



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 328 446**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/46** (2006.01)

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61P 9/10** (2006.01)

**A61P 3/06** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **01906927 .7**

96 Fecha de presentación : **02.02.2001**

97 Número de publicación de la solicitud: **1267914**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.01.2003**

54

Título: **Uso de lipasa ácida lisosómica para tratar la arterosclerosis y enfermedades asociadas.**

30

Prioridad: **04.02.2000 US 180362 P**  
**02.02.2001 US 775517**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.11.2009**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.11.2009**

73

Titular/es: **CHILDREN'S HOSPITAL RESEARCH  
FOUNDATION**  
**3333 Burnet Avenue**  
**Cincinnati, Ohio 45229, US**

72

Inventor/es: **Grabowski, Gregory, A. y  
Du, Hong**

74

Agente: **Sugrañes Moliné, Pedro**

**ES 2 328 446 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

Uso de lipasa ácida lisosómica para tratar la arterosclerosis y enfermedades asociadas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere al uso de sustancias disolventes de lípidos para el tratamiento y la prevención de enfermedad arterial coronaria. Más específicamente, esta invención se refiere al uso de proteínas y/o polipéptidos hidrolizantes de lípidos tales como lipasa ácida lisosómica (LAL) para el tratamiento y la prevención de aterosclerosis en mamíferos.

**Antecedentes**

El número creciente de pacientes que padecen aterosclerosis continúa impulsando la investigación del metabolismo de colesterol y triglicéridos. Mediante un gran número de investigaciones, se ha elucidado lo esencial del control del metabolismo del colesterol en las dos últimas décadas (véase la Figura 1). El sistema clave para el control del metabolismo del colesterol requiere dos conjuntos de rutas separables: 1) la ruta endógena y 2) las rutas de entrada de colesterol exógeno. Ambos conjuntos de rutas se modulan mediante la proteína lipasa ácida lisosómica (LAL) [1]. En la primera, la célula percibe la necesidad de síntesis de colesterol endógeno mediante la liberación de los factores de transcripción proteínas de unión a elemento regulador de esterol (SREBP1 y 2), cuyos precursores se unen a la membrana nuclear y al retículo endoplasmático. Las SREBP regulan positivamente la HMG-CoA reductasa y otras enzimas en las rutas de síntesis endógena [2-5]. Esta regulación positiva deriva del mecanismo de realimentación bioquímica de la célula que percibe un bajo nivel de colesterol libre en los medios y/o plasma circundantes que deriva de la ruta de endocitosis mediada por receptor; concretamente, la ruta exógena [6]. Los receptores de lipoproteína de baja densidad (LDLR) y otros receptores de membrana plasmática participan en este proceso de captación. Estos lípidos suministrados por LDLR y asociados a otras lipoproteínas se presentan al lisosoma para degradación por LAL. Una vez se percibe un suministro de colesterol exógeno deficiente, SREBP1 y 2 estimulan la transcripción de una cascada de enzimas que conducen a la producción de colesterol intracelular libre y ácidos grasos [7-10]. La célula percibe entonces la suficiencia de los niveles de colesterol libre y, una vez superados, se activa directamente la ACAT (acil CoA: colesterol aciltransferasa) mediante el colesterol libre y se regula positivamente la síntesis de ACAT. El efecto neto es retirar el colesterol libre mediante esterificación a un conjunto de almacenamiento citoplasmático de ésteres de colesterol que no está contenido en membranas, concretamente no lisosómico, y para retirar el colesterol libre y los ésteres de colesterol de las células. Una vez la célula percibe que está disponible suficiente colesterol libre, se mantiene un conjunto en estado estacionario de colesterol libre [11].

Tanto SREBP1 como 2 son factores de transcripción que se unen a elementos reguladores de esterol (SRE) en las regiones promotoras de genes clave en la síntesis de colesterol y ácido graso. Las SREBP se activan mediante un proceso proteolítico en dos etapas que está mediado por proteasas que se activan mediante elementos sensores de colesterol libre en la membrana plasmática y, potencialmente, otros componentes de la célula [12, 13]. Estas proteasas escinden las SREBP residentes en el retículo endoplasmático (RE) y liberan sus componentes activos, que se transportan entonces al núcleo. La SREBP2 tiene un solo transcrito, mientras que el gen SREBP-1 produce dos transcritos y proteínas, SREBP-1a y SREBP-1c. Estas formas alternativas de SREBP1 surgen del uso de sitios de inicio de la transcripción residentes en primeros exones alternativos, que se cortan y empalman entonces en un segundo exón común. En seres humanos, los ARNm de SREBP-1a/-1c exhiben también corte y empalme alternativos en el extremo 3' que conduce a proteínas que difieren en 113 aminoácidos en el extremo C [14, 15]. Los tres miembros de SREBP comparten los mismos dominios estructurales, indicando su función común [16]. Estos dominios incluyen: 1) el segmento NH<sub>2</sub>-terminal de 480 aminoácidos es un activador de la transcripción básico "similar" a hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina, 2) el segmento medio de 80 aminoácidos comprende dos secuencias que se extienden por la membrana y 3) la mitad carboxi-terminal de 590 aminoácidos que funciona como dominio regulador [17].

Existen al menos dos rutas para la entrada de colesterol externo en células derivadas de monocitos/macrófagos [18]: 1) los sistemas de proteína *ldlr* y relacionado con *ldlr* [19]; y 2) el sistema receptor secuestrante (por ejemplo, SRA, SR-B y CD36) para ésteres de colesterol (CE) unidos a lipoproteína [20-24]. La ruta SR-B1 suministra ésteres de colesterol a la célula mediante transferencia de ésteres de colesterol mediante SR-B1 sin captación de HDL [25, 26].

En la ruta de LDL-CE (éster de colesterol) o LDL-TG (triglicérido), se captan los complejos en células después de reconocimiento mediado por receptor. La ruta endosómica suministra estos lípidos a los liposomas después de desacoplar los complejos de LDL-lípido del receptor en el compartimento endosómico tardío acidificado. Una vez se suministra la partícula de LDL-lípido al lisosoma, se liberan los lípidos, posiblemente después de degradación de la partícula de LDL, mediante proteólisis o mediante ataque simultáneo por proteólisis y por LAL [27]. Este colesterol libre derivado se transporta entonces fuera del lisosoma al citosol mediante una o más proteínas residentes en o sobre la membrana lisosómica. Una vez sale del lisosoma, el colesterol libre se mueve a la superficie interna de la membrana plasmática y directamente al retículo endoplasmático. Se transporta entonces el colesterol libre desde la superficie interna de la membrana plasmática al retículo endoplasmático y participa en el control de realimentación de la ruta sintética endógena. Por tanto, a partir de esta visión general simplificada del metabolismo de colesterol y triglicéridos en células, resulta claro que la LAL ocupa una posición clave en el control de la síntesis de colesterol endógeno puesto que, sin su actividad, no pueden liberarse del lisosoma ni colesterol libre ni ácidos grasos libres (FFA) derivados de la ruta de LDL para controlar estas rutas críticas.

La importancia de la LAL en el metabolismo de colesterol y triglicéridos está subrayada por los fenotipos humanos resultantes de deficiencias hereditarias de LAL. Estas dos raras enfermedades, enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo, son enfermedades de inicio temprano y tardío, respectivamente [28]. La enfermedad de Wolman da como resultado una acumulación masiva de ésteres de colesterilo y triglicéridos en los lisosomas de una variedad de tejidos y células, incluyendo aquellos del hígado (hepatocitos y células de Kupffer), bazo, glándula suprarrenal y epitelio del intestino delgado. Esto conduce a un fenotipo grave caracterizado por hepatoesplenomegalia, calcificación suprarrenal y un intestino delgado engrosado y dilatado. En comparación, la enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo es una enfermedad mucho más heterogénea con inicio en la niñez temprana y la adolescencia tardía, e incluso la madurez, con hepatomegalia aislada y/o cirrosis progresiva y principalmente almacenamiento de ésteres de colesterilo.

El inventor ha descubierto que una evidencia circunstancial adicional ha implicado bajas actividades de LAL en monocitos y/o placas de pacientes con aterosclerosis o ateromas de arteria carótida. Esta evidencia indica que variantes polimórficas podrían conducir a una actividad diferencial de LAL en diversos tejidos y pueden predisponer a, o ser un factor de riesgo adicional en, el desarrollo de enfermedad aterosclerótica en seres humanos [29]. Según esta invención, esto sugiere que el suplemento de actividad LAL en células de implicación patológica en aterosclerosis/arteriosclerosis puede proporcionar un medio para disminuir los ésteres de colesterilo y triglicéridos acumulados patológicos que están relacionados causalmente con estas enfermedades.

Escary y col., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1998), 18(6), 991-998 dan a conocer que, en la aterosclerosis, los macrófagos acumulan una gran cantidad de ésteres de colesterilo (CE) formando las células espumosas, que inician y participan activamente en la formación de lesiones. La prevención o reversión de la acumulación de CE en células espumosas de macrófagos podría dar como resultado la protección de múltiples efectos patológicos. Se muestra que la hidrólisis de CE catalizada por éster de colesterol hidrolasa neutra puede modularse mediante la sobreexpresión de lipasa sensible a hormona (HSL) en células espumosas de macrófago. En macrófagos de murino transfectados con un vector de plásmido que codifica HSL, la sobreexpresión de HSL estimulaba la hidrólisis neta de CE, conduciendo a una hidrólisis más rápida de los depósitos lipídicos. Se sugiere que la sobreexpresión de HSL en macrófagos, sola o en combinación con inhibidores de ACAT, constituiría un enfoque terapéutico útil. Sin embargo, nCEH y LAL no son la misma proteína: LAL tiene 378 aminoácidos y está localizada en lisosomas, mientras que nCEH tiene 593 aminoácidos y está localizada en el citoplasma.

Sheriffet y col., *J. Biol. Chem.*, 270, 1995, 27766-27772 estudian el papel y actividad de la lipasa ácida lisosómica (LAL). Se dice que la LAL es esencial para la hidrólisis de CE y triglicéridos que se suministran a lisosomas mediante el sistema receptor de LDL. La deficiencia de LAL está asociada a la enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo (EAEC) y enfermedad de Wolman (EW). La mutagénesis dirigida a sitio mostró que la Ser<sub>153</sub> era importante para retener la actividad catalítica. Por otro lado, la N-glucosilación no es necesaria para la actividad catalítica de la LAL, pero probablemente desempeña un papel en el plegamiento inicial de la proteína.

Du Hong y col., *Am. J. Human Genet.*, 57, 1995, A178 dan a conocer también que defectos genéticos con mutaciones en LAL humana (hLAL) dan como resultado EAEC o EW. Se clonaron dos formas polimórficas de hLAL que tenían un nivel de actividad diferente. El polimorfismo se localizó en las posiciones 6 (Pro a Thr) y 2 (Gly a Arg).

En Du Hong y col., *Human Molecular Genetics*, 7, 1998, 1357-1364, se afirma también que la LAL es esencial para la hidrólisis de triglicéridos y ésteres de colesterol en lisosomas, y que la deficiencia de LAL produce dos fenotipos, EAEC y EW. Se prepararon ratones homocigóticos deficientes (lal-/lal-) que no producían LAL. En estos ratones, la acumulación masiva de triglicéridos y CE ocurre en varios órganos. Estos ratones son útiles para estudiar el papel de la LAL en el metabolismo y patogénesis de sus estados de deficiencia (véase el resumen). Se menciona también que la LAL es una glucoproteína de 378 aminoácidos que se transfiere al lisosoma mediante el sistema receptor de 6-fosfato de manosa.

