



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 238 104** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) МПК<sup>7</sup> **A 61 K 38/16, 51/00, C 07 K 14/435, 1/00**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО  
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

- (21), (22) Заявка: 2001135855/15, 25.05.2000
- (24) Дата начала действия патента: 25.05.2000
- (30) Приоритет: 01.06.1999 US 09/324,096
- (43) Дата публикации заявки: 27.08.2003
- (45) Дата публикации: 20.10.2004
- (56) Ссылки: STRATTON et al. *Circulation*, 1995, v.92, p.3113-3121. VRIENS P.W. The use of technetium TC 99M annexin X for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft refection. *J. of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 1998, v.116, №5, p.844-853.
- (85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 03.01.2002
- (86) Заявка РСТ: US 00/14324 (25.05.2000)
- (87) Публикация РСТ: WO 00/73332 (07.12.2000)
- (98) Адрес для переписки: 129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Е.Е. Назиной

- (72) Изобретатель: ТАЙТ Джонатан Ф. (US), БРАУН Дэвид С. (US)
- (73) Патентообладатель: ЮНИВЕРСИТИ ОФ ВАШИНГТОН (US)
- (74) Патентный поверенный: Егорова Галина Борисовна

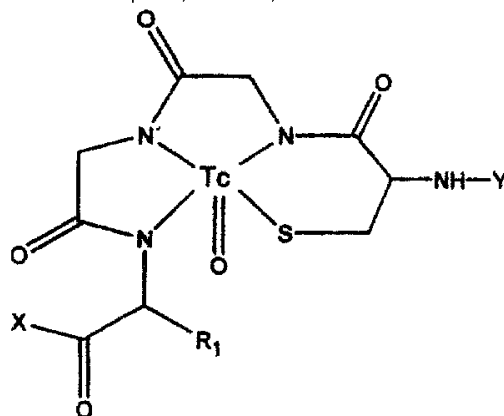
RU  
2  
2  
3  
8  
1  
0  
4  
C  
2

RU  
2  
2  
3  
8  
1  
0  
4  
C  
2

(54) **ПРОИЗВОДНЫЕ АННЕКСИНА С ЭНДОГЕННЫМИ САЙТАМИ ХЕЛАТИРОВАНИЯ**

(57) Изобретение относится к медицине и касается производных аннексина с эндогенными сайтами хелатирования и которые могут применяться в диагностике тромбоза. Сущность изобретения включает модифицированные аннексины, имеющие N-концевой сайт хелатирования, содержащий аминокислотный удлиняющий сегмент. Этот удлиняющий сегмент содержит аминокислотную последовательность X<sub>1</sub>-Gly-X<sub>2</sub>, где X<sub>1</sub> и X<sub>2</sub> выбраны из Gly, и Cys. и где, по меньшей мере, один из X<sub>1</sub> или X<sub>2</sub> является Cys. При этом радионуклиды легко хелатируются этими модифицированными аннексинами с получением радиоактивно меченых аннексинов. Преимущество изобретения заключается в получении аннексинов, которые могут применяться в диагностике тромбозов и апоптоза in vivo. 7

н. и 20 з.п. ф-лы, 4 табл., 2 ил.



(NH<sub>2</sub>) Cys-Gly-Gly (CO<sub>2</sub>H)

Фиг. 1А



(19) **RU** <sup>(11)</sup> **2 238 104** <sup>(13)</sup> **C2**

(51) Int. Cl.<sup>7</sup> **A 61 K 38/16, 51/00, C 07 K 14/435, 1/00**

RUSSIAN AGENCY  
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: 2001135855/15, 25.05.2000  
 (24) Effective date for property rights: 25.05.2000  
 (30) Priority: 01.06.1999 US 09/324,096  
 (43) Application published: 27.08.2003  
 (45) Date of publication: 20.10.2004  
 (85) Commencement of national phase: 03.01.2002  
 (86) PCT application:  
 US 00/14324 (25.05.2000)  
 (87) PCT publication:  
 WO 00/73332 (07.12.2000)  
 (98) Mail address:  
 129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,  
 OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i  
 Partnery", pat.pov. E.E. Nazinoj

(72) Inventor: TAJT Dzhonatan F. (US),  
 BRAUN Dehvid S. (US)  
 (73) Proprietor:  
 JuNIVERSITI OF VASHINGTON (US)  
 (74) Representative:  
 Egorova Galina Borisovna

(54) **ANNEXIN DERIVATIVES WITH ENDOGENIC SITES OF CHELATION**

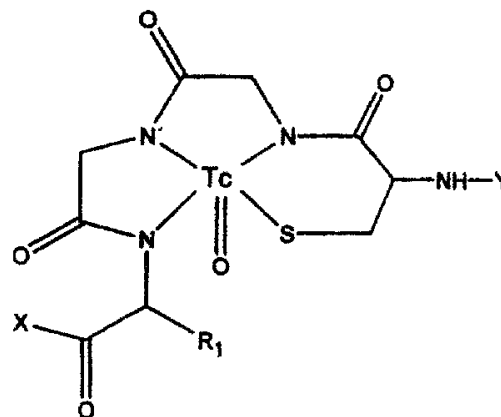
(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: the present innovation deals with annexin derivatives with endogenic sites of chelation to be applied in diagnostics of thrombosis. The innovation deals with modified annexins having N-terminal site of chelation containing amino acid-lengthening segment. The latter contains amino acid sequence X<sub>1</sub>-Gly-X<sub>2</sub>, where X<sub>1</sub> and X<sub>2</sub> are chosen out of Gly and Cys and where, at least, one out of X<sub>1</sub> or X<sub>2</sub> is Cys. Moreover, radionuclides are easily chelated by these modified annexins at obtaining radioactively labeled annexins. The annexins obtained could be applied in diagnostics of thrombosis and apoptosis in vivo.

EFFECT: higher efficiency.

27 cl, 2 dwg, 5 ex, 4 tbl



(NH<sub>2</sub>) Cys-Gly-Gly (CO<sub>2</sub>H)

Фиг. 1А

RU 2 238 104 C2

RU 2 238 104 C2

Область изобретения  
 Данное изобретение относится к производным аннексина, имеющие сайты хелатирования, производным аннексина с радиоактивной меткой и методы получения изображения с применением радиоактивно меченых производных аннексина.

Предпосылки создания изобретения

Образование тромбов в сосудах является важным осложняющим фактором при атеросклерозе и коронарной травме или коронарном заболевании. Методики определения наличия тромбов в сосуде включают инвазивные методики, которые часто сами являются тяжелыми и не дают возможности определить тромбы с хорошей чувствительностью и специфичностью. Доступные неинвазивные методики имеют ограниченную ценность и не способны дать изображение артериальных тромбов. При обычном получении изображения артериального тромбоза применяют радионуклидные методы, которые являются сложными, требуют много времени и ограничены в практическом применении. Более важно, что эти методы не дают возможности определения небольших тромбов, которые имеют большое клиническое значение, особенно при коронарных тромбах.

Активированные тромбоциты, связанные с сосудистыми тромбами, экспрессируют фосфатидилсерин, анионный фосфолипид в количестве значительно большем, чем тромбоциты в норме, которые экспрессируют мало, если вообще экспрессируют, фосфатидилсерина. Аннексины представляют собой класс белков, которые характеризуются опосредуемым кальцием связыванием с анионными фосфолипидами. Аннексин V является человеческим белком из 319 аминокислот с молекулярным весом 36000 Дальтон и связывается с фосфатидилсерином с высоким сродством ( $K_d=7$  нМ/л). Соответственно, аннексин V предоставляет потенциальную возможность для селективного меченя тромбоцитарных тромбов. Кроме того, так как фактически нет эндогенно циркулирующего аннексина V конкурентно связывающегося на тромбах или для разбавления экзогенно вводимого аннексина V, аннексин V является привлекательным кандидатом для неинвазивного определения сосудистых тромбов. Недавно радиоактивно меченные производные аннексинов были использованы для получения изображения тромбов сосудов *in vivo*. Stratton et al., *Circulation*, 92:3113-3121, 1995.

