

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 319**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.12.2008** **E 12151004 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.04.2018** **EP 2441473**

54 Título: **Marcador fluorescente para la muerte celular en el ojo**

30 Prioridad:

14.12.2007 GB 0724412

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

28.06.2018

73 Titular/es:

**UCL BUSINESS PLC. (100.0%)
The Network Building 97 Tottenham Court Road
London W1T 4TP, GB**

72 Inventor/es:

**CORDEIRO, FRANCESCA;
MOSS, STEPHEN y
FITZKE, FREDERICK**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 674 319 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

Marcador fluorescente para la muerte celular en el ojo

- 5 La invención se refiere a un marcador para su uso en la visualización directa de la muerte celular, particularmente de apoptosis en el ojo, especialmente de muerte de células individuales de las células nerviosas retinianas.
- 10 La formación de imágenes de células vivas para detectar procesos celulares se usa en ensayos *in vitro* de células cultivadas. Sin embargo, esto no se ha aplicado previamente a nivel celular *in vivo* en el ojo. La pérdida de células nerviosas es un proceso que se produce en las primeras etapas de ciertos trastornos neurodegenerativos como el glaucoma, la retinopatía diabética y el Alzheimer. El glaucoma es la principal causa de ceguera irreversible en todo el mundo y afecta al 2% de las personas mayores de 40 años. La afección tiene una morbilidad significativa debido a su naturaleza silenciosa y progresiva, que a menudo provoca un retraso en el diagnóstico y el tratamiento. La enfermedad de Alzheimer es la forma más común de demencia, y se predice que aumentará de 4 a 12 millones de estadounidenses en los próximos 20 años. Sería útil poder evaluar la apoptosis de las células nerviosas retinianas para evaluar la progresión de enfermedades como el glaucoma, así como las enfermedades cerebrales degenerativas.
- 15
- 20 Mediante la optimización de un marcador para detectar la muerte celular, la administración del marcador y la máquina de formación de imágenes, que ha conducido al desarrollo de la tecnología, los inventores han podido demostrar que es posible la visualización de apoptosis en el ojo en una sola célula. Los inventores han superado desventajas significativas que incluyen autofluorescencia retiniana intrínseca y efectos negativos tales como respuestas inflamatorias al marcador.
- 25 De acuerdo la invención, se proporciona un marcador de muerte celular etiquetado con una etiqueta que tiene una longitud de onda en el espectro infrarrojo para su uso en el diagnóstico de una enfermedad degenerativa del ojo o una enfermedad neurodegenerativa del cerebro, mediante la identificación de la muerte celular en el ojo, en el que el marcador de muerte celular es una anexina. La etiqueta optimizada por longitud de onda desarrollada proporciona una calidad de imagen mejorada al mejorar la relación señal a ruido y al mismo tiempo reduce el efecto tóxico asociado con otras etiquetas.
- 30 Dicho marcador de muerte celular etiquetado puede usarse en un método para identificar o controlar la muerte celular en el ojo que comprende administrar un marcador de muerte celular etiquetado con o conjugado con una etiqueta optimizada por longitud de onda a un sujeto y generar una imagen de longitud de onda de emisión del ojo del sujeto usando un dispositivo de generación de imágenes optimizado. Esto permite la cuantificación de la muerte celular a nivel de células individuales en el ojo en tiempo real.
- 35 El término "muerte celular" se refiere a cualquier proceso que incluye, por ejemplo, la muerte de una célula por apoptosis y necrosis, durante la cual hay pérdida de la integridad de la membrana plasmática. El marcador de muerte celular etiquetado de la invención permite que se puedan identificar células que se están muriendo, por ejemplo, que están sometidas a apoptosis.
- 40 En general, el término "marcador de muerte celular" se refiere a un marcador que permite que las células vivas se distingan de las células muertas o que están muriendo. Por ejemplo, puede ser un compuesto o molécula que se une específicamente a células vivas, pero no a células muertas o que están muriendo, o que se une específicamente a células muertas o que están muriendo, pero no a células vivas. El marcador de muerte celular utilizado en la presente invención es una anexina. Las anexinas son proteínas que se unen reversiblemente a las membranas celulares en presencia de cationes. Las anexinas pueden ser naturales o pueden ser recombinantes.
- 45 La proteína puede ser un fragmento completo o tal vez funcional, es decir, un fragmento o porción de una anexina que se une específicamente a las mismas moléculas que la proteína completa. Además, los derivados funcionales de tales proteínas pueden ser marcadores de muerte celular. Hoy en día se encuentra disponible una variedad de anexinas, tales como las descritas en la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos no. 2006/0134001A. Una anexina preferida es la Anexina 5, que es bien conocida en la técnica. Otras anexinas que pueden usarse como marcadores de muerte celular incluyen anexinas 11, 2 y 6. Se conocen en la técnica otros marcadores de muerte celular, especialmente apoptosis, que incluyen, por ejemplo, yoduro de propidio y el dominio C2A de sinaptotagmina [Jung *et al.*, *Bioconjug Chem.* Septiembre a octubre de 2004; 15(5): 983-7].
- 50
- 55 En general, el término "etiqueta optimizada por longitud de onda" se refiere a una sustancia fluorescente, que es una sustancia que emite luz en respuesta a la excitación y que ha sido seleccionada para su uso debido a una relación señal a ruido mejorada y, por lo tanto, a una resolución de imagen mejorada y sensibilidad mientras se adhiere al estándar de seguridad de exposición a la luz para evitar efectos fototóxicos. Las longitudes de onda optimizadas incluyen longitudes de onda infrarrojas y cercanas al infrarrojo. La presente invención usa una etiqueta que tiene una longitud de onda en el espectro infrarrojo. Tales marcadores son bien conocidos en la técnica e incluyen colorantes tales como IRDye700, IRDye 800, D-776 y D-781. También se incluyen sustancias
- 60
- 65

- fluorescentes formadas mediante la conjugación de tales colorantes a otras moléculas tales como proteínas y ácidos nucleicos. Se prefiere que las longitudes de onda optimizadas provoquen poca o ninguna inflamación en la administración. Una etiqueta optimizada por longitud de onda preferida es D-776, ya que se ha encontrado que provoca poca o ninguna inflamación en el ojo, mientras que otros colorantes pueden provocar inflamación. Los colorantes optimizados también muestran preferiblemente una estrecha correlación entre el nivel de fluorescencia que puede detectarse histológicamente y el que puede detectarse *in vivo*. Se prefiere particularmente que exista una correlación sustancial, especialmente una correlación 1:1 entre la fluorescencia histológica y la fluorescencia *in vivo*.
- El marcador de muerte celular etiquetado puede prepararse usando técnicas estándar para conjugar una etiqueta optimizada por longitud de onda con un compuesto marcador. Tales etiquetas pueden obtenerse de fuentes bien conocidas tales como Dyomics. Las técnicas apropiadas para conjugar la etiqueta con el marcador son conocidas en la técnica y pueden ser proporcionadas por el fabricante de la etiqueta.
- Con el fin de generar una imagen de muerte celular, el marcador etiquetado se administra al sujeto, por ejemplo, mediante inyección intravenosa. El área del sujeto que se someterá a formación de imágenes, el ojo, se coloca dentro del campo de detección de un dispositivo de imágenes médicas. Posteriormente, se toman imágenes de las longitudes de onda de emisión del marcador etiquetado y se construye una imagen para que se proporcione un mapa de las áreas de muerte celular. La generación de la imagen puede repetirse para permitir que la muerte celular se controle durante un período de tiempo. Se puede monitorizar en tiempo real. Es particularmente preferida la monitorización de la muerte celular de las células retinianas, principalmente las células nerviosas retinianas. Las células nerviosas retinianas incluyen células ganglionares retinianas (RGC), células bipolares, amacrinas, horizontales y fotorreceptoras.
- El marcador de muerte celular etiquetado puede administrarse localmente o sistémicamente. Los métodos para administrar el marcador son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, inyección intravenosa. Aunque los marcadores de muerte celular etiquetados se han administrado por vía intravenosa, los inventores han descubierto sorprendentemente que cruzan la barrera retiniana de la sangre permitiendo la visualización en el ojo. El trabajo previo mostró que el colorante Alexa Fluor 488nm no se pudo ver *in vivo* después de la administración intravenosa, a pesar de que se demostró histológicamente su capacidad para cruzar la barrera retiniana de la sangre. Alternativamente, aunque menos preferido, el marcador de muerte celular etiquetado puede administrarse por vía tópica u ocular.
- También se proporciona una composición farmacéutica, especialmente una composición para diagnóstico, que comprende un marcador de muerte celular, en particular una anexina, marcada con una etiqueta que tiene una longitud de onda en el espectro infrarrojo y seleccionada entre D-776 y D-781, siendo la composición adecuada para la administración ocular.
- La invención se describirá ahora en detalle, solo a modo de ejemplo, con referencia a las figuras, en las que:
- La Figura 1 muestra la correlación entre formación de imágenes *in vivo* y apoptosis histológica de células ganglionares retinianas cuando se utilizan fluoróforos que no están afectados por la autofluorescencia retiniana, permitiendo, por ejemplo, el rendimiento de recuentos de apoptosis de células individuales *in vivo* que corresponden exactamente al observado en el estándar de referencia en histología.
- La Figura 1a muestra una comparación de formación de imágenes *in vivo* con apoptosis histológica retiniana en un modelo animal de glaucoma a las 3 semanas. La superposición de microscopía confocal correspondiente (histología) sobre la imagen *in vivo* muestra más células apoptóticas etiquetadas con Anexina 488 intravítrea (manchas grises en superposición) en la imagen histológica en comparación con la imagen *in vivo* (manchas blancas en la imagen de fondo).
- La Figura 1b muestra imágenes de las áreas correspondientes de la retina usando histología, análisis *in vivo* y *ex vivo* en ojo de rata tratado con estaurosporina (SSP) usando Anexina D-776 intravítrea (manchas etiquetadas con rojo). Una correlación 1:1 entre los tres métodos se puede observar claramente.
- Las Figuras 2a y 2b muestran imágenes retinianas por detección de células retinianas apoptóticas (DARC, por sus siglas en inglés) que demuestran que la Anexina 488 (125 µg) intravenosa no se pudo visualizar *in vivo*, aunque las imágenes histológicas de los animales con SSP (a) y glaucoma (b) revelaron apoptosis, lo que demuestra que el marcador había cruzado la barrera retiniana de la sangre. Los inventores consideraron que las imágenes *in vivo* no eran posibles debido al alto nivel de autofluorescencia de fondo encontrada en esta longitud de onda no optimizada.
- La Figura 2c muestra que, a longitudes de onda optimizadas, por ejemplo infrarrojas, la Anexina D-776 intravenosa (125 µg) fue capaz de mostrar la apoptosis de células retinianas individuales *in vivo* inducida por SSP e histológicamente.