Reader y col., *FASEB J.*, 10, 1996, A233 dan a conocer la transfección de células HeLa y fibroblastos de Wolman con un vector adenovírico que expresa hLAL. Este virus recombinante puede ser útil en el estudio del papel de LAL en el metabolismo lipídico celular mediante estudios de transferencia génica en animales.

En la base de datos EMBL, número de acceso X76448.1, NCBI locus CAA54026, se da a conocer la secuencia aminoacídica de LAL humana, con relación a un artículo de revista de Ameis D. (de fecha 1994) que describe la purificación y caracterización de LAL humana.

### Resumen de la invención

Como se describe en la presente memoria, la presente invención comprende el uso de una proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos o mezclas de los mismos según la reivindicación 1 para disminuir y/o eliminar placas ateroscleróticas en mamíferos, mediante tratamiento directo e indirecto de estas placas, *in situ*, usando proteínas y/o polipéptidos. Estas proteínas y/o polipéptidos son capaces de retirada de lípidos, principalmente por hidrólisis, mediante un proceso catalítico o estequiométrico, estando orientada la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos a receptores en y/o sobre la célula que conducen a la captación en el lisosoma. Los sitios receptores se seleccionan del grupo constituido por receptores de reconocimiento de oligosacáridos y receptores de reconocimiento de secuencia peptídica.

Generalmente, las composiciones usadas para la práctica de esta invención incluyen proteínas o polipéptidos hidrolizantes de lípidos y, en particular, la proteína lipasa ácida lisosómica (LAL) según la reivindicación 10. Sin embargo, pueden usarse también otras proteínas o polipéptidos hidrolizantes de lípidos, tales como proteínas que muestran al menos un 85% de homología de secuencia con la lipasa ácida lisosómica. Otras proteínas incluyen variantes polimórficas de lipasa ácida lisosómica con sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y de Gly2 por Arg, y también polipéptidos que muestran una actividad biológica similar a la lipasa ácida lisosómica.

Las proteínas o polipéptidos hidrolizantes de lípidos producidos exógenamente, contenidos en un portador farmacéuticamente aceptable, pueden administrarse por vía oral, parenteral, mediante inyección, infusión intravenosa, inhalación, liberación de dosificación controlada o mediante administración peritoneal para disminuir y/o eliminar placas ateroscleróticas. El procedimiento preferido de administración es mediante infusión intravenosa.

Las proteínas y/o polipéptidos hidrolizantes de lípidos producidos endógenamente pueden usarse también para disminuir y/o eliminar placas ateroscleróticas. Generalmente, dicho procedimiento implica proporcionar una proteína o polipéptido humano biológicamente activo hidrolizante de lípidos, tal como lipasa ácida lisosómica humana, a células de un individuo que tiene una deficiencia de proteína(s) o polipéptido(s) humanos biológicamente activos hidrolizantes de lípidos. Esto se consigue mediante el uso de un vector que comprende y expresa una secuencia de ADN que codifica proteína o polipéptido humano biológicamente activo hidrolizante de lípidos para la fabricación de un medicamento para administración *in vivo* en células competentes para la producción de proteína o polipéptido biológicamente activo hidrolizante de lípidos según la reivindicación 15. El vector usado puede ser un vector vírico, incluyendo pero sin limitación un lentivirus, adenovirus, virus adenoasociado y vectores similares a virus, un plásmido, o una vesícula lipídica. El vector se capta por las células competentes para la producción de proteína o polipéptido humano biológicamente activo hidrolizante de lípidos. Se expresa la secuencia de ADN y se produce la proteína o polipéptido humano biológicamente activo hidrolizante de lípidos. Adicionalmente, las células que albergan este vector secretarán esta proteína o polipéptido biológicamente activo hidrolizante de lípidos, que se capta entonces posteriormente por las otras células deficientes en la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos.

Otras proteínas y/o polipéptidos que pueden usarse para el tratamiento endógeno de placas arteroscleróticas incluyen proteínas biológicamente activas que tienen al menos un 85% de homología de secuencia con la lipasa ácida lisosómica, proteínas variantes polimórficas de la lipasa ácida lisosómica con sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y Gly2 por Arg y polipéptidos que muestran una actividad biológica similar a la lipasa ácida lisosómica.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Esquema de una célula de mamífero para ilustrar las rutas de incorporación de colesterol y ácido graso al metabolismo celular. Se ilustran dos rutas: 1) la síntesis endógena de colesterol y ácidos grasos controlada por los sistemas SREBP1 y 2 que percibe el nivel de colesterol celular extralisosómico modulado por la escisión de LAL de ésteres de colesterilo y triglicéridos en los lisosomas; 2) la ruta exógena mediante la cual los ésteres de colesterilo y triglicéridos entran en la célula mediante endocitosis mediada por receptor (mostrada como LDL-CE como ejemplo) para suministro a los lisosomas dentro de las células. El receptor de LDL y varios otros receptores secuestrantes participan en esta ruta. La LAL controla la salida de colesterol y ácidos grasos de los lisosomas, que entran en la célula mediante esta ruta. La liberación de colesterol libre y/o ácidos grasos mediante LAL u otros de dichos compuestos terapéuticos conduce al efecto directo de reducir la síntesis de colesterol y FFA en la célula mediante los sistemas sensores SREBP. Pueden alcanzarse reducciones del colesterol y/o FFA celulares mediante este efecto directo y/o mediante la eliminación del colesterol libre y/o FFA de la célula mediante el transporte de colesterol a través de la membrana plasmática y fuera de la célula.

Las abreviaturas de los componentes celulares son las siguientes: MP= membrana plasmática, RE= retículo endoplasmático, TGN= red trans-Golgi, MVB= cuerpo multivesicular, EN=endosoma, FC= colesterol libre, FFA= ácido graso libre, CYTO CE= éster de colesterilo (CE) no lisosómico reesterificado o esterificado, NPC1= sitio del defecto C1 de Niemann-Pick, LAL= lipasa ácida lisosómica.

Figura 2: Macropatología típica de ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados con LAL (LC2) y tratados (LA2 y LA4): [Parte superior] Vistas ventrales que muestran el hígado infiltrado con grasa amarilla en un ratón *lal*<sup>-/-</sup> no tratado (LC2) típico. En ratones *lal*<sup>-/-</sup> tratados (LA2 y LA4), los hígados tenían esencialmente un color normal. [Parte media] Apariencia macroscópica de hígado (parte superior), bazo (parte media) y riñón (parte inferior) de ratones LC2, LA4 y LA2. El bazo de ratón no tratado es más claro que los bazos de ratones tratados. [Parte inferior] Apariencia macroscópica del intestino delgado de ratones no tratados LC2 y tratados LA4 y LA2. El intestino delgado de ratón no tratado (LC2) da una apariencia más clara, indicando la formación de colesterol y triglicéridos. Esto está en contraposición con los intestinos más oscuros mostrados para los ratones tratados (LA4 y LA2).

Figura 3: Microscopía óptica de hígado, bazo e intestino delgado ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados con LAL (LC2) y tratados (LA2). Secciones teñidas con H & E del hígado (3A y 3B), y bazo (3E y 3F). Secciones teñidas congeladas de hígado (3C y 3D). A, C, E (izquierda) son de ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados. B, D y F (derecha) son de ratones tratados con LAL. Los ratones tratados tenían números sustancialmente disminuidos de células de almacenamiento de macrófagos en comparación con los de ratones no tratados. La tinción indica grandes acumulaciones de grasa neutra en hígados de ratones no tratados y su gran reducción a casi ausencia en hígado.

Figura 4: Secciones representativas de la válvula aórtica de ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> con o sin tratamiento con LAL teñidas con H & E. (A y B) Vetas grasas ricas en células espumosas típicas en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> de 3,5 meses de edad en HFCD durante 2 meses. El asterisco indica una zona necrótica cercana a la capa media desestabilizada. La flecha apunta a hendiduras/cristales de colesterol. La flecha de la derecha (hendiduras/cristales de colesterol) muestra una arteria coronaria cerca del ostio. (C) Células espumosas reducidas en las vetas grasas de la válvula aórtica de ratones tratados con LAL. Esto era de los ratones tratados con LAL más implicados. (D) Un ejemplo típico (3/5) de válvulas aórticas normales de ratones tratados con LAL.

## Descripción detallada de la invención

### Definiciones

Los términos “aminoácido” o “secuencia aminoacídica”, como se usan en la presente memoria, designan un oligopéptido, péptido, polipéptido o secuencia proteica, o un fragmento de cualquiera de estos, y moléculas de origen natural o sintético. Cuando se indica “secuencia aminoacídica” en la presente memoria para designar una secuencia aminoacídica de una molécula proteica de origen natural, no se pretende que “secuencia aminoacídica” y términos similares limiten la secuencia aminoacídica a la secuencia aminoacídica nativa completa asociada a la molécula de proteína indicada.

Como se usa en la presente memoria, el término “proteínas o polipéptidos exógenos hidrolizantes de lípidos” designa aquellos producidos o fabricados fuera del cuerpo y administrados al cuerpo; el término “proteínas o polipéptidos endógenos hidrolizantes de lípidos” designa aquellos producidos o fabricados dentro del cuerpo mediante algún tipo de dispositivo (biológico u otro) para suministro en o a otros órganos del cuerpo.

Como se usa en la presente memoria, el término “biológicamente activo” designa una proteína que tiene funciones estructurales, reguladoras o bioquímicas de una molécula de origen natural.

El término “derivado”, como se usa en la presente memoria, designa la modificación química de una secuencia polipeptídica o una secuencia polinucleotídica. Las modificaciones químicas de una secuencia polinucleotídica pueden incluir, por ejemplo, el reemplazo de hidrógeno por un grupo alquilo, acilo o amino. Un derivado de polinucleótido codifica un polipéptido que retiene al menos una función biológica de la molécula natural. Un derivado de polipéptido es aquel modificado, por ejemplo mediante glucosilación, o cualquier otro proceso que retiene al menos una función biológica del polipéptido del que derivaba.

Las palabras “inserción” o “adición”, como se usan en la presente memoria, designan cambios en una secuencia aminoacídica o nucleotídica que dan como resultado la adición de uno o más residuos aminoacídicos o nucleótidos, respectivamente, a la secuencia encontrada en la molécula de origen natural.

Las frases “ácido nucleico” o “secuencia de ácido nucleico”, como se usan en la presente memoria, designan un nucleótido, oligonucleótido, polinucleótido o cualquier fragmento del mismo. Estas frases designan también ADN o ARN de origen genómico o sintético que puede ser monocatenario o bicatenario, y pueden representar la cadena con sentido o antisentido, o cualquier material similar a ADN o similar a ARN. En este contexto, “fragmentos” designa aquellas secuencias de ácido nucleico que, cuando se traducen, producirían polipéptidos que retienen alguna característica funcional, por ejemplo, actividad lipasa, o característica de dominio estructural, del polipéptido completo.

Las frases “identidad porcentual” u “homología porcentual” designan el porcentaje de similitud de secuencia encontrada en homólogos de una secuencia aminoacídica o de ácido nucleico particular cuando se comparan dos o más de las secuencias aminoacídicas o de ácido nucleico.

El término “aterosclerosis” designa los procesos patológicos que conducen a una acumulación anormal de colesterol y ésteres de colesterol y lípidos relacionados en macrófagos, células de músculo liso y otros tipos de células, que conducen al estrechamiento y/u oclusión de una o varias arterias y arteriolas del cuerpo y órganos corporales, incluyendo pero sin limitación las arterias coronarias, aorta, arterias renales, arterias carótidas y arterias que suministran sangre a los miembros y al sistema nervioso central. Las reacciones inflamatorias asociadas y mediadoras de este proceso patológico se incluyen también en esta definición.