В дополнение к его ассоциации с тромбами сосудов происходит также экспрессия фосфатидилсерина на поверхности клеток во время апоптоза. Одним из наиболее ранних событий при запрограммированной гибели клеток является внешнее проявление фосфатидилсерина, мембранного фосфолипида, в норме закрытого внутренним листком липидного бислоя. Клетки, подвергающиеся апоптозу, перераспределяют фосфатидилсерин из внутреннего листка липидного бислоя плазматической мембраны на наружный листок.

Гибель клетки может происходить или посредством некроза, что приводит к

нерегулируемому выделению ряда внутриклеточных веществ, или путем апоптоза, который является организованной последовательностью, оставляющей небольшой клеточный остаток. При апоптозе клеточный дебрис абсорбируется на соседних клетках без повреждения примыкающей ткани или внеклеточного матрикса. Апоптоз (или запрограммированная гибель клеток) играет важную роль в ряде физиологических явлений, включающих эмбриогенез, регуляцию иммунной системы и гомеостаз. Запрограммированная гибель клеток также играет роль и в патогенезе ряда заболеваний, включая СПИД и другие вирусные заболевания, церебральную ишемию и миокардиоишемию, аутоиммунные и нейродегенеративные заболевания, отторжение трансплантата органа и костного мозга и реакцию опухоли на химиотерапию и облучение.

Апоптоз определялся на гистологических срезах с помощью окрашивания *in situ* разрывов ДНК, образовавшимися путем расщепления хроматина эндонуклеазами, путем получения изображения с помощью концевое опосредованного дезоксирибонуклеотидилтрансферазой дезоксирибонуклеотинового трифосфата биотинированного одностороннего разрыва и внесения метки.

Так как аннексин обладает высоким сродством в отношении клеточных мембран, экспрессирующих фосфатидилсерин, производные аннексина V были использованы для обнаружения апоптоза в гематopoэтических клетках, нейронах, фибробластах, эндотелиальных клетках, клетках гладких мышц, карциномах, лимфомах, всех мышечных типах эмбриональных клеток и клетках растений и насекомых. Сообщалось о применении радиоактивно меченого аннексина V для получения изображения *in vivo* экспрессии фосфатидилсерина, связанной с апоптозом. Blankenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:6349-6354, 1998. Сообщалось, что во время запрограммированной гибели клеток определяли экспрессию фосфатидилсерина, которую визуализировали посредством использования радиоактивно меченого конъюгата аннексина ( $^{99m}\text{Tc}$  ГИНИК-аннексина V). Сообщалось также об использовании того же самого радиоактивно меченого конъюгата аннексина для получения изображения апоптоза *in vivo* во время отторжения аллотрансплантата сердца. Vriens et al., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 116:844-853, 1998.

Несмотря на преимущества и превосходство, связанные со средствами получения изображения на основе аннексина, указанные выше, остается потребность в улучшенных средствах для получения изображения на основе аннексинов, которые эффективны для получения изображения тромбов сосудов и апоптоза, и которые более легки в получении, чем используемые в настоящее время конъюгаты аннексина. Данное изобретение обращено к удовлетворению этих потребностей и представляет дополнительные связанные с ним преимущества.

Краткое изложение изобретения

В одном из аспектов данное изобретение представляет модифицированный аннексин,

имеющий N-концевой сайт хелатирования. Благодаря сайту хелатирования модифицированный аннексин легко хелатирует радионуклид с получением радиоактивно меченого аннексина. При предпочтительном воплощении модифицированный аннексин включает эндогенный сайт хелатирования, который получен с помощью рекомбинантной технологии. Также представлены способы получения модифицированного аннексина.

В другом аспекте данное изобретение представляет способ получения изображения тромбов сосудов. При данном способе изображения тромбов сосудов получают, используя модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, с которым образует комплекс радионуклид.

В дополнительном аспекте данное изобретение представляет способ получения изображения апоптоза. При данном способе изображение апоптоза получают с использованием модифицированного аннексина, имеющего N-концевой сайт хелатирования, с которым образует комплекс радионуклид.

Представленные аспекты и многие сопутствующие преимущества данного изобретения станут более легко понятными при обращении к следующему ниже подробному описанию, в сочетании с соответствующими чертежами, где фиг.1A-1C представляют химическое строение сайтов хелатирования данного изобретения с хелатированным технецием; и фиг.2 схематически представляет рЕТ-12a-PAP1.

Подробное описание изобретения

Данное изобретение относится к производным аннексина. По использованию здесь термин "аннексин" относится к классу белков, характеризующихся своей способностью связываться с высоким сродством с мембранными липидами в присутствии миллимолярных концентраций кальция. Аннексины, как было показано, проявляют антикоагулянтное действие, которое осуществляется связыванием аннексинов с отрицательно заряженными поверхностными фосфолипидами (например, на активированных тромбоцитах). Аннексин V является примером молекулы аннексина, используемым в описании данного изобретения. Аннексины в рамках данного изобретения включают аннексины I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, XI, XIII, XXXI и XXXII. Термин "аннексин" включает природный аннексин, выделенный из природных источников и очищенный, таких как, например, человеческая плацента, или молекулы аннексина, содержащие природную последовательность, получаемую с помощью генной инженерии, рекомбинантной технологии или других средств. Термин "аннексин" включает модифицированные аннексины, которым дано определение ниже, полученные из любого источника, или продуцируемые любым источником. По использованию здесь, термин "модифицированный аннексин" относится к молекуле аннексина, причем природная последовательность или молекула изменена таким образом, без существенного изменения сродства связывания аннексина с мембраной. Такие аннексины могут быть получены с

помощью химических методов, методов генной инженерии и рекомбинантной технологии. Модификация может включать модификацию последовательности посредством добавления нескольких аминокислотных остатков и/или добавления/удаления аминокислоты в единственном сайте в природной или генно-инженерной последовательности. В контексте данного изобретения модифицированные аннексины включают аннексины, модифицированные по N-концу путем добавления аминокислотных остатков.

В одном из аспектов данное изобретение представляет модифицированный аннексин, пригодный для радиоактивного мечения диагностическими средствами для получения изображения. При предпочтительном осуществлении данное изобретение представляет модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, включающий аминокислотное удлинение. Аминокислотное удлинение включает аминокислотную последовательность, имеющую, по меньшей мере, глицин и, по меньшей мере, один цистеин в аминокислотной последовательности. При предпочтительном осуществлении аминокислотное удлинение имеет аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly и Cys, где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  представляет собой Cys. Соответственно, предпочтительное аминокислотное удлинение включает аминокислотные последовательности: Gly-Gly-Cys, Cys-Gly-Gly и Cys-Gly-Cys.

Аминокислотное удлинение может дополнительно включать одну аминокислоту или более на одном из концов удлинения. Природа этих дополнительных аминокислот не является особо значимой при условии, что дополнительные аминокислоты не влияют ни на связывание аннексина, необходимое для получения изображения, ни на способность модифицированного аннексина хелатировать радионуклид. Например, последовательностям, указанным выше, может предшествовать такая аминокислота, как гистидин и/или глицин, а за ней может следовать такая аминокислота, как аланин.

