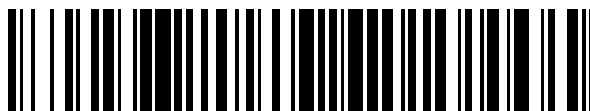


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 638 919**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 51/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.08.2011** **PCT/CN2011/001449**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.09.2012** **WO12126157**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.08.2011** **E 11835310 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.05.2017** **EP 2687539**

54 Título: **Variante de la anexina V y preparación y uso de la misma**

30 Prioridad:

24.03.2011 CN 201110072451

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

24.10.2017

73 Titular/es:

**TARGETPHARMA LABORATORIES
(CHANGZHOU) CO., LTD (100.0%)
Changzhou Science City Science Hall, Room
2204 ChangWu Road, No 801, Jiangsu Province
Changzhou 213164, CN**

72 Inventor/es:

**HUA, ZICHUN y
HU, MINJIN**

74 Agente/Representante:

FORTEA LAGUNA, Juan José

ES 2 638 919 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

Variante de la anexina V y preparación y uso de la misma

5 Campo de la invención

La invención pertenece al campo de la ingeniería genética y la biotecnología, se refiere a una variante de la anexina V, a la preparación de la variante de la anexina V y al uso de la misma en la detección o monitorización de la apoptosis.

10 Antecedentes de la invención

La anexina V pertenece a la familia de las anexinas, que es un grupo de proteínas que están altamente conservadas en la evolución, y tiene la propiedad de unirse al Ca^{2+} y a ésteres fosfato. Estructuralmente son homólogas y se consideran elementos unidos a la membrana regulados por Ca^{2+} . La misma función de la familia de anexinas es, en presencia de Ca^{2+} , alta afinidad por moléculas de éster fosfato ácidas. La familia de anexinas se encuentra en eucariotas superiores e inferiores. Los miembros de las anexinas existen en muchos tipos variados de células y sus efectos bioquímicos están estrechamente relacionados con propiedades inmunológicas, tales como una función en la anticoagulación, y el proceso antiinflamatorio, especialmente en los procesos de replicación, diferenciación y exocitosis celular (Iwasaki A, Suda M, Nakao H, et al, Biochem., 1987, 10: 1261; Pollard H B, Haigler H T, Biol Chem, 1990, 265: 21207). La función biológica de los miembros de la familia también necesita estudios adicionales. Aunque todavía no se entiende muy bien la función *in vivo* de los miembros, generalmente se piensa que la actividad de unión de la anexina con el fosfato es la base de la actividad de la familia de las anexinas *in vitro* y se refiere a sus propiedades fisiológicas.

En la actualidad, las principales aplicaciones de la anexina V son la detección de la apoptosis. La apoptosis, que también se denomina muerte celular programada (MCP), es una parte importante del ciclo vital de la célula y es un proceso de muerte celular regulado por genes diferente del proceso de necrosis y muerte accidental. La apoptosis celular es una forma importante de ajustar y mantener el equilibrio relativo del organismo y también está estrechamente relacionada con diversas patologías. En el proceso de desarrollo de tumores y lesión de isquemia cerebral y miocárdica por reperusión y radioterapia y quimioterapia y el rechazo a trasplante de órganos se pueden encontrar cambios en la apoptosis celular. La apoptosis celular es un proceso de muerte celular programada en el que las células participan activamente e implica una serie de cambios en las moléculas biológicas y la morfología celular; en el que, cuando se produce apoptosis, la fosfatidilserina (PS) se da la vuelta y se expone al exterior de la membrana celular (Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. J Immunol, 1992, 148(7): 2207-2216). Es un acontecimiento temprano en la apoptosis que se produce antes de los cambios morfológicos de las células apoptóticas (Narula J, Strauss HW, 2003, J Nucl Med, 44(3):397-399) y es también el acontecimiento inicial de la reacción en cascada de la apoptosis. Como signo de la reorganización de las células apoptóticas por los fagocitos, conduce además a la contracción del citoplasma, a la concentración de la cromatina y a la degradación del ADN nuclear, etc. Por lo tanto, la PS dada la vuelta es el objetivo de detección en primera fila de aplicación más estudiado, más prometedora y más factible para la apoptosis, que puede detectar tempranamente la apoptosis con mucha precisión, (Bold RJ, Termuhlen PM, McConkey DJ, Surg Oncol, 1997, 6(3):133-142). Tanto aquí como en el extranjero es rutinario el uso de fármacos en combinación con la detección específica de PS de la apoptosis.

Debido a su afinidad específica por la PS (Meers P, Mealy T. Biochemistry, 1993, 32(43): 11711-11721), la anexina V se une específicamente a la superficie de la célula que está en el proceso apoptótico, de modo que la anexina V puede usarse para la detección de células apoptóticas después de marcar con proteína fluorescente o material radioactivo. Este método es ampliamente utilizado en la investigación de la biología y la inmunología celular y molecular (Koopman G, Reutelingsperger C, Kuijten GA, et al. Blood, 1994, 84(5):1415-1420; Vermes I, Haanen C, Stevens-Nakken H, et al. J Immunol Methods, 1995, 184(1): 39-510; Zhang G, Gurtu V, Kain SR, et al. Biotechniques, 1997, 23(3): 525-531; Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, et al. J Thorac Cardiovasc Surg, 1998, 116(5): 844-853; Boldt A, Barten MJ, Weiss C, et al. Cytometry A, 2006, 69(3): 158-160). La anexina V marcada con fluoresceína (tal como FITC, PE, etc.) o biotina se utilizó como sonda para comprobar el fenómeno de la apoptosis mediante citometría de flujo o microscopia de fluorescencia y es un método de detección en laboratorio sensible, eficiente y maduro. Sin embargo, los especímenes clínicos, además de la sangre, deben detectarse mediante biopsia de tejido con traumatismo, y durante la realización, se produce fácilmente apoptosis y afecta a los resultados del análisis. Por tanto, la detección *in vivo* de apoptosis tiene que explorar nuevos métodos. Por ejemplo, la obtención de imágenes de la apoptosis *in vivo* con anexina V marcada con radionúclidos consigue obtención de imágenes de la apoptosis celular de forma no invasiva *in vivo* para monitorizar la apoptosis *in vivo* en tiempo real. Este tipo de obtención de imágenes de apoptosis ha realizado grandes progresos en el campo de la monitorización de la apoptosis celular *in vivo*. En la actualidad, las aplicaciones de la anexina V recombinante marcada con material radiactivo en la evaluación de la lesión isquémica, la respuesta de rechazo a aloinjertos y la evaluación del tratamiento de tumores con fármacos quimioterapéuticos todavía están en fase de experimentación clínica (Watanabe H, Murata Y, Miura M, et al. Nucl Med Commun, 2006, 27(1): 81-89; Blankenberg FG, Kalinyak J, Liu L, et al. Eur J Nucl Med Mol Imaging, 2006, 14: 1-9).