El término “placa aterosclerótica” designa la formación de colesterol y triglicéridos debido a la aterosclerosis.

### Discusión

Las consecuencias de la aterosclerosis son una causa principal de mortalidad y morbilidad. Los macrófagos que acumulan ésteres de colesterol son conocidos por ser un componente importante contribuyente a la formación de placas ateroscleróticas en arterias coronarias así como arterias carótidas, la aorta y otros vasos periféricos por todo el cuerpo. Estos ésteres de colesterol derivan de la circulación, donde se portan en lipoproteínas. Los ésteres de colesterol entran en las células mediante los receptores de lipoproteína de baja densidad (LDL-R) y otros receptores secuestrantes de partículas de lipoproteína de baja densidad (LDL) oxidada. Una vez internalizadas, se suministran estas partículas y sus ésteres de colesterol unidos al lisosoma para escisión a colesterol por la lipasa ácida lisosómica (LAL).

Los enfoques terapéuticos actuales para tratar la aterosclerosis incluyen tratamiento dietético (dietas bajas en colesterol) y ejercicio, inhibidores de la síntesis de colesterol y cirugía de derivación arterial coronaria. Sin embargo, la insatisfacción con el éxito de estas intervenciones proporciona el empuje para el desarrollo continuado de terapias nuevas/alternativas/auxiliares para este importante grupo de enfermedades.

Existen dos procedimientos principales empleados para el tratamiento de la aterosclerosis y la disolución de la placa aterosclerótica. El primer procedimiento de tratamiento es la cirugía de derivación coronaria. Este procedimiento se usa para tratar pacientes con angina establecida, inestable y/o angina progresiva. El segundo procedimiento de tratamiento es la inhibición química de la síntesis de colesterol hepático usando la clase de medicamentos denominada “estatinas”. Este enfoque inhibe la síntesis de colesterol inhibiendo la acción de la enzima limitante de la velocidad, HMG-CoA reductasa, en la ruta sintética del colesterol. La cirugía de derivación arterial coronaria es eficaz para disminuir los ataques de angina de pacientes seleccionados y se ha mostrado que las estatinas reducen exitosamente el colesterol plasmático y disminuyen la tendencia a desarrollar placas ateroscleróticas. Sin embargo, ningún enfoque ofrece el potencial para la disolución directa de las placas ateroscleróticas existentes.

La LAL representa la ruta bioquímica principal de entrada de éster de colesterilo en el cuerpo, y se usa posteriormente para modular la biosíntesis de colesterol celular. Una vez la LAL libera el colesterol de los ésteres de colesterilo, el colesterol libre sale del lisosoma y conduce a la regulación negativa de la síntesis de colesterol mediada por la proteína de unión de elemento regulador de esterol (SREBP). La acumulación de ésteres de colesterilo dentro de los macrófagos de placas ateroscleróticas ocurre en presencia de cantidades normales de LAL. Este hecho indica que el suministro de ésteres de colesterilo a estas células supera la capacidad de las cantidades normales de LAL de catabolizar los ésteres de colesterilo suministrados que inician el desarrollo de placas ateroscleróticas. Este proceso desestabiliza el metabolismo celular normal para la regulación de la síntesis de colesterol celular endógeno y conduce a cantidades en exceso de síntesis de colesterol y éster de colesterilo celular por la falta de regulación negativa del sistema mediado por SREBP de síntesis de colesterol y la ruta de acil CoA: colesterol aciltransferasa (ACAT) para la síntesis de éster de colesterilo intracelular [30].

Ocurren eventos similares en el hígado, que es el órgano principal del cuerpo responsable de la biosíntesis de colesterol y del mantenimiento de la homeostasis de colesterol. El suministro de LAL a hepatocitos en exceso de las cantidades normales potencia la salida de colesterol libre del lisosoma (concretamente, aumenta el flujo de ésteres de colesterilo a través del sistema lisosómico), que es una ruta importante para el metabolismo de dichos lípidos suministrados a hepatocitos por la circulación portal y la dieta. El resultado es un aumento del colesterol liberado de lisosomas, que posteriormente modula negativamente la síntesis de colesterol hepático y su suministro al cuerpo. Esto disminuye la carga de colesterol y ésteres de colesterilo a los sitios periféricos, reduciendo así el potencial aterogénico.

El uso de una proteína o polipéptido adecuado, tal como LAL o un homólogo de LAL que posea una actividad biológica similar, ofrece un medio de terapia alternativo para aterosclerosis así como enfermedad vascular periférica. La LAL funciona evitando la progresión o promoviendo la regresión de las lesiones de placa aterosclerótica mediante dos mecanismos: 1) entrando directamente en las células espumosas de lesión y disolviendo enzimáticamente los ésteres de colesterilo almacenados así como los tri-, di- y monoacilglicéridos; y 2) indirectamente promoviendo la salida lisosómica de colesterol libre y ácidos grasos libres que podrían modular la síntesis lipídica celular (hepática, macrófaga y otras) mediada por SREBP u otras rutas. Los pacientes que padecen aterosclerosis tienen la tendencia a tener niveles reducidos de LAL en las placas ateromatosas.

La LAL, un miembro de la familia de las lipasas, es una glucoproteína de 372 aminoácidos que se transfiere al lisosoma mediante el sistema receptor de manosa [31-33]. La secuencia de ADNc que codifica LAL se ha reseñado anteriormente [34]. Esta glucoproteína tiene seis secuencias consenso de glucosilación (Asn-X-Ser/Thr) y tres en Asn<sup>15</sup>, Asn<sup>80</sup> y Asn<sup>252</sup> están conservadas entre los miembros de la familia génica lipasa. Todos los miembros de la familia génica lipasa tienen secuencias pentapeptídicas GX SXG conservadas que contienen los nucleófilos de serina de sitio activo [35-37]. La LAL tiene dos de dichas secuencias en los residuos 97-101 y 151-155, con nucleófilos de serina potenciales en los residuos 99 y 153, donde un nucleófilo clave reside en el residuo Ser 153. La LAL escinde ésteres de colesterilo y triglicéridos *in vitro* usando sistemas de fosfolípido/detergentes. La Ser<sup>53</sup> se ha definido como una parte de la triada catalítica Asp-Ser-His común a muchas lipasas.

Las sustancias hidrolizantes lipídicas adecuadas para uso en esta invención incluyen, pero sin limitación, glucoproteínas tales como LAL, homólogos de LAL, en los que los homólogos poseen al menos un 85% de homología de secuencia, debido a la degeneración del código genético que codifica LAL, polipéptidos que poseen una actividad biológica similar a LAL y sustancias derivadas no peptídicas. Se incluyen también proteínas y polipéptidos hidrolizantes de lípidos que contienen la triada de lipasa catalítica Asp-Ser-His, donde la Ser es un residuo Ser<sup>153</sup>. Las sustancias adicionales incluyen variantes polimórficas de LAL en las que dos de los aminoácidos se reemplazan por aminoácidos diferentes. Se prepara un ejemplo de dichas variantes polimórficas clonando LAL de una colección de ADNc hepático humano normal y cambiando dos nucleótidos (C86 a A y G107 a A), lo que da como resultado la sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y de Gly2 por Arg en LAL, proporcionando cuatro variantes polimórficas diferentes de LAL. Las secuencias aminoácidas adicionales incluyen aquellas capaces de hidrólisis lipídica, catalítica o estequiométrica, en las que el residuo 153 de la cadena aminoácida es un residuo de serina.

Las proteínas derivadas de LAL adicionales incluyen aquellas proteínas que tienen la secuencia LAL nativa, pero que tienen más de seis residuos de acetilglucosilación ligados a N o menos de seis residuos de acetilglucosilación

## ES 2 328 446 T3

ligados a N. Cada sitio de glucosilación tiene dos residuos de acetilglucosamina ligados a N que son oligosacáridos terminales, siendo preferiblemente el residuo terminal de oligosacárido un residuo de  $\alpha$ -manosa y habiendo al menos tres residuos terminales de oligosacárido en cada sitio de glucosilación.

5 Para el tratamiento de la aterosclerosis, la sustancia hidrolizante de lípidos se orienta a los receptores que conducen a la captación en el lisosoma. Estos receptores incluyen, pero sin limitación, las categorías de receptores de reconocimiento de oligosacárido, que incluye un receptor de manosa, el receptor de 6-fosfato de manosa y la categoría de receptores de reconocimiento de secuencia peptídica, que incluye los receptores CD 36 y LDL.

### 10 *Procedimientos de tratamiento de aterosclerosis usando secuencias aminoácídicas hidrolizantes de lípidos*

La LAL podría usarse junto con estatinas para reducir el nivel de placas ateroscleróticas. Adicionalmente, la LAL podría usarse también junto con cirugía de derivación para algunos pacientes que desarrollan reestenosis y/o para prevenir el resurgimiento de placas después de la cirugía. Además, el tratamiento con agentes terapéuticos tales como LAL puede efectuar mejoras en las arterias y/o arteriolas a las que no puede accederse mediante cirugía u otros de dichos enfoques invasivos. Las ventajas adicionales del tratamiento con LAL pueden incluir la eliminación de la necesidad de cirugía en algunos pacientes y suministrar un producto natural a pacientes sin los efectos secundarios acompañantes o potenciales de los productos químicos sintéticos, como es el caso para el enfoque de terapia con estatina.

20 La terapia con LAL puede usarse también para el tratamiento de dos enfermedades humanas raras, enfermedad de Wolman y enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo. Ambas enfermedades son debidas a mutaciones en el locus LAL. La primera conduce a la muerte en el primer año de vida y la segunda es una enfermedad crónica con desarrollo de cirrosis del hígado en la vida adulta. Ninguna de las enfermedades tiene actualmente disponibles regímenes terapéuticos.

Los papeles terapéuticos potenciales adicionales para el tratamiento con LAL incluyen su uso en el tratamiento de esteatosis hepática en el embarazo, infiltración grasa inespecífica del hígado, enfermedad aterosclerótica periférica debido a enfermedades secundarias tales como diabetes mellitus, estenosis de carótida debida a aterosclerosis y estados patológicos similares.

30 La proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos puede usarse terapéuticamente como material exógeno o como material endógeno. Las proteínas o polipéptidos exógenos hidrolizantes de lípidos son aquellos producidos o fabricados fuera del cuerpo y administrados al cuerpo. Las proteínas o polipéptidos endógenos hidrolizantes de lípidos son aquellos producidos o fabricados dentro del cuerpo mediante algún medio (biológico u otro) para suministro en o a otros órganos del cuerpo. La LAL está presente en el tejido corporal. Los pacientes que padecen aterosclerosis tienen la tendencia a tener niveles reducidos de LAL en las placas ateromatosas. Para conseguir dichos resultados deseados para el tratamiento tanto directo como indirecto de las placas, la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos se orienta a órganos específicos mediante receptores específicos. Por ejemplo, la LAL puede orientarse a sistemas de receptor de manosa, u otros receptores específicos de oligosacárido, y entra en macrófagos, células de músculo liso, células endoteliales y hepatocitos.

### *Terapia endógena*

45 Un tratamiento indirecto de placas implica suministrar LAL a los órganos principales de la biosíntesis del colesterol, principalmente el hígado. Esto conduce a un mayor rendimiento lisosómico neto total de ésteres de colesterilo y al suministro de colesterol libre al citoplasma, donde se reduciría la síntesis de colesterol global. Da también como resultado una reducción del suministro endógeno de colesterol desde el hígado a órganos periféricos, concretamente macrófagos en placas desarrolladas o en desarrollo.