Предлагаемые структуры для удлиняющих аминокислотных сегментов с хелатированным технецием проиллюстрированы на фиг.1. На фиг.1A-1C изображены химические структуры для сайтов хелатирования, соответствующих аминокислотным последовательностям Cys-Gly-Gly, Gly-Gly-Cys и Cys-Gly-Cys, соответственно. На этих фигурах "X" и "Y" относятся к частям молекулы (например, одной аминокислоте или более) за сайтом хелатирования. Альтернативно, "X" может представлять C-конец, а "Y" может представлять N-конец молекулы, включая сайт хелатирования. Например, "X" может представлять собой последовательность аминокислот, образующую C-конец полипептида (например, C-конец аннексина), а "Y" может представлять собой последовательность аминокислот, образующую N-конец полипептида (например, N-конец модифицированного аннексина). Обращаясь к фиг.1, технеций хелатирован атомами азота и серы из аминокислотной последовательности Cys-Gly-Gly, как

показано. На фиг.1 показано, что хелатирование включает атом азота из амидной связи соседней аминокислоты ( $R_1$  является заместителем аминокислоты, выбранным из заместителей для встречающихся в природе аминокислот).

Сайт хелатирования, включающий одну из аминокислотных последовательностей, указанных выше, расположен на N-конце молекулы аннексина. N-конец аннексина отдален от его биологического сайта связывания. Типичный модифицированный аннексин, имеющий аминокислотную последовательность, включающую удлиняющий сегмент Cys-Gly-Gly, представлен в SEQ ID NO:2. Модифицированный аннексин, имеющий аминокислотную последовательность, включающую удлиняющий сегмент Gly-Gly-Cys, представлен в SEQ ID NO:4. Типичный модифицированный аннексин, имеющий аминокислотную последовательность, включающую удлиняющий сегмент Cys-Gly-Cys, представлен в SEQ ID NO:6. Модифицированные аннексины, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6, включают их N-концевые метиониновые остатки, которые в норме удаляются пост-трансляционно как у людей, так и у *E.coli*. При предпочтительных воплощениях модифицированный аннексин изменен так, что включает серию в положении 316. Такая модификация приводит к замене серина на цистеин.

Модифицированные аннексины данного изобретения включают удлиняющий N-концевой аминокислотный сегмент. Удлиняющий аминокислотный сегмент может быть добавлен к аннексину с помощью химических средств. Альтернативно, при предпочтительном воплощении удлиняющая аминокислотная вставка осуществляется с помощью генной инженерии (т.е. включается в аннексин с помощью рекомбинантной технологии). Соответственно, модифицированные аннексины данного изобретения, предпочтительно, получают с помощью генной инженерии. В кратком изложении, кДНК, кодирующую аннексин V дикого типа или мутантный аннексин V, клонировали в вектор (например, pET12a) и затем трансформировали в штамм *E.coli* (например, BL21(DE3)). Данную клеточную линию затем выращивали в среде для выращивания и экспрессированный белок собирали и очищали. Типичный способ получения модифицированных аннексинов данного изобретения описан в примерах 1 и 2. По этому способу данное изобретение представляет биоинженерные формы аннексина V, имеющие эндогенные сайты хелатирования.

При другом воплощении данное изобретение представляет молекулу выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированные аннексины, указанные выше. Данное изобретение представляет молекулу выделенной нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированные аннексины, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6. Более конкретно, данное

изобретение представляет молекулы выделенных нуклеиновых кислот, имеющие последовательности нуклеиновых кислот, представленные в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5.

5 Данное изобретение представляет также реплицируемый вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный аннексин, который  
10 описан выше. Данное изобретение представляет реплицируемый вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, который  
15 включает аминокислотную последовательность  $X_1$ -Gly- $X_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбираются из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  и  $X_2$  представляет собой Cys. Данное изобретение представляет также реплицируемые векторы экспрессии, включающие последовательности  
20 нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированные аннексины, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6.

Модифицированные аннексины данного изобретения являются, предпочтительно, очищенными рекомбинантными белками, полученными из клеток-хозяев, содержащих векторы экспрессии, которые кодируют модифицированные аннексины. Таким образом, в другом аспекте данное изобретение представляет клетки-хозяева, содержащие векторы экспрессии, кодирующие модифицированные аннексины  
35 данного изобретения. Данное изобретение представляет клетки-хозяева, включающие вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, включающий аминокислотную  
40 последовательность  $X_1$ -Gly- $X_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбираются из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  и  $X_2$  является Cys. Данное изобретение представляет также клетки-хозяева, включающие векторы  
45 экспрессии, имеющие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие модифицированные аннексины, имеющие аминокислотные последовательности, представленные в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 и SEQ ID NO:6.

В другом аспекте данное изобретение представляет модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, который образует комплекс с радионуклидом. Соответствующие радионуклиды  
50 включают  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ,  $^{94}\text{Tc}$ ,  $^{95}\text{Ru}$ ,  $^{100}\text{Pd}$ ,  $^{109}\text{Pd}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{212}\text{Pb}$  и  $^{111}\text{In}$ . При предпочтительном воплощении радионуклидом, образующим комплекс с модифицированными аннексинами, является  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Способ образования типичных модифицированных аннексинов, хелатированных технецием, описан в примере 3. Радиохимический выход и радиохимическая чистота модифицированных аннексинов данного изобретения, образовавших комплексы с технецием, также представлены в примере 3.

Как резюмировано в табл. 2 радиохимический выход, определяемый как процент выхода радиоактивно меченого белка по радионуклиду для модифицированных аннексинов (аннексин V-116, -117 и -118) был высоким (т.е. 79,3, 71,0 и 94,3 процентов, соответственно) и сравнимым с выходом аннексинохелатного конъюгата (т.е.  $^{99m}\text{Tc}$  ГИНИК-аннексин V, 97,0 процентов), демонстрируя, что модифицированные аннексины эффективно хелатируют технеций. Аннексин V продемонстрировал только незначительное неспецифическое связывание технеция (3,9 процента).

Средний радиохимический выход для меченого аннексина V с другим экзогенным органическим хелатором ( $\text{N}_2\text{S}_2\text{-TFP}$ ), как сообщалось, составлял 48 процентов. Stratton et al., *Circulation*, 92:3113-3121, 1995. Радиохимический выход, обеспечиваемый модифицированными аннексинами данного изобретения, значительно выше, чем для аннексиновых хелаторных конъюгатов.

Радиохимическую чистоту меченых технецием аннексинов определяли после гель-фильтрации и показано, что модифицированные аннексины имели высокую чистоту (88,3, 89,3 и 98,0 процентов, соответственно), сравнимую с аннексинохелатным конъюгатом (99,0 процентов).

Аннексинохелатным конъюгатом, использованным при сравнении, был гидразиноникотинамидный (HYNIC=ГИНИК) конъюгат. Конъюгат и его соответствующий комплекс с технецием может быть получен по методам, описанным Abrams et al., *J.Nucl. Med.*, 31:2022-2028, 1990 Blankenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:6349-6354, 1998. В кратком изложении, радиоактивно меченый аннексиновый конъюгат получают в две стадии: (1) взаимодействие аннексина с сукцимидил-6-ГИНИК для получения ГИНИК-производного аннексина и (2) инкубация производного аннексина с  $^{99m}\text{Tc}$ -глюкогептаноатом с последующей очисткой гель-фильтрацией для получения радиоактивно меченого белка. Метод конъюгации, указанный выше, с использованием хелатопроизводного белкового конъюгата, является типичным для включения радионуклидов в белки.