Aunque el marcaje de proteínas o polipéptidos con yodo radiactivo (* I) es sencillo, juicioso y puede conservar su actividad biológica, el suministro de ^{123}I y ^{124}I para la obtención de imágenes *in vivo* es difícil. El más conocido es la anexina V marcada con $^{99\text{m}}\text{Tc}$. La ventaja del $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es su semivida de 6 horas, de modo que se puede obtener una imagen temprana, además, la dosis para el paciente es menor y se puede obtener fácilmente de un generador de Mo/Tc. No obstante, el marcaje de la anexina V directamente con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ es difícil y la velocidad de marcaje es baja, y durante el proceso de marcaje se producirá algo de desnaturalización de proteínas, lo que afecta a la distribución de la radiactividad en el cuerpo que se está generando (Takei T, Kuge Y, Zhao S, et al. J Nucl Med, 2004, 45(12): 2083-2087). Por tanto el marcaje de la anexina V con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ se basa en el principio de marcaje indirecto. Los agentes quelantes bifuncionales de uso habitual incluyen N-1-imino-4-mercaptoputil(imino) (Kemerink GJ, Liem IH, Hofstra L, et al. J Nucl Med, 2001, 42(2): 382-387), etilendiaminacisteína (EC) (Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, et al. Cancer Biother Radiopharm, 2001, 16(1):73-83), dinitruro de disulfuro (N2S2, también conocido como BTAP) (Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, et al. Eur J Nucl Med, 2001, 28(9):1373-1378) etc., y el más habitual es hidrazinonicotinil (HYNIC), que se ha analizado clínicamente (Penn DL, Kim C, Zhang K, et al. Nucl Med Biol, 37(1): 29-34; Rottey S, Slegers G, Van Belle S, et al. J Nucl Med, 2006, 47(11): 1813-1818; Kartachova M, Haas RL, Olmos RA, et al. Radiother Oncol, 2004, 72(3): 333-339; Kemerink GJ, Liu X, Kieffer D, et al. J Nucl Med, 2003, 44(6): 947-952). Los comportamientos biológicos *in vivo* de los productos marcados preparados mediante diferentes agentes quelantes bifuncionales difieren considerablemente. Los productos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ preparados con imino tienen una mayor ingesta en el hígado, el riñón y el bazo, y tienen una semivida biológica relativamente larga *in vivo*; los productos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ preparados con N2S2(BTAP) tienen una mayor ingesta en el hígado, el riñón, el bazo y la parte inferior del abdomen; los productos marcados con $^{99\text{m}}\text{Tc}$ preparados con HYNIC se metabolizan a través del riñón en lugar del tracto intestinal, por lo que tienen una mayor ingesta en el riñón y el hígado, y tienen una semivida biológica relativamente larga *in vivo* (Boersma HH, Kietselaer BL, Stolk LM, et al. J Nucl Med, 2005, 46(12): 2035-2050). Además, el método de marcaje indirecto es complejo, se tiene que purificar el producto y no se puede formar fácilmente un kit, por lo que su uso clínico está sujeto a ciertas restricciones.

En estudios recientes se ha revelado que durante la expresión recombinante genética de la anexina V, tras la modificación estructural, es muy rentable marcar directamente con $^{99\text{m}}\text{Tc}$, por ejemplo, Zhang Lina et al. añadieron 10 histidinas en el extremo N de la proteína anexina V (Zhang LN, Yang X, Hua ZC, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2000, 30(4): 305-312). Se obtiene una buena expresión de la proteína anexina V en la que se han añadido 10 histidinas y tiene una actividad elevada para la detección de la apoptosis *in vivo* e *in vitro* (Zhang LN, Yang X, Hua ZC, Preparative Biochemistry and Biotechnology, 2000, 30(4): 305-312; Ye F, Fang W, Wang F, et al. Nuclear Medicine and Biology, doi: 10.1016 /j.nuc- medbio.2010.11.002; Zheng Yumin, Wang Zizheng, Yan Jue, et al. Journal of Chinese Nuclear Medicine, 2008, 28(6): 378-382; Song Liping, Hua Zichun, Zhang Xin, et al. Journal of China Clinic Medical Imaging, 2010, 21(1): 53-55; Song Liping, Hua Zichun, Zhang Xin, et al. Journal of China clinic medical imaging, 2010, 21 (5): 358-360). Tait JF, et al. añadieron 7 aminoácidos en el extremo N, incluyendo 1-2 restos de cisteína, para obtener tres mutantes denominados por separado; anexina V-116, anexina V-117 y anexina V-118 (Tait JF, Brown DS, Gibson DF, et al. Bioconjug Chem, 2000, 11(6): 918-925; Tait JF, Smith C, Gibson DF, Bioconjug Chem, 2002, 13(5): 1119-1123). Sus actividades de unión a la membrana son consistentes con la anexina V natural y tienen distribuciones biológicas similares con la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-anexina V (Tait JF, Brown DS, patente de Estados Unidos US7.204.972B2). Las tres variantes de la anexina V pueden expresarse en el citoplasma de *E. coli* y se puede aislar y purificar con un rendimiento de 10 mg/l (Tait JF, Brown DS, Gibson DF, et al. Bioconjug Chem, 2000, 11(6): 918-925; Tait JF, Smith C, Gibson DF, Bioconjug Chem, 2002, 13(5): 1119-1123; Tait JF, Brown DS, patente de Estados Unidos US7.204.972B2).

Además, el documento WO 98/04294 divulga otros conjugados de anexina marcados radiactivamente.

No obstante, la aplicación de la anexina V recombinante tiene los siguientes problemas:

1. En la actualidad, la anexina V recombinante marcada con material radiactivo tiene las desventajas de una baja eficiencia de marcaje. Mientras tanto, debido a la baja tasa de marcaje y la generación de algunas proteínas desnaturalizadas que se producen durante el marcaje, se verá afectada la distribución radiactiva de la anexina V *in vivo*. En los ensayos clínicos, también se ha descubierto que la anexina V se distribuye principalmente en el riñón, el hígado y el bazo (Rottey S, Van den Bossche B, Slegers G, Van Belle S, van de Wiele C, Q. J. Nucl. Med. Mol. Imaging, 2009, 53(2): 127-32).