50 Los principios de la terapia génica para la producción de productos terapéuticos en el cuerpo incluyen el uso de vehículos de suministro (denominados vectores) que pueden ser variantes víricas no patogénicas, vesículas lipídicas (liposomas), carbohidratos y/u otros conjugados químicos de secuencias nucleotídicas que codifican la proteína o sustancia terapéutica. Estos vectores se introducen en las células del cuerpo mediante captación física (inyección directa), química o mediada por receptor celular. Una vez dentro de las células, puede hacerse que las secuencias nucleotídicas produzcan la sustancia terapéutica en entornos celulares (episómico) o nucleares (núcleo). Los episomas producen habitualmente el producto deseado durante periodos limitados, mientras que las secuencias nucleotídicas incorporadas al núcleo pueden producir el producto terapéutico durante periodos extensos, incluso permanentemente.

60 Dichos enfoques de terapia génica se usan para producir productos terapéuticos para efectos beneficiosos locales (concretamente, en la célula u órgano) o distantes. Ambos pueden proporcionar disminuciones de los efectos patológicos y pueden combinarse para producir terapia aditiva y/o sinérgica. Para cualquier efecto, local o distante, pueden necesitarse secuencias nucleotídicas naturales (denominadas normales) o alteradas (mutadas) para potenciar los efectos beneficiosos. Esto último puede ser necesario para el suministro orientado al tipo celular específico implicado en la patología de la enfermedad. Para la aterosclerosis, sería necesario el suministro distante a macrófagos (células espumosas), células de músculo liso y otros diversos tipos celulares en las lesiones patológicas, conocidas como ateromas. El suministro subcelular a los lisosomas puede ser también necesario y puede necesitarse también poner a disposición o producir variantes para dicho enfoque.

Puede conseguirse un enfoque para el uso de sustancias de retirada de lípidos, particularmente proteínas y polipéptidos hidrolizantes de lípidos, para el tratamiento de aterosclerosis y la retirada de placas ateroscleróticas mediante los enfoques de terapia génica discutidos anteriormente. Dichos enfoques proporcionan una fuente de proteína o polipéptido activo humano biológicamente activo hidrolizante de lípidos para suministro al cuerpo mediante sistemas biológicos u otros sistemas de producción. Este procedimiento de introducción puede conseguirse mediante fuentes internas o de producción (biológicas u otras, vectores de terapia génica, liposomas, activación génica, etc.) que conducen a la producción de proteínas y polipéptidos humanos biológicamente activos hidrolizantes de lípidos por ciertas células del cuerpo. La fuente puede proporcionar el suministro local o distante, por ejemplo, mediante efectos directos en la célula o mediante secreción fuera de las células para suministro a otras células del cuerpo, como aquellas en placas ateromatosas. Esto incluye, pero sin limitación, enfoques de terapia génica somática que permitirían la síntesis y/o producción de otro modo de la sustancia terapéutica en el cuerpo. En particular, secuencias nucleotídicas que codifican las secuencias funcionales hidrolizantes de lípidos de lipasa ácida lisosómica incorporadas a conjugados, liposomas, vectores víricos (concretamente, lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados u otros virus o dichos vectores similares a virus) para la expresión de las secuencias activas para efecto terapéutico. Además, podrían hacerse producir, expresar o preparar de otro modo el compuesto necesario en cantidades terapéuticas a las secuencias nucleotídicas que comprenden los componentes funcionales de interés biológico y terapéutico y que residen en las células del cuerpo. La proteína o polipéptido terapéutico hidrolizante de lípidos así producido en el cuerpo conduciría a la reducción o eliminación de las placas ateromatosas u otras lesiones de placas ateroscleróticas.

Las variantes y secuencias nucleotídicas homólogas o codificadas de lipasa ácida lisosómica incorporadas para la síntesis y/o producción de la proteína/péptido activo se integran transitoria o permanentemente en células para la producción terapéutica. Las secuencias de lipasa ácida lisosómica normal, variantes polimórficas, mutada específicamente o modificada pueden expresarse a partir del contexto de los vectores incorporados a células para una función normal y/o modificada específicamente para potenciar o promover de otro modo los efectos terapéuticos beneficiosos.

Dichas secuencias pueden conducir a la síntesis *in vivo* de la lipasa ácida lisosómica humana biológicamente activa deseada u otras proteínas terapéuticas dentro de células después de la incorporación a células mediante diversas rutas como se describe anteriormente. Una vez dentro de las células, la lipasa ácida lisosómica humana biológicamente activa sintetizada u otra proteína terapéutica hidroliza ésteres de colesterol y/o triglicéridos en los lisosomas después de su suministro orientado. La liberación de colesterol libre resultante de los lisosomas conduce a la regulación negativa de la ruta sintética de colesterol endógeno mediante los sistemas controlados por SREBP. Adicionalmente, la lipasa ácida lisosómica humana u otras proteínas o polipéptidos humanos terapéuticos producidos a partir de secuencias nucleotídicas incorporadas se secretan de las células, entran en el sistema circulatorio y se captan por células distantes mediante endocitosis mediada por receptor u otros de dichos sistemas de suministro lisosómico a los lisosomas de células patológicamente implicadas de las placas ateromatosas. Dichas placas incluyen, pero sin limitación, macrófagos y células de músculo liso. La liberación lisosómica de colesterol libre dentro de dichas células tiene al menos dos efectos beneficiosos sobre la reducción y/o eliminación de la placa ateromatosa: 1) el colesterol libre sale del lisosoma y participa en la regulación negativa mediada por SRBEP de macrófago endógeno o síntesis de colesterol de otro tipo celular, y 2) el colesterol libre sale del lisosoma y sale de la célula mediante transporte de colesterol inverso. Ambos efectos son beneficiosos para reducir la cantidad de ésteres de colesterol acumulados dentro de los lisosomas de macrófagos de células espumosas y/u otras células de las lesiones ateromatosas.

Los vectores génicos que contienen las secuencias nucleotídicas necesarias u otros componentes necesarios para expresión terapéutica se introducen en las células del cuerpo mediante varias rutas como se describen anteriormente y también su introducción directa en células de placa ateromatosa usando suministro mediante dispositivo angiográfico.

La terapia endógena contempla también la producción de una proteína o polipéptido en el que la célula se ha transformado con una secuencia genética que activa el gen de origen natural que codifica la proteína, concretamente técnicas de activación génica endógena.

#### *Terapia exógena*

Un procedimiento para el tratamiento directo de placas ateroscleróticas implica el suministro de LAL a placas y macrófagos y a las células de músculo liso en las mismas, de modo que se degradan y eliminan los ésteres de colesterol y/o triglicéridos que se almacenan o acumulan dentro de lisosomas de estas células. Esto da como resultado posteriormente la liberación de colesterol de los lisosomas y una disminución de la síntesis de colesterol endógeno dentro de las células espumosas (macrófagos y células de músculo liso). El efecto neto es reducir la cantidad de colesterol que se acumula directamente en el sitio diana patológico y disminuir el tamaño de las placas y otras de dichas lesiones *in situ*.

Debe observarse que la orientación directa e indirecta a las placas no son mutuamente excluyentes, y pueden ser sinérgicas con efectos tanto locales como globales sobre la homeostasis de colesterol y la disminución del potencial aterogénico.

Las proteínas o polipéptidos hidrolizantes de lípidos útiles en la presente invención para terapia exógena pueden administrarse mediante cualquier medio adecuado. Un experto en la técnica apreciará que están disponibles muchos procedimientos adecuados de administración del compuesto a un hospedador en el contexto de la presente invención,

en particular un mamífero, y que, aunque puede usarse más de una vía para administrar una proteína o polipéptido particular, una vía de administración particular puede proporcionar una reacción más inmediata y eficaz que otra vía.

5 Las formulaciones adecuadas para administración por inhalación incluyen formulaciones de aerosol dispuestas en propulsores aceptables a presión, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. El agente activo puede aerosolizarse con excipientes adecuados. Para administración por inhalación, la composición puede disolverse o dispersarse en forma líquida, tal como en agua o disolución salina, preferiblemente a una concentración a la que la composición se solubilice completamente y a la que pueda administrarse una dosis adecuada en un volumen inhalable.

15 Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen (a) disoluciones líquidas, tales como una cantidad eficaz del compuesto disuelta en diluyentes tales como agua o disolución salina, (b) cápsulas, saquitos o comprimidos, que contiene cada uno una cantidad predeterminada del ingrediente activo en forma de sólidos o gránulos, (c) suspensiones en un líquido apropiado y (d) emulsiones adecuadas. Las formas de comprimido pueden incluir uno o más de lactosa, manitol, almidón de maíz, almidón de patata, celulosa microcristalina, goma arábiga, gelatina, dióxido de silicio coloidal, croscarmelosa de sodio, talco, estearato de magnesio, ácido esteárico y otros excipientes, colorantes, diluyentes, agentes de tamponación, agentes humectantes, conservantes, agentes aromatizantes y portadores farmacológicamente compatibles.

20 Las formulaciones adecuadas para infusión intravenosa y administración intraperitoneal incluyen, por ejemplo, disoluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que vuelven la formulación isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en forma de dosis unitaria o envases sellados multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado liofilizado que requiere sólo la adición de portadores líquidos estériles, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes del uso. Las disoluciones y suspensiones de inyección extemporánea pueden prepararse para polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito anteriormente.

30 La administración parenteral, si se usa, podría ser también por inyección. Los inyectables pueden prepararse en formas convencionales, como disoluciones líquidas o suspensiones, formas sólidas adecuadas para disolución o suspensión en líquido antes de la inyección, o como emulsiones. Un enfoque para administración parenteral revisado más recientemente implica el uso de un sistema de liberación lenta o sostenida, de tal modo que se mantiene un nivel constante de dosificación. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. n° 3.710.795, Higuchi, expedida en 1973, que se incorpora como referencia a la presente memoria.

40 La dosificación apropiada administrada en cualquier caso dado variará, por supuesto, dependiendo de factores conocidos tales como las características farmacodinámicas de la proteína o polipéptido particular y de su modo y vía de administración; la edad, estado general de salud, metabolismo, peso del receptor y otros factores que influyen en la respuesta al compuesto; la naturaleza y extensión de la aterosclerosis; el tipo de tratamiento concurrente; la frecuencia de tratamiento y el efecto deseado.

45 Un procedimiento preferido de tratamiento de mamíferos que poseen placa aterosclerótica implica la introducción de una proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos adecuado mediante infusión intravenosa de una cantidad segura y eficaz de una proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos para causar la disminución y eliminación de la placa. Una cantidad segura y eficaz de la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos se define como una cantidad que causaría una disminución del nivel de placas ateroscleróticas en un paciente minimizando los efectos secundarios indeseados. Un médico experimentado experto en esta invención tendría conocimientos de las relaciones de dosificación apropiadas. El nivel de actividad de la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos debe considerarse también para determinar el número de unidades a administrar para conseguir el efecto deseado. Por tanto, el nivel de actividad de la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos debería ser suficiente para causar una reducción de las placas ateroscleróticas dentro de una dosificación razonable administrada.