Среди модифицированных аннексинов данного изобретения наивысшие радиохимический выход и радиохимическую чистоту получали для аннексина V-118, который включает удлиняющий аминокислотный сегмент Cys-Gly-Cys. В противоположность другим модифицированным аннексинам аннексин V-118 включает два цистеиновых остатка в удлиняющем аминокислотном сегменте, а не единственный цистеиновый остаток в удлиняющих аминокислотных сегментах аннексина V-116 и -117, которые включают последовательности Cys-Gly-Gly и Gly-Gly-Cys, соответственно. Соответственно, модифицированный аннексин, включающий последовательность Cys-Gly-Cys, может быть характеризован как  $\text{N}_2\text{S}_2$ -пептидный хелат, а другие модифицированные аннексины, включающие последовательности Cys-Gly-Gly и Gly-Gly-Cys, соответственно, могут быть характеризованы как  $\text{N}_3\text{S}$ -пептидные хелаты.

5 Термин " $\text{N}_x\text{S}_y$ " относится к хелатам с координацией к радионуклиду. Обычные  $\text{N}_x\text{S}_y$  хелатирующие соединения описаны в международной патентной заявке с серийным №PCT/US97/12977, включенной сюда в виде ссылок. В данном изобретении модифицированный аннексин, включающий  $\text{N}_2\text{S}_2$ -пептидный хелат (т.е. аминокислотный удлиняющий сегмент Cys-Gly-Cys), обеспечивает наивысшие радиохимический выход и чистоту.

10 Биологическая активность модифицированных аннексинов данного изобретения описана в примере 4. В примере 4 средство модифицированных аннексинов к клеточным мембранам определяется их способностью конкурировать с меченым флуоресцеином аннексином V в отношении связывания с эритроцитами, подвергшимся действию фосфатидилсерина.

20 Как резюмировано в табл. 3, при исследовании конкурентного связывания модифицированные аннексины данного изобретения проявляют слегка сниженное связывание по сравнению с флуоресцеиновым производным аннексина V ( $\text{IC}_{50}$ =9,3, 10,3 и 10,1 по сравнению с 6,8 для аннексина V дикого типа). Однако связывание модифицированных аннексинов было по существу эквивалентным показателю для аннексинового хелатного конъюгата ( $\text{IC}_{50}$ =10,1).

30 Связывание радиоактивно меченых модифицированных аннексинов с эритроцитами определяли также путем измерения процента радиоактивности, связанной клетками после инкубации с модифицированными аннексинами. Результаты, обобщенные в табл. 4, показывают, что связывание модифицированных аннексинов сравнимо или выше по сравнению с аннексинохелатным конъюгатом.

40 Результаты показывают, что модифицированные аннексины данного изобретения могут эффективно хелатировать радионуклид и сохранять биологическую активность аннексинов. Результаты показывают, что модифицированные аннексины данного изобретения могут быть легко получены с высоким радиохимическим выходом и с высокой радиохимической чистотой, и эффективны так же, как и обычный аннексинохелатный конъюгат в отношении их свойств связывания.

45 В противоположность обычным аннексинохелатным конъюгатам модифицированные аннексины данного изобретения предполагают в качестве преимущества простоту производства. В то время как обычные хелатные конъюгаты требуют многих химических стадий и стадий очистки, модифицированные аннексины требуют только инкубации с радионуклидом для получения диагностического реагента. Таким образом, данное изобретение простым способом обеспечивает клинически применимый реагент для получения изображения. Кроме того, так как обычные общепринятые химические процессы конъюгации обычно основаны на конъюгации лизиновых остатков белка, число и расположение конъюгированного заместителя высокоизменчивы, и для конъюгации не является необычным то, что она происходит

вблизи сайта биологической активности, подавляя, тем самым, биологическую активность конъюгата. В противоположность обычным химическим процессам конъюгации, которые дают разброс продуктов конъюгации, данное изобретение представляет модифицированный белок, имеющий единственный сайт хелатирования, отдаленный от сайта биологической активности.

В другом аспекте данного изобретения представлены способы применения модифицированных аннексинов для получения изображения тромбов сосудов и апоптоза.

Производные аннексинов были использованы для получения изображения тромбов сосудов. Высокоselectивный захват радиоактивно меченого аннексина V на тромбе в левом предсердии на модели на свинье подтвердил возможность выявления тромба левого предсердия *in vivo* с использованием получения изображения радиоактивно меченого аннексина с помощью гамма-камеры. Работа Stratton et al. *Circulation*, 92:3113-3121, 1995 включена сюда в виде ссылки. При этом способе изображение внутрисердечного тромба получали с

использованием  $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ -комплекса, который предварительно формировали, а затем он ковалентно конъюгировал с аннексином V. Комплекс с технецием получали, как описано в Kasina et al., *J.Nucl. Med.*, 32:1445-1451, 1991. Чтобы получить изображение тромба радиоактивно меченый аннексин инъецировали в периферическую вену животного после анестезии и формирования тромба левого предсердия. Получение изображения в гамма-камере давало плоское и томографическое изображения в течение некоторого периода времени после инъекции. Были получены автордиографические результаты для отбора тканевых срезов после забоя животного. Результаты получения изображения показали, что отношение показателей для ушка левого предсердия к показателям в крови было значительно выше как при способах получения плоского, так и томографического изображения у животных, получивших инъекции аннексина с радиоактивной меткой и с тромбом в левом предсердии, чем у контрольных без тромбов. Все тромбы были или положительными, или неопределенно положительными, и оценки количественного визуального анализа и количественные отношения показателей для тромбов к показателям в крови были наивысшими через 2 и 3 часа после инъекции.

В другом аспекте данное изобретение представляет способ получения изображения тромбов сосудов. По данному способу определяется наличие и расположение тромбов сосудов. При данном способе эффективное количество радиоактивно меченого модифицированного аннексина данного изобретения вводят теплокровному животному и изображения регистрируют. Предпочтительно, изображения получают с использованием гамма-камеры и регистрируют. Как он использован здесь, термин "эффективное количество" относится к количеству радиоактивно меченого

модифицированного аннексина, достаточному для получения изображения тромбов сосудов *in vivo*. Для целей данного изобретения эффективное количество радиоактивно меченого модифицированного аннексина составляет примерно 10 микрограмм аннексина на килограмм веса тела, введенных внутривенно.

Радиоактивно меченое производное аннексина использовали также для получения изображения апоптоза. О локализация  $^{99m}\text{Tc}$ -ГИНИК-аннексин V в местах гибели апоптотных клеток *in vivo* сообщалось. Например, локализация  $^{99m}\text{Tc}$ -ГИНИК-аннексина V *in vivo* наблюдалась при апоптозе "старящихся" гепатоцитов, вызванном отторжением с помощью анти-Fas антител у BALB/c мышей; острым отторжении у крыс с ОЧН с трансплантированными гетеротипическими PVG сердечными аллотрансплантатами; и лечении циклофосфамидом трансплантированных 38C13 мышинных В-клеточных лимфом. Blankenberg et al., *J.Nucl. Med.* 40:184-191, 1999 и Blankenberg et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:6349-6354, 1998, каждая из которых включена сюда в виде ссылки. Получение внешнего радионуклидного изображения показало от двукратного до шестикратного повышения захвата радиоактивно меченого аннексина в местах апоптоза на всех трех моделях на животных. Эти результаты показали, что радиоактивно меченый аннексин V может использоваться *in vivo* в качестве неинвазивных средств для обнаружения и периодического получения изображения тканей и органов, подвергающихся запрограммированной гибели клеток.

Радиоактивно меченый аннексин использовали также для получения изображения апоптоза *in vivo* во время отторжения сердечного аллотрансплантата. Vriens et al., *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, 116:844-853, 1998, включен сюда в виде ссылки. Не подвергавшиеся воздействию крысы служили в качестве реципиентов аллогенного PVG крысиного или сингенного ACI крысиного сердечных трансплантатов.

