

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 412 892**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/715 (2006.01)

C07K 14/71 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.04.2008 E 08738276 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2139915**

54 Título: **Proteínas de unión y receptores solubles modificados con glicanos y su uso**

30 Prioridad:

03.05.2007 IL 18295607

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

12.07.2013

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT CO. LTD.
(100.0%)
WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O. BOX 95
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**RUBINSTEIN, MENACHEM;
WERMAN, ARIEL y
ALKAHE, BEN**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 412 892 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

Proteínas de unión y receptores solubles modificados con glicanos y su uso

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a agentes capaces de retirar de la circulación componentes no deseados y al uso clínico de dichos agentes. Los ejemplos de dichos componentes no deseados son las citoquinas proinflamatorias, LDL, VLDL, LDL oxidada, lipoproteínas remanentes y factores del crecimiento.

Antecedentes de la invención

10 Las proteínas de unión y los receptores solubles son proteínas en la circulación que se unen con alta afinidad y especificidad a diversas citoquinas, factores del crecimiento, hormonas polipeptídicas y otras proteínas efectoras en la circulación. En la mayoría de los casos, el receptor soluble se corresponde con el dominio de unión al ligando extracelular del correspondiente receptor de la superficie celular. Estos receptores solubles se generan mediante variantes de corte y empalme del ARNm que codifica el receptor soluble, o mediante el desprendimiento del dominio extracelular de unión al ligando del receptor de la superficie celular. Sin embargo, existen algunas proteínas de unión a citoquinas, tales como la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP) y la osteoprotegerina, que no se corresponden con un receptor de la superficie celular.

15 La existencia de receptores solubles y la compleja regulación de su producción y función sugiere que desempeñan un papel importante en la fisiología normal y en respuesta a una enfermedad, aunque en algunos casos parecen contribuir al proceso patológico. Por ejemplo, un componente importante de la respuesta alérgica está mediado por eosinófilos cuya producción y actividad se ve significativamente estimulada por IL-5. En pacientes con asma alérgico, el nivel de ARNm que codifica el receptor de IL-5 unido a membrana en muestras de biopsia endobronquial aumenta con la gravedad del estrangulamiento bronquial. A medida que los pacientes tratados se recuperan de un episodio asmático agudo, la expresión del ARNm del receptor de IL-5 soluble aumenta, lo cual sugiere que el receptor de IL-5 soluble pueden contrarrestar los efectos de IL-5 en el pulmón y el aumento en su expresión puede producir la recuperación del asma (Heaney y Golde, 1998).

20 Debido a su implicación fundamental en la patogénesis de muchas enfermedades, las citoquinas constituyen dianas clave para estrategias bioterapéuticas. El descubrimiento de que las formas solubles de los receptores de citoquinas están implicadas en la regulación endógena de la actividad de las citoquinas ha provocado un interés sustancial en su aplicación potencial como agentes inmunoterapéuticos. Como tales, los receptores de citoquinas solubles tienen muchas ventajas, incluyendo su especificidad, baja inmunogenicidad y alta afinidad. La capacidad de muchos receptores de citoquinas solubles para inhibir la unión y la actividad biológica de sus ligandos los hace ser antagonistas de citoquinas muy específicos. Varias empresas farmacéuticas han generado una serie de agentes terapéuticos basados en receptores de citoquinas solubles y muchos de ellos están sometidos a ensayos clínicos. El más avanzado con respecto al desarrollo clínico es el etanercept (Enbrel™, Amgen), una proteína de fusión entre el receptor de TNF soluble de tipo II y la región Fc de la IgG1 humana. Este antagonista de TNF- α ha sido el primer receptor de citoquinas soluble que ha recibido aprobación para un uso en seres humanos. En general, la mayoría de los agentes basados en receptores de citoquinas solubles han resultado ser seguros, bien tolerados y sólo han mostrado unos pequeños efectos secundarios en la mayoría de los pacientes. Los receptores de citoquinas solubles constituyen una nueva generación de agentes terapéuticos con un tremendo potencial para aplicaciones en una amplia diversidad de enfermedades humanas (Idriss y Naismith, 2000).

35 El TNF α se une a dos receptores cognados de peso molecular 55 y 75 kDa. El TNFR-1 humano consiste en 434 aminoácidos, mientras que el TNFR-2 comprende 439 restos. Estos receptores comparten una homología muy limitada en la región extracelular. La superfamilia de receptores de TNF se define por la presencia de unidades repetidas de agrupamientos de cisteínas. Los receptores de TNF están presentes en cada todos los tipos celulares conocidos con pocas excepciones, tales como eritrocitos y linfocitos T no estimulados. La densidad de los receptores varía de 200-10.000 por célula. No parece existir correlación entre el número de receptores presentes sobre una célula y la magnitud o dirección de la respuesta inducida por TNF. Se han identificado formas solubles de TNFR-1 y TNFR-2 en la orina humana y en el suero de pacientes con cáncer. Estas probablemente regulan la actividad del TNF atrayendo como señuelo al ligando, infraregulando con ello las señales generadas.

40 Hasta la fecha se han identificado muchos receptores unidos a membranas (incluyendo TNFR-1 y -2), que forman lo que se conoce como la superfamilia de receptores de TNF. Su peso molecular está en el intervalo de 50-120 kDa. Los miembros de la familia de receptores de TNF pertenecen a las glicoproteínas transmembrana de tipo I. También se ha identificado una serie de receptores relacionados denominados "receptores señuelo", que actúan secuestrando a los ligandos segregados. Los receptores señuelo (DcR1, DcR2 y DcR3) secuestran a los ligandos Trail (DcR1 y DcR2) y Fas (DcR3), evitando con ello la apoptosis. Además también se ha identificado un receptor señuelo no unido a membrana soluble denominado osteoprotegerina (OPG). No se han indicado muchas modificaciones postraduccionales para la familia de TNFR-1. TNFR-1 y TNFR-2 están ambos N-glicosilados, pero sólo TNFR-2 está O-glicosilado. Todos los demás receptores de membrana también están glicosilados (Idriss y Naismith, 2000).