2. Debido al bajo rendimiento, el método de preparación de la anexina V recombinante no satisface las necesidades de aplicación práctica. Debido a que la anexina V recombinante forma habitualmente cuerpos de inclusión cuando se expresa en *E. coli*, los investigadores extranjeros estudiaron la anexina V recombinante expresada por levadura para resolver el problema de la fácil formación de cuerpos de inclusión en *E. coli*. Incluso en las últimas investigaciones y patentes de la autoridad internacional sobre la anexina V, el profesor estadounidense Tait JF y su grupo de investigación, tres tipos de anexina V recombinante variante, en la que siete aminoácidos se añaden al extremo N se expresan en *E. coli* y se purifican, la productividad es de únicamente 10 mg/l y las necesidades de la aplicación práctica no se satisfacen con éxito. El proceso de purificación incluye ultrasonidos, adsorción y disociación de la membrana celular, cromatografía de intercambio iónico Mono Q (concentración de elución: NaCl 0,22 M), ultrafiltración y diálisis. En estudios preliminares hace 10 años, el inventor de la presente invención construyó una anexina V en la que se añadieron 10 histidinas. La

eficiencia del marcaje aumentó significativamente y el método es simple, pero la productividad final fue de solo 7,4 mg/l (Zhang LN, Yang X, Hua ZC, *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 30(4): 305-312). El nivel de expresión y el rendimiento son similares al rendimiento de las tres variantes recombinantes de la anexina V del profesor americano Tait JF y su grupo de investigación, en el que se añaden siete aminoácidos al extremo N. Esto indica que existe un grave cuello de botella en la producción de anexina V recombinante.

Sumario de la invención

Con el fin de superar el problema de los dos aspectos que existen en la producción y marcaje de la proteína anexina V y sus variantes, el propósito de la presente invención es proporcionar una variante de la anexina V y su método de preparación con un nivel alto y producción masiva y su aplicación en la preparación de una sonda de detección para la apoptosis celular *in vitro* e *in vivo*.

Con el fin de conseguir el objetivo anterior, la invención proporciona una variante de la anexina V, habiéndose añadido dicha variante en el extremo C de una anexina V

(i) un resto de cisteína, o

(ii) un péptido corto con estructura flexible, en el que el péptido corto tiene hasta 25 restos de aminoácidos, de los cuales 1-3 son restos de cisteína y los otros restos de aminoácidos, si los hay, son restos de glicina, alanina y/o serina.

La invención proporciona además una variante de la anexina V, teniendo dicha variante la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un derivado de la misma en la que uno o varios restos de aminoácidos están sustituidos, deletados o añadidos, teniendo dicho derivado la misma actividad que la variante de la anexina V que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:1.

La invención proporciona además un método de preparación de la variante de la anexina V mencionada anteriormente, llevado a cabo mediante las siguientes etapas:

a. en base a estructura cristalina de la anexina V, se lleva a cabo el modelado molecular y el diseño de la secuencia de aminoácidos que se va a añadir al extremo C de la anexina V, con ayuda del diseño molecular asistido por ordenador;

b. diseñar par de cebadores de la secuencia codificadora de la anexina V, realizar la amplificación por PCR con el gen de la anexina V humana mantenido en el laboratorio de los inventores como molde;

c. reciclar el producto de la PCR mediante electroforesis, conectarlo a un vector de clonación y transferirlo a la célula Top 10 de *Escherichia coli* competente, y llevar a cabo el cultivo;

d. digerir por separado el producto reciclado de la etapa c y el vector de expresión pET28a mediante las enzimas de restricción Nco I y Xho I, y conectar los dos fragmentos génicos obtenidos de este modo mediante la ADN ligasa de T4 y transferirlos a la célula Top 10 de *Escherichia coli* competente, realizar el cultivo y cribar y extraer el plásmido de expresión recombinante;

e. transferir el plásmido de expresión recombinante extraído a la bacteria huésped de expresión de bacterias de *Escherichia coli*, BL21 (DE3), cultivar las bacterias para obtener las bacterias líquidas, inducir las bacterias líquidas con IPTG, recoger las bacterias;

f. cultivar en expansión las la bacterias obtenidas en la etapa e, recoger las bacterias;

g. triturar, lisar, purificar las bacterias, para recolectar la proteína purificada.

En el método de preparación anterior de la variante de la anexina V, las secuencias de nucleótidos del par de cebadores son:

el cebador con sentido: 5'- gtt cca tgg gcg cac agg ttc tca gag gca-3';

el cebador antisentido: 5'-tcc gct cga gtt agc agt cat ctt ctc cac aga gca-3'.

En los métodos de preparación anteriores de la variante de la anexina V, la etapa de purificación en la etapa g contiene, sucesivamente, precipitación, desorción, precipitación progresiva en sulfato de amonio, cromatografía en columna por Super Q - 650M y cromatografía en columna de SP.

El método de preparación anterior de la variante de la anexina V como sonda de detección para la apoptosis celular se lleva a cabo mediante marcaje químico fluorescente o marcaje con radionúclidos.

La aplicación de la variante mencionada anteriormente de la anexina V como sonda de detección para la apoptosis celular es la aplicación 55 de la preparación de un reactivo de monitorización de la apoptosis celular.

En la medida definida por las reivindicaciones, el método de preparación comprende la adición de un péptido corto con estructura flexible y hasta 25 restos de aminoácidos de los cuales 1-3 son restos de cisteína y los otros restos de aminoácidos, si los hay, son glicina, alanina y/o serina al extremo C-terminal de la anexina V mediante el uso de diseño molecular asistido por ordenador y la construcción de la variante de la anexina V; obtención del gen de la variante diseñada de anexina V; construcción de un plásmido recombinante; la expresión de ingeniería genética recombinante correspondiente; y la etapa de separación, purificación, obtención de la variante de la anexina V. En la que la productividad de la variante de la anexina V es mucho mayor que la productividad de la anexina V notificada y sus variantes.

La aplicación de la variante de la anexina V en la preparación de una sonda de detección para la apoptosis celular *in vitro* e *in vivo* divulgada en la presente invención se realiza adicionalmente a través de las siguientes soluciones técnicas: marcar fácilmente la variante de la anexina V obtenida con productos químicos fluorescentes o radionúclidos, que se utilizará en la preparación de la sonda de detección para la apoptosis *in vitro* e *in vivo*.