La Figura 3 muestra imágenes reflectantes y DARC de retinas tratadas con D-776 sola (A), Anexina D-776 (B) y Anexina IRDye 800 (C) demostrando que la tortuosidad vascular retiniana *in vivo* se puede ver usando IRDye 800 pero no con D-776 (ya sea sola o en inyección repetida).

5 La Figura 4 es una micrografía electrónica de barrido de un ojo tratado con anexina marcada con IRDye 800 que muestra la presencia de células inflamatorias en la base del humor vítreo. En el humor vítreo se observan varios hialocitos pero también algunas células inflamatorias.

10 La Figura 5 muestra los resultados de una evaluación por DARC (detección de células retinianas apoptóticas) de la neurodegeneración diabética en modelos transgénicos. Las células ganglionares retinianas apoptóticas se pueden ver en la retina diabética (a), pero no en el control de tipo salvaje emparejado por edad (b).

15 La Figura 6 muestra la metodología para la técnica de visualización de marcadores de muerte celular optimizados para la longitud de onda en el ojo. Brevemente, se administra una inyección intravenosa (modo ocular o tópico u otro) del colorante optimizado por longitud de onda, después de lo cual, después de un tiempo óptimo, se logra la visualización de la retina después de la excitación con una luz láser de longitud de onda optimizada y detección con filtros correctos en longitudes de onda optimizadas.

20 La Figura 7 muestra imágenes de áreas correspondientes del mismo ojo de rata histológicamente e *in vivo* después de inyecciones intravítreas con estaurosporina (7,14 nanomoles o 0,2 mg/ml) y Anexina 488. Existe una sorprendente discrepancia entre el número de puntos positivos (Anexina 488) con formación de imágenes *in vivo* en comparación con la histología, con muchos más que se ven histológicamente.

25 La Figura 8 es un gráfico que muestra los recuentos medios de puntos positivos de Anexina 488 administrados por vía intravítrea comparados histológicamente con puntos positivos de apoptosis de RGC observados *in vivo* de imágenes correspondientes tomadas para 3 ojos después del tratamiento con SSP. Existe un recuento significativamente mayor en la imagen histológica.

30 La Figura 9 muestra los resultados de la administración intravenosa de Anexina 488 (0,2 ml 25 µg/ml) en un ojo tratado con SSP. El ojo mostró puntos positivos de Anexina 488 histológicamente, pero nada *in vivo*.

35 La Figura 10 muestra los resultados de la administración de Anexina 488 intravenosa. En particular, hubo recuentos medios similares de puntos positivos de Anexina 488 histológicamente cuando se compararon con Anexina 488 intravítrea, pero se visualizó muy poco *in vivo*.

La Figura 11 muestra imágenes DARC *in vivo* usando Anexina Alexa Fluor 555 del mismo ojo al inicio y 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas que muestran apoptosis se observan *in vivo*, pero muy débilmente.

40 La Figura 12 muestra la estructura molecular de tres de los colorantes infrarrojos utilizados.

45 La Figura 13 muestra los resultados de una evaluación de etiquetas fluorescentes. De todas las etiquetas fluorescentes evaluadas, el mejor colorante acoplado con Anexina 5 fue D-776. Mostró una correlación perfecta (1:1) en formación de imágenes *in vivo* e histología con Anexina D-776.

50 La Figura 14 muestra los resultados de la administración de Anexina marcada con IRDye 800. La administración de Anexina IRDye 800 a un modelo de glaucoma mostró un aumento en el etiquetado de apoptosis de células retinianas *in vivo*. Sin embargo, todavía hubo una reducción del 20% en el nivel de etiquetado *in vivo* en comparación con el histológico.

55 La Figura 15 presenta imágenes reflectantes que muestran ojos de rata tratados con la misma dosis de Anexina 5 conjugada con diferentes colorantes fluorescentes infrarrojos 5 días después de la administración. Solo el ojo tratado con Anexina 5 D-776 no mostró tortuosidad de vasos retinianos en este momento.

La Figura 16 es un gráfico que muestra la diferencia observada en el nivel de tortuosidad retiniana según la clasificación de los observadores ciegos que observan imágenes *in vivo*. Hubo un aumento significativo en la tortuosidad de los vasos en ojos que recibieron IRDye 800 y DY-781 intravítreas en comparación con D-776 y el control. Este hecho sugiere fuertemente una inflamación.

60 La Figura 17 es una imagen de microscopía electrónica de barrido de un macrófago que se encuentra en el humor vítreo de un ojo con Anexina 5 IRDye 800, que confirma la presencia de inflamación causada por el colorante.

65 La Figura 18 muestra imágenes de DARC *in vivo* usando Anexina 11 D776 del mismo ojo al inicio y 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas demuestran claramente que la

Anexina 11 puede usarse para detectar apoptosis *in vivo*.

La Figura 19 contiene imágenes de un ojo de rata tratadas con estaurosporina (SSP) y luego se les administró tanto Anexina 488 como Yoduro de Propidio (PI). Las diferentes fases de muerte de RGC inducida por SSP se muestran en imágenes fijas de la misma área del ojo seguidas durante varias horas. Se puede ver la apoptosis de células individuales en las fases apoptótica y necrótica (tinción solo con PI) temprana (tinción solo con Anexina 488 positiva) y tardía (tinción con PI y con Anexina 488 positiva) a las 2,0 (a), 2,5 (b) y 3,0 (c) horas después del tratamiento con SSP. (d) Usando esta técnica, es posible rastrear los cambios en las mismas células (con flechas e identificados como Puntos 1 y 2) a lo largo del tiempo, que se someten a las etapas secuenciales de la muerte celular apoptótica. Ambas células muestran que el pico en el etiquetado con anexina 5 se produce antes del pico de PI, y corrobora la afirmación de que la optimización de la longitud de onda de los marcadores puede conducir a la visualización de la muerte celular en el ojo.

La Figura 20 muestra una comparación entre el etiquetado de MC540 *in vivo* de ojos tratados con solución salina y SSP y se comparó con el etiquetado con Anexina D-776. Como se puede ver, la Anexina D-776 es capaz de marcar células individuales que son claramente individualmente visibles en las imágenes *in vivo*. El nivel de apoptosis de RGC es mucho mayor después de la administración de SSP en la Anexina D-776. En comparación, debido a que la MC540 etiqueta las membranas enteras, se detecta una señal fluorescente difusa, lo que hace imposible identificar células individuales, aunque la MC540 después de la imagen con SSP tiene un nivel de fluorescencia definitivamente más alto que el valor de referencia.

La Figura 21 es un diagrama que muestra capas retinianas. Las células nerviosas retinianas son: células fotorreceptoras, bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares.

La Figura 22 muestra una sección de histología de la retina de un modelo de isquemia de ratón. Se administró Anx-F intravítrea antes de la muerte del animal. Las flechas muestran cuatro células teñidas positivas para Anx-F en diferentes capas de la retina, lo que confirma la presencia de apoptosis en las capas internas nucleares (INL), externas nucleares (ONL) y fotorreceptoras (PL).

Ejemplos

Conjugación de D-776 a anexina 5

La anexina 5 recombinante expresada de manera bacteriana (5 mg en 1 ml de tampón isotónico) se dializa frente a "tampón de etiquetado" durante tres horas con dos cambios (250 ml cada vez). El tampón de etiquetado se produce disolviendo 21 g (250 mmol) de hidrogenocarbonato de sodio en 400 ml de agua destilada. Se agrega 1 g de azida de sodio (0.2 por ciento). El pH se ajusta con una solución acuosa concentrada de hidróxido de sodio a un pH de 9,0. Antes del uso, el tampón se diluye mediante la adición de 9 partes de agua a una parte de la solución madre concentrada (v/v). La proteína anexina 5 ahora está lista para la reacción de etiquetado. La relación de colorante a proteína se mantiene constante para cada reacción de etiquetado. Por lo tanto, se usan 0,5 mg del éster de D-776-NHS para etiquetar 1 mg de anexina 5. Esto proporciona una relación molar entre el colorante y la proteína anexina 5 de aproximadamente 500. El éster de NHS se disuelve en dimetilformamida por agitación en vórtice, y la reacción comenzó mediante la adición del colorante a la proteína anexina 5 en el tampón de etiquetado. La concentración final de anexina 5 en la reacción de etiquetado debe ser de 5 mg/ml. Se permite que el etiquetado proceda en un tubo Eppendorf colocado en un agitador en el transcurso de dos horas.

Al final del período de reacción, la solución de etiquetado coloreada se pipetea cuidadosamente en una columna de 5 o 10 ml de Sephadex G-25 y se deja filtrar en el gel. El conjugado se eluye luego añadiendo lentamente 100 mM de tampón PBS a un pH de 7,4 gota a gota sobre la columna. La proteína etiquetada se adelanta como una banda relativamente aguda mientras que el colorante libre se difumina lentamente. Una vez que la anexina 5 conjugada llega a la parte inferior de la columna, se recoge en un tubo Eppendorf y está lista para su uso de inmediato.

Métodos de Formación de Imágenes

La formación de imágenes puede llevarse a cabo usando técnicas conocidas en la técnica, tales como las descritas a continuación.

Toda la formación de imágenes *in vivo* se llevó a cabo con la técnica DARC¹ (detección de células retinianas apoptóticas) con oftalmoscopio láser de barrido confocal (cSLO) modificado a 790 nm (Heidelberg Retina Angiograph 2, Heidelberg Engineering, Dossenheim, Alemania)^{1, 2, 3}. Se usó la lente estándar (15° x 15° a 30° x 30°) y la lente de campo amplio (55°: todos los valores de grado calibrados para el ojo humano). La reflectancia y las imágenes fluorescentes correspondientes con diferentes ajustes de enfoque se tomaron de la retina de la rata. Para mejorar la relación señal a ruido y mejorar el contraste de la imagen, se calculó la imagen media de una serie de imágenes individuales (hasta 100) después de la corrección de los movimientos oculares.

Optimización de fluorescencia

Los inventores encontraron que la presencia de señales fluorescentes intrínsecas en la retina significaba que los marcadores de muerte celular etiquetados con ciertos marcadores fluorescentes no podían formarse en una imagen adecuada. Los inventores habían usado previamente una anexina marcada fluorescente (Anexina 488) para obtener imágenes de la apoptosis de las células ganglionares retinianas. Cuando se administraron sistémicamente, los inventores encontraron que, sorprendentemente, la autofluorescencia retiniana inherente interfería con la señal a tal grado que no se podían obtener resultados útiles.