La artritis reumatoide (AR), una enfermedad sistémica, es la forma más común de artritis inflamatoria. El trastorno tiene una prevalencia mundial de aproximadamente 1% y una incidencia anual de 3 por cada 10.000 adultos. La AR viene acompañada de una significativa morbilidad y mortalidad. Dependiendo de la gravedad de la enfermedad en el momento de su aparición, el riesgo de discapacidad puede ser tan alto como 33%, y la mortalidad puede aumentar tanto como 52%, con frecuencia como resultado de una infección o una enfermedad circulatoria. Tal como puede esperarse, los pacientes con AR también presentan un deterioro significativo en su calidad de vida.

Los objetivos finales del tratamiento son la prevención o el control de los daños en las articulaciones, la prevención de la pérdida funcional, y el alivio del dolor. Con la introducción de los antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF) en 1999, la gestión de la AR ha cambiado considerablemente. El infliximab (Remicade®), el etanercept (Enbrel®) y el adalimumab (Humira™) se han diseñado para modular la cascada inflamatoria de la AR mediante su unión a TNF, disminuyendo con ello su biodisponibilidad.

Se han detectado diversas citoquinas proinflamatorias en el fluido sinovial de pacientes con ARN, que incluyen TNF, interleuquina 1 (IL-1), IL-17, IL-18 e IL-6. Estudios anteriores demostraron que en un sistema de cultivo de células sinoviales, la síntesis secundaria de IL-1 y otras citoquinas puede reducirse en gran medida dirigiéndose específicamente al TNF. El papel del TNF se basa en (1) su capacidad para degradar el cartílago y el hueso *in vitro*, (2) sus propiedades artritogénicas en modelos animales, (3) la colocalización de sus receptores en el sinovio AR y la unión entre el pannus y el cartílago, y (4) su papel fundamental para regular la síntesis de IL-1 en células sinoviales derivadas de AR cultivadas.

El etanercept es una proteína de fusión que consiste en la porción de unión al ligando del receptor de TNF p75 humano más el fragmento Fc de IgG1 humana. El etanercept tiene una semivida terminal de 102 ± 30 horas. La dosis inicial recomendada es de 25 mg por vía subcutánea dos veces semanales, con o sin metotrexato. El tratamiento con etanercept produce unas reducciones significativas relacionadas con la dosis en la actividad de la enfermedad y no aparecen problemas de seguridad significativos. Los antagonistas de TNF representan un avance significativo en la terapia de la AR activa. Han demostrado eficacia en la inhibición de la destrucción de las articulaciones a lo largo de diversas longitudes de tiempo, reduciendo los síntomas y mejorando la función física en pacientes con AR (Schwartzman, Fleischmann *et al.*, 2004).

El etanercept está aprobado para su uso en EEUU como monoterapia subcutánea en adultos con psoriasis de moderada a grave que son candidatos para la terapia sistémica o la fototerapia. El fármaco también está indicado en pacientes con artritis psoriática, en los que puede utilizarse en combinación con metotrexato. En pacientes con psoriasis de moderada a grave, la terapia a corto plazo con etanercept aumenta significativamente la proporción de pacientes que logran una reducción del 75% en la puntuación del área de psoriasis e índice de gravedad comparado con un placebo. De modo similar, en pacientes con artritis psoriática, un tratamiento a corto plazo con etanercept solo o en combinación con metotrexato mejora las características clínicas de la enfermedad, mientras que el avance radiográfico de los daños en las articulaciones parece frenarse significativamente (Goldsmith y Wagstaff, 2005). En fechas más recientes, el etanercept ha demostrado eficacia en el tratamiento de adultos con espondilitis anquilosante (McCormack y Wellington, 2004).

Debido a que el etanercept consiste en el dominio Fc de la IgG1 humana, su complejo con el TNF es retirado de la circulación a través del receptor de Fc que se encuentra en las células inmunológicas. Los intentos para desarrollar una terapia anti-TNF basada sólo en el receptor de TNF p55 soluble no han tenido éxito hasta la fecha, a pesar del hecho de que se une al TNF con una mayor afinidad, comparado con el receptor de TNF p75.

La aterosclerosis es el proceso en el que las sustancias grasas, el colesterol, los productos de desecho celulares, el calcio y la fibrina forman placas en el revestimiento interno de una arteria. La placa puede bloquear parcial o totalmente el flujo de la sangre a través de una arteria. La ruptura de una placa es una amenaza aún más grave, puesto que puede provocar embolia en arterias críticas más estrechas. La aterosclerosis afecta a las arterias de tamaño grande y medio. El tipo de arteria y el lugar en que se desarrolla la placa varía en cada persona. La aterosclerosis es una enfermedad lenta y progresiva que puede comenzar en la infancia. En algunas personas, esta enfermedad avanza con rapidez en la tercera década de su vida. En otras no resulta amenazadora hasta que alcanzan la edad de 50 o 60 años. Puede afectar a las arterias del cerebro, corazón, riñones y brazos y piernas. A medida que la placa se va construyendo puede provocar graves enfermedades y complicaciones. Estas incluyen la enfermedad de la arteria coronaria, angina, ataque al corazón, muerte súbita, enfermedad cerebrovascular, ictus, ataque isquémico transitorio y enfermedad arterial periférica. Las enfermedades provocadas por la aterosclerosis son la principal causa de enfermedad y muerte en el mundo occidental. Debido a la expansión de ciertos hábitos (dietas ricas en grasas, abuso del tabaco, y falta de ejercicio), las enfermedades cardiovasculares se convertirán en la principal causa de disminución de los años productivos a nivel mundial para 2020 (Murray y López, 1997).