En el diseño molecular asistido por ordenador de la variante de la anexina V de la invención, los inventores determinaron la longitud de los aminoácidos que se van a añadir al extremo C de la anexina V, mediante la realización del modelado molecular y del diseño molecular de aminoácidos que se van a añadir al extremo C de la anexina V, en base a la estructura cristalina de la anexina V. El objetivo de añadir restos de cisteína al extremo C de la anexina V es mejorar la eficacia del marcaje de la anexina V recombinante, utilizando las características de que los restos de cisteína participan fácilmente en las reacciones de acoplamiento y tienen afinidad por los iones metálicos, etc. Los resultados mostraron que en la extensión de la longitud peptídica corta de 25 aminoácidos calculada durante el diseño molecular computarizado, siempre y cuando el péptido corto esté compuesto por restos de aminoácidos que tienen una mayor flexibilidad tales como glicina, alanina, serina, etc., t en el que el número de cisteína contenido no es mayor de tres, no habrá ningún impacto sobre la estructura de la anexina V. Los resultados mostraron además que dentro de este grupo de péptidos cortos, si la longitud de los péptidos cortos es mayor, la alteración de la estructura de la anexina V es menor. Relativamente, cuando la longitud es menor, puede tener cierto impacto en la estructura proteica de la anexina V, lo que puede llevar a afectar la función de la anexina V como sonda de apoptosis para reconocer las células apoptóticas. Aunque la adición de cisteínas puede ayudar a llevar a cabo el marcaje con fluoresceína o radionúclidos, los resultados del diseño molecular muestran que el número de cisteínas debe controlarse en el intervalo de 1-3, si no es probable que se produzca la polimerización de la proteína.

En base al diseño molecular anterior, los inventores seleccionaron en primer lugar el programa de diseño añadiendo solo un resto de cisteína al extremo C de la anexina V, porque la simulación por ordenador muestra que este programa tiene el mayor impacto sobre el marcador químico (con fluoresceína o radionúclido) de la anexina V o después del marcaje químico con fluoresceína/radionúclido, tiene la mayor posibilidad de afectar a la estructura de la anexina V y a la función de identificación de células apoptóticas. En otros programas de diseño, habrá una distancia desde la superficie de la molécula de la anexina V, por lo que la interferencia y la influencia será mucho menor.

Los inventores también han intentado expresar la variante de la anexina V en la que el extremo C es el péptido corto que contiene alanina-glicina-glicina-serina-serina-glicina-glicina-cisteína, o 25 restos de aminoácidos que contienen los 3 restos repetidos de glicina- (alanina-glicina-glicina-serina-serina-glicina-glicina-cisteína)₃, y se obtuvieron resultados similares.

Por lo tanto, confirma la corrección del diseño molecular del ordenador. Por el contrario, el nivel de expresión de la variante de la anexina V con una sola cisteína añadida es mayor, los niveles de expresión de otras variantes son ligeramente inferiores, pero todos superiores a 60 mg/l.

En el método de expresión genética de la variante de la anexina V, las condiciones de reacción PCR son: pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, después 30 ciclos de amplificación como desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C para 30 segundos, polimerización a 72 °C durante 30 segundos, finalmente polimerización durante 7 minutos a 72 °C, después conservación a 4 °C.

Además, en el método de expresión de la variante de la anexina V, después de transformar el plásmido de expresión recombinante en la cepa huésped de E. coli BL21 (DE3), el producto monoclonal se llevó a un cultivo de agitación durante una noche a 37 °C, después se inoculó en solución de cultivo LB en la relación en volumen de 1:100 y se cultivó a 37 °C durante 2 horas hasta que la DO₆₀₀ fue de aproximadamente 0,6. El inductor IPTG se añade a las bacterias líquidas hasta que la concentración final es de 0,5 mM, induciendo la expresión a 37 °C durante 4 horas. Se recogen las bacterias y se analizan mediante SDS-PAGE al 12 %. El nivel de expresión y la productividad de la variante de la anexina V en el intervalo de 10-40 °C no cambian significativamente.

Además, se obtiene la variante de la anexina V generada por la bacteria en la etapa anterior. Las bacterias se resuspenden con la proporción de 5 ml de tampón (NH₄Cl 50 mM, pH 9,0) a 1 g de bacterias en húmedo. Se añade lisozima para tratar las bacterias, se añade sacarosa hasta que la concentración es del 60 % después de 1 hora,

luego se diluye mediante el tampón (NH_4Cl 50 mM, CaCl_2 20 mM, pH 9,0) con 20 veces el volumen, se centrifuga y se retira el sobrenadante y se conserva el precipitado. Se resuspende el precipitado con la proporción de 5 ml de solución de desorción (NH_4Cl 50 mM, pH 9,0, EDTA 20 mM) hasta que precipitan 501 g, el sobrenadante se centrifuga y se adquiere. Se efectúa precipitación progresiva en sulfato de amonio del sobrenadante obtenido anteriormente, se recogen las partes del 40 % al 70% de la precipitación. Después de que la precipitación se disuelve de nuevo y se dializa, se filtra para eliminar la materia insoluble. Después se realiza cromatografía Super Q-650M usando el tampón inicial (NH_4Cl 50 mM, pH 9,0) para equilibrar la columna de cromatografía Super Q-650M (Japan TOSOH Company), se eluye con el tampón de elución (NH_4Cl 50 mM, se recoge el pico de elución. Se lleva a cabo cromatografía SP con el pico de elución, usando tampón inicial (NH_4Cl 20 mM, NaCl 80 mM, CaCl_2 15 mM, pH 9,0) para equilibrar la columna de cromatografía SP, se eluye con tampón de elución (NH_4Cl 20 mM, NaCl 400 mM, pH 9,0), se recoge el pico de elución. Los métodos de separación y purificación anteriores pueden hacer que la productividad sea de hasta 110 mg/l, con una pureza superior al 97 %.

En el proceso de purificación, los resultados experimentales muestran que, cuando la purificación se realiza mediante cromatografía en columna SP, a diferencia de la anexina V, la combinación de la variante de la anexina V con la columna SP es más fuerte, por lo que no se eluirá a menos que la fuerza iónica sea mayor. Esto ilustra, desde otra perspectiva, que la capacidad de unión con el ion metálico de la variante de la anexina V es más fuerte que la de la anexina V. La combinación de la variante de la anexina V con más iones de calcio provoca la combinación más sólida de la variante de la anexina V con columna SP. Esto verifica la eficacia de la variante de la anexina V diseñada por los inventores, desde otra perspectiva.

Además, la variante de la anexina V es fluorescente marcada químicamente o marcada con radionúclidos. La variante marcada de anexina V puede usarse para monitorizar la apoptosis celular *in vitro* e *in vivo*.