Para evitar la interferencia de la autofluorescencia retiniana, los inventores investigaron otros fluoróforos que incluyen fluoróforos infrarrojos y cercanos a infrarrojo tales como Licor 800 CW, D-776 y D-781. Usando estas etiquetas, los inventores pudieron observar la apoptosis de células individuales en el ojo vivo que correspondía exactamente a la localización histológica. Esto se ilustra en las Figuras 1, 2 y 3.

Al evaluar los tres colorantes, los inventores encontraron que tanto Licor 800 CW como D-781 provocaban tortuosidad vascular e inflamación en el humor vítreo. D-776 no provocó inflamación ni cambios vasculares. Esto se muestra en las Figuras 3 y 4.

Evaluación de neurodegeneración diabética en modelos transgénicos

Una evaluación por DARC de la neurodegeneración diabética en modelos transgénicos se llevó a cabo usando las técnicas descritas en la presente memoria. Como se puede observar en la Figura 5, el animal diabético (a) muestra significativamente más apoptosis de células ganglionares retinianas que el control de tipo salvaje emparejado por edad (b).

Optimización de Longitud de Onda de Anexina 5 Etiquetada Fluorescentemente (Anx-F)

Discrepancia *in vivo* versus histología en células etiquetadas

a) Administración intravítrea

Los inventores habían utilizado previamente una anexina 5 marcada fluorescente (Anexina 488) para obtener imágenes de la apoptosis de las células ganglionares retinianas, la cual se administró al ojo por vía intravítrea. La anexina 5 etiquetada por Alexa Fluor 488, o anexina 5 etiquetada a otro marcador fluorescente. Los inventores evaluaron:

- Máximos de excitación/emisión de Anexina Alexa Fluor 532 de 532/553
- Máximos de excitación/emisión de Anexina Alexa Fluor 555 de 555/568
- Máximos de excitación/emisión de Anexina D-776 de 771/793
- Máximos de excitación/emisión de anexina Dy-781 de 783/800
- Máximos de excitación/emisión de Anexina Licor IRDye 800 de 774/789

Los inventores también encontraron que el número de moléculas de colorante conjugado por molécula de anexina era importante. Los inventores argumentan que tener como objetivo un número bajo de moléculas de colorante (menos de 12 y preferiblemente menos de 5) por molécula de anexina mejora la fluorescencia nativa del conjugado mientras que conserva su afinidad de unión a las células apoptóticas.

Los inventores también encontraron que la forma en que se conjugó la molécula de colorante con la molécula de anexina era importante. Los inventores encontraron que el etiquetado de la molécula de Anexina con el colorante en el extremo N terminal daba como resultado una relación de señal a ruido mejorada, y cuando se administraba por vía intravenosa daba como resultado una menor captación en órganos principales, por ejemplo, en el hígado y en el riñón. Además, el etiquetado de residuos de cisteína en lugar de residuos de lisina en la molécula de anexina produjo menos ruido.

Las imágenes en la Figura 11 muestran DARC *in vivo* usando Anexina Alexa Fluor 555 del mismo ojo en el punto de referencia y 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas que muestran apoptosis se ven *in vivo*, pero muy débilmente. En comparación con los colorantes infrarrojos (véase a continuación), tanto la Anexina Alexa Fluor 555 como la Anexina Alexa Fluor 532 eran claramente subóptimas para la formación de imágenes *in vivo* con DARC.

De manera sorprendente, de todas las etiquetas fluorescentes evaluadas, el mejor colorante acoplado con Anexina 5 fue D-776. Mostró una correlación perfecta (1:1) con la formación de imágenes *in vivo* y la histología con la Anexina D-776, como se observa a continuación.

El análisis estadístico comparó la histología con *in vivo*, utilizando la distancia de separación entre puntos, la

separación media fue de 19,756 píxeles en las imágenes anteriores, en comparación con un modelo de ruido aleatorio (30,986 píxeles), y la probabilidad de que esto ocurra por casualidad es del 0,001305 por ciento. Se obtuvo un resultado similar con puntos individuales coincidentes, con $p = 0,001597$ por ciento, es decir, es muy poco probable que la coincidencia de puntos entre la histología y las imágenes *in vivo* pudiera haber ocurrido por casualidad. Esto debe compararse con los otros colorantes de anexina infrarroja, tal como el IRDye 800 (Licor) que mostró al menos un 20% menos de manchas *in vivo*.

El uso de Anexina Dy-781 dio resultados similares, pero al igual que con la Anexina IRDye 800, la formación de imágenes 5 días después de la tinción reveló tortuosidad vascular retiniana, lo que sugiere inflamación.

Las imágenes en las Figuras 13, 14 y 15 muestran ojos de rata tratados con la misma dosis de Anexina 5 conjugada con diferentes colorantes fluorescentes infrarrojos 5 días después de la administración. Solo el ojo tratado con Anexina 5 D-776 no mostró anomalías en los vasos retinianos.

El gráfico de la Figura 16 muestra la diferencia observada en el nivel de tortuosidad retiniana tal como la calificaron los observadores ciegos que observaron las imágenes *in vivo*. Hubo un aumento significativo en la tortuosidad de los vasos en ojos que recibieron IRDye 800 y DY-781 de manera intravítrea en comparación con D-776 y el control. Este hecho sugiere fuertemente una inflamación, que se investigó a continuación junto con la histología.

La Figura 17 es una imagen de microscopía electrónica de barrido de un macrófago observado en el humor vítreo de un ojo con Anexina 5 IRDye 800, que confirma la presencia de inflamación provocada por el colorante.

Uso de otras anexinas como marcadores

Los inventores han mostrado que otros marcadores de anexina tales como Anexina 11, anexina 2 y anexina 6, que todos tienen afinidad por la fosfatidilserina expuesta, también se unen a las células retinianas en apoptosis.

Las imágenes de la Figura 18 muestran imágenes DARC *in vivo* usando Anexina 11 D-776 del mismo ojo en el punto de referencia y 2 horas después de la administración de estaurosporina (SSP). Las manchas blancas demuestran claramente que la Anexina 11 puede usarse para detectar apoptosis *in vivo*.

Uso de otros marcadores de muerte celular (es decir, distintos de la anexina) (con fines comparativos únicamente) Yoduro de Propidio

Posteriormente, los inventores evaluaron otros marcadores de muerte celular. En primer lugar, el yoduro de propidio (IP) que identifica las células necróticas mediante el etiquetado de las células con membranas rotas y la tinción fluorescente de su ADN y ARN. El PI tiene un máximo de excitación y emisión de 532 nm y 649 nm, respectivamente. Las imágenes en la Figura 19 muestran una comparación entre las células necróticas que etiquetan el IP *in vivo* y las células apoptóticas de etiquetado con Anexina 488 *in vivo* en la retina.

(a-c) Imágenes fijas tomadas de un video de lapso de tiempo de muerte de RGC inducida por estaurosporina (SSP), que muestran células individuales en las fases apoptótica y necrótica (roja, solo con tinción con PI) temprana (verde, tinción con Anexina 488 positiva) y tardía (amarilla, tinción con PI y Anexina 488 positiva) a las 2,0 (a), 2,5 (b) y 3,0 (c) horas después del tratamiento con SSP. (d) Usando esta técnica, es posible rastrear los cambios en las mismas células (con flechas e identificados como Puntos 1 y 2) a lo largo del tiempo, que se someten a las etapas secuenciales de la muerte celular apoptótica. Ambas células muestran que el pico en el etiquetado con anexina 5 se produce antes del pico de PI, y corrobora la afirmación de que la optimización de la longitud de onda de los marcadores puede conducir a la visualización de la muerte celular en el ojo.

Los inventores también encontraron que es posible la visualización simultánea de múltiples marcadores de muerte celular tales como Anexina V y Yoduro de Propidio siempre que cada marcador separado haya sido optimizado para la longitud de onda.

Merocianina 540 (MC540)

La merocianina 540 es un colorante que identifica células apoptóticas en virtud del hecho de que se une a la membrana externa de las células y fluoresce en proporción al grado de desorganización de las membranas, que se produce temprano en la apoptosis. La MC450 tiene máximos de excitación y emisión de 488 nm y 575 nm respectivamente. Las imágenes de la Figura 20 muestran una comparación entre el etiquetado *in vivo* de CM540 de los ojos tratados con solución salina y SSP y se compararon con el etiquetado con Anexina 776.

Como se puede ver, la Anexina 776 es capaz de marcar células individuales que son claramente individualmente visibles en las imágenes *in vivo* mostradas anteriormente. El nivel de apoptosis de RGC es mucho mayor después de la administración de SSP. En comparación, debido a que la MC540 etiqueta las membranas

completas, se detecta una señal fluorescente difusa, lo que hace imposible identificar células individuales, aunque la MC540 después de la imagen SSP tiene un nivel de fluorescencia definitivamente más alto que el valor de referencia.

5 **Etiquetado de células apoptóticas a través de la retina**

Los inventores han mostrado previamente que Anx-F puede usarse para identificar la apoptosis de RGC. Más recientemente, utilizando la misma técnica, han demostrado que es posible visualizar células bipolares apoptóticas. Ahora muestran que Anx-F, cuando se administra por vía intravítrea, también puede teñir otras
10 células retinianas, tal como se observa en la Figura 21.

La sección de histología en la Figura 22 se toma a partir de un ojo de ratón que ha tenido isquemia inducida experimentalmente. Se administró Anx-F intravítrea antes de la muerte del animal. Las flechas muestran cuatro células teñidas positivas para Anx-F en diferentes capas de la retina, lo que confirma la presencia de apoptosis
15 en las capas internas nucleares (INL), externas nucleares (ONL) y fotorreceptoras (PL).