En años recientes se han generado nuevos conocimientos acerca de los mecanismos moleculares implicados en la aterogénesis. Brown y Goldstein han sido capaces de explicar la progresiva acumulación de colesterol en el plasma y las arterias debida a un defecto en el receptor de LDL, que en efecto es la principal causa de la hipercolesterolemia familiar (Brown y Goldstein, 1986). En esta enfermedad compleja, el colesterol asociado a LDL (LDLc) ha demostrado ser el responsable de la acumulación de colesterol en lesiones ateroscleróticas. Los modelos para el mecanismo de acumulación de colesterol en placas ateroscleróticas subrayan la mayor captación de LDL

hacia las paredes de los vasos, o una mayor retención de LDL que ya ha entrado en las paredes de los vasos. En la actualidad, la sobreexpresión de la expresión del receptor de LDL hepático mediante la inhibición de la síntesis de colesterol es el medio más eficaz para disminuir el nivel de colesterol plasmático (Kong, Liu *et al.*, 2006).

5 Las lipoproteínas son moléculas que tienen una forma globular y son una combinación de lípidos y proteínas. Las lipoproteínas están implicadas en el transporte y el metabolismo de los lípidos en el cuerpo. Pueden dividirse en lipoproteínas aterogénicas y vasoprotectoras. Las lipoproteínas aterogénicas en general son todas lipoproteínas que contienen apoB, tales como VLDL, IDL o LDL, mientras que las lipoproteínas vasoprotectoras contienen apoA-I, tales como HDL. Las diversas lipoproteínas consisten en un núcleo hidrófobo de triglicéridos y ésteres de colesterol rodeado por una capa de colesterol libre hidrófilo; fosfolípidos, y apolipoproteínas. Las lipoproteínas se clasifican
10 según sus diversos tamaños y densidades flotantes. La densidad de una partícula de lipoproteína se determina mediante las cantidades relativas de lípidos y proteínas contenidas en la partícula.

La siguiente tabla resume las propiedades de las principales lipoproteínas:

Clase de lipoproteína	Densidad (g/ml)	Tamaño (nm)	Lípidos principales	Apolipoproteínas principales
Quilomicrones	0,93	100-500	TG de la dieta	B48, C-II, E
VLDL	0,93-1,006	30-80	TG endógenos	B100, C-II, E
IDL	1,006-1,019	25-50	CE y TG	B100, E
LDL	1,019-1,063	18-28	CE	B100
HDL	1,063-1,210	5-15	CE	A, C-II, E

TG: triglicéridos, CE: ésteres de colesterol

La nomenclatura utilizada para las lipoproteínas está en función sólo de la densidad de cada partícula.

15 Las diversas lipoproteínas se derivan de las otras mediante una transformación compleja que se produce principalmente en el hígado. Un punto de partida conveniente para la evolución de las lipoproteínas comienza con la clase de densidad más baja, los quilomicrones. Estas partículas son sintetizadas en las células de la mucosa intestinal directamente de las grasas de la dieta, concretamente triglicéridos, colesterol y fosfolípidos, y la apolipoproteína (apo) B48, que se sintetiza en estas células. Su densidad es baja porque su tamaño es grande (\geq
20 100 nm) y contienen grandes cantidades de lípidos (en especial triglicéridos de flotación). Su gran tamaño evita la penetración de la membrana capilar. En lugar de esto, los quilomicrones son segregados por la mucosa intestinal hacia el sistema linfático y después entran en la circulación a través del conducto torácico. Los quilomicrones adquieren apoE y apoC-II en la sangre. Después, su tamaño se reduce progresivamente por la acción de una lipoproteína lipasa del endotelio capilar, que cataliza la eliminación de ácidos grasos libres del agrupamiento de triglicéridos del quilomacrón. La partícula remanente de quilomacrón reducida sale de esta vía mediante su captación
25 hacia el interior de los hepatocitos a través de un proceso mediado por receptores, en el que la apoE del quilomacrón actúa como ligando para el receptor de LDL hepático. En el hepatocito, el quilomacrón remanente libera sus contenidos (es decir, los triglicéridos, los ésteres de colesterol, los fosfolípidos y las apolipoproteínas remanentes). El hepatocito reensambla estos productos derivados del quilomacrón remanente junto con triglicéridos y ésteres de colesterol endógenos para formar lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) y las segrega hacia la circulación para la siguiente fase de transporte de los lípidos hacia la periferia. Nótese que, al igual que los quilomicrones, las VLDL también son ricas en triglicéridos y contienen apoC-II y apoE. Sin embargo, a diferencia de los quilomicrones, contienen menos triglicéridos, son más pequeñas, y ahora portan apoB100 en lugar de apoB48.

35 La aparición de apoB100 en este momento es importante, porque es un ligando fisiológico para el receptor de LDL. En la siguiente media hora, la lipoproteína lipasa reduce aún más el contenido en triglicéridos de la VLDL, produciendo unas partículas progresivamente más pequeñas, más densas y más enriquecidas en colesterol a medida que se avanza en esta cascada bien conocida para producir una lipoproteína de densidad intermedia (IDL). La hidrólisis de los triglicéridos de la IDL para producir ácidos grasos libres está mediada por otra lipasa, la lipasa hepática, y la LDL pronto aparece como la partícula terminal en esta vía. La LDL es la lipoproteína del plasma más
40 rica en colesterol, y un aumento en el colesterol LDL (LDLc) plasmático es un importante factor de riesgo para la aterosclerosis y la enfermedad cardíaca coronaria (CHD). Así, un transporte excesivo de colesterol hacia la periferia por la LDL derivada del hígado conduce a la acumulación de placas ateroscleróticas. Por tanto, el LDL-colesterol se ha descrito, de modo excesivamente simplificado, como "colesterol malo", y el HDL-colesterol como "colesterol bueno". La LDL, cuya semivida en la circulación es del orden de varios días, contiene sólo apoB100 y fundamentalmente sólo una copia por partícula. Nótese que las partículas precursoras corriente arriba (IDL y VLDL) también contienen apoB100. Esto es importante porque los niveles de apoB se correlacionan con la mortalidad por infarto de miocardio en un grado mayor que los niveles de LDL, lo cual sugiere que las lipoproteínas postprandiales
45 también son aterogénicas (Tulenko y Sumner, 2002).