Los inventores marcaron la anexina V y la variante de la anexina V por separado mediante fluoresceína FITC, con el fin de monitorizar la apoptosis celular. Los resultados muestran que tanto la variante de la anexina V-FITC (Figura 3A) como la FITC-anexina V (Figura 3B) pueden identificar las células apoptóticas y tienen una relación dependiente de la dosis. Pero en comparación con la anexina V-FITC, la misma dosis de la variante de la anexina V-FITC tiene una señal más fuerte, lo que indica que la eficacia de la variante de LA anexina V marcada por FITC es más alta; Y se genera una señal de fluorescencia más fuerte cuando el número de moléculas de la sonda es igual.

Los inventores marcaron la anexina V y la variante de la anexina V con el radionúclido $^{99\text{m}}\text{Tc}$, respectivamente, repitiendo el marcaje de cada proteína tres veces. La eficiencia del marcaje de la variante de la anexina V es muy estable y la eficiencia del marcaje de la anexina V cambia considerablemente, por lo que la variante de la anexina V es más fácil de marcar. Además, después de dejar reposar la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anexina V durante 3 horas, la radiactividad específica es del 95 %, tras 24 horas, la radiactividad específica es del 65 %; no obstante, después de dejar reposar la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - variante de la anexina V durante 3 horas, la radiactividad específica es del 98 %, tras 24 horas, la radiactividad específica es también superior al 90 %. Por tanto, la variante de la anexina V marcada con radionúclido tiene una estabilidad mejor. La $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -anexina V y la $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -variante de la anexina V marcadas con radionúclido se inyectaron en animales. Todos ellos exhibieron la misma distribución tisular y características metabólicas y, por lo tanto, todos ellos pueden usarse para la monitorización mediante obtención de imágenes *in vivo*.

Los efectos beneficiosos de la presente invención son: (1) En comparación con el método tradicional de adición de la secuencia de aminoácidos en el extremo N de la anexina V, la eficacia del marcaje puede mejorarse en gran medida sin afectar la actividad de su función biológica. Mientras tanto, usando la etapa de precipitación y desorción avanzadas, precipitación progresiva en sulfato de amonio, cromatografía Super Q-650M y cromatografía SP para realizar la separación y purificación de proteínas, el rendimiento de la proteína se incrementa considerablemente a más de 10 veces del rendimiento de los métodos tradicionales. (2) La proteína de la variante de la anexina V tiene una pureza elevada, alta productividad, alta eficiencia de marcaje y estabilidad, y sin afectar a la función biológica de la variante de la anexina V, es aplicable a la producción industrial y sienta las bases para un estudio más profundo de la variante de la anexina V y las aplicaciones como reactivos de monitorización para la apoptosis celular, monitorización de fármacos para enfermedades, etc.

Descripción de los dibujos

Figura 1, Análisis SDS-PAGE de las bacterias recombinantes en las que se expresa la variante de la anexina V de la realización de la presente invención.

1: las proteínas bacterianas totales después de la expresión inducida; 2: sobrenadante de expresión después de la lisis de bacterias; 3: precipitación de expresión después de la lisis de bacterias.

Figura 2, Análisis SDS-PAGE del proceso de separación y purificación de la variante de la anexina V de la realización de la presente invención.

1: patrones del peso molecular (de arriba a abajo son: 116,0, 66,2, 45,0, 35,0, 25,0, 18,4, 14,4 kDa); 2: productos de desorción; 3,4: productos de precipitación progresiva en sulfato de amonio; 5: muestras

purificadas de cromatografía Super Q - 650M; 6: el flujo de la columna de cromatografía Super Q - 650M; 7: picos de elución de la cromatografía Super Q - 650M; 8: muestras purificadas mediante cromatografía SP; 9: el flujo de la columna de cromatografía de SP; 10: picos de elución de la cromatografía de SP.

5 Figura 3, comparación de la actividad biológica de la variante recombinante de anexina V de la realización de la presente invención y la anexina V recombinante para detectar la apoptosis celular.

10 3A: concentraciones diferentes (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM; azul: 0,036 nM) de la variante recombinante de anexina V para detectar la apoptosis celular; 3B: concentraciones diferentes (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM; azul: 0,036 nM) de la anexina V recombinante para detectar la apoptosis celular; 3C: comparación de la actividad biológica de diferentes concentraciones de la anexina V recombinante y la variante recombinante de anexina V para detectar apoptosis celular (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM; azul: 0,036 nM). Cuando el color es el mismo, la sonda representada por el pico más alto es la variante de la anexina V-FITC.

15 Descripción detallada de la invención

Realización

a: modelado estructural y diseño molecular de la variante de la anexina V:

20 En las estaciones de trabajo de ordenador SGI usando el software de diseño molecular de MSI company (InsightII, Discover, y otros módulos), en base a la estructura cristalina de la anexina V, se realizó el modelo molecular y el diseño molecular de los aminoácidos que se van a añadir en el extremo C de la anexina V, para determinar la longitud de los aminoácidos que pueden añadirse al extremo C y se seleccionó la variante de la variante de la anexina V con una cisteína añadida al extremo C de la anexina V como base para las etapas posteriores de la implementación.

b: construcción del vector de expresión procariótico de la proteína de la variante de la anexina V:

30 De acuerdo con la secuencia génica divulgada de la anexina V, el cebador con sentido y el cebador antisentido se diseñan y sintetizan químicamente. Con el gen de la anexina V humana conservado en el laboratorio como molde, utilizando el método de PCR para amplificar, se obtiene la secuencia de ADN que codifica la variante de la anexina V, en la que la secuencia de nucleótidos de los cebadores es:

35 El cebador con sentido: 5'-gttccatgggcgcacaggttctcagaggca-3';

El cebador antisentido: 5'-tccgctcgagtttagcagtcattctccacag agca-3'.

40 Las condiciones de la reacción de PCR son: pre-desnaturalización a 94 °C durante 5 minutos, después 30 ciclos de amplificación como desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, hibridación a 58 °C durante 30 segundos, polimerización durante 30 segundos a 72 °C, y la última polimerización a 72 °C durante 7 minutos, después la conservación a 4 °C.

45 c: reciclar el producto de la PCR mediante electroforesis, conectarlo a un vector de clonación y transferirlo a la célula Top 10 de *Escherichia coli* competente, y llevar a cabo el cultivo;

50 d: digerir por separado el producto reciclado de la etapa c y el vector de expresión pET28a mediante las enzimas de restricción Nco I y Xho I, mezclar el fragmento del vector pET28a recuperado y el fragmento de ADN humano de la variante de la anexina V en una relación de 1:20 y conectarlos mediante la T4 ADN ligasa, transformar el producto en bacterias competentes de *E. coli* Top10, cribar los clones positivos mediante restricción y análisis de la secuencia de ADN para verificar la exactitud de la secuencia codificante.