## 55 Ejemplos experimentales

### *Diseño del estudio*

60 Se diseñó este estudio para cohortes de edad coincidente de ratones deficientes de lipasa ácida lisosómica, *lal*<sup>-/-</sup>, o deficientes de receptor de lipoproteína de baja densidad *ldlr*<sup>-/-</sup> en forma de un ensayo controlado abierto de ratones tratados y no tratados. Se usó una sola dosis de LAL en todos los ratones. Se sacrificaron todos los ratones después de 30 días de administración de LAL. Se administró LAL en forma de inyección rápida i.v. por la vena de la cola cada tres días durante 30 días. Se dividieron las cohortes en grupos iguales para inyecciones en días alternos. Se empezaron las inyecciones a los 2,0 ó 2,5 meses de edad para los ratones *lal*<sup>-/-</sup> o *ldlr*<sup>-/-</sup>, respectivamente. Se presenta el diseño de estudio global en la Tabla 1. Los ratones *lal*<sup>-/-</sup> recibieron una dieta de pienso corriente a lo largo de todo el periodo de estudio. La dosificación de LAL empezó a los 2 meses de edad. Se mantuvieron los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> con una dieta de pienso corriente durante 1,5 meses y después se dispusieron en una dieta rica en colesterol (7,5% de grasa; 1,25% de colesterol). La dosificación de LAL empezó después de que los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> hubieran estado en la dieta rica en

## ES 2 328 446 T3

grasas/rica en colesterol durante 30 días, concretamente, a los 2,5 meses de edad. Las dosis de LAL en los grupos tratados fueron 1,48 U (21  $\mu$ g; 70  $\mu$ l) de LAL en 1xPBS con 2% de seroalbúmina humana y ditiotreitól 10 mM (DTT). Los grupos de control recibieron 1xPBS con 2% de HSA y DTT 10 mM. La cohorte final era la deficiencia combinada *lal*<sup>-/-</sup>, *ldlr*<sup>-/-</sup>.

Los ratones consumieron ávidamente la dieta rica en grasas/rica en colesterol y toleraron bien las inyecciones. Todas las inyecciones (325) fueron exitosas con administración i.v. obtenida para todas. Un ratón *ldlr*<sup>-/-</sup> murió justo antes de iniciar las inyecciones. La alta mortalidad en los ratones *lal*<sup>-/-</sup>, *ldlr*<sup>-/-</sup> era debida a infarto de intestino delgado masivo posiblemente secundario al bloqueo de vasos por la infiltración masiva de macrófagos de la submucosa y lámina propia. Los datos de estos últimos homocigotos dobles no están incluidos aquí.

Se obtuvieron muestras para determinaciones de lípido plasmático y análisis de anticuerpo 32 días después de la primera inyección. Se sacrificaron todos los ratones 48 h después de la inyección de LAL final.

TABLA 1  
*Diseño de estudio*

Nombre	Genotipo	Dieta	Nº de ratones	Edad* (mos.)	Inyección	Dosificación ***(U)	Inyecciones totales
LC	<i>lal</i> <sup>-/-</sup>	Pienso	5	2	PBS**	0	10
LA, LB	<i>lal</i> <sup>-/-</sup>	Pienso	8	2	LAL	1,48	10
RC	<i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	HF/HCh	4	2,5	PBS	0	10
RA, RB	<i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	HF/HCh	8	2,5	LAL	1,48	10
LRC	<i>lal</i> <sup>-/-</sup> <i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	HF/HCh	4	2,5	PBS	0	10
LRA, LRB	<i>lal</i> <sup>-/-</sup> <i>ldlr</i> <sup>-/-</sup>	HF/HCh	8	2,5	LAL	1,48	10

\*: la edad se refiere a la del inicio de las inyecciones

\*\* : la inyección de control era 1 x PBS, con 2% de HSA y DTT 10 mM

\*\*\*: las dosis se administraron cada 3 días a cada ratón, 1,48 U= 21  $\mu$ g

### *Estabilidad de la actividad LAL*

Se controló la estabilidad de la actividad LAL a 4°C cada 3-4 días durante 34 días. Las actividades LAL permanecieron relativamente estables durante este periodo de tiempo, aunque queda por realizar una estandarización rigurosa del ensayo.

### *Procedimientos generales*

*Animales.* Se proporcionaron cuidados a los ratones según las directrices institucionales y todos los procedimientos recibieron aprobación previa por el IACUC de la Children's Hospital Research Foundation, Cincinnati, Ohio. Los ratones *lal*<sup>-/-</sup> se originaron a partir de fondos genéticos mixtos de 129Sv y CF-1. Los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> se adquirieron en Jackson Laboratory y eran cohortes de C57BL6/J. Se albergaron los ratones en microaislamiento en ciclos de 12 h/12 h de oscuridad/luz. Estaban disponibles agua y alimento, dietas de pienso corriente o HFCD, a voluntad. Se genotiparon los ratones mediante cribado de ADN de cola basado en PCR.

*Análisis de lípidos plasmáticos.* Se recogió sangre de la vena cava inferior (VCI) de ratones después de anestesiárselos con 200  $\mu$ l de sedante triple (ketamina, acepromazina y xilazina). Se recogió el plasma después de la filtración (5,000xg; 10 min; 4°C) de la sangre y se almacenó a -20°C. Se determinó colorimétricamente el colesterol libre plasmático total con un kit COD-PAP (Wako Chemicals). Se determinaron los triglicéridos plasmáticos totales en muestras de plasma con un kit de triglicéridos/GB (Boehringer Mannheim). Se determinó el colesterol plasmático total usando un kit de colesterol/HP (Boehringer Mannheim).

*Análisis de lípidos de tejidos.* Se extrajeron los lípidos totales de hígado, bazo e intestino delgado mediante el procedimiento de Folch (Folch, J., Lees, M. y Sloane-Stanley, G. H. (1957) "A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue". *J. Biol. Chem.*, 226, 497-505). Se midieron las concentraciones de triglicéridos usando el análisis químico desarrollado por Biggs. Brevemente, se evaporaron tanto patrones como muestras en cloroformo a vacío. Se resuspendieron los lípidos en los siguientes reactivos en orden: 0,5 ml de isopropanol, 4,5 ml de H<sub>2</sub>O: isopropanol: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 40 mM (0,5:3,0:1,0) y 2,0 ml de heptano, y se mezclaron con agitación vigorosa en cada etapa. Se dejaron los tubos hasta bifase (~5 minutos). Se añadieron 80 mg de florisil en un conjunto de tubos nuevos, se transfirió 1,0 ml de la fase superior de cada muestra a tubos que contenían florisil y se mezclaron por agitación. Se transfirieron entonces 0,2 ml de esta fase superior a un nuevo conjunto de tubos y se añadió alcóxido de sodio 28 mM (2,0 ml) y se mezcló cuidadosamente. Se incubaron los tubos a 60°C durante 5 min. Se añadió metaperyodato de sodio (3 mM, 1 ml) a cada tubo y se mezcló bien. Se dejaron oxidar los tubos durante 45 minutos. Finalmente, se añadió 1,0 ml de acetilacetona 73 mM a cada tubo y se incubaron a 60°C durante 20 min. Se enfriaron los tubos a temperatura ambiente (~25 min) y se leyeron a 410 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640.

Se midieron las concentraciones de colesterol en tejido total usando O-ftalaldehído. Brevemente, se evaporaron patrones de colesterol y muestras extraídas por Folch en atmósfera de N<sub>2</sub>. Se añadió O-ftalaldehído (3 ml, Sigma) a cada patrón de colesterol y se mezcló con muestra de tejido. Se añadió lentamente ácido sulfúrico concentrado (1,5 ml), se mezcló entonces durante 5-10 min y se leyó en un espectrofotómetro Beckman DU640.

*Análisis de transferencia Western y ensayo de actividad LAL:* Se realizaron inmunotransferencias con antisuero anti-LAL como se describe. Se estimaron las actividades de LAL con el sustrato fluorogénico oleato de 4-MU (4-MUO). Se realizaron todos los ensayos por duplicado. Los ensayos eran lineales dentro del marco temporal usado y se escindieron menos del 10% de los sustratos.

*Análisis histológicos.* Se realizaron exámenes de microscopía óptica de hígados, bazo, intestino, glándulas suprarrenales, riñones, corazón, pulmón, timo, páncreas y cerebro. Se tiñeron las secciones con hematoxilina/eosina (embebidas en parafina) o aceite rojo O (ORO) (secciones congeladas) para análisis de microscopio óptico.

*Tinción inmunohistoquímica.* Los análisis inmunohistoquímicos fueron con secciones de hígado embebidas en parafina y se realizaron con anticuerpo de conejo anti-LAL. Se saturó la actividad peroxidasa endógena mediante incubación en metanol que contenía 0,5% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min.

Se incubó el anticuerpo primario (1:200) a 40°C durante una noche. Se lavaron entonces las secciones con 1xPBS tres veces (5 min por lavado), se incubaron con IgG conjugada con fosfatasa alcalina como anticuerpo secundario durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con 1xPBS durante 5 min. Se detectó la señal usando el kit VECTASTAIN ABC-AP (Vector) y se contratiñó con rojo nuclear rápido.

*Estudios de captación de LAL en cultivos de macrófagos J774E y J774A.1:* Se mantuvieron células J774E y J774A.1 en medio DMEM con 6-tioguanina 60 μM o en medio DMEM suplementado, respectivamente, con suero de ternera fetal al 10%, penicilina y estreptomina (37°C; 5% de CO<sub>2</sub>). Para los estudios de captación, se sembraron células a 2×10<sup>5</sup> por pocillo un día antes de añadir LAL o Ceredase. En los momentos después de la incubación designados, se trataron las células con 1xPBS dos veces, se recogieron con un rascador de caucho y se centrifugaron (12.000 rpm, 1 min) a temperatura ambiente. Se extrajeron las proteínas intracelulares mediante lisis celular con 1% de taurocolato/1% de Triton X-100, se congelaron/descongelaron cinco veces (hielo seco y baño de agua a 37°C) y se centrifugaron (12.000 rpm, 10 min.) a 4°C. Se analizaron los extractos proteicos mediante transferencia Western.

Para tinción por inmunofluorescencia, se sembraron células (1,5×10<sup>5</sup>) en un portaobjetos con cámara, se incubaron con LAL durante 5, 18 ó 24 h, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 1 h. Se realizó la tinción por inmunofluorescencia.

## Resultados

1) *Reducción del almacenamiento de lípidos en hígado, bazo e intestino delgado de ratones *lal*<sup>-/-</sup> después de tratamiento con LAL*

a. *Cambios fenotípicos y patológicos macroscópicos* (figura 2): En ratones *lal*<sup>-/-</sup>, el tratamiento con LAL dio como resultado una corrección significativa de los fenotipos de almacenamiento de lípidos en diversos órganos. A los 3 meses de edad, los ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados desarrollaron un color amarillo/blanco cremoso en el hígado y estaba presente una hepatoesplenomegalia significativa. En comparación, los ratones tratados con LAL tenían hígados y bazos con colores mucho más normales. Los hígados normales en controles de edad coincidente eran aproximadamente un 5% del peso corporal, mientras que los hígados eran un 14% en los ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados. La administración de LAL redujo éste en aproximadamente un 30% (p=0,0029). Los pesos esplénicos eran similares en los ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados y tratados (p=0,5044). Sin embargo, el color del bazo revirtió a casi normal en el grupo tratado. El intestino delgado en los ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados era amarillo en el duodeno y blanco cremoso en el yeyuno. En el grupo tratado, el intestino delgado revertía parcialmente a un color normal.

b. *Evaluación histológica*: La tinción con H & E o aceite rojo O de hígado, bazo e intestino delgado de ratones no tratados y tratados mostró claras diferencias. En el hígado, los ratones *lal*<sup>-/-</sup> tratados con LAL tenían reducciones del tamaño y número de células de Kupffer rellenas de lípido (véanse las Figuras 3A y B). Los hepatocitos tienen menos almacenamiento lipídico que las células de Kupffer en ratones *lal*<sup>-/-</sup> no tratados, y este almacenamiento de hepatocito parece sin cambios en el grupo tratado. Usando tinción con aceite rojo O para lípidos neutros, era evidente una diferencia significativa entre los ratones tratados y no tratados (véanse las Figuras 3C y D). En el bazo, el grupo tratado mostraba una reducción de las células de almacenamiento lipídico en comparación con las presentes en ratones no tratados. En el intestino delgado, la tinción con aceite rojo O de ratones tratados con LAL y no tratados mostró diferencias sustanciales. Las secciones de intestino de ratones no tratados estaban llenas de células teñidas con aceite rojo O (macrófagos) en lámina propia, mientras que las secciones comparables de ratones tratados eran casi completamente negativas de tinción con aceite rojo O. Los cayados aórticos, base y válvulas aórticas y arterias coronarias de ratones *lal*<sup>-/-</sup>, tratados o no tratados, eran esencialmente normales a lo largo del estudio.