Un tercer tipo de lipoproteína, HDL, está implicada principalmente en la devolución de los lípidos, en gran medida del colesterol, al hígado en un proceso denominado transporte inverso de colesterol.

Los acontecimientos más tempranos en la aterogénesis son la activación de la células endoteliales vasculares, la adhesión, y la migración de los monocitos y los linfocitos T hacia el espacio subendotelial. La LDL en la circulación se convierte en aterogénica sólo después de sufrir una oxidación por las células vasculares, que la transforman en LDL oxidada muy biorreactiva (ox-LDL). La LDL oxidada está implicada en la formación de células espumosas, y activa acontecimientos proaterogénicos tales como la sobreexpresión de moléculas de adhesión, quimioatrayentes, factores del crecimiento, citoquinas proinflamatorias y proapoptóticas. Además, este efecto tóxico de la LDL oxidada probablemente desempeña un papel en la erosión/ruptura de las placas y la posterior aterotrombosis. Varios efectos biológicos de la ox-LDL son mediados a través de los cambios en la actividad de los factores de transcripción y posteriormente en la expresión génica. La ox-LDL activa el factor de transcripción sensible a redox NF-kappaB, que a su vez sobreexpone la expresión de otros genes proinflamatorios, tales como genes de moléculas de adhesión, factor tisular, y el receptor captador LOX-1 (Robbesyn, Salvayre *et al.*, 2004).

La mayoría de las "células espumosas" cargadas de lípidos presentes en las placas proaterogénicas no son el resultado de la captación de LDL nativa, sino que son debidos a la captación de lipoproteínas oxidadas. La modificación oxidativa de la LDL se produce en el espacio subendotelial. La captación de ox-LDL por receptores captadores convierte a los macrófagos derivados de monocitos en células espumosas. Hasta la fecha se han identificado al menos 10 receptores captadores pero aún no se sabe cuáles de ellos contribuyen a este fenómeno particular *in vivo*, pero es evidente que SRA y CD36 son cuantitativamente importantes basándose en experimentos de inactivación de genes (Kita, Kume *et al.*, 2001).

La concentración de ox-LDL en el plasma puede ser menor que 0,5% de la LDL total en pacientes con CHD y a la cual están expuestas las células endoteliales. Esta concentración plasmática puede no ser suficiente para las actividades proaterogénicas y proinflamatorias de la ox-LDL. Varios estudios han indicado que las lipoproteínas remanentes (RLP) ya están oxidadas en el plasma. Se ha identificado una gran cantidad del lípido lisofosfatidil-colina proaterogénico y proinflamatorio en los remanentes de los quilomicrones, un constituyente de RLP. En otras palabras, las principales lipoproteínas oxidadas en el plasma pueden ser las ox-RLP. El método de aislamiento de RLP del plasma permite verificar la susceptibilidad oxidativa de las lipoproteínas remanentes y comparar las propiedades proaterogénicas y proinflamatorias de las RLP con las de la ox-LDL. De forma similar a la ox-LDL, la RLP en la circulación activa células componentes vasculares e induce varios genes proaterogénicos (ICAM-1, VCAM-1, HB-EGF, PDGF-A-B, COX-2, y eNOS), metaloproteinasas de matriz (MMP), CD-40, CD-40L, y el factor tisular (TF). Muchos estudios clínicos sugieren que la concentración de RLP-C plasmática está asociada, de modo más convincente, con el aumento en el riesgo de una aterosclerosis prematura, comparado con la ox-LDL plasmática. Además, a juzgar por la concentración plasmática de estas lipoproteínas, es más probable que la disfunción endotelial sea provocada por la RLP en la circulación, en lugar de la ox-LDL en la circulación. Tomado conjuntamente, es probable que la RLP plasmática reductora también sea una diana para la terapia hiperlipidémica, en especial en pacientes con síndrome metabólico que está muy asociado con el nivel de RLP-C plasmático, pero no con los niveles de LDL-C (Nakajima, Nakano *et al.*, 2006).

La apolipoproteína B es una proteína anfipática grande que existe en dos formas: apoB100 y apoB48. En los seres humanos, la apoB100 se expresa en el hígado y está presente en VLDL, IDL y LDL. La apoB48 se expresa en el intestino y está presente en quilomicrones y sus remanentes. La apoB48 y la apoB100 son codificadas por el mismo gen. El ARNm para la apoB48 se genera a partir del ARNm de la apoB100 mediante el denominado proceso de edición, durante el cual una desaminación de una citidina a una uridina convierte un codón de glutamina en un codón de fin.

La apoB100 tiene una estructura pentapartita que consiste en una estructura N-terminal globular, dos dominios de láminas- β anfipáticos y dos dominios de α -hélice anfipáticos. La región N-terminal de 1000 aminoácidos es de vital importancia para la formación de VLDL, porque interacciona con la proteína de transferencia de triglicéridos microsómica (MTP). Durante la formación de lipoproteínas, la MTP cataliza la transferencia de lípidos a apoB.

