005.
- Harris *et al.*, (2001) *Clin Pharmacokinet* 40, 539 - 551
- Hirata *et al.* (2006) *J Amer. Soc. Echocardiography* 19:165-191
- Holte *et al.* (2007) *Cardiovascular ultrasound* 5: 33
- Jasti *et al.* (2004) *Circulation* 110: 2831-2836
- 10 Kozlowski *et al.*, (2001) *J Control Release* 72, 217 - 224
- Kozlowski *et al.*, (2001), *Biodrugs* 15, 419 - 429
- Motwani and Topol, *Circulation*, 97(9):916-931, 1998.
- Ong and Serruys (2005) *Curr Issues Cardiol* 32: 372-377
- Pires *et al.*, *Vascul. Pharmacol.*, 44(5):257-264, 2006.
- 15 Rand, J. *Autoimmun.*, 15(2):107-111, 2000.
- Reddy, (2001) *Ann Pharmacother* 34, 915 - 923
- Roberts *et al.*, (2002) *Adv Drug Deliv Rev*, 54, 459 - 476
- Shen *et al.*, *Am. J. Transplant.*, 7(11):2463-2471, 2007.
- Smith Jr., *et al.*, *J. Am. Coll. Cardiol.*, 47(1):216-235, 2006.
- 20 Teoh *et al.*, *Gastroenterology*, 133(2):632-646, 2007.
- Thiagarajan and Benedict, *Circulation*, 96(7):2339-2347, 1997.
- Vermes, I., *et al.*, *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin*
- V. J Immunol Methods*, 1995. 184(1): p. 39-51
- 25 Veronese (2001) *Biomaterials* 22, 405 - 417
- Vogt *et al.* (2004) *European Heart Journal* 25: 1330-40.
- Zhang *et al.*, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 24(12):2277-2283, 2004.
- Zou *et al.*, *Am. J. Pathol.*, 153(4):1301-1310, 1998.

Lista de secuencias

- 30 <210> 1
- <211> 320
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- 35 <221> misc_feature
- <223> Anexina humana A5
- <400> 1

ES 2 630 013 T3

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

ES 2 630 013 T3

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

REIVINDICACIONES

- 1.- Una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma para su uso en la profilaxis o tratamiento de reestenosis en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:
 - a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
 - 5 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
 - c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
 - d) un análogo funcional de Anexina A5 que es una proteína que reduce la formación de neoíntima y que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más de 95 % idéntica a la Anexina A5 humana, SEQ ID NO:1;
 - 10 e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
- 2.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la reestenosis esta asociada a un injerto de derivación.
- 3.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la reestenosis está asociada a una intervención basada en catéter.
- 15 4.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la reestenosis está asociada a la implantación de una endoprótesis vascular.
- 5.- Uso de una Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma en la fabricación de un medicamento para la profilaxis o tratamiento de reestenosis, en el que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:
 - a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
 - b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
 - c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
 - 25 d) un análogo funcional de Anexina A5 que reduce la formación de neoíntima y que es una proteína que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % idéntica a la Anexina humana A5, SEQ ID NO:1;
 - e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
- 6.- Una Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso en el tratamiento de estenosis en un paciente, en la que el paciente se somete a una intervención para el tratamiento de estenosis y la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención, en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:
 - a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
 - b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
 - 35 c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
 - d) un análogo funcional de Anexina A5 que reduce la formación de neoíntima y que es una proteína que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % idéntica a la Anexina humana A5, SEQ ID NO:1;
 - e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - 40 f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
- 7.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la intervención para el tratamiento de estenosis es una intervención quirúrgica, tal como injerto de derivación.
- 8.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la intervención para el tratamiento de estenosis es una intervención basada en catéter, tal como una

angioplastia con balón con o sin implantación de una endoprótesis vascular y con o sin aterectomía.

- 5 9.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, 6, 7 u 8, en la que la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración por vía parenteral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea o para su administración por vía local desde una endoprótesis vascular de elución de fármaco.
- 10.- La Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 o 6 a 9, en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con un producto terapéutico trombolítico tal como aspirina, clopidogrel, triclopídina, activador del plasminógeno tisular, urocinasa, o una enzima bacteriana.
- 10 11.- Uso de una Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de estenosis en un paciente, en la que el paciente se somete a una intervención para el tratamiento de estenosis y la Anexina A5 o análogo funcional o variante de la misma es para su administración junto con la intervención, en la que la Anexina A5 o el análogo funcional o variante de la misma se selecciona entre:
 - a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
 - 15 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
 - c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
 - d) un análogo funcional de Anexina A5 que reduce la formación de neoíntima y que es una proteína que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % idéntica a la Anexina humana A5, SEQ ID NO:1;
 - 20 e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).
- 12.- Una endoprótesis de liberación de fármaco para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fármaco es Anexina A5 o un análogo funcional o variante de la misma, seleccionado de:
 - a) Anexina humana A5 (SEQ ID NO:1);
 - 25 b) un ortólogo de mamífero de Anexina humana A5;
 - c) una variante alélica o genética de a) o b) que reduce la formación de neoíntima;
 - d) un análogo funcional de Anexina A5 que reduce la formación de neoíntima y que es una proteína que es más del 50 %, más del 75 %, tal como más del 80 %, más del 90 %, o incluso más preferiblemente más del 95 % idéntica a la Anexina humana A5, SEQ ID NO:1;
 - 30 e) un dímero de, o una proteína de fusión que comprende, cualquiera de a), b), c) o d); y
 - f) una variante PEGilada de cualquiera de a), b), c), d) o e).