Животные-реципиенты подвергались процессу получения изображения с помощью  $^{99m}\text{Tc}$ -ГИНИК-аннексина V ежедневно в течение семи дней, и анализ области, представляющей интерес, использовали для количественной оценки захвата аннексиновой радиоактивной метки. Одна группа животных получала циклоспорин, начиная с четвертого дня после трансплантации. Не подвергавшиеся воздействию аллотрансплантаты проявили признаки отторжения через четыре дня после трансплантации. Получение ядерного изображения показало значительное поглощение радиоактивно меченого аннексина при отторжении аллогенных трансплантатов, а не сингенных трансплантатов после трансплантации. Наблюдалась корреляция между острым отторжением и захватом радиоактивной метки, а после лечения циклоспорином в аллотрансплантатах не смогли определить никаких апоптотных ядер, и захват радиоактивно меченого аннексина снижался

до исходного уровня. Результаты показали, что радиоактивно меченый аннексин V может использоваться *in vivo* в качестве неинвазивного средства для обнаружения и контроля отторжения сердечного аллотрансплантата.

В дополнительном аспекте данное изобретение представляет также способ визуализации апоптоза. По данному способу определяется наличие и расположение апоптозных клеток. По данному способу эффективно количество радиоактивно меченого аннексина данного изобретения вводят теплокровному и получают изображение по радиоактивности. Предпочтительно, изображения получают, используя гамма-камеру. По использованию здесь, термин "эффективное количество" относится к количеству радиоактивно меченого модифицированного аннексина, достаточному для визуализации апоптозных клеток *in vivo*. Для целей данного изобретения эффективное количество радиоактивно меченого аннексина составляет примерно 10 микрограмм аннексина на килограмм веса тела, вводимого внутривенно. Способ может применяться для визуализации апоптоза, связанного с реакцией на химиотерапевтическое средство.

Данное изобретение представляет аминокислотные последовательности, которые эффективны в качестве сайтов хелатирования для радионуклида. Как отмечено выше, аминокислотная последовательность включает последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбираются из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys. Хотя сайт хелатирования может быть эффективно включен в аннексин для получения пригодных средств для визуализации, как описано выше, будет понятно, что пептидные хелаты (т.е. хелатирующие аминокислотные последовательности) могут быть встроены в другие молекулы, включая пептиды и белки, с получением модифицированных молекул, имеющих сайты хелатирования. Аминокислотная последовательность может быть включена в молекулу с помощью химических средств. Альтернативно, для пептидов и белков аминокислотная последовательность предпочтительно включается с помощью методов рекомбинантной технологии с получением пептида или белка, имеющих эндогенный сайт хелатирования. Сайт хелатирования предпочтительно встраивают в пептид или белок по C- или N-концу, предпочтительно, на удалении от связывающего сайта пептида или белка.

Следующие примеры представлены в целях иллюстрации, но не ограничения.

**ПРИМЕРЫ**

**Пример 1**

Конструирование и проверка плазмид

Было сконструировано четыре плазмиды для экспрессии мутантных форм аннексина V в *E.coli* под контролем промотора фага T7. Исходным вектором экспрессии был pET12a, который можно приобрести у Novagen Corporation (Madison, WI).

а. Создание вектора экспрессии pJ115, кодирующего аннексин V-115 с мутацией Cys-316→ Ser (положение 316 относится к

аннексину V дикого типа).

Рестрикционный фрагмент 232-пн BstBI-BamHI сначала выделяли из плазмиды pANXVC-S-N6, известной также как pJ110, которая кодирует модифицированный аннексин V с мутацией Cys-316→ Ser. Tanaka K., et al., "Preparation and characterization of a di-sulfide-linked bioconjugate of annexin V with the B-chain of urokinase: an improved fibrinolytic agent targeted to phospho-lipidcontaining thrombi". *Biochemistry*, 1996; 35:922-9. Тот же рестрикционный фрагмент затем удаляли из плазмиды pE12a-PAP1 (фиг.2) (Wood, B.L., et al., "Increased erythrocyte phosphatidylserine exposure in sickle cell disease: flow-cytometric measurement and clinical associations," *Blood*, 1996; 88:1873-80), который кодирует аннексин V дикого типа, и мутантный фрагмент лигировали в полученный вектор с образованием плазмиды pJ115. Данную плазмиду подвергали анализу последовательности ДНК для подтверждения того, что желаемая мутация введена правильно.

б. Создание векторов экспрессии pJ116, pJ117 и pJ118, кодирующих мутантные молекулы аннексина V, аннексина V-116, аннексина V-117 и аннексина V-118.

Для каждого конструируемого вектора были составлены смысловые и антисмысловые олигонуклеотиды (последовательности, представленные в табл. 1) для кодирования желаемой пептидной последовательности с NdeI сайтами рестрикции на обоих концах. Эквивалентные количества смыслового и антисмыслового олигонуклеотидов затем фосфорилировали и отжигали с образованием двухцепочечного кластера с NdeI-совместимыми одноцепочечными концами. Двухцепочечный олигонуклеотид (3,8 нг) затем лигировали с плазмидой pJ115 (0,42 мкг), которая предварительно расщепляли с помощью NdeI и дефосфорилировали. Смесь после лигирования затем трансформировали в *E.coli*, штамм DH5alpha. Плазмидную ДНК получали из колоний, устойчивых к ампициллину, и отсортировывали с помощью ПЦР на наличие желаемой вставки. Затем выполняли анализ последовательности ДНК у положительных клонов для подтверждения наличия желаемой вставки.

Таблица 1  
Смысловые и антисмысловые олигонуклеотиды для конструирования pJ116, pJ117 и pJ118

Название	Вектор	Последовательность (с 3' → 5')
JT-289	pJ.16	TATGGCATGTGGCGGTGGCCA
JT-290	pJ.16	TATGGCCACCGCCACATGCCA
JT-295	pJ.17	TATGGCAGSTGGCTGTGCCA
JT-296	pJ.17	TATGGCCACAGCCACCTGCCA
JT-297	pJ.18	TATGGCATGTGGCTGGCTGCCA
JT-298	pJ.18	TATGACCGCAGCCACATGCCA

**Пример 2**

Экспрессия и очистка белков

Каждую из плазмид pJ116, pJ117 и pJ118 трансформировали в *E. coli*, штамм BL21(DE3) для цитоплазматической экспрессии. Каждый полученный клон культивировали в течение ночи до насыщения при 37 ° C при встряхивании в бульоне Terrific, содержащем карбенициллин (50 мкг/мл). Затем клетки отделяли от культуральной среды с помощью



центрифугирования в течение 10 мин при 2560× g и промывали ледяным буфером, (50 ммоль/л трисHCl, 150 ммоль/л NaCl pH 8,0). Бактерии затем разрушали ультразвуком в ледяном растворе 50 ммоль/л трисHCl pH 7,2, 10 ммоль/л CaCl<sub>2</sub>, 1 ммоль/л β-меркаптоэтанола, и затем центрифугировали в течение 20 мин при 22530× g. Супернатант отбрасывали, а аннексин V, связанный с клеточными мембранами, выделяли путем повторного суспендирования осадка в растворе 50 ммоль/л трисHCl pH 7,2, 20 ммоль/л ЭДТА, 1 ммоль/л β-меркаптоэтанола. Бактериальные мембраны затем удаляли путем центрифугирования в течение 20 мин при 22530× g, и супернатант, содержащий аннексин V диализировали против раствора 20 ммоль/л трисHCl pH 8,0, 1 ммоль/л β-меркаптоэтанола. Диализат затем наносили на колонку Mono Q (Pharmacia, Piscataway, NJ) и элюировали в градиенте от 0 до 1 моль/л NaCl в том же буфере. Все мутанты аннексина V элюировались при примерно 0,22 моль/л NaCl. Очищенный белок концентрировали ультрафильтрацией до концентрации примерно 5 мг/мл, диализировали против раствора 20 ммоль/л ГЭПЭС pH 7,4, 100 ммоль/л NaCl и хранили в аликвотных образцах при -70° C. Конечный выход составлял примерно 10 мкг/л культуры с чистотой, равной ~98% по электрофорезу в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия.