Los dominios de lámina- β anfipáticos consisten en láminas- β antiparalelas con una anchura de aproximadamente 30 Å, formando estructuras de unión a lípidos muy fuertes. Estas regiones son exclusivas comparadas con otras apolipoproteínas, evitando el equilibrio con diferentes lipoproteínas, pero permanecen unidas a la partícula sobre la cual se han segregado hacia el plasma. Entre los dos dominios de lámina- β anfipáticos existe un dominio de hélice anfipática del tipo observado en las otras apolipoproteínas. Este dominio también está presente cerca del C-terminal. La organización global sobre la LDL se ha aclarado pero no se ha resuelto completamente. La proteína tiene una estructura alargada que incluye a la partícula de LDL completa. El C-terminal se pliega sobre la estructura precedente, atravesándola en el aminoácido 3500. Aquí, una arginina (resto 3500) se une a un triptófano (resto 4396), evitando que el C-terminal obstaculice el sitio de unión para el receptor de LDL entre el aminoácido 3359 y 3369. En efecto, varias mutaciones conocidas que implican a estos aminoácidos (siendo la más conocida la de la Arg3500) rompen esta interacción y dan como resultado una menor unión al receptor de LDL. La porción C-terminal de la proteína parece interactuar con su N-terminal (Segrest, Jones *et al.*, 2001; Olofsson y Boren, 2005).

Identificada en un principio como componente de las lipoproteínas en el plasma, la apoE contiene 299 restos

aminoácidos y tiene una masa molecular relativa de 34.000 Da. De forma similar a otras apolipoproteínas solubles, la apoE contiene dominios de unión a lípidos en α -hélice anfipáticos que le permiten cambiar, de modo reversible, de un estado unido a lipoproteínas a un estado libre de lípidos. En el estado libre de lípidos, la apoE contiene dos dominios, cada uno al final de la molécula. Los dos dominios se pliegan de modo independiente y cada uno es responsable de diferentes funciones clave. La región de unión al receptor de LDL está en los restos 136-150. Sin embargo, la actividad de unión al receptor completa también requiere una arginina en la posición 172, que está localizada en la "región bisagra" que conecta los dos dominios. La apoE libre de lípidos no se une con alta afinidad al receptor de LDL. Los principales elementos de unión a lipoproteínas de la apoE se encuentran en los restos 244-272 del dominio C-terminal.

La apoE es polimórfica y sus diversas isoformas muestran propiedades funcionales y estructurales diferenciadas. Las tres isoformas alélicas habituales, apoE2, apoE3 y apoE4, se diferencian en las posiciones 112 y 158. La apoE3, la isoforma más habitual, contiene cisteína y arginina, respectivamente, mientras que la apoE2 tiene dos cisteínas y la apoE4 tiene dos argininas en estas posiciones. La apoE3 y la apoE4 se unen a los receptores de LDL con una alta afinidad similar, mientras que la unión de apoE2 es de 50 a 100 veces más débil. Como resultado, la apoE2 homocigótica está asociada con la hiperlipoproteinemia de tipo III, un trastorno de lípidos caracterizado por unos mayores niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos y enfermedad cardiovascular prematura.

El efecto patológico más pronunciado atribuible al polimorfismo de la apoE en seres humanos es la asociación de apoE4 con enfermedades neurodegenerativas, que incluyen la enfermedad de Alzheimer. Se ha sugerido que dos propiedades clave de la apoE4, la interacción con el dominio y una reducida estabilidad con relación a apoE2 y apoE3, subyacen en la asociación de la apoE4 con la enfermedad. El concepto de "interacción con el dominio" se introdujo para explicar por qué la apoE3 y apoE4 se diferencian en sus preferencias de unión a lipoproteínas. La apoE4 se une preferentemente a lipoproteínas de densidad menor grandes, concretamente VLDL y LDL, mientras que la apoE3 y la apoE2 prefieren lipoproteínas de alta densidad ricas en colesterol más pequeñas, tales como HDL. La preferencia de unión de la apoE4 está dirigida por la presencia de arginina (cargada positivamente) en la posición 112. La comparación de las estructuras de rayos X de los dominios N-terminales de la apoE3 y la apoE4 demuestra que el resto en la posición 112 afecta a la conformación de la cadena lateral de Arg61. En la apoE4, la Arg112 permite que la Arg61 en la apoE4 interaccione con un resto ácido en su C-terminal.

La distancia entre los dominios N- y C-terminales de la apoE libre de lípidos difiere debido a la interacción interdominios. La interacción entre los dominios se ha implicado en la producción de fragmentos neurotóxicos cuando las neuronas están estresadas y son inducidas para que expresen la apoE4. Además de matar neuronas, estos fragmentos generan depósitos intracelulares que son parecidos a las madejas neurofibrilares que, junto con las placas de amiloides, son las características patológicas de la enfermedad de Alzheimer.

Las conformaciones parcialmente plegadas o de tipo fundido globular proporcionan flexibilidad y adaptabilidad a las proteínas para los importantes cambios conformacionales que acompañan a la unión del ligando. En particular, la variación en la estabilidad de los dominios N-terminales de las tres isoformas de la apoE puede contribuir a sus diferencias en las preferencias de unión a lipoproteínas y otras funciones biológicas *in vivo*. La menor estabilidad de la apoE4 con relación a la apoE3 también puede tener un importante papel patológico en el cerebro.

Se ha detectado heterogeneidad en la estructura cerca de la región de unión al receptor de LDL de la apoE unida a lipoproteínas con anticuerpos monoclonales contra epitopos específicos. Tras unirse a fosfolípidos, la apoE sufre un considerable cambio conformacional. Estudios recientes sugieren que la apoE unida a fosfolípidos se pliega en una estructura de tipo de horquilla en α -hélice. Una conformación de horquilla en α -hélice coloca a todos los elementos conocidos del motivo de unión al receptor de LDL, incluyendo Arg172, en un vértice estructural, lo cual explica potencialmente por qué sólo la apoE unida a lípidos se une al receptor de LDL con alta afinidad. Sin embargo, la presencia de una bicapa de fosfolípidos en las partículas de lipoproteínas que contiene apoE no se ha verificado de modo experimental (Hatters, Peters-Libeu *et al.*, 2006).