Referencias

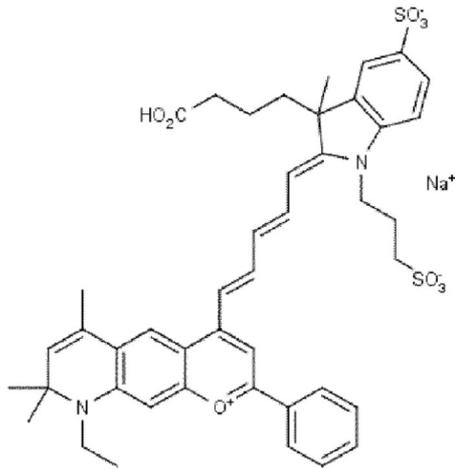
1. Cordeiro MF, Guo L, Luong V, et al. Real-time imaging of single nerve cell apoptosis in retinal neurodegeneration (Generación de imágenes en tiempo real de apoptosis de células nerviosas individuales en neurodegeneración retiniana). Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101:13352-13356.
20

2. Guo L, Salt TE, Luong V, et al. Targeting amyloid- β in glaucoma treatment (Amiloide- β dirigido en el tratamiento del glaucoma). Proc Natl Acad Sci USA 2007.
25

3. Maass A, Lundt von Leithner P, Luong V, et al. Assessment of rat and mouse RGC apoptosis imaging in-vivo with different scanning laser ophthalmoscopes (Evaluación de generación de imágenes *in vivo* de apoptosis por RGC de rata y ratón con diferentes oftalmoscopios de barrido láser). Curr Eye Res 2007; [aceptado para publicación].
30

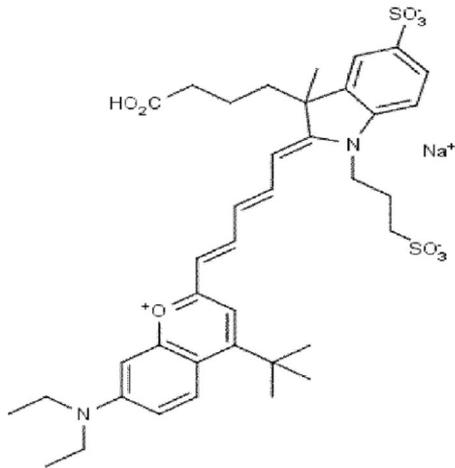
REIVINDICACIONES

1. Un marcador de muerte celular etiquetado con una etiqueta que tiene una longitud de onda en el espectro infrarrojo para su uso en el diagnóstico de una enfermedad degenerativa del ojo o una enfermedad neurodegenerativa del cerebro, mediante la identificación de la muerte celular en el ojo, en el que el marcador de muerte celular es una anexina.
2. Un marcador de muerte celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etiqueta es D-776 que tiene la estructura:

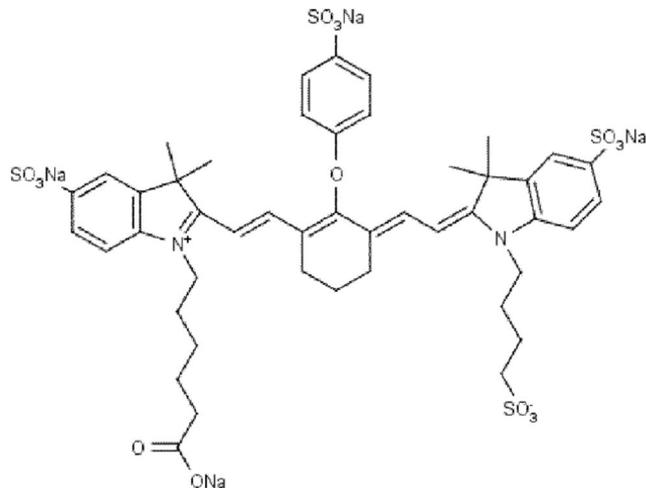


10

o D-781 que tiene la estructura:



o IR Dye-800 que tiene la structure:

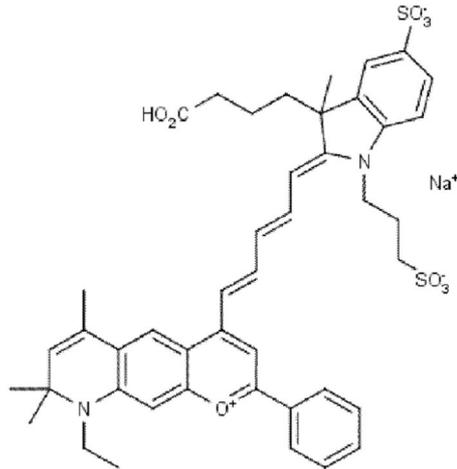


15

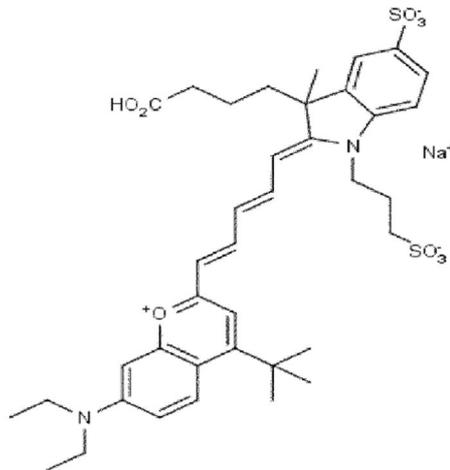
3. Un marcador de muerte celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad degenerativa del ojo es glaucoma o retinopatía diabética.

5 4. Un marcador de muerte celular para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la enfermedad neurodegenerativa del cerebro es la enfermedad de Alzheimer.

5. Una composición farmacéutica que comprende un marcador de muerte celular etiquetado con una etiqueta que tiene una longitud de onda en el espectro infrarrojo, en la que el marcador se selecciona de D-776 que tiene la estructura:



10 y D-781 que tiene la estructura:



15 y en la que la composición es adecuada para administración ocular y en la que el marcador de muerte celular es una anexina.