Figura 1

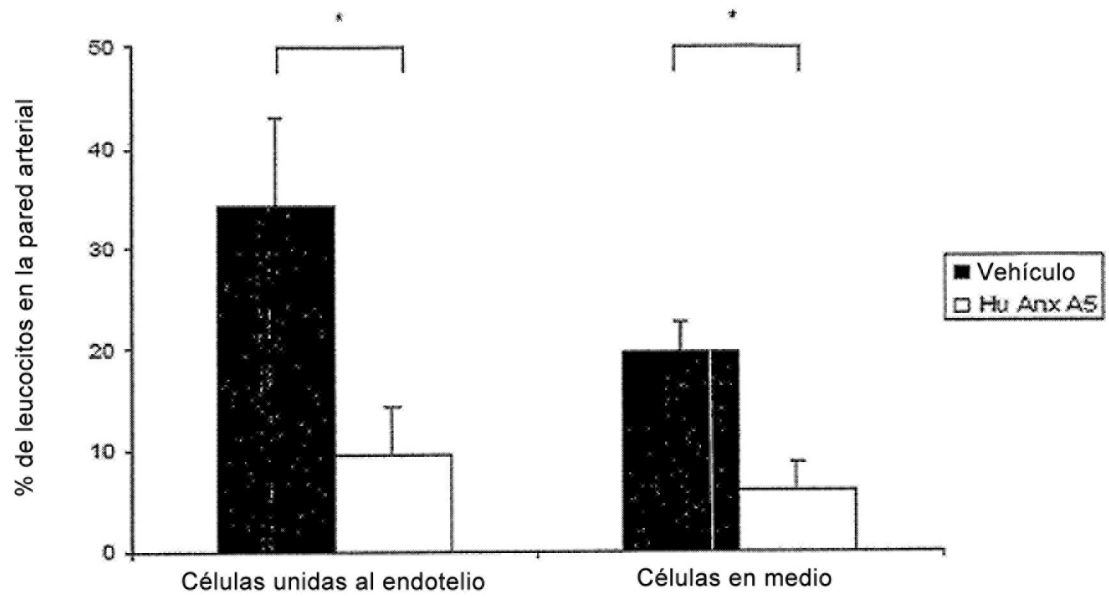


Figura 2

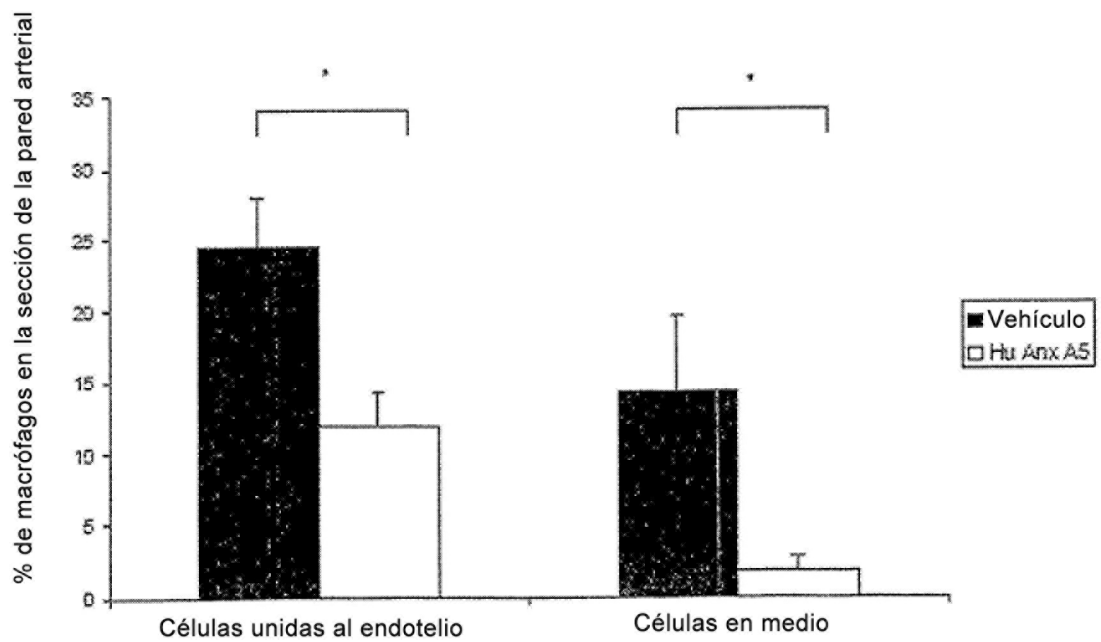