El LDLR se descubrió por primera vez en 1974. Desde entonces, su estructura, función, mutantes, y modulaciones fisiológicas, así como farmacológicas, se han estudiado a fondo. El LDLR sobre la superficie celular se une e internaliza las lipoproteínas que contiene apoB y apoE desde la circulación. La afinidad del LDLR por las lipoproteínas apoE3 y apoE4 ($K_D = 0,12$ nM) es 25-50 veces mayor que por las lipoproteínas con apoB. Aún así, los remanentes de quilomicrones que contienen apoE tienen otros modos de entrada en los hepatocitos. Después de la endocitosis, el LDLR se desacopla de su ligando y vuelve a la superficie celular para su reciclaje, mientras que la LDL se somete a un posterior metabolismo (Kong, Liu *et al.*, 2006).

El LDLR humano es una glicoproteína que abarca la membrana con una estructura altamente conservada en seres humanos y otras especies animales. Su forma madura contiene 836 restos aminoácidos con una masa molecular de 160 kDa, y tiene cinco dominios funcionales: un dominio de unión al ligando, un dominio de homología con el precursor del factor del crecimiento epidérmico (EGF), un dominio de polisacárido O-enlazado, un dominio que abarca la membrana, y un dominio citoplásmico corto. El análisis del contenido en oligosacáridos de LDLR revela un oligosacárido unido a Asn y 6-9 unidades O-enlazadas (Cummins, Kornfeld *et al.*, 1983). La posición del único oligosacárido unido a Asn es el resto aminoácido 657 del precursor de LDLR humano (Zhang, Li *et al.*, 2003).

El dominio de unión al ligando del LDLR consiste en siete repeticiones imperfectas ricas en cisteína (R1-R7) de aproximadamente 40 aminoácidos, denominadas repeticiones de clase A de LDLR (LDL-A, también denominadas repeticiones del tipo del complemento). Las estructuras de resonancia magnética nuclear, así como la estructura cristalina, revelan una conformación con dos bucles estabilizada por tres enlaces disulfuro. De manera característica, la formación de enlaces disulfuro se produce entre los restos cisteína I y III, II y V, y IV y VI (los números romanos indican la posición relativa de los restos cisteína en la repetición). Además, una secuencia conservada de aminoácidos ácidos (CDXXXDCXDXSDE; los restos ácidos se indican en negrita, y X representa cualquier aminoácido) está presente en la parte C-terminal de cada repetición LDL-A. El análisis cristalográfico demuestra que muchos restos ácidos están implicados en la formación de un complejo de coordinación con un ión calcio, lo cual explica los requerimientos de calcio para un correcto plegamiento y la formación de enlaces disulfuro en las repeticiones LDL-A y para la unión de lipoproteínas al LDLR. Los requerimientos estructurales para la unión de LDL y VLDL difieren: la LDL se une a su receptor a través de apoB100, VLDL a través de apoE. Mientras que la unión de LDL depende de la presencia de R2-R7, parece que sólo R5 es fundamental para la interacción con VLDL. La importancia de R5 es subrayada por el alto número de mutaciones FH que se han localizado en esta repetición. Sólo un número pequeño de mutaciones FH se encuentran en R1, que no es importante para la unión de cualquiera de los ligandos al LDLR (Gent y Braakman, 2004).

El receptor (VLDLR) de lipoproteínas de densidad muy baja (VLDL) es muy similar al LDLR. La diferencia principal es la presencia de una repetición del tipo del complemento extra en el dominio de unión al ligando presente en el N-terminal. Por contraste con LDLR, la mayor parte de VLDLR se expresa en tejidos extrahepáticos, por ejemplo, corazón, músculo, y tejido adiposo. El VLDLR actúa en la captación de lipoproteínas que contienen apoE ricas en triglicéridos (Hussain, Strickland *et al.*, 1999).

El receptor 2 de apoE humano, o LR7/8B, contiene siete repeticiones de unión al ligando, agrupadas como 5C2 separadas por un conector, similares a las que se encuentran en VLDLR (5C3) y diferentes de las observadas en LDLR (4C3). El receptor 2 de apoE es más parecido a VLDLR que a LDLR y, por tanto, se espera que tenga una capacidad de unión al ligando más amplia, similar a la observada para VLDLR, en lugar de la especificidad restringida observada para LDLR (Hussain, Strickland *et al.*, 1999).

La megalina (también denominada gp330 o LRP-2) es un único polipéptido de 4660 aminoácidos que contiene 36 dominios de unión al ligando ricos en cisteína, 16 dominios de homología con el precursor del EGF, y 40 repeticiones YWTD en el dominio extracelular. Existen cuatro agrupamientos de dominios de unión al ligando que consisten en 7, 8, 10 y 11 repeticiones del tipo del complemento en la molécula que reconocen varios grupos de ligandos (Hussain, Strickland *et al.*, 1999). Otros miembros de la familia LDLR incluyen la proteína relacionada con LDLR, LR11 (también denominada SORLA-1), LRP3 y LRP6. Su especificidad de unión al ligando exacta sólo se conoce parcialmente (Hussain, Strickland *et al.*, 1999).