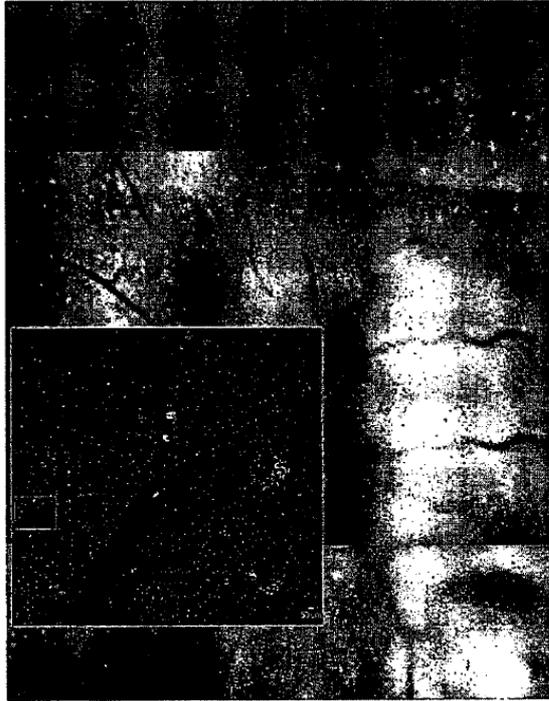


FIG. 1A

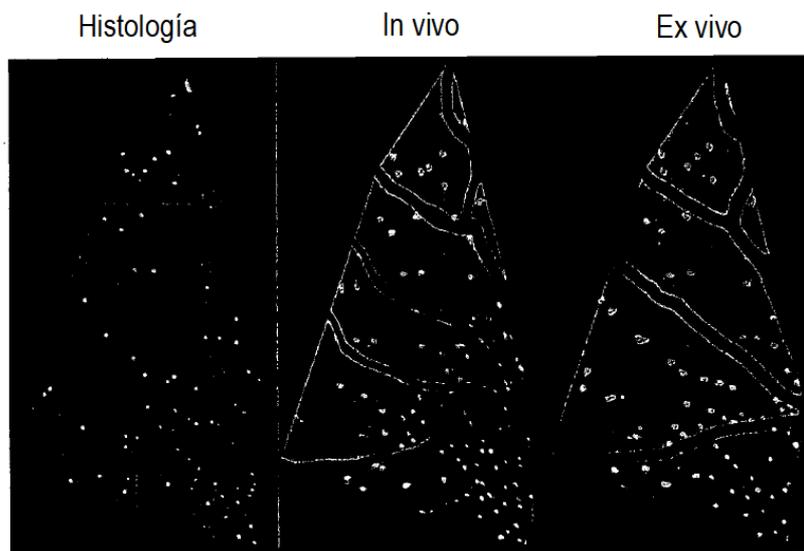


FIG. 1B

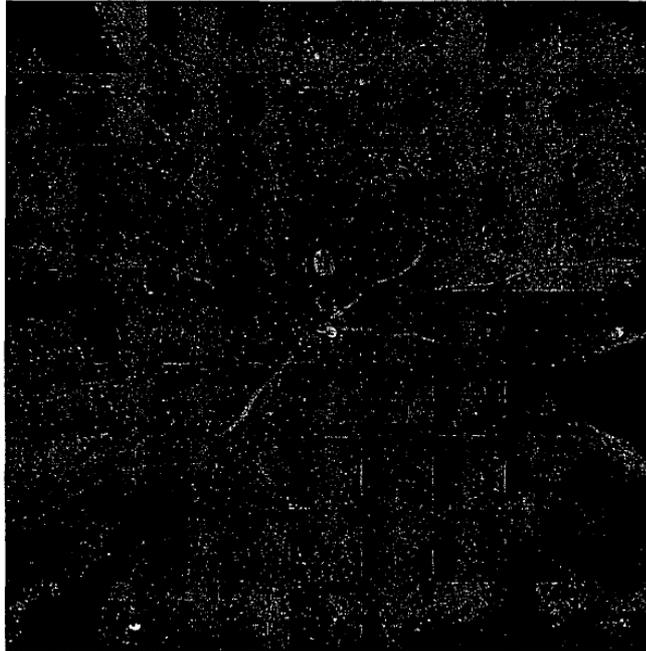


FIG. 2A

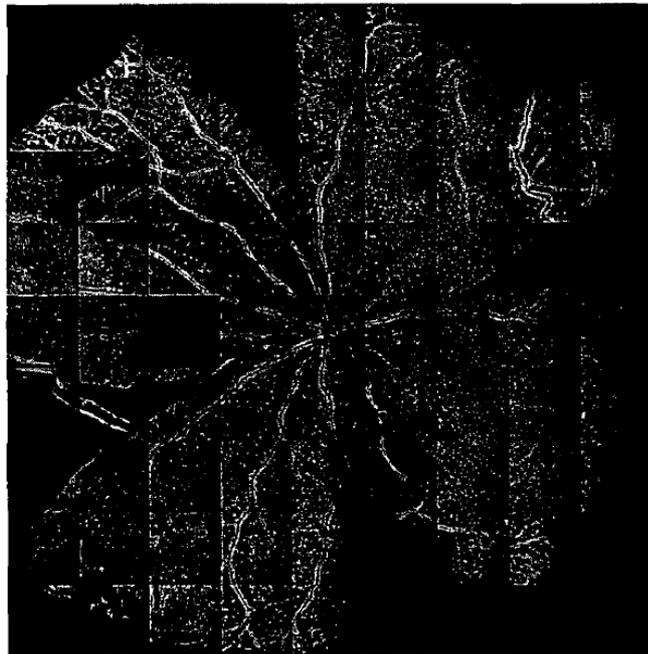


FIG. 2B

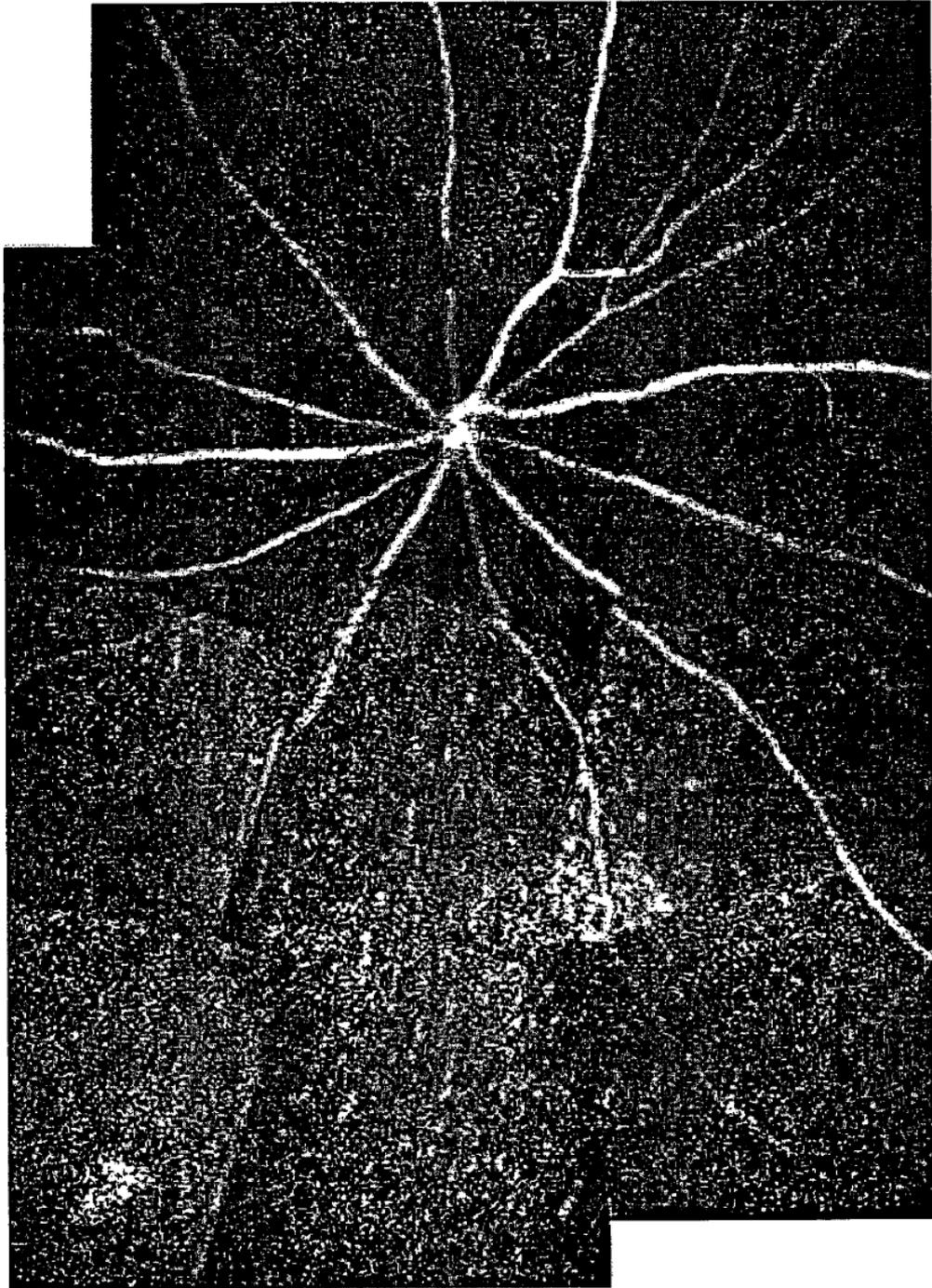


FIG. 2C

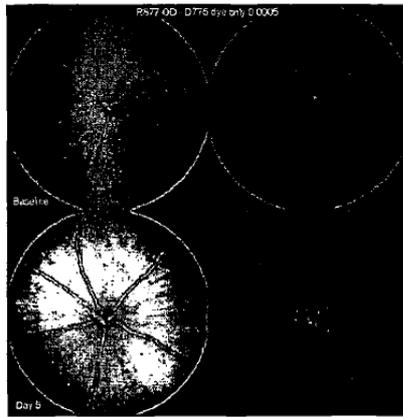


FIG. 3A

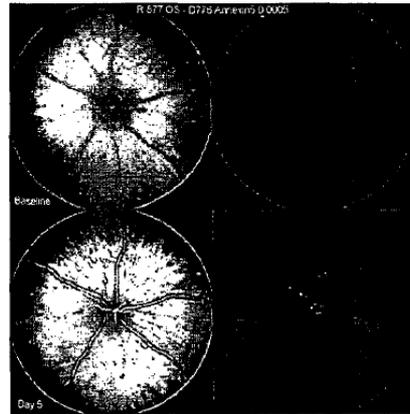


FIG. 3B

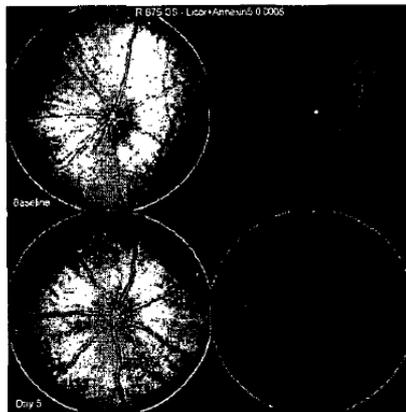


FIG. 3C

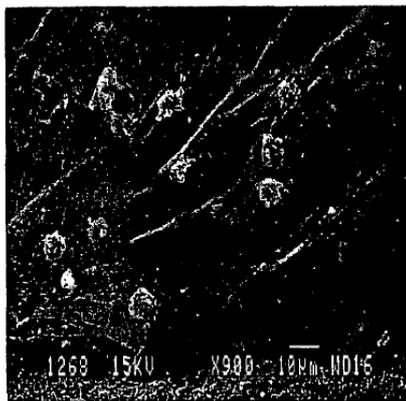


FIG. 4