**Пример 3**

Введение технециевой метки в типичные модифицированные аннексины

Типичной процедурой по введению метки технецием в модифицированные аннексины, полученные, как описано выше, является такая, которая в основном описана в Larsen et al., "[99mTc]Tricine: A useful precursor complex for the radiolabeling of hydrazinonicotinate protein conjugates", Bioconjugate Chem., 6:635-638, 1995, и Blankenberg et al., "In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death", Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 95:6349-6354, 1998, обе включены сюда в виде ссылки.

В кратком изложении, аннексин сначала восстанавливают дитиотреитолом, а затем метят технецием.

**Восстановление дитиотреитолом**

1. Добавляют дитиотреитол (100 мМ в воде) к основному стандартному раствору аннексина (3-8 мг/мл в 20 мМ ГЭПЭС-Na pH 7,4, 100 мМ NaCl) до 1 мМ конечной концентрации. Например, к 600 мкг аннексина в 200 мкг добавляют 2 мкл 100 мМ дитиотреитола.

2. Инкубируют 15 мин при 37° C.

3. Очищают гель-фильтрацией на колонке сефадекса G-25, предварительно уравновешенной дезоксигенированным 20 мМ цитратом натрия pH 5/2, 100 мМ NaCl. Хранят при -70° C. Например:

а) Уравновешивают колонку Pharmacia NAP-5 тремя объемами верхней части колонки дезоксигенированного нитратного буфера (20 мМ цитрата натрия pH 5,2, 100 мМ NaCl). Дезоксигенируют продуванием аргоном.

б) Добавляют 200 мкл образца на колонку.

Пропускают, но не собирают.

с) Добавляют 500 мкл дезоксигенированного нитратного буфера. Пропускают, но не собирают.

5 д) Добавляют 600 мкл дезоксигенированного цитратного буфера. Пропускают и собирают. Теперь должно быть 600 мкг в 600 мкл или 50 мкг в 50 мкл.

е) Хранят в аликвотных образцах по от 500 до 100 мкг при -70° C.

10 Введение технециевой метки:

1. Оттаивают 100 мкг восстановленного аннексина V-SH (аликвотные образцы с 50-100 мкг в 50 мкл 20 мМ раствора цитрата натрия, pH 5,2, 100 мМ NaCl).

15 2. Воссоздают олово/трициновый реактив (аликвотный образец, лиофилизированный из 1 мл 20 мМ трицина, 80 мкг/мл SnCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, pH 7,1) с помощью 1 мл дистиллированной воды.

20 3. Добавляют 0,9% NaCl к аннексину, если необходимо довести конечный объем реакционной смеси до 200 мкл.

4. Добавляют 100 мкл олово/трицинового реактива к аннексину и осторожно перемешивают.

25 5. Добавляют 500 мкКи <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> (<sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub> в 0/9% NaCl) к аннексину и осторожно перемешивают.

6. Инкубируют 15 минут при комнатной температуре.

30 7. Определяют процент включения технеция в белок с помощью БТСХ в ФБФР (PBS) (процент радиохимического выхода).

8. Очищают гель фильтрацией на колонке Sephadex G25 в ФБФР (фосфатнобуферном физиологическом растворе). Например:

35 а) Уравновешивают колонку NAP-5 (Sephadex G25, Pharmacia #17-0853-01) с ФБФР (PBS), три объема верхней части колонки.

б) Добавляют 200 мкл образца на колонку. Пропускают, но не собирают.

40 в) Добавляют 500 мкл ФБФР. Пропускают, но не собирают.

д) Добавляют 400 мкл ФБФР. Пропускают и собирают.

45 9. Определяют процент технеция, связанного с аннексином с помощью БТСХ (быстрой тонкослойной хроматографии) в ФБФР (процент радиохимической чистоты).

Результаты введения метки в аннексин V, модифицированные аннексины данного изобретения (идентифицированные как аннексины V-116, V-117 и V-118), и аннексинохелатный конъюгат (ГИНИК-аннексин V) обобщены в табл. 2.

Таблица 2  
Введение метки технеция в аннексины:  
радиохимический выход и чистота

Белок	% радиохимического выхода	% радиохимической чистоты
Аннексин V	3,9 ± 1,6	Неприменимы
Аннексин V-116	79,3 ± 1,2	88,3 ± 3,2
Аннексин V-117	71,0 ± 7,9	89,3 ± 4,7
Аннексин V-118	94,3 ± 0,6	98,0 ± 0,0
ГИНИК-аннексин V	97,0%	99,0%

60 В таблице результаты представлены как среднее арифметическое ± СО с n=2 для аннексина V, n=3 для мутантов 116, 117 и 118 и n=1 для ГИНИК-аннексина V. Радиохимическую чистоту определяют после очистки гель-фильтрацией.

**Пример 4**

Биологическая активность репрезентативных модифицированных аннексинов

Биологическую активность модифицированных аннексинов данного изобретения определяли путем анализа конкурентного связывания и измерения связывания с эритроцитами, подвергшимися воздействию фосфатидилсерина.

Биологическую активность модифицированных аннексинов сравнивали с активностью природного аннексина V и аннексинохелатного конъюгата, ГИНИК-аннексин V.

Анализ конкурентного связывания  
Сродство аннексинов к клеточным мембранам определяли по их способности конкурировать с меченым флуоресцеином аннексином V в отношении связывания с эритроцитами, подвергшимися воздействию с фосфатидилсеринном. Эритроциты были закуплены (4Cplus Normal Control, Beckman-Coulter Corp., Hialeah, FL). Аннексины добавляли в различных концентрациях к 1 мл раствора, содержащего 5 нМ флуоресцеин-аннексина V и  $8,3 \times 10^6$  эритроцитов в буфере, состоящем из 10 мМ ГЭПЭС-Na pH 7,4, 136 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 5 мМ глюкозы, 1 мг/мл БСА (буфер HNKGВ) плюс 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. Образцы инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Клетки затем центрифугировали, супернатант удаляли и флуоресцеин-аннексин V, связанный с осажденными клетками, выделяли путем повторного суспендирования в 950 мкл буфера HNKGВ, содержащего 5 мМ ЭДТА. Образец затем снова центрифугировали, супернатант удаляли и концентрацию флуоресцеин-аннексина V в супернатанте определяли путем флуорометрии. Результаты данного анализа обобщены в табл. 3 и представлены как концентрация конкурентного белка, которая подавляет 50% связывания флуоресцеин-аннексина V, представленная аббревиатурой IC<sub>50</sub>.

Таблица 3  
Биологическая активность аннексинов по анализу конкурентного связывания

Белок	IC <sub>50</sub> (нмоль/л)
Аннексин V	6,8 ± 0,7
Аннексин V-116	9,3 ± 0,4
Аннексин V-117	10,3 ± 2,5
Аннексин V-118	10,1 ± 2,8
ГИНИК-аннексин V	10,1 ± 2,0

В таблице результаты представлены как среднее арифметическое ± СО с n=9 для аннексина V, мутантов 116, 117 и 118, а n=9 для ГИНИК-аннексина V.