55 e: transferir el plásmido de expresión recombinante extraído a las bacterias huésped de expresión de *Escherichia coli* BL21(DE3), escoger una monoclonia para agitar el cultivo a 37 °C durante la noche, a continuación inocular en solución de cultivo LB con un volumen 1:100, cultivarlo a 37 °C durante 2 horas hasta que la DO600 es de aproximadamente 0,6, añadir el inductor IPTG hasta que la concentración final es de 0,5 mM, inducir la expresión a 37 °C durante 4 horas, recoger las bacterias para análisis usando SDS-PAGE al 12 %; Los resultados del análisis se muestran en la figura 1, en la que 1: proteínas bacterianas totales tras la expresión inducida; 2: sobrenadante de expresión tras la lisis de las bacterias; 3: precipitación de la expresión tras la lisis de las bacterias. El nivel de expresión de la variante de la anexina V representó el 35,4 % de las proteínas bacterianas totales y la gran mayoría es la forma soluble.

65 f: transferir el plásmido pET28a-His-FADD y pET28a-His-FADD (F25Y) en la cepa huésped *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión y la cepa crece en placas de agar LB que contienen kanamicina, a 37 °C durante 16 horas, después cribar la monoclonia para inocular en el medio líquido LB recién preparado (que contiene 50 mg/l de kanamicina), para agitar el cultivo a 37 °C en la tabla de agitación hasta que la DO600 del fluido de cultivo es de

aproximadamente 0,6; la temperatura de la tabla de agitación desciende a 25 °C y continuar cultivando durante media hora y añadir IPTG hasta que la concentración final es de 0,5 mM para inducir la expresión de la proteína diana. Después de agitar el cultivo a 25 °C durante 5 horas, se recogen las bacterias.

g: el líquido con bacterias recogido en la etapa f se resuspende con la proporción de 5 ml de tampón (NH₄Cl 50 mM, a pH 9,0) a 1 g de bacterias húmedas y añadir lisozima para tratar las bacterias, añadir sacarosa hasta que la concentración es del 60 % tras 1 hora, después diluir en el tampón (NH₄Cl 50 mM, CaCl₂ 20 mM, pH 9,0) con 20 veces el volumen, centrifugar y descartar el sobrenadante, recoger el precipitado. Resuspender el precipitado con la proporción de 5 ml de solución de desorción (NH₄Cl 50 mM, pH 9,0, EDTA 20 mM) a 1 g de precipitado, centrifugar y adquirir el sobrenadante. El sobrenadante obtenido anteriormente se precipita graduado en sulfato de amonio, y recoger 40-70 % partes de la precipitación que se va a volver a disolver y dializar, después se filtra para eliminar la sustancia insoluble. Usar el tampón de inicio (NH₄Cl 50 mM, pH 9,0) para equilibrar la columna de cromatografía Super Q-650M (Japan TOSOH company), usando el tampón de elución (NH₄Cl 50 mM, pH 9,0, NaCl 200 mM) para eluir, recoger el pico de elución; usando el tampón de inicio I (NH₄Cl 20 mM, NaCl 80 mM, CaCl₂ 15 mM, pH 9,0) Para equilibrar la columna de cromatografía SP y usar el tampón de elución (NH₄Cl 20 mM, NaCl 400 mM, pH 9,0) para eluir y recoger el pico de elución. Los fluidos recogidos se analizan mediante SDS-PAGE y los resultados se muestran en la Figura 2, en la que 1: patrones del peso molecular (de arriba a abajo son: 116,0, 66,2, 45,0, 35,0, 25,0, 18,4, 14,4 kDa); 2: productos de desorción; 3, 4: productos de precipitación fraccionada en sulfato de amonio; 5: muestras purificadas de cromatografía Super Q - 650M; 6: el flujo de la columna de cromatografía Super Q - 650M; 7: picos de elución de la cromatografía Super Q - 650M; 8: muestras purificadas mediante cromatografía SP; 9: el flujo de la columna de cromatografía de SP; 10: picos de elución de la cromatografía de SP.

Mediante los métodos de purificación mencionados anteriormente se obtiene la variante de la anexina V cuya pureza es superior al 97 % y se obtienen más de 110 mg de la variante de la anexina V por litro de fermentación. Mediante estos dos métodos de purificación altamente complementarios de la columna Super Q y la columna SP, se puede retirar la mayor parte de la proteína contaminante de la variante de la anexina V. Los resultados experimentales también muestran que después de las dos purificaciones, la pureza de la proteína es superior al 97 %.

h: marcaje fluorescente con FITC de la anexina V y la variante de la anexina V: Colocar la solución que contiene 3 mg de anexina V y la variante de la anexina V en un tubo de ultrafiltración cuyo peso molecular es de 10 KDa, usando una solución de bicarbonato sódico 0,1 M cuyo valor de pH es 9,0 para realizar ultrafiltración, centrifugación verter el sobrenadante, añadir la solución de bicarbonato sódico de nuevo, repetir tres veces y medir la concentración de proteína. La concentración final es de aproximadamente 5 mg/ml. Se extraen 200 µl la solución y se introducen en un vial Cryule™ antes de la reacción, en agitación.

Disolver 2 mg de FITC en 1ml de bicarbonato sódico 0,1 M (pH 9,0), en agitación rápida a temperatura ambiente. Se extrae una cantidad apropiada de solución de FITC (la relación molar entre FITC y la proteína es de 60 a 100:1) y se deja caer lentamente en la solución de proteína y controlando que el volumen final de reacción no excede los 250 µl. La mezcla se agita durante dos horas a temperatura ambiente en oscuridad. Se usan tubos de ultrafiltración para ultrafiltrar el líquido de reacción usando PBS (pH 7,2) hasta que no se pueden encontrar moléculas de FITC de color verde claro en el filtrado y los productos deben ser una solución transparente de color amarillo-naranja. El conjugado resultante se tapa con papel de aluminio y se introduce en el refrigerador a - 20 °C.

i: comparación de la actividad biológica para detectar la apoptosis celular de la variante recombinante de anexina V y la anexina V recombinante:

Se trataron las células A549 de carcinoma de pulmón humano ($1,5 \times 10^5$) mediante 100 ng/ml de concentración final de TRAIL humano recombinante durante 6 horas, se digirieron con la enzima tripsina y se centrifugaron durante 5 minutos para recoger las células a 4 °C y 800 rpm. Se añaden 400 µl de anexina V recombinante o variante de la anexina V marcadas con FITC que contenía 0,36 nM, 0,12 nM, 0,036 nM a cada muestra, respectivamente, para detectar apoptosis celular mediante citometría de flujo. Los experimentos de cada concentración de anexina V recombinante o variante de la anexina V se repiten tres veces, con las células de la muestra sin marcador como control. Los resultados de la comparación de la actividad biológica se muestran en la figura 3, en la que 3A: diferentes concentraciones (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM; azul: 0,036 nM) de la variante recombinante de anexina V para detectar apoptosis celular; 3B: concentración diferente (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM; azul: 0,036 nM) de la anexina V recombinante para detectar la apoptosis celular; 3C: comparación de la actividad biológica de diferentes concentraciones de la anexina V recombinante y la variante recombinante de anexina V para detectar apoptosis celular (verde: 0,36 nM; rosa: 0,12 nM, azul: 0,036 nM). Cuando el color es el mismo, la sonda representada por el pico alto es la variante de la anexina V-FITC.

j: marcaje con radionúclido de la anexina V y la variante de la anexina V:

disolver 3,5 mg de SnCl₂ en 10 ml de PBS cuyo valor de pH es de 7,4 para obtener 0,35 µg/ml de solución de SnCl₂. Tomar 100 µl (35 µg) de SnCl₂ a temperatura ambiente y añadir 20 µl de 0,6 µg/µl de anexina V y

variante de la anexina V, trocear durante 5 minutos. En ello se añade la solución de $^{99m}\text{Tc}^{\text{m}}\text{O}_4$ con el volumen menor de 0,1 ml y radiactividad aproximadamente 5 mci, después se introducen 10 μl de Vc y dejar reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente. La pureza radioquímica, cuyo valor debe ser superior al 95 % para su uso, de las proteínas marcadas se detecta mediante HPLC.

5 k: determinación de la estabilidad *in vitro* de la variante recombinante de anexina V y la anexina V recombinante marcada con radionúclido:

10 ^{99m}Tc -anexina V, ^{99m}Tc -anexina reposa durante 1 hora, 2 horas, 3 horas a temperatura ambiente respectivamente y, a continuación, se examina la pureza radioquímica. Además, cuando la ^{99m}Tc -anexina V durante 3 horas, la radiactividad específica es del 95 %, cuando reposa durante 24 horas, la radiactividad específica es del 65 %; no obstante, cuando la después de dejar reposar la ^{99m}Tc - variante de la anexina V durante 3 horas, la radiactividad específica es del 98 %, cuando reposa durante 24 horas, la radiactividad específica es también superior al 90 %. Por lo tanto, el marcaje con radionúclidos de la variante de la anexina V tiene mejor estabilidad. Se inyectaron en los animales ^{99m}Tc -anexina V y ^{99m}Tc -variante de la anexina V marcadas con radionúclido y todas ellas exhibieron la misma distribución tisular y características metabólicas y, por lo tanto, todas pueden usarse para la detección mediante obtención de imágenes *in vivo*.

20 Las realizaciones específicas mencionadas anteriormente ilustran con detalle el propósito, el esquema técnico y los efectos beneficiosos de la presente invención, sin embargo, será evidente que son solo ejemplos específicos de la presente invención sin limitación a la presente invención.

25 <110> Targetpharma Laboratories (Chagzhou) Co., Ltd
Hua, ZiChun

<120> VARIANTE DE ANEXINA V VARIANT Y SU PREPARACIÓN Y APLICACIÓN

<140> PCT/CN2011/001449
30 <141> 29-08-2011

<150> CN 201110072451.2
<151> 24-03-2011

35 <160> 3

<170> PatentIn versión 3.3

40 <210> 1
<211> 346
<212> PRT
<213> Desconocida

<220>
45 <223> Anexina

<400> 1

ES 2 638 919 T3

Met Gly Ala Gln Val Leu Arg Gly Thr Val Thr Asp Phe Pro Gly Phe
 1 5 10 15
 Asp Glu Arg Ala Asp Ala Glu Thr Leu Arg Lys Ala Met Lys Gly Leu
 20 25 30
 Gly Thr Asp Glu Glu Ser Ile Leu Thr Leu Leu Thr Ser Arg Ser Asn
 35 40 45
 Ala Gln Arg Gln Glu Ile Ser Ala Ala Phe Lys Thr Leu Phe Gly Arg
 50 55 60
 Asp Leu Leu Asp Asp Leu Lys Ser Glu Leu Thr Gly Lys Phe Glu Lys
 65 70 75 80
 Leu Ile Val Ala Leu Met Lys Pro Ser Arg Leu Tyr Asp Ala Tyr Glu
 85 90 95
 Leu Lys His Ala Leu Lys Gly Ala Gly Thr Asn Glu Lys Val Leu Thr
 100 105 110
 Glu Ile Ile Ala Ser Arg Thr Pro Glu Glu Leu Arg Ala Ile Lys Gln
 115 120 125
 Val Tyr Glu Glu Glu Tyr Gly Ser Ser Leu Glu Asp Asp Val Val Gly
 130 135 140
 Asp Thr Ser Gly Tyr Tyr Gln Arg Met Leu Val Val Leu Leu Gln Ala
 145 150 155 160
 Asn Arg Asp Pro Asp Ala Gly Ile Asp Glu Ala Gln Val Glu Gln Asp
 165 170 175
 Ala Gln Ala Leu Phe Gln Ala Gly Glu Leu Lys Trp Gly Thr Asp Glu
 180 185 190
 Glu Lys Phe Ile Thr Ile Phe Gly Thr Arg Ser Val Ser His Leu Arg
 195 200 205
 Lys Val Phe Asp Lys Tyr Met Thr Ile Ser Gly Phe Gln Ile Glu Glu
 210 215 220
 Thr Ile Asp Arg Glu Thr Ser Gly Asn Leu Glu Gln Leu Leu Leu Ala
 225 230 235 240
 Val Val Lys Ser Ile Arg Ser Ile Pro Ala Tyr Leu Ala Glu Thr Leu
 245 250 255
 Tyr Tyr Ala Met Lys Gly Ala Gly Thr Asp Asp His Thr Leu Ile Arg
 260 265 270
 Val Met Val Ser Arg Ser Glu Ile Asp Leu Phe Asn Ile Arg Lys Glu
 275 280 285
 Phe Arg Lys Asn Phe Ala Thr Ser Leu Tyr Ser Met Ile Lys Gly Asp
 290 295 300
 Thr Ser Gly Asp Tyr Lys Lys Ala Leu Leu Leu Leu Cys Gly Glu Asp
 305 310 315 320
 Asp Gly Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Cys Ala Gly Gly Ser Ser Gly
 325 330 335
 Gly Cys Ala Gly Gly Ser Ser Gly Gly Cys
 340 345