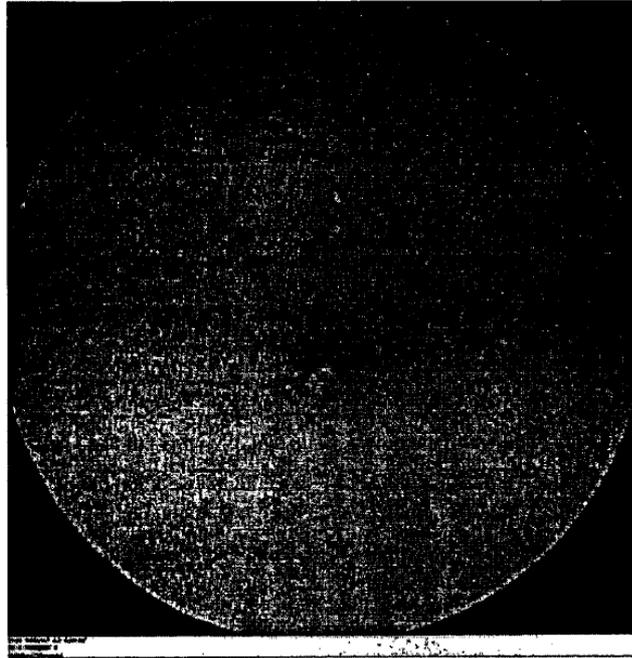


FIG. 5A

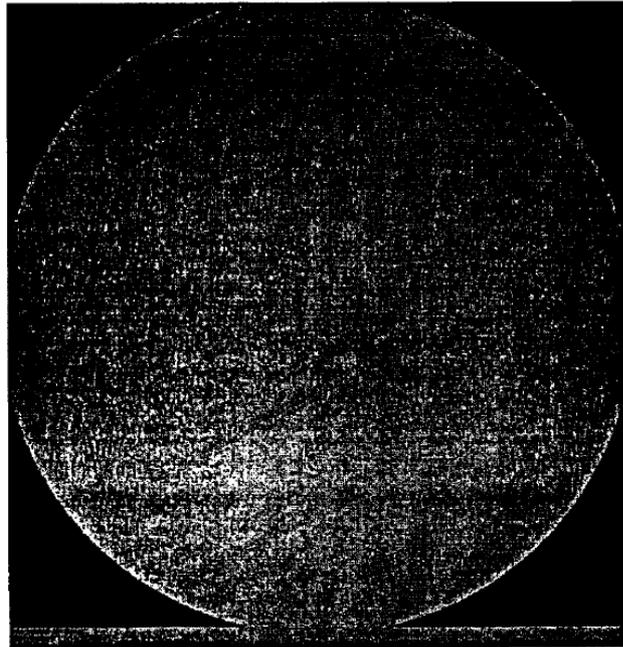


FIG. 5B

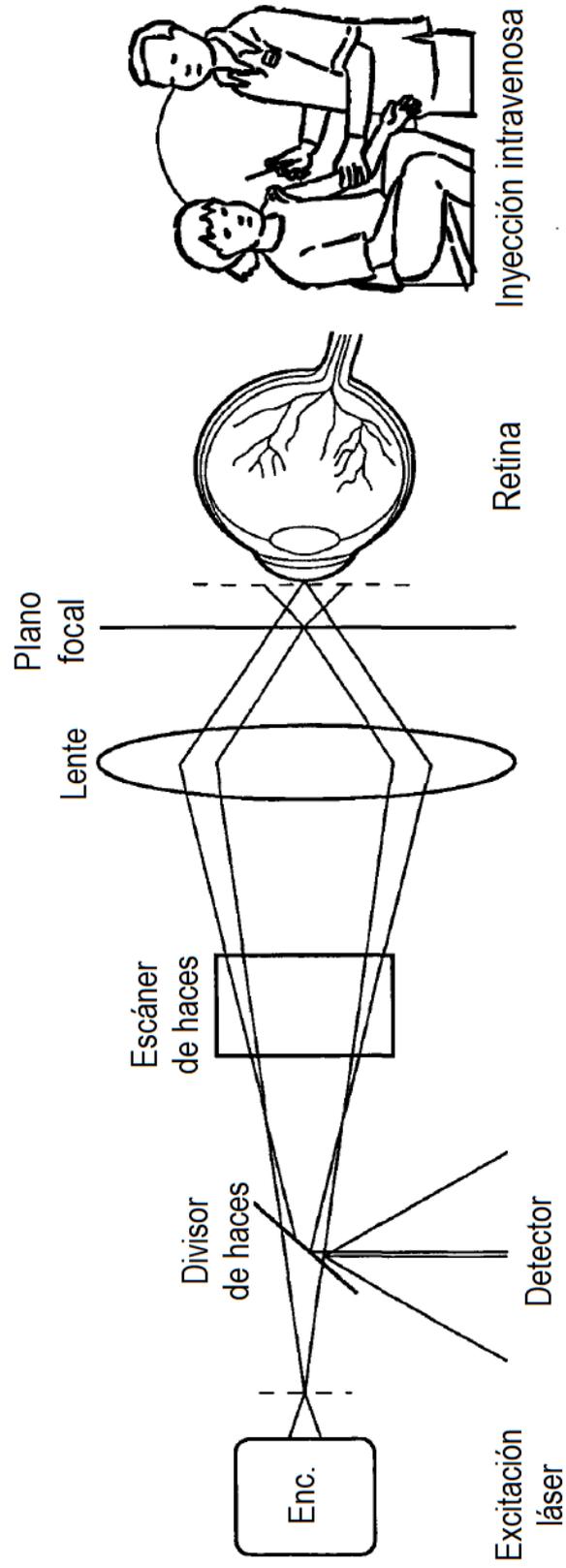


FIG. 6

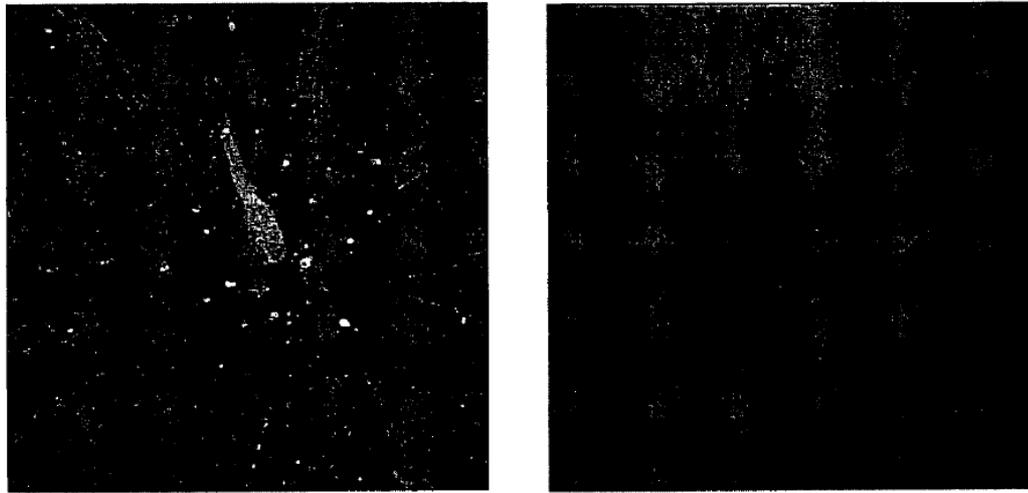


Imagen de histología

Anexina 488 intravítrea

Imagen in vivo

FIG. 7

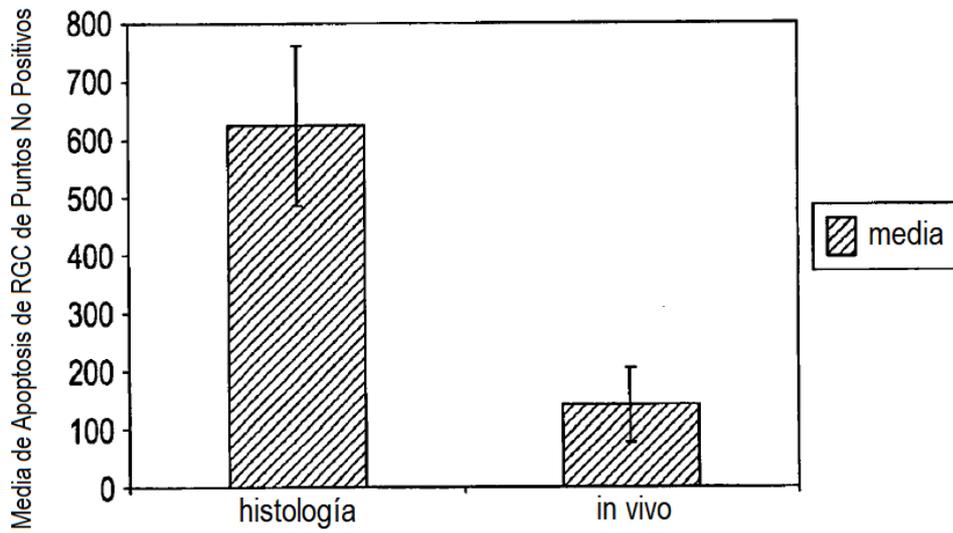


FIG. 8

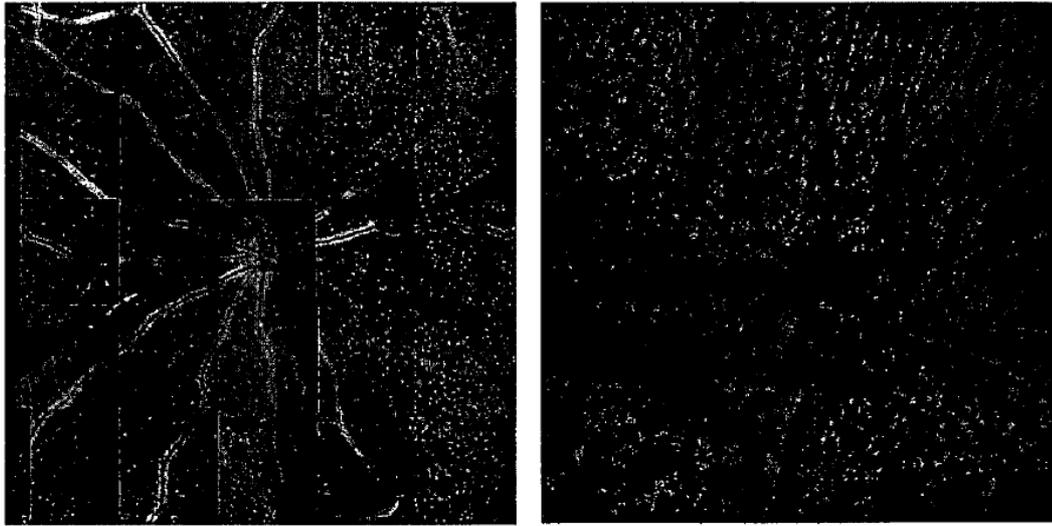


Imagen de histología

Anexina 488 IV

Imagen in vivo

FIG. 9

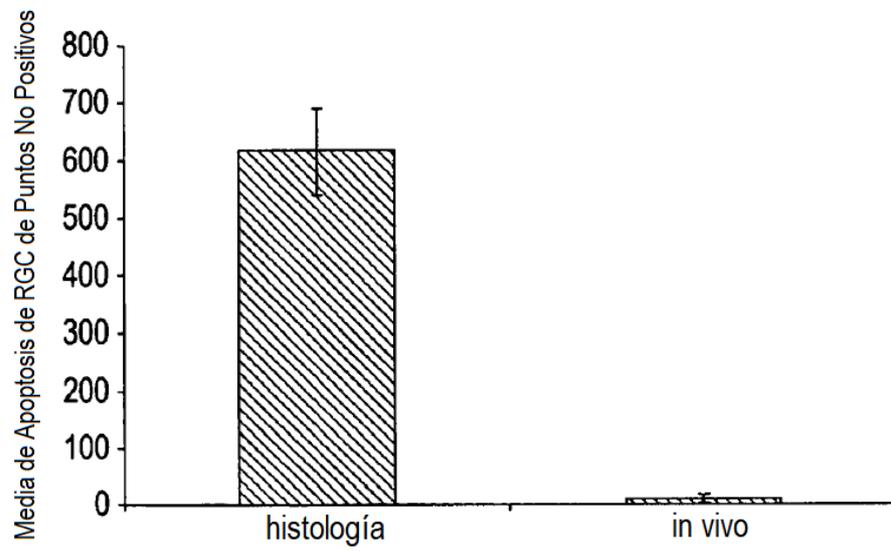


FIG. 10