Анализ связывания эритроцитов. Способность радиоактивно меченых аннексинов связываться с клеточными мембранами определяли путем измерения процента радиоактивности, связанной с эритроцитами, следующим образом. Радиоактивно меченые аннексины при конечной концентрации 10 нмоль/л добавляли в двойные пробирки, содержащие конечный объем, равный 1 мл буфера HNKGВ плюс 2,5 мМ CaCl<sub>2</sub>. В одну пробирку затем добавляли  $4,2 \times 10^8$  эритроцитов. После 15 мин инкубации при комнатной температуре обе пробирки центрифугировали в течение трех

минут при 8320x g. Радиоактивность определяли в 800 мкл супернатантов. Процент радиоактивности, связанной с клетками, рассчитывали, используя следующее уравнение:  $100(1 - (\text{показатель счетчика для супернатанта в присутствии клеток}) / (\text{показатель счетчика для супернатанта в отсутствие клеток}))$ .

Таблица 4  
Биологическая активность аннексинов по связыванию радиоактивно меченых белков с эритроцитами

Белок	% радиоактивности, связанной с эритроцитами
Аннексин V-116	80,3 ± 2,9
Аннексин V-117	84,3 ± 2,5
Аннексин V-118	86,3 ± 2,1
ГИНИК-аннексин V	83,9 ± 2,5

Результаты представлены как среднее арифметическое ± СО с n=3 для мутантов 116, 117 и 118, n=7 для ГИНИК-аннексина V.

#### Пример 5

Гибридизация молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих модифицированные аннексины с другими последовательностями нуклеиновой кислоты

Молекулы нуклеиновой кислоты данного изобретения способны к гибридизации с последовательностями нуклеиновой кислоты, представленными в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, или с комплементарной последовательностью к последовательностям нуклеиновой кислоты, представленными в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, при следующих строгих условиях гибридизации: инкубация 5 X НХНЦ при 65° С в течение 16 часов с последующей промывкой при следующих условиях: две промывки в 2 X НХНЦ при 18-25° С по двадцать минут на промывку; предпочтительно две промывки в 2 X НХНЦ при 18-25° С по двадцать минут на промывку, с последующей одной промывкой в 0,5 X НХНЦ при 55° С в течение тридцати минут; наиболее предпочтительно две промывки в 2 X НХНЦ при 18-25° С по пятнадцать минут на промывку с последующими двумя промывками в 0,2 X НХНЦ при 65° С по двадцать минут на промывку. Аббревиатура "НХНЦ" относится к буферу, используемому в растворах для гибридизации нуклеиновой кислоты. Один литр 20X (двадцатикратный концентрат) стандартного исходного буферного раствора НХНЦ (pH 7,0) содержит 175,3 г хлорида натрия и 88,2 г цитрата натрия.

Способность молекул нуклеиновой кислоты данного изобретения гибридизоваться с последовательностями нуклеиновой кислоты, представленными в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, или с комплементарной последовательностью к последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:5, могут быть определены с использованием методики гибридизации проб радиоактивно меченых нуклеиновых кислот с нуклеиновыми кислотами, иммобилизованными на нитроцеллюлозных фильтрах или нейлоновых мембранах, которые представлены, например, на страницах 952-955 Molecular Cloning, A Laboratory Manual (2nd edition), J.Sambrook,

RU 2238104 C2

RU 2238104 C2

E.F.Fritsch and T.Maniatis eds., процитированные страницы которых включены сюда в виде ссылки.

В дополнение к последовательностям нуклеиновой кислоты, представленным в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5, примерами репрезентативных последовательностей нуклеиновых кислот, которые кодируют модифицированные аннексыны данного изобретения и которые гибридизируются с комплементарной последовательностью последовательностей нуклеиновых кислот, представленных в SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:3 и SEQ ID NO:5, могут быть разработаны с помощью компьютера с использованием дегенерации генетического кода. Каждая из типичных примеров последовательностей нуклеиновой кислоты имеет разную последовательность, но каждая кодирует модифицированный аннексин данного изобретения.

Хотя было проиллюстрировано и описано предпочтительное воплощение данного изобретения, будет понятно, что в нем могут быть произведены различные изменения, без выхода за рамки сущности и объема данного изобретения.

### Формула изобретения:

1. Модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, в котором сайт хелатирования включает аминокислотный удлиняющий сегмент, включающий аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly, и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys.

2. Модифицированный аннексин по п.1, отличающийся тем, что аминокислотный удлиняющий сегмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Cys, Cys-Gly-Gly или Cys-Gly-Cys.

3. Модифицированный аннексин по п.1, отличающийся тем, что аннексином является аннексин V.

4. Модифицированный аннексин по п.1, отличающийся тем, что аминокислота в положении 316 аннексина заменена серином.

5. Модифицированный аннексин по п.1, отличающийся тем, что модифицированный аннексин получен путем рекомбинантной технологии.

6. Модифицированный аннексин по п.1, дополнительно включающий радионуклид, образующий комплекс с сайтом хелатирования.

7. Модифицированный аннексин по п.6, отличающийся тем, что радионуклид выбран из группы, состоящей из Cu-64, Cu-67, Ga-67, Ga-68, Re-186, Re-188, Tc-99m, Tc-94, Ru-95, Pd-100, Pd-109, Bi-212, Pb-212 и In-111.

8. Модифицированный аннексин по п.7, отличающийся тем, что радионуклид представляет собой Tc-99m.

9. Модифицированный аннексин по п.1, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

10. Модифицированный аннексин по п.9, дополнительно включающий образующий комплекс радионуклид.

11. Модифицированный аннексин по п.10,

отличающийся тем, что радионуклид представляет собой Tc-99m.

12. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, причем сайт хелатирования содержит удлиняющий аминокислотный сегмент, включающий аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys.

13. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.12, кодирующая модифицированный аннексин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

14. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.13, имеющая последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:1, или которая способна к гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:1, или с комплементарной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:1 в строгих условиях гибридизации.

15. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.13, имеющая последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:3, или которая способна к гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:3, или с комплементарной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:3 в строгих условиях гибридизации.

16. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п.13, имеющая последовательность нуклеиновой кислоты, представленную в SEQ ID NO:5, или которая способна к гибридизации с последовательностью нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:5, или с комплементарной последовательностью молекулы нуклеиновой кислоты, представленной в SEQ ID NO:5 в строгих условиях гибридизации.

17. Реплицируемый вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный аннексин, имеющий N-концевой сайт хелатирования, включающий аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys.

18. Реплицируемый вектор экспрессии по п.17, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую модифицированный аннексин, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из группы, представленной в SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:4 или SEQ ID NO:6.

19. Реплицируемый вектор экспрессии по п.17 или 18, используемый для встраивания в клетку-хозяин.

20. Штамм E.coli, содержащий вектор по п.17 или 18.

21. Линия клеток, содержащая вектор по п.17 или 18.

22. Способ визуализации сосудистых

тромбов, включающий введение теплокровному животному эффективного количества модифицированного аннексина, имеющего N-концевой сайт хелатирования, причем сайт хелатирования содержит аминокислотный удлиняющий сегмент, включающий аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys, при этом радионуклид образует комплекс с сайтом хелатирования; и получение ядерного изображения у животного для определения наличия и расположения сосудистых тромбов.

23. Способ по п.22, отличающийся тем, что аминокислотный удлиняющий сегмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Cys, Cys-Gly-Gly или Cys-Gly-Cys.