c. *Inmunohistoquímica*: Los análisis inmunohistológicos de hígado con anticuerpo anti-LAL (hLAL recombinante producido por *E. coli*) mostraron una tinción predominantemente oscura (positiva) de las células de revestimiento sinusoidal. Pudo detectarse algo de antígeno en las células de almacenamiento, pero esta señal estaba a un nivel bajo debido al gran espacio de dilución presentado por estas células. Se obtuvieron las muestras de hígado 30 min después de la inyección. Los ratones *lal*<sup>-/-</sup> no inyectados tenían LAL indetectable.

d. *Hallazgos bioquímicos*: Se determinaron el colesterol de tejido (tanto libre como esterificado) y los triglicéridos de hígado, bazo e intestino delgado mediante análisis químicos. En comparación con ratones de tipo silvestre de edad coincidente, los ratones *lal*<sup>-/-</sup> tienen ésteres de colesterol y triglicéridos elevados en varios tejidos. El éster de colesterol total medio por órgano a los 3,5 meses de edad aumentaba 31 veces en hígado y 19 veces en bazo en comparación con el tipo silvestre. La administración de LAL a dichos ratones estaba asociada a reducciones del colesterol total de un 47% en hígado total ( $267,22 \pm 8,22$  mg frente a  $144,23 \pm 7,99$  mg;  $p=0,0003$ ,  $n=3$ ) y un 69% en bazo total ( $8,73 \pm 0,43$  mg frente a  $2,63 \pm 0,50$  mg,  $p=0,0008$ ,  $n=3$ ). Se observaron también reducciones similares de los triglicéridos: 58% en hígado total ( $26,52 \pm 17,93$  mg frente a  $39,79 \pm 6,38$  mg,  $p=0,047$ ,  $n=4$ ) y 45% en bazo total ( $8,23 \pm 0,68$  mg frente a  $4,55 \pm 1,26$  mg,  $p=0,042$ ,  $n=4$ ). Aunque no se observó cambio de la concentración de colesterol en el intestino delgado ( $p=0,67$ ), la concentración de triglicéridos del grupo tratado se redujo un 65% ( $49,52 \pm 2,40$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  frente a  $17,09 \pm 4,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$ ,  $p=0,042$ ,  $n=4$ ).

#### e. Resumen

El tratamiento limitado de ratones *lal*<sup>-/-</sup> con LAL (10 inyecciones en 30 días, 1,48 U/dosis) condujo a correcciones macroscópicas, histológicas y bioquímicas de los niveles de colesterol y triglicéridos en ratones tratados.

#### 2) Químicas plasmáticas y niveles lipídicos en ratones *lal*<sup>-/-</sup> y *ldlr*<sup>-/-</sup>

No se observaron diferencias en los niveles de glucosa plasmática en ratones *lal*<sup>-/-</sup> o *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados o no tratados, aunque los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> tienen niveles plasmáticos de glucosa mayores que el tipo silvestre de ratones *lal*<sup>-/-</sup>. Los ratones *lal*<sup>-/-</sup> y *ldlr*<sup>-/-</sup> tenían niveles de ácidos grasos plasmáticos no esterificados (NEFA) aumentados en comparación con los controles de tipo silvestre (162% y 227%, respectivamente). La administración de LAL estaba asociada a aumentos de NEFA de un 32,6% en ratones *lal*<sup>-/-</sup> y de un 24,5% en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>. Los niveles plasmáticos de triglicéridos se redujeron en ratones *lal*<sup>-/-</sup> tratados, pero no cambiaron en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>. La HFCD produjo hipercolesterolemia en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>. La concentración plasmática de colesterol libre aumentó 22 veces y la concentración plasmática de éster de colesterol aumentó 13,8 veces en comparación con ratones de tipo silvestre. Los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados con LAL tenían reducciones del colesterol plasmático libre de un 18,2% ( $p=0,0894$ ) y de ésteres de colesterol de un 26,7% ( $P=0,0025$ ). Los niveles de colesterol libre y éster de colesterol no cambiaron en ratones *lal*<sup>-/-</sup> tratados.

#### 3) Efectos histológicos y bioquímicos de la administración de LAL en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>

##### a. Estudios anatómicos macroscópicos y histológicos

Los órganos viscerales de estos ratones parecían normales. Se prepararon montajes completos de los cayados aórticos de ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> y se examinaron mediante transiluminación. A los 3,5 meses, todos los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> no tratados (3/3) tenían lesiones extensas en el cayado y arranques de los vasos principales, concretamente arterias braquiocefálicas. Aunque no se determinó cuantitativamente, la administración de LAL parecía tener poco efecto sobre estas lesiones en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados.

Para evaluar las lesiones arteriales coronarias, se seccionaron y analizaron secuencialmente los corazones de ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados y no tratados. No se trataron cuatro ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>. Uno de estos se encontró muerto justo antes de empezar la administración de LAL (a la edad de 2,5 meses). Ocho ratones recibieron LAL y todos sobrevivieron durante todo el periodo de estudio. Los resultados se resumen en la Tabla 2. Todos los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> no tratados tenían lesiones de placa graves en la válvula aórtica y los ostios de las arterias coronarias (véanse las Figuras 4A y B). De las válvulas aórticas examinadas en el grupo tratado, dos tenían una acumulación de células espumosas leve a moderada (++), una muy leve (+) y dos ninguna (véase la Figura 4C). Las válvulas aórticas de tres ratones tratados no se examinaron histológicamente, ya que se habían extirpado para los estudios de cayado aórtico de montaje completo.

## ES 2 328 446 T3

Las lesiones coronarias en el grupo no tratado eran extensas y multifocales. Todas tenían una fuerte infiltración de los ostios coronarios por macrófagos, con placas extendiéndose a una distancia considerable en las arterias coronarias. También se encontraron placas aisladas y dispersadas individuales a lo largo del primer tercio de las arterias coronarias. En un caso, la rama principal de la coronaria izquierda estaba completamente obstruida con una lesión avanzada que contenía cristales de colesterol e inflamación aparente. En comparación, 7/8 de los ratones *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados tenían vasos coronarios normales (véase la Tabla 2). Un ratón *ldlr*<sup>-/-</sup> tratado con LAL tenía células espumosas en un vaso coronario intramuscular pequeño. Las otras arterias coronarias en este ratón eran normales. Este ratón particular (RA1) tenía también lesiones leves-moderadas de la válvula aórtica.

Para obtener una evaluación más cuantitativa de las lesiones arteriales coronarias en ratones *ldlr*<sup>-/-</sup>, se examinaron secciones de H&E secuenciales (total =210; 10  $\mu$ m) del corazón en un ratón no tratado (RC2) y en un ratón tratado (RB2). RC2 tenía múltiples placas en arterias coronarias, mientras que RB2 tenía arterias coronarias completamente normales.

TABLA 2

*Efecto de LAL sobre las válvulas aórticas y las arterias coronarias de ratones ldlr<sup>-/-</sup>*

*Ratones no tratados con LAL*

Designación	Lesión de válvula aórtica	Lesiones de arterias coronarias
RC2	++++	++++
RC3	++++	+++
RC4	++++	++++

*Ratones tratados con LAL*

Designación	Lesión de válvula aórtica	Lesiones de arterias coronarias
RA1	++	+
RA2	+	-
RA3	+	-
RA4	++	-
RB1	-	-
RB2	-	-
RB3	NR	-
RB4	NR	-

++++= lesiones graves, +++= moderadas, ++= leves/moderadas, += leves, -= sin lesiones; NR= no realizado debido a la extirpación del cayado aórtico de montaje completo.

Estos resultados muestran un efecto selectivo importante de un nivel de dosis fijada individual de LAL sobre la presencia de células espumosas aórticas valvulares y arteriales coronarias y lesiones aterogénicas progresivas.

### b. Estudios bioquímicos

Los resultados de lípidos plasmáticos se reseñan anteriormente para los grupos *ldlr*<sup>-/-</sup> tratados y no tratados. Los niveles hepáticos y esplénicos de colesterol y triglicéridos aumentaron frente a ratones de tipo silvestre en el grupo *ldlr*<sup>-/-</sup> no tratado. No se observaron efectos significativos sobre el colesterol total en hígado ( $p=0,8816$ ) y bazo ( $p=0,1061$ ) o la concentración de colesterol ( $0,0927$ ) en el intestino delgado. Se redujeron los triglicéridos a un 65,1% en hígado total ( $91,54 \pm 1,98$  mg frente a  $59,60 \pm 6,86$  mg;  $p=0,002$ ), y a un 53,5% en bazo total ( $3,24 \pm 0,39$  mg frente a  $1,73 \pm 0,33$  mg;  $p=0,0183$ ). La concentración de triglicéridos en el intestino delgado se redujo también a un 43% ( $41,74 \pm 3,69$   $\mu$ g/mg frente a  $23,79 \pm 2,08$   $\mu$ g/mg,  $p=0,001$ ).

## c. Estudios de anticuerpos

Se obtuvo suero en el sacrificio de cada ratón de cada genotipo y se usó en análisis Western. Se usó la Prep nº 3 (2,65 ng/pocillo) como antígeno. Se usó suero a diluciones de 1:100. Todos los ratones expuestos a 10 inyecciones de LAL dieron señales Western positivas. Las bandas positivas comigraron con la LAL detectada con anticuerpo de conejo anti-LAL. Con un suero de ratón, se consiguieron señales positivas con diluciones 1:100 a 1:6400 usando la Prep. nº 3. Se realizaron estudios adicionales para determinar la reactividad de estos sueros de ratón ante LAL o LAL no glucosilada producida en *E. coli*. Usando 2,65 ng de antígeno, la LAL no glucosilada dio señales muy bajas a ausentes con todos menos con un suero de ratón. Estos resultados indican que la especificidad del anticuerpo está dirigida más hacia los oligosacáridos que a la proteína LAL en estas conformaciones.

## Resumen de datos

Los datos de *ldlr*<sup>-/-</sup> muestran efectos claros y drásticos de la administración de LAL sobre la presencia de placas y células espumosas valvulares aórticas y arteriales coronarias. Todas las lesiones se redujeron en gran medida o estaban ausentes en los ratones tratados en comparación con lesiones muy graves en la cohorte no tratada. Los cambios en los triglicéridos hepáticos, esplénicos e intestinales indican un efecto directo de la LAL en estos órganos.