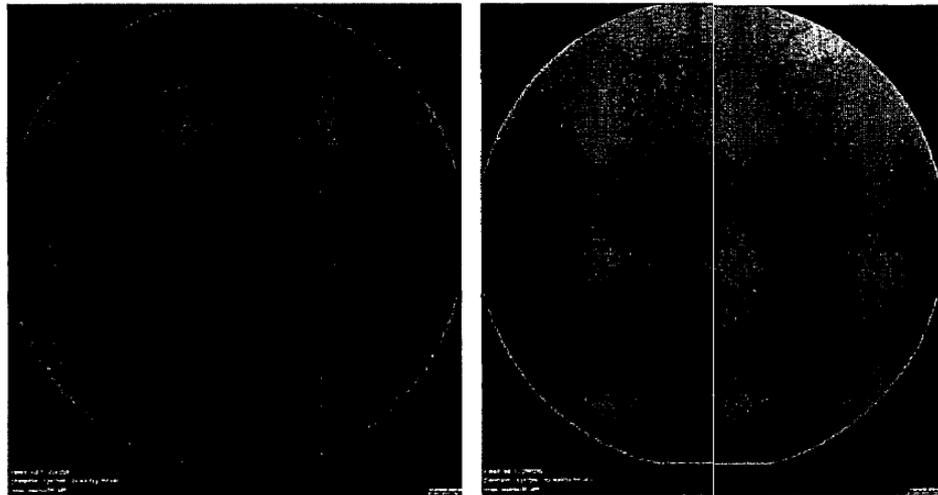


Imagen in vivo de referencia

Imagen in vivo 2 h después de SSP

Anexina Alexa Fluor 555

FIG. 11

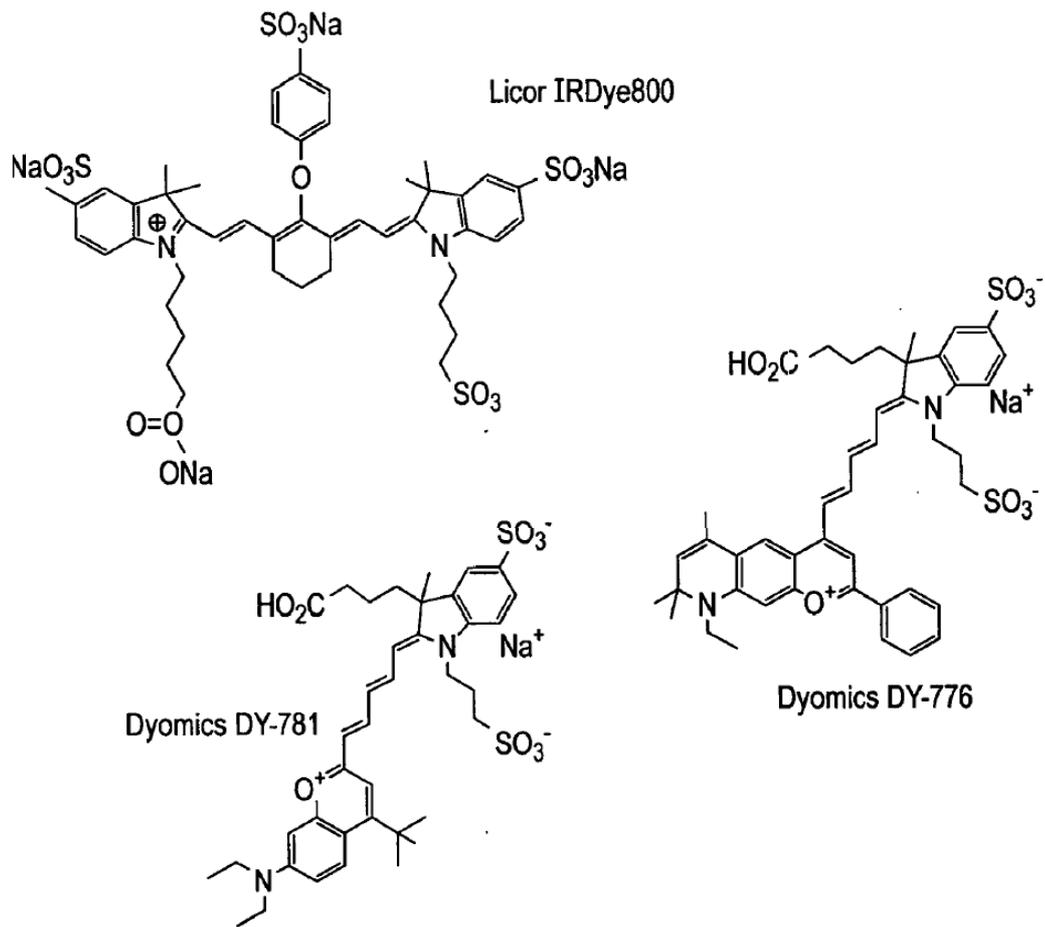


FIG. 12

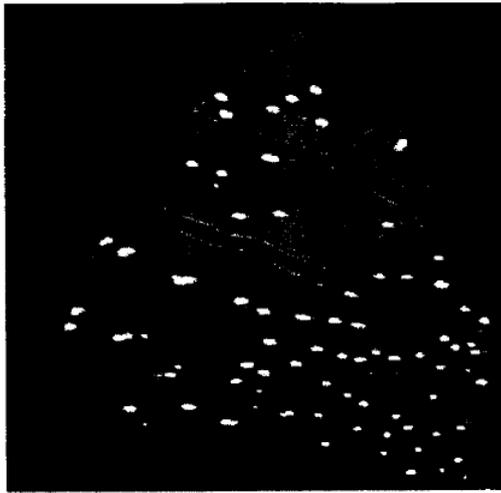


Imagen de histología

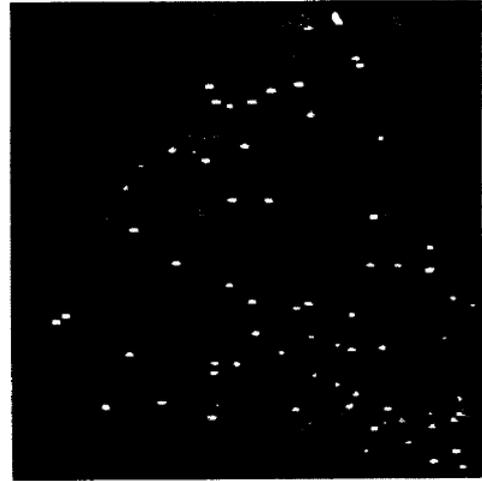


Imagen in vivo

Anexina 5 DY776

FIG. 13

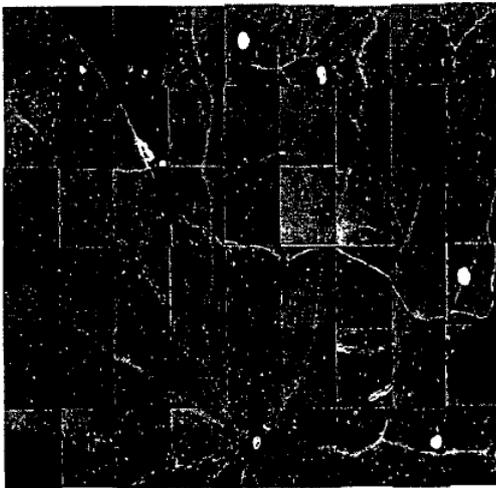


Imagen de histología

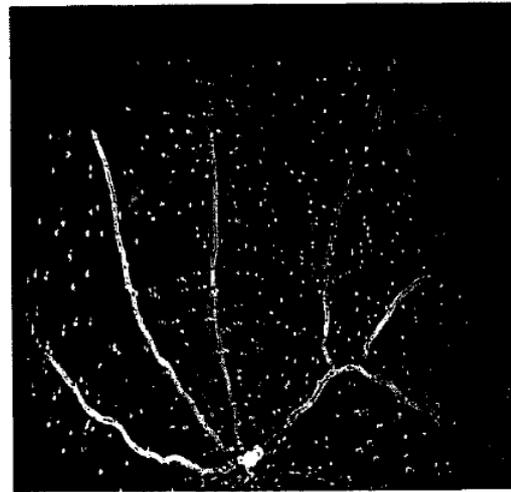
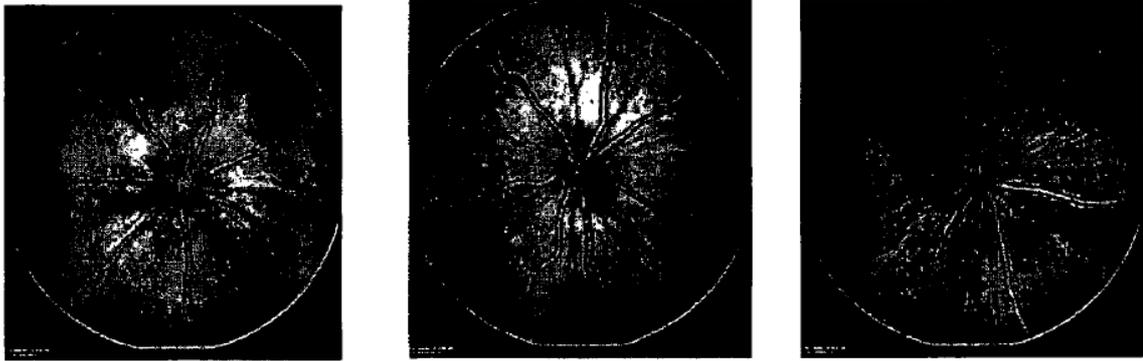