24. Способ визуализации апоптоза, включающий введение теплокровному животному эффективного количества модифицированного аннексина, имеющего

N-концевой сайт хелатирования, причем сайт хелатирования содержит аминокислотный удлиняющий сегмент, включающий аминокислотную последовательность  $X_1\text{-Gly-X}_2$ , где  $X_1$  и  $X_2$  выбраны из Gly и Cys, и где, по меньшей мере, один из  $X_1$  или  $X_2$  является Cys, при этом радионуклид образует комплекс с сайтом хелатирования; и получение изображения по радиоактивности у животного для определения наличия и расположения апоптозных клеток.

25. Способ по п.24, отличающийся тем, что аминокислотный удлиняющий сегмент включает аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из Gly-Gly-Cys, Cys-Gly-Gly или Cys-Gly-Cys.

26. Способ по п.24, отличающийся тем, что апоптоз связан с отторжением после трансплантации.

27. Способ по п.24, отличающийся тем, что апоптоз связан с реакцией на химиотерапевтическое средство.

25

30

35

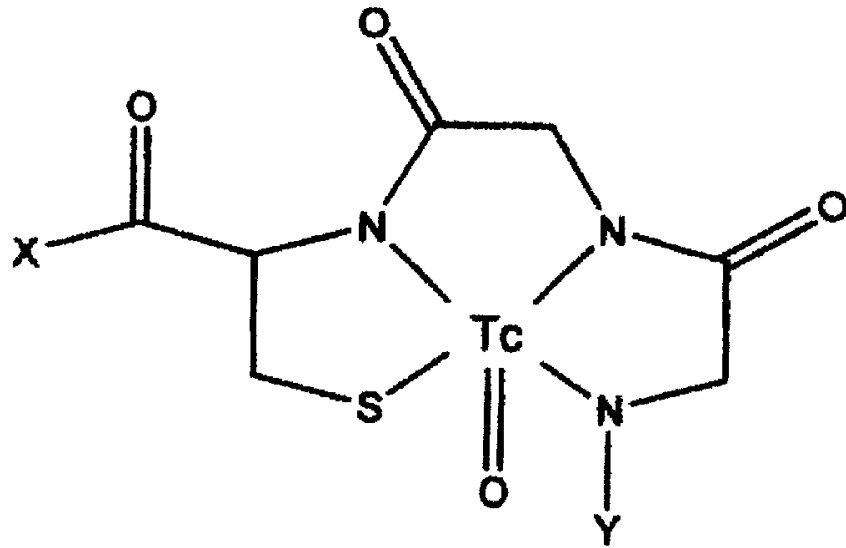
40

45

50

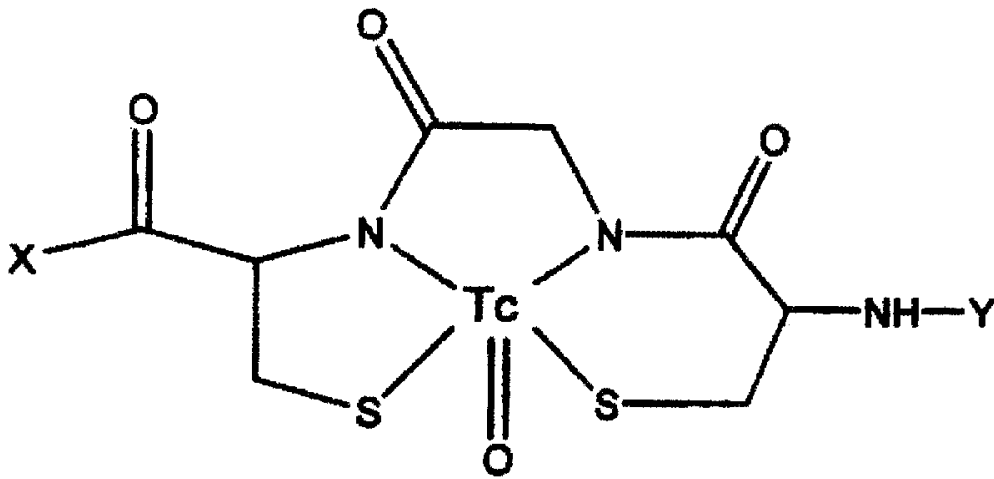
55

60



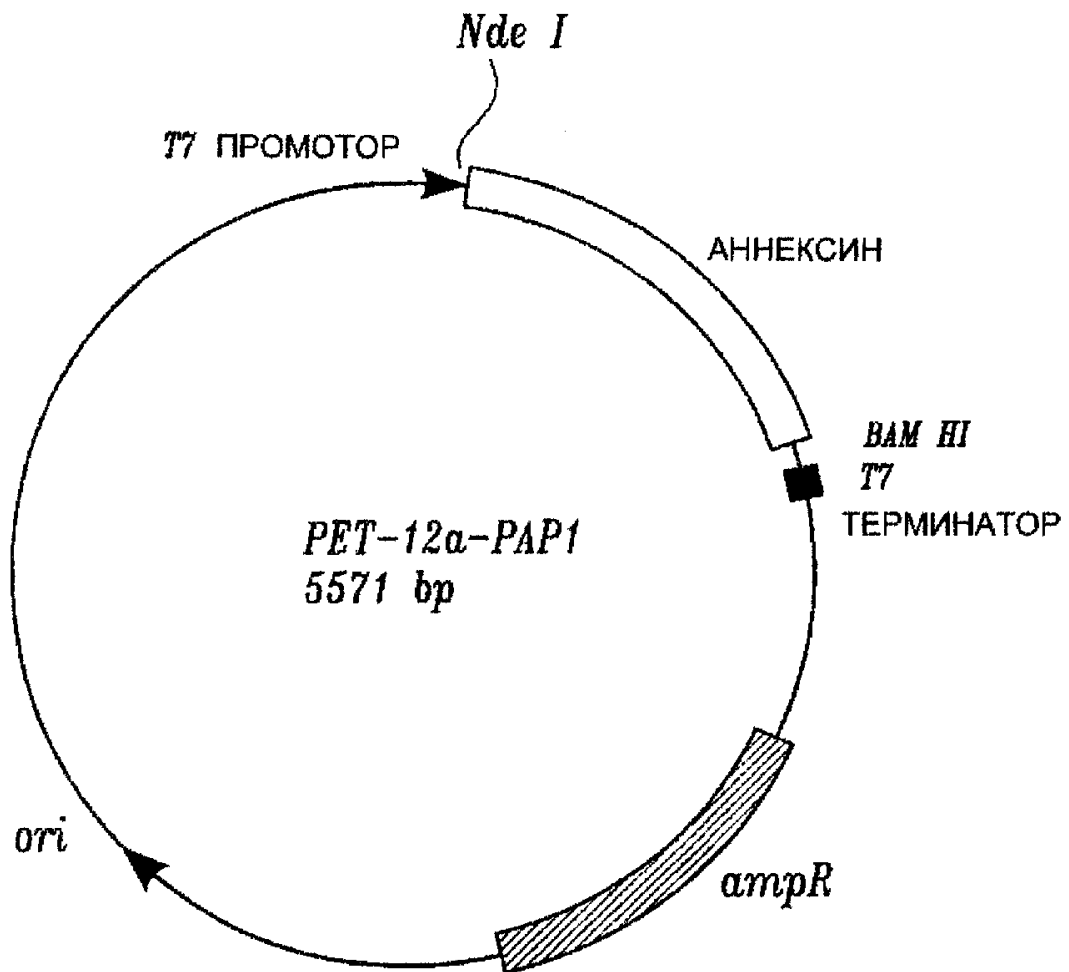
**(NH<sub>2</sub>) Gly-Gly-Cys (CO<sub>2</sub>H)**

**Фиг. 1В**



**(NH<sub>2</sub>) Cys-Gly-Cys (CO<sub>2</sub>H)**

**Фиг. 1С**



ФИГ. 2

RU 2238104 C2

RU 2238104 C2