## Referencias

- 1) Du, H.; Witte, D. F.; Grabowski, G. A. 1996, *Journal of Lipid Research*, vol. 37, pág. 937-949.
- 2) Hua, X., Yokoyama, C., Wu, J., Briggs, M. R., Brown, M. S., Goldstein, J. L., y Wang, X. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 90, pág. 11603-11607.
- 3) Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1997, *Cell*, vol. 89, pág. 331-340.
- 4) Goldstein, J. L. y Brown, M. S. 1990, *Nature*, vol. 343, pág. 425-430.
- 5) Wang, X., Sato, R., Brown, M. S., Hua, X. y Goldstein, J. L. 1994, *Cell*, vol. 77, pág. 53-62.
- 6) Goldstein, J. L., Basu, S. y Brown, M. S. 1983, *Met. in Enzymology*, vol. 8, pág. 241-260.
- 7) Goldstein, J. L., Dana, S. E., Faust, J. R., Beaudet, A. L. y Brown, M. S. 1975, *J. Biol. Chem.*, vol. 250, pág. 8487-8495.
- 8) Kim, J. B. y Spiegelman, B. M. 1996, *Genes. Dev.* vol. 10, pág. 1096-1107.
- 9) Ericsson, J., Jackson, S. M., Lee, B. C. y Edwards, P. A. 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 93, pág. 945-950.
- 10) Du, H., Witte, D. P. y Grabowski, G. A. 1996, *J. Lipid Res.* vol. 37, pág. 937-949.
- 11) Osborne, T. F. y Rosenfeld, J. M. 1998, *Curr. Opin. Lipidol.* vol. 9, pág. 137-140.
- 12) Sakai, J., Duncan, B. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1996, *Cell*, vol. 85, pág. 1037-1046.
- 13) Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1997, *J. Bio. Chem.*, vol. 272, pág. 20213-20221.
- 14) Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. 1993, *Cell*, vol. 75, pág. 187-197.
- 15) Hua, X., Wu, J., Goldstein, U., Brown, M. S. y Hobbs, H. H. 1995, *Genomics*, vol. 25, pág. 667-673.
- 16) Sato, R., Yang, J., Wang, X., Evans, M. J., Ho, Y. K., Goldstein, J. L. y Brown, M. S. 1994, *J. Biol. Chem.*, vol. 269, pág. 17267-17273.
- 17) Sakai, J., Nohturfft, A., Cheng, D., Ho, Y. K., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. 1997, *J. Bio. Chem.* vol. 272, pág. 20213-20221.
- 18) Fielding, C. J. y Fielding, P. E. 1997, *J. Lipid. Res.* vol. 38, pág. 1503-1521.
- 19) Dietschy, J. M. 1990, *Hospital Practice*, pág. 67-78.
- 20) Rigotti, A., Trigatti, B. L., Penman, M., Rayburn, H., Herz, J. y Krieger, M. 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pág. 12610-12615.

## ES 2 328 446 T3

21) **Temel, R. E., Trigatti, B., DeMattos, R. B., Azhar, S., Krieger, M. y Williams, D. L.** 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 94, pág. 13600-13605.

22) **Jian, B., Llera-Moyer, M., Ji, Y., Wang, N., Phillips, M. C., Swaney, J. B., Tall, A. R. y Rothblat, G. H.** 1998, *J. Bio. Chem.*, vol. 273, pág. 5599-5606.

23) **Johnson, M. S. C., Svensson, P. A., Helou, K., Billig, H., Levan, G., Carlsson, L. M. S. y Carlsson, B.** 1998, *Endocrinology*, vol. 139, pág. 72-80.

24) **Fluiter, K., Westhuyzen, D. R. y Berkel, T. J. C.** 1998, *J. Bio. Chem.*, vol. 273, pág. 8434-8438.

25) Id. en 21.

26) Id. en 22.

27) **Somerharju, P. y Lusa, S.** 1998, *Biochem. Biophys. Acta*, vol. 1389, pág. 112-122.

28) **Assman, G. y Seedorf, U.** 1995, "The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease", pág. 2563-2587.

29) **Sheriff, S. y Du, H.** 1995, *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 57, página 1017A.

30) **Sheriff, S., Du, H., Grabowski, G. A.** 1995, *J. Biol. Chem.*, Vol. 270, pág. 27766-27772.

31) **Amies, D., Merkel, M., Eckerskom, C., Greten, H.** 1994, *Eur. J. Biochem.*, vol. 219, pág. 905-914.

32) **Neufeld, E. F., Sando, G. N., Garvin, A. J., Rowl, W.** 1977, *J. Supramol. Struct.*, vol. 6, pág. 95-101.

33) **Sando, G. N., Henke, V. L.** 1982, *J. Lipid Res.*, vol. 23, pág. 114-123.

34) **Anderson, R. A. y Sando, G. N.** 1991, *J. Biol. Chem.*, vol. 266, pág. 22479-22484.

35) **Komaromy, M. C., Schotz, M. C.** 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 84, pág. 1526-1530.

36) **Lowe, M. E., Rosenblum, J. L.** 1989, *J. Biol. Chem.*, vol. 264, pág. 20042-20048.

37) **Shimida, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., Tsunaawu, S.** 1989, *J. Biochem. (Tokyo)*, vol. 106, pág. 383-388.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de una proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos seleccionado del grupo constituido por la proteína lipasa ácida lisosómica, una proteína que muestra al menos un 85% de homología de secuencia con la lipasa ácida lisosómica, una proteína variante polimórfica de lipasa ácida lisosómica con sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y de Gly2 por Arg, o mezclas de las mismas, para la fabricación de un medicamento para tratar la aterosclerosis en un mamífero, en el que dicha proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos se orienta a sitios de receptor para captación en lisosomas.
- 10 2. El uso según la reivindicación 1, en el que dicho sitio receptor se selecciona del grupo constituido por receptores de reconocimiento de oligosacárido y receptores de reconocimiento de secuencia peptídica.
- 15 3. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho sitio receptor es un sitio receptor de manosa.
4. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que la lipasa ácida lisosómica tiene menos de seis residuos de acetilglucosilación ligados a N.
- 20 5. El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que la lipasa ácida lisosómica tiene más de seis residuos de acetilglucosilación ligados a N.
6. El uso según la reivindicación 4 ó 5, en el que el residuo de N-acetilglucosilación es un oligosacárido terminal.
- 25 7. El uso según la reivindicación 6, en el que el residuo oligosacárido terminal es un residuo de manosa.
8. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicha proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos se produce exógenamente, está en un portador farmacéuticamente aceptable y ha de administrarse por vía oral, parenteral, mediante inyección, infusión intravenosa, inhalación, liberación de dosificación controlada o mediante administración peritoneal.
- 30 9. El uso según cualquier reivindicación precedente, en el que dicho medicamento es eficaz para tratar la enfermedad de Wolman o la enfermedad de almacenamiento de éster de colesterilo.
- 35 10. Una composición que comprende una cantidad segura y eficaz de una proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos seleccionado del grupo constituido por la proteína lipasa ácida lisosómica, una proteína que muestra al menos un 85% de homología con la lipasa ácida lisosómica, una proteína variante polimórfica de lipasa ácida lisosómica con sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y de Gly2 por Arg, mezclas de las mismas y un portador farmacéuticamente aceptable para uso en un procedimiento para tratar el cuerpo humano o animal mediante terapia.
- 40 11. La composición según la reivindicación 10, en la que la lipasa ácida lisosómica tiene menos de 6 residuos de acetilglucosilación ligados a N.
- 45 12. La composición según la reivindicación 10, en la que la lipasa ácida lisosómica tiene más de 6 residuos de acetilglucosilación ligados a N.
13. La composición según la reivindicación 11 u 12, en la que el residuo de N-acetilglucosilación es un oligosacárido terminal.
- 50 14. La composición según la reivindicación 13, en la que el residuo terminal oligosacárido es un residuo de manosa.
- 55 15. Uso de un vector que comprende y expresa una secuencia de ADN que codifica proteína o polipéptido biológicamente activo hidrolizante de lípidos seleccionado del grupo constituido por la proteína lipasa ácida lisosómica, una proteína que muestra al menos un 85% de homología con la lipasa ácida lisosómica, una proteína variante polimórfica de lipasa ácida lisosómica con sustitución del aminoácido Pro(-6) por Thr y de Gly2 por Arg, y que expresa la secuencia de ADN en células para producir la proteína o polipéptido biológicamente activo hidrolizante de lípidos para la fabricación de un medicamento para tratar mamíferos que padecen aterosclerosis, enfermedad de Wolman o enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterilo, en el que dicho vector ha de administrarse a las células, y las células que albergan el vector secretan la proteína o polipéptido biológicamente activo hidrolizante de lípidos que se capta por otras células deficientes en la proteína o polipéptido hidrolizante de lípidos.
- 60 16. El uso según la reivindicación 15, en el que el vector se selecciona del grupo constituido por un vector vírico, un plásmido y una vesícula lipídica.
- 65 17. El uso según la reivindicación 16, en el que dicho vector es un vector vírico seleccionado del grupo constituido por lentivirus, adenovirus, virus adenoasociados y vectores similares a virus.