Imagen in vivo

Anexina 5 IRDye 800

FIG. 14



Anexina 5 IRDye 800

Anexina 5 Dy-781

Anexina 5 Dy-776

FIG. 15

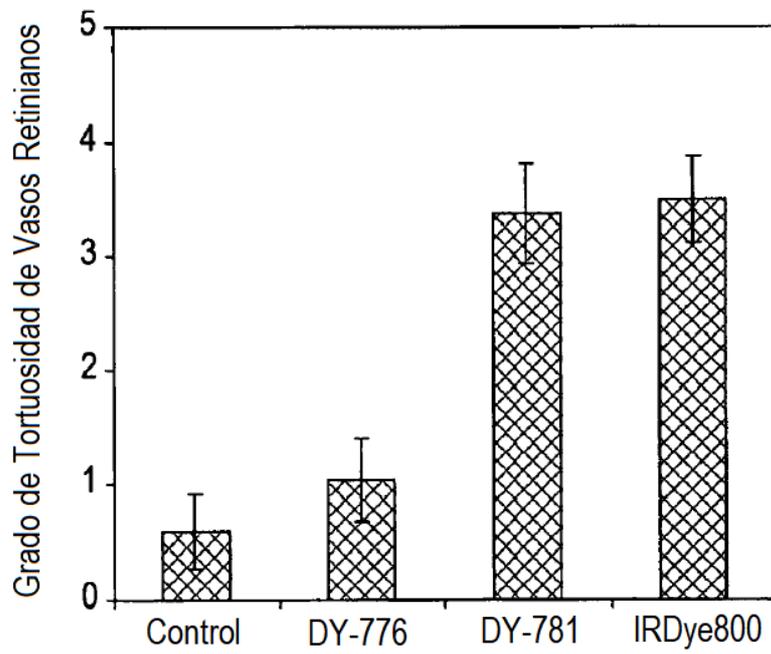


FIG. 16

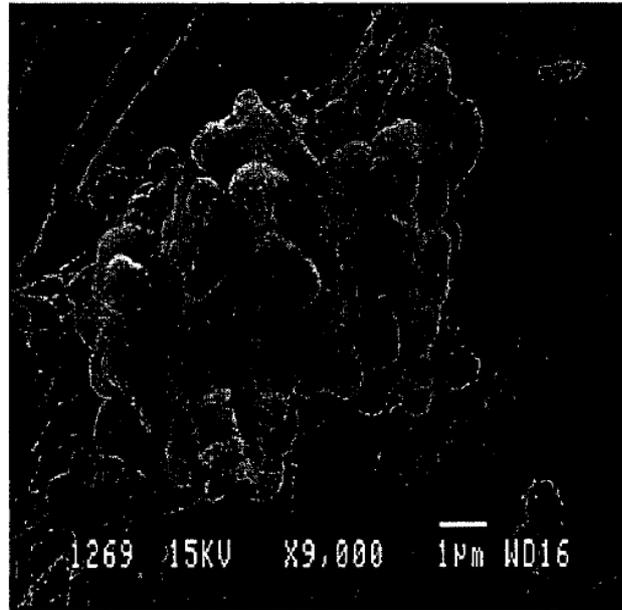


FIG. 17

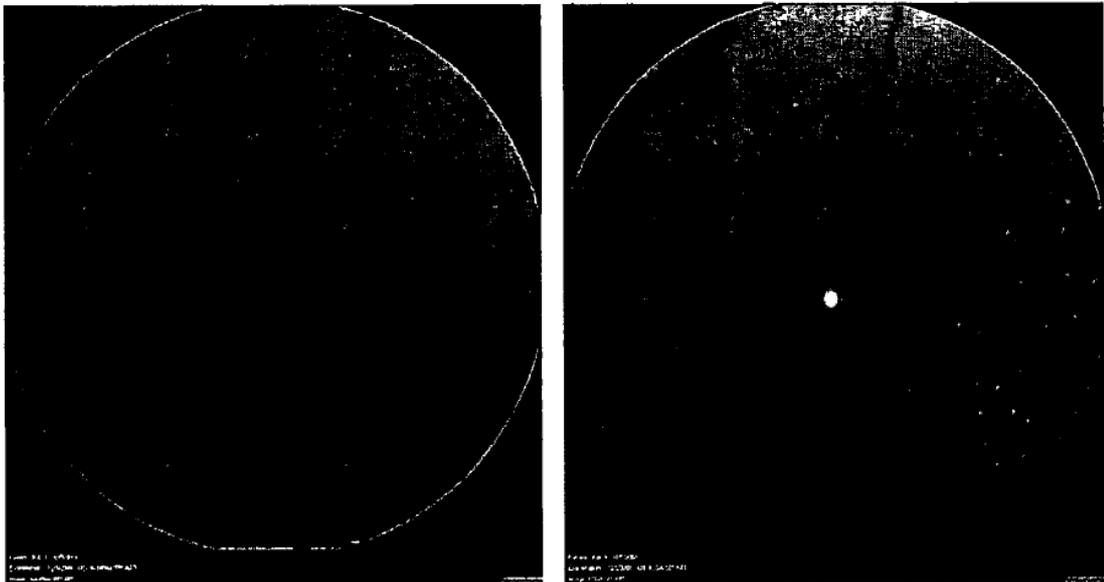


Imagen in vivo de referencia

Imagen in vivo 2 h después de SSP

Anexina 11 Dy776

FIG. 18

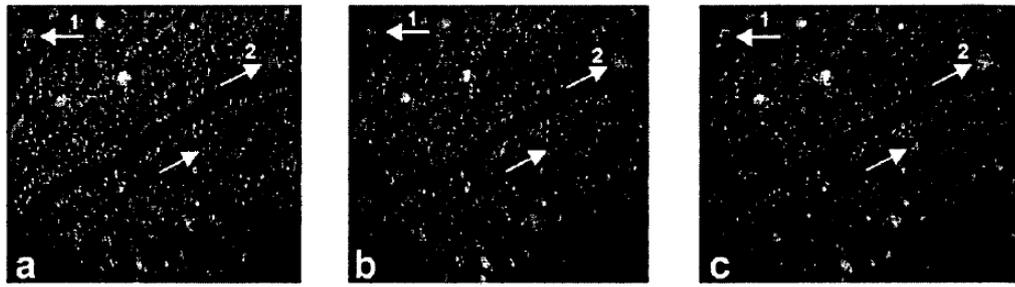


FIG. 19A

FIG. 19B

FIG. 19C

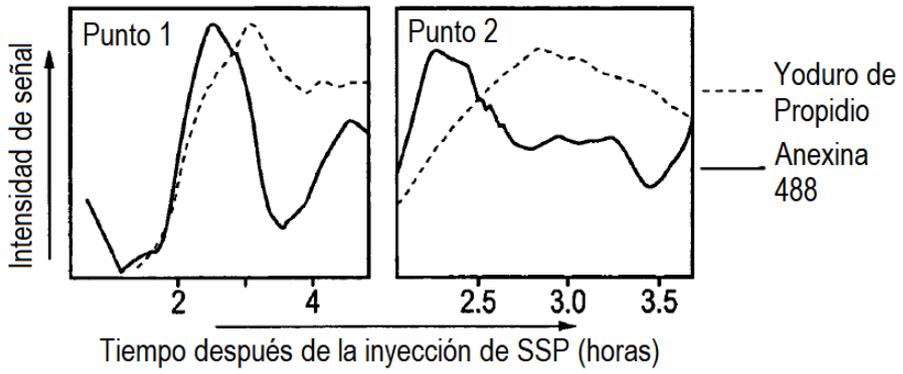


FIG. 19D

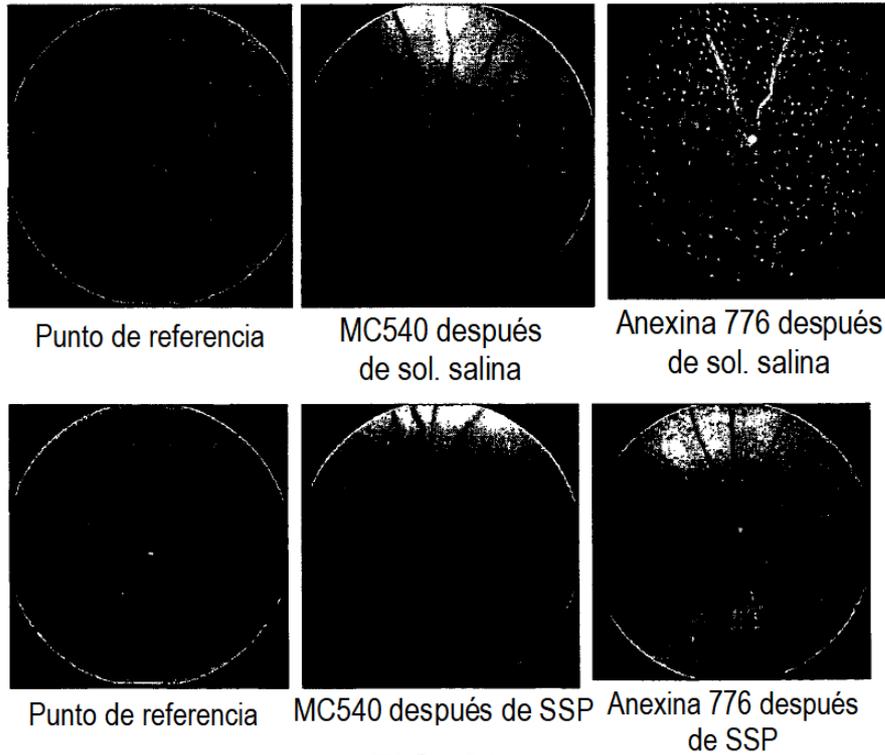


FIG. 20

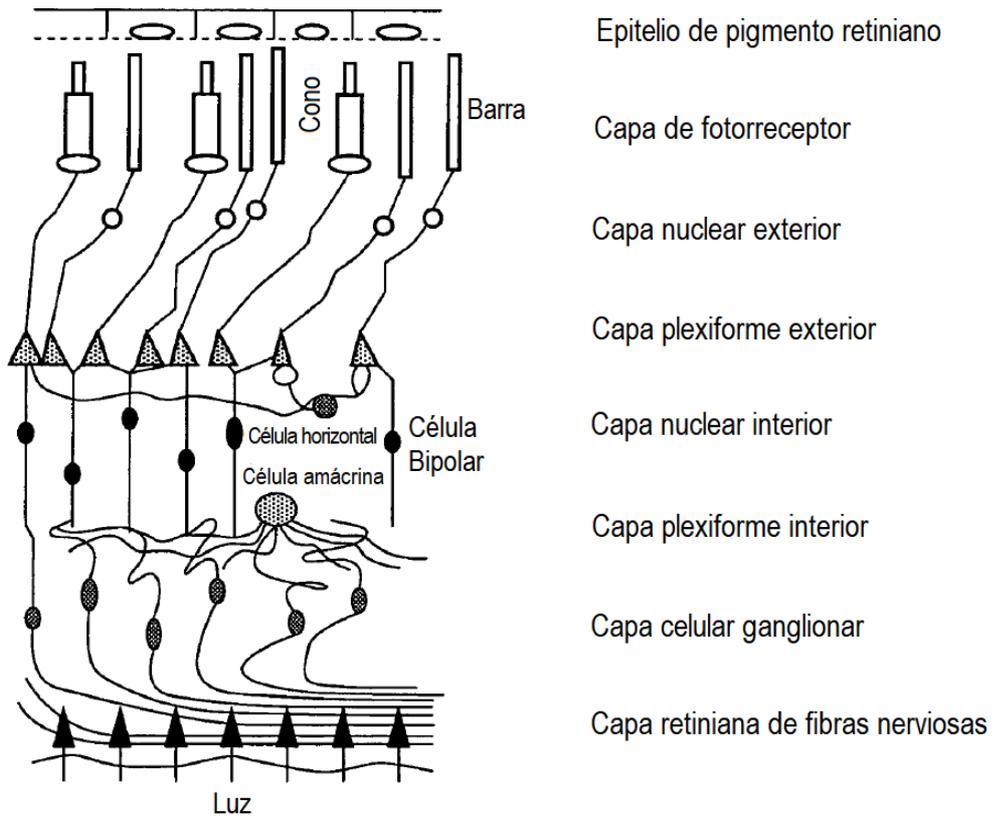


FIG. 21

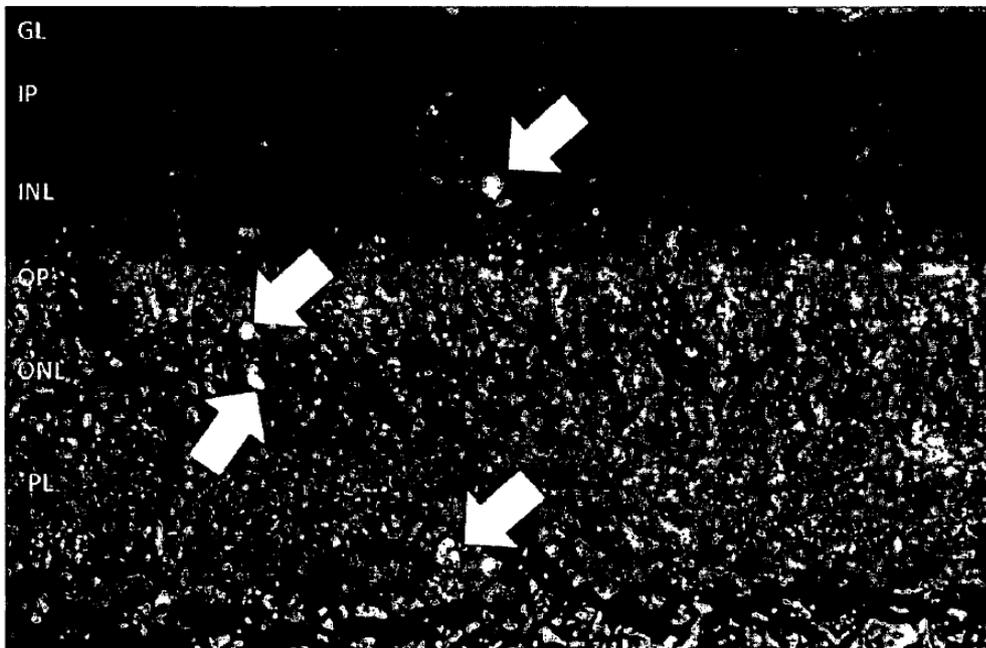


FIG. 22