Figura 3

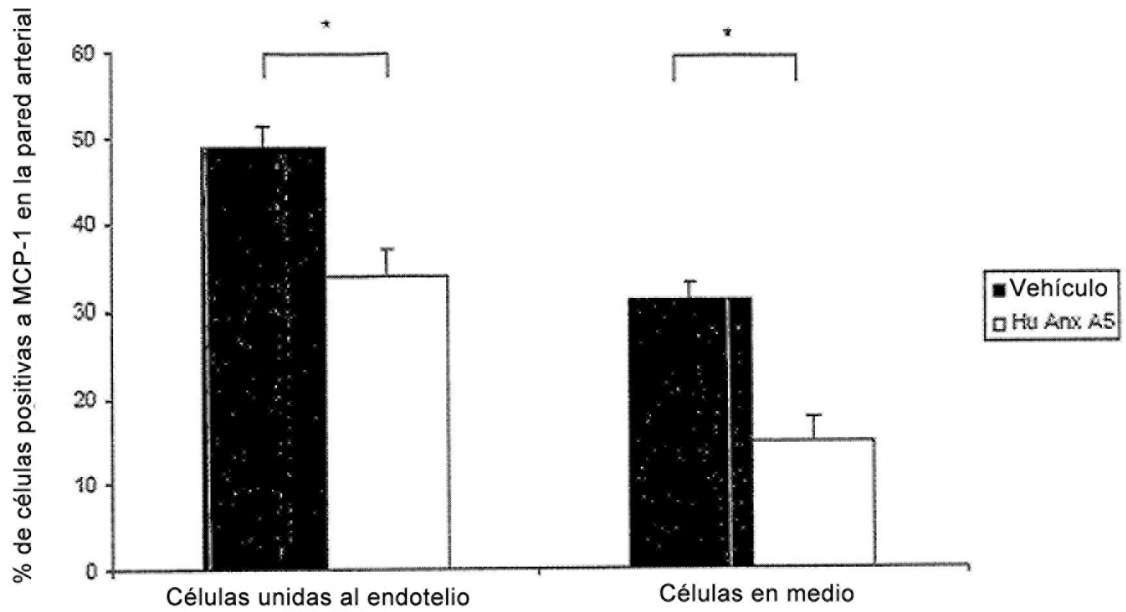


Figura 4

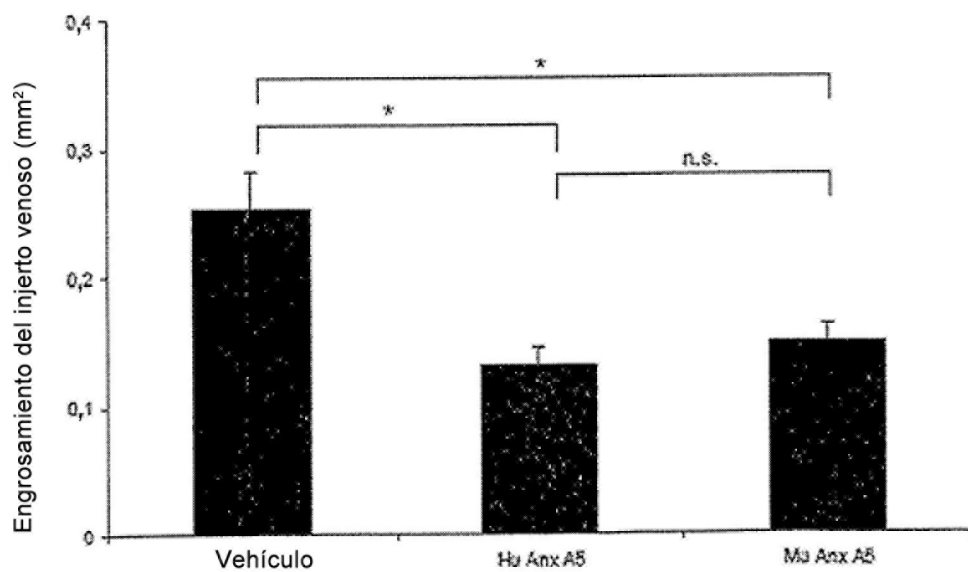


Figura 5