Los miembros de la familia de LDLR reconocen varios ligandos distintos desde el punto de vista estructural. El LDLR y el receptor 2 de apoE se unen a lipoproteínas y a lipoproteína lipasa. El LDLR puede distinguir entre las tres isoformas de apoE con unas afinidades de unión del orden de apoE4 > apoE3 >>> apoE2. La constante de disociación (KD) de las lipoproteínas con apoE4 y apoE3 es de 0,12 nM, mientras que apoE4 tiene una afinidad muy baja por LDLR. Sin embargo, otros receptores de la familia no pueden discriminar y parece que todos se unen igual a todas las isoformas de apoE. No obstante, los individuos homocigóticos para apoE2 (aproximadamente 1% de la población (Mahley, 1988)) muestran una cantidad aproximadamente 2 veces mayor de triglicéridos de VLDL debido a la captación ineficaz de VLDL a través del receptor de LDL (Cardona, Tinahones *et al.*, 2003). Otros miembros de la familia de LDLR son menos específicos y se unen a lipoproteínas así como a diversas proteasas e inhibidores de proteasas. Además de solapar especificidades de ligandos, cada receptor parece tener un ligando exclusivo. Se ha demostrado que la apoB100 se une al LDLR y a megalina. Un anticuerpo monoclonal que inhibe la unión a megalina de RAP, apoE-VLDL, lipoproteína ligasa, aprotinina, y lactoferrina reconoce las repeticiones del tipo del complemento 4 y 5 dentro del dominio 2 (aminoácidos 1111-1210), lo cual indica que este es un sitio de unión habitual para estos cuatro ligandos. Una disposición de siete repeticiones de complemento y regiones precursoras de EGF similar al LDLR también está presente en la megalina. Otros receptores contienen ocho repeticiones del tipo del complemento en sus dominios de unión al ligando. La presencia de ocho repeticiones puede evitar la unión de una LDL más grande a estos receptores. La proteína asociada al receptor (RAP), una chaperona presente en el lumen del retículo endoplasmático, se une a todos los miembros de la familia de LDLR. Ayuda a un plegamiento correcto y a evitar la unión prematura de los ligandos al receptor. Una propiedad notable de RAP es que actúa como antagonista universal para la unión de todos los ligandos a diferentes receptores (Hussain, Strickland *et al.*, 1999).

El hígado no sólo es la única fuente de LDL en circulación (a través de VLDL) sino que también es el principal sitio de catabolismo de LDL. La captación de LDL por el hígado es mediada en gran medida por mecanismos dependientes de receptores que implican al receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), y por lo menos del 80% al 90% de toda la captación del cuerpo de LDL dependiente de receptores se produce en el hígado (Spady, 1992). Además las partículas de apoE que contienen HDL grandes puede transportar colesterol al hígado directamente porque contienen apoE, que muestra una alta afinidad por el LDLR (Hatters, Peters-Libeu *et al.*, 2006). En la dieta occidental, los seres humanos sintetizan 1 g de colesterol/día e ingieren 0,4 g más (Grundy, 1983). En estado estable, esta cantidad de colesterol también debe eliminarse. Las diversas lipoproteínas, receptores y

enzimas implicadas en el tráfico y el metabolismo del colesterol se sintonizan para enfrentarse a este nivel de colesterol "en exceso". Cualquier interferencia en el nivel o la actividad de estas lipoproteínas, receptores o enzimas conduce a un cambio en los niveles de colesterol sérico.

5 El nivel de expresión del LDLR es regulado indirectamente al nivel transcripcional por el colesterol citoplásmico. El promotor del LDLR consiste en 200 pares de bases cadena arriba del codón de inicio de la traducción. El promotor contiene un elemento regulador de estero 1 (SRE-1), flanqueado por dos secuencias de unión Sp1. La expresión basal del LDLR está mediada por los dos elementos Sp1. La expresión del LDLR puede potenciarse de modo sinérgico tras la unión de proteínas nucleares de unión al elemento regulador del estero (nSREBP) a SRE-1 del promotor del LDLR. Las nSREBP pertenecen a la gran familia de factores de la transcripción básicos de hélice-bucle-hélice-cremallera de leucina (bHLH-Zip). Se han identificado tres miembros de la familia de nSREBP, nSREBP-1a, -1c y -2. Son sintetizados en el ER como precursores inactivos denominados SREBP. Su dominio NH₂-terminal sobresale hacia al citosol. Contiene el bHLH-Zip y un dominio ácido que tiene que unirse a un coactivador de la transcripción para actuar. La porción central de SREBP consiste en dos dominios que abarcan la membrana que anclan SREBP al ER y a la envuelta nuclear. El segmento COOH-terminal también se extiende hacia el citosol y actúa como dominio regulador para la transformación de SREBP en nSREBP activo.

20 Tres proteínas de la membrana del ER participan en la regulación del procesamiento de SREBP. Cuando el colesterol celular es abundante se une a una proteína acompañante transmembrana denominada proteína de activación de la ruptura de SREBP (SCAP) que, junto con una de otras dos proteínas denominadas gen inducido por insulina-1 y -2 (Insig-1 e Insig-2), forma un complejo ternario de SREBP/SCAP/Insig. Este complejo está atrapado en la membrana del ER, con lo cual se evita el procesamiento de SREBP.

25 La disminución de la cantidad de colesterol citoplásmico desestabiliza el complejo ternario, que se disocia para formar heterodímeros de SCAP-SREBP. Estos heterodímeros son transportados hasta el aparato de Golgi, en donde las SREBP se rompen de modo proteolítico para generar nSREBP activas. Estas nSREBP, y en particular nSREBP-2, se translocan al núcleo y se unen al promotor de LDLR y lo activan, así como a aproximadamente 30 genes más implicados en el metabolismo de lípidos. Las nSREBP no son estables. Están poliubiquitinadas y son degradadas con rapidez por el proteasoma con una semivida calculada de 3 h.