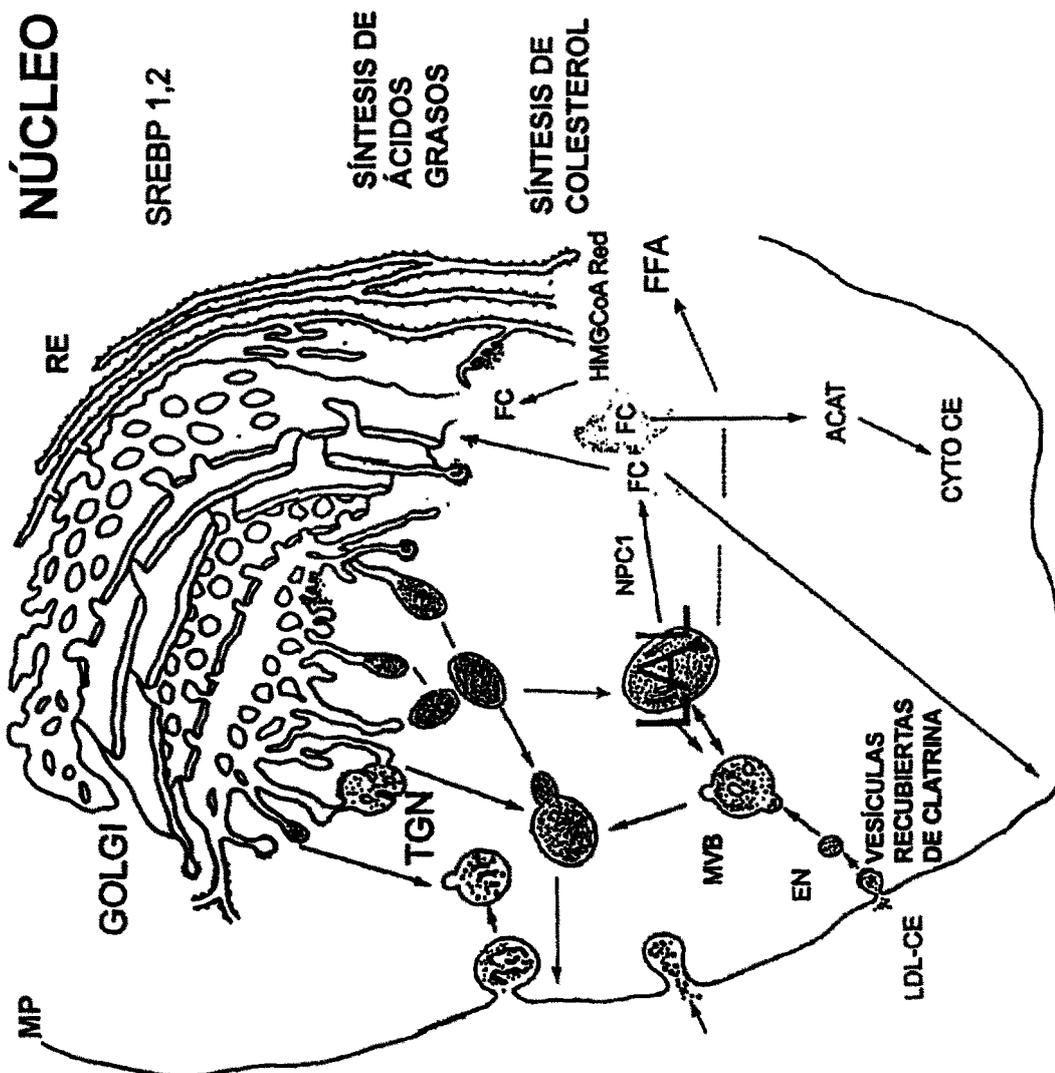


Figura 1

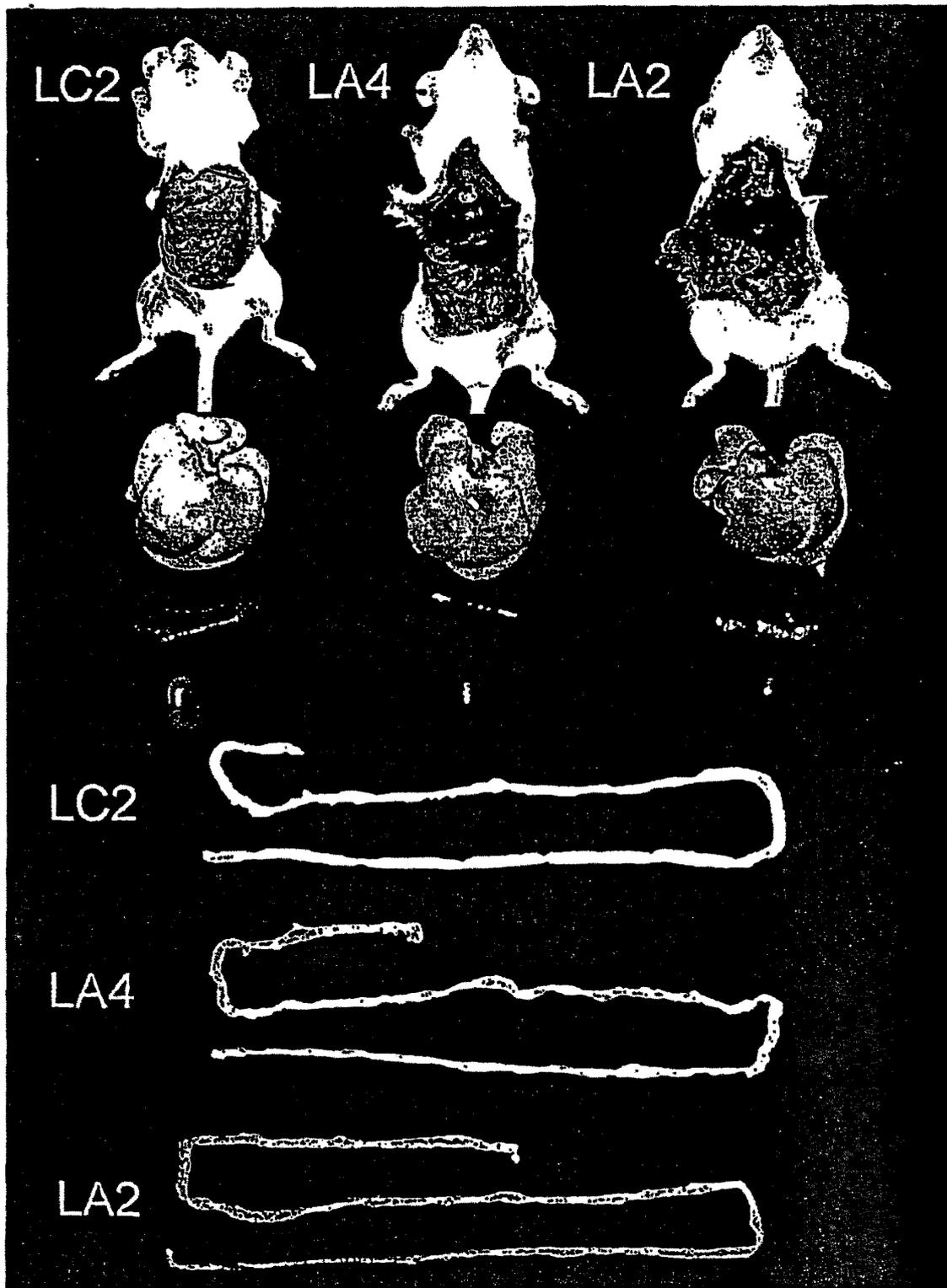


Figura 2

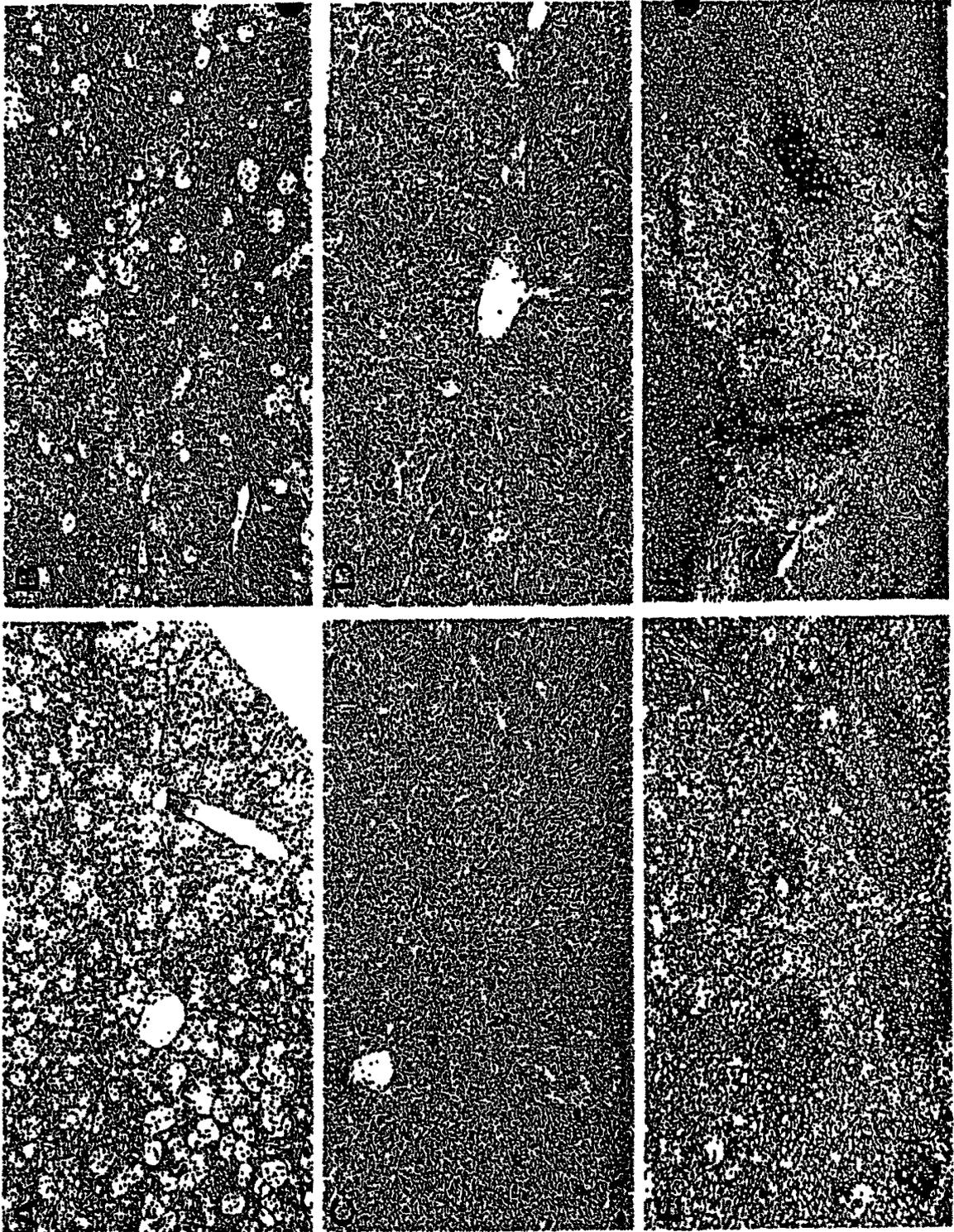


Figura 3

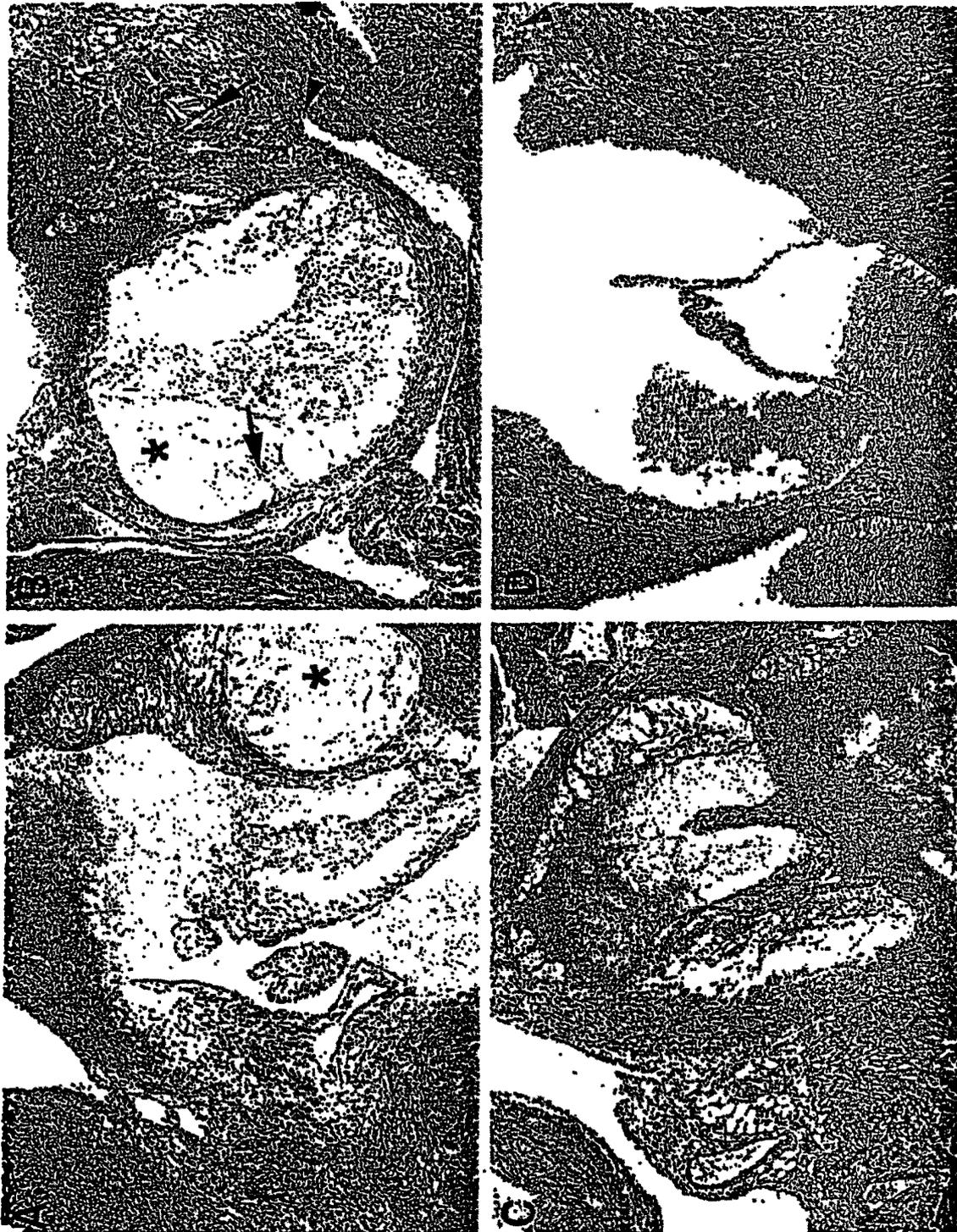


Figura 4