ES 2 638 919 T3

5 <210> 2
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

10 <400> 2
 gttccatggg cgcacaggtt ctcagaggca 30

 <210> 3
 <211> 36
 <212> ADN
15 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Cebador

20 <400> 3
 tccgctcgag ttagcagtca tcttctccac agagca 36

REIVINDICACIONES

1. Una variante de la anexina V, teniendo dicha variante añadido al extremo C de una anexina V
 - (i) un resto de cisteína o
 - (ii) un péptido corto con estructura flexible, en el que el péptido corto tiene hasta 25 restos de aminoácidos, de los cuales 1-3 son restos de cisteína y los otros restos de aminoácidos, si los hay, son restos de glicina, alanina y/o serina.
2. La variante de la anexina V de la reivindicación 1, teniendo dicha variante la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 o un derivado de la misma, en la que uno o varios restos de aminoácidos están sustituidos, delecionados o añadidos, teniendo dicho derivado la misma actividad que la variante de la anexina V que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No:1.
3. La variante de la anexina V de la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que dicha variante está marcada con una sustancia química fluorescente o un radionúclido.
4. Un método para la preparación de la variante de la anexina V de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, comprendiendo dicho método:
 - (a) en base a la estructura cristalina de la anexina V, el modelado molecular y el diseño de la secuencia de aminoácidos que se va a añadir al extremo C de la anexina V, en el que dicho diseño molecular se lleva a cabo con la ayuda del diseño molecular asistido por ordenador;
 - (b) diseñar un par de cebadores para la amplificación de la secuencia nucleotídica codificante de la proteína anexina V y realizar la amplificación por PCR con el gen de la anexina V como molde;
 - (c) reciclar el producto de la PCR mediante electroforesis, conectar dicho producto reciclado a un vector de clonación, transferir dicho vector de clonación a las células TOP10 y cultivar dichas células;
 - (d) digerir por separado el producto reciclado de la etapa c y el vector de expresión pET28a mediante las enzimas de restricción Nco I y Xho I, y conectar los dos fragmentos génicos obtenidos de este modo mediante la ADN ligasa de T4 y transferir los fragmentos conectados a las células TOP10, cultivar dichas células y cribar y extraer el plásmido de expresión recombinante;
 - (e) transferir el plásmido de expresión recombinante extraído a las bacterias *Escherichia coli*, cultivar las bacterias, inducir las bacterias con IPTG y recoger las bacterias;
 - (f) cultivar en expansión las bacterias obtenidas en la etapa (e) y recoger las bacterias; y
 - (g) triturar y lisar las bacterias, y purificar y recoger la variante de la anexina V.
5. El método de la reivindicación 4, en el que las secuencias de nucleótidos del par de cebadores son:
 - (i) para el cebador con sentido 5'- gtt cca tgg gcg cac agg ttc tca gag gca-3'; y
 - (II) para el cebador antisentido, 5'-tcc gct cga gtt agc agt cat ctt ctc cac aga gca-3'.
6. El método de la reivindicación 4, en el que la purificación de la variante de la anexina V en la etapa (g) comprende, en sucesión: precipitación, desorción, precipitación progresiva en sulfato de amonio, cromatografía en columna por Super Q - 650M y cromatografía en columna de SP.
7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, comprendiendo además dicho método una etapa de marcaje químico fluorescente o marcaje con radionúclidos de la variante de la anexina V.
8. La variante de la anexina V de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para su uso como sonda para la detección o monitorización de la apoptosis *in vivo*.
9. Un método *in vitro* para la detección o monitorización de la apoptosis, comprendiendo dicho método la utilización de la variante de la anexina V de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.
10. Un método para la preparación de una sonda para la detección o monitorización de la apoptosis, comprendiendo dicho método proporcionar la variante de la anexina V de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y marcar dicha variante con un producto químico fluorescente o un radionúclido.

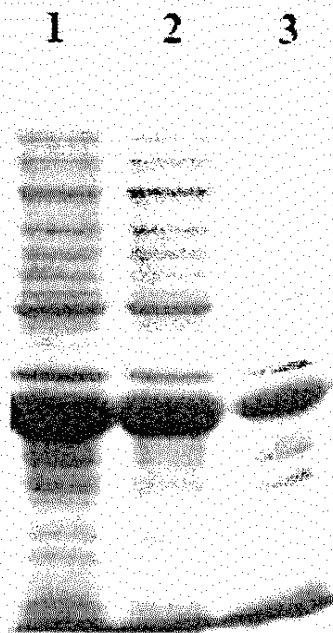


Figura 1

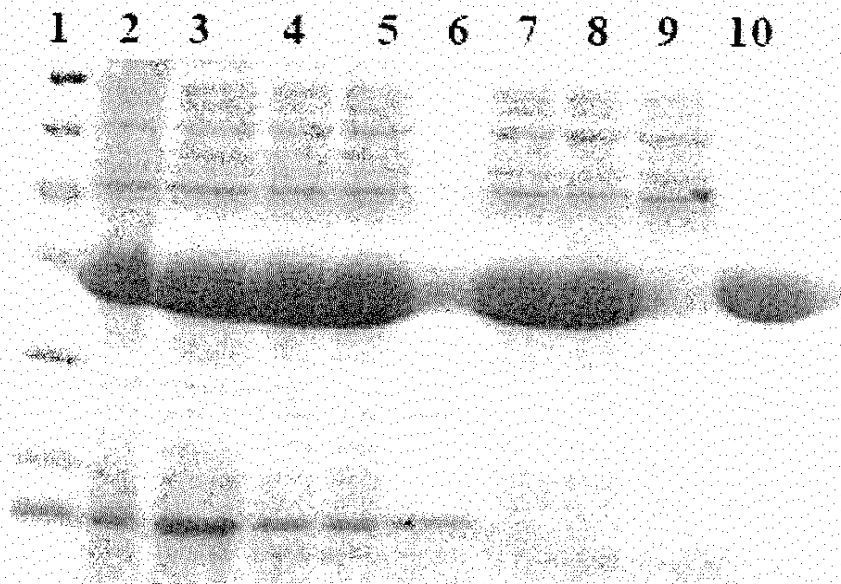


Figura 2