30 Así, cuando el colesterol o sus derivados son abundantes en las células, la vía de SREBP se reprime y se mantiene la transcripción del gen LDLR a un nivel muy bajo. Por contraste, una deficiencia en colesterol estimula la expresión de LDLR (Kong, Liu *et al.*, 2006). Estos mecanismos aparecen en todos los tipos celulares, incluyendo los hepatocitos, y conducen a una reducción no deseada en la expresión de LDLR hepática cuando el colesterol sérico (LDL-c) es abundante.

35 El hígado es capaz de realizar el catabolismo del colesterol y la conversión del colesterol en sales biliares que se segregan hacia el intestino, aunque la mayoría de las sales biliares son reabsorbidas con eficacia. El hígado expresa la colesterol-7 α -hidroxilasa, que cataliza la primera etapa limitadora de la velocidad de una compleja cascada enzimática en la que el núcleo esteroide del colesterol se hidroxila en dos o tres posiciones y la cadena lateral del colesterol se acorta y se carboxila. Los productos finales son moléculas denominadas sales biliares. Una de las dos sales biliares producidas en el hígado de seres humanos se denomina colato. A diferencia del colesterol, que es muy insoluble en agua, las sales biliares son moléculas de tipo detergente hidrosolubles.

40 Los hepatocitos son células hepáticas polarizadas que crean una frontera con sangre en una parte y bilis en la otra; la membrana sinusoidal está en la parte de la sangre y la membrana canalicular en la parte de la bilis. Existen tres transportadores principales en la membrana canalicular. ABCB11 es responsable del transporte dependiente de ATP de las sales biliares a la bilis. Una vez se encuentran en la bilis, las sales biliares se dan la vuelta e interaccionan con la membrana canalicular y los transportadores ABCB4 y ABCG5/G8. Esta interacción compleja conduce a la formación de una micela biliar. Las velocidades de secreción diaria para los lípidos biliares varían de 2 g/día de colesterol, 11 g/día de fosfolípidos, y 24 g/día de sales biliares. Pero las sales biliares son sintetizadas a una velocidad de sólo 0,4 g/día en el individuo medio, porque una vez que han completado sus funciones en el árbol biliar y el intestino, casi todas son reabsorbidas en el íleon distal y vuelven al hígado a través de la circulación venosa portal. En las heces se pierde menos del 5% de las sales biliares cada día, que viene a ser aproximadamente 0,4 g/día. Teniendo en cuenta que el colesterol es el sustrato para la síntesis de sales biliares en el hígado, una pérdida de 0,4 g/día de sales biliares se traduce en una pérdida de la misma cantidad de colesterol (Carey, M.C., Duane, W.C., Enterohepatic circulation, en: Arias, I.M., Boyer, J.L., Faustoet, N., *et al.*, eds., The Liver: Biology and Pathobiology, Nueva York, Raven Press, 1994, 719-767). El colesterol se segrega hacia la bilis a una velocidad de hasta 2 g/día. La dieta estadounidense media consiste en aproximadamente 0,4 g/día de colesterol. Por tanto, la cantidad de colesterol que se deriva de la bilis en el intestino es hasta 5 veces mayor que la cantidad que se ingiere a través de la dieta. El individuo medio absorbe 50% del colesterol que pasa a través del intestino a diario. Esto significa que 50% se pierde en las heces, que vienen a ser 1,2 g/día. En conjunto, normalmente se eliminan 1,6 g de colesterol con las heces, del cual 1,2 g se originan en el hígado.

60 Los secuestrantes de ácidos biliares, tales como Cholestipol™, son fármacos eficaces para disminuir el LDLc con una amplia experiencia clínica. Disminuyen el LDLc del 10% al 30% de una manera dependiente de la dosis, pero con frecuentes efectos secundarios que limitan su uso en muchos casos. El colesevelam es un nuevo secuestrante

de ácidos biliares más potente que está disponible en comprimidos de 625 mg; la dosis recomendada es adultos es de 3,8 g diarios (tres comprimidos dos veces diarias con las comidas) y se tolera mejor que los secuestrantes de ácidos biliares menos potentes colestiramina y Colestipol™. Debido a su buen perfil de seguridad, las nuevas resinas siguen siendo una alternativa a las estatinas en una monoterapia, en especial en niños o mujeres jóvenes.

- 5 La ezetimiba es un nuevo fármaco para disminuir los lípidos que inhibe la absorción intestinal del colesterol procedente de la dieta y de fuentes biliares impidiendo el transporte de colesterol a través de la pared intestinal. Utilizado como monoterapia, la ezetimiba disminuye el LDLc en una media del 17,3%. La adición de 10 mg de ezetimiba diarios a una terapia en curso de estatina aumenta la reducción en los niveles de LDLc (de -14% a -25%) comparado con un placebo. Este régimen en general se tolera bien a través de un amplio intervalo de dosis de diferentes estatinas y ofrece una nueva estrategia para la reducción de LDLc, evitando dosis altas de estatinas, o permitiendo unas reducciones mayores que 60% en LDLc cuando se emplea con una estatina potente para alcanzar unos objetivos de LDLc en pacientes de alto riesgo (Civeira, 2004).

- 15 La hipercolesterolemia familiar (FH) es un trastorno heredado codominante autosómico del metabolismo de lipoproteínas que se caracteriza por unas concentraciones plasmáticas muy altas de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLc), xantomas de tendones y un mayor riesgo de enfermedad cardíaca coronaria prematura (CHD). Normalmente la FH identificada clínicamente está provocada por mutaciones en el gen del receptor de LDL (LDLR). La FH heterocigótica es una de las enfermedades genéticas dominantes autosómicas más habituales en seres humanos, mientras que la FH homocigótica es rara pero más grave. La frecuencia de heterocigotos es de aproximadamente uno en 500 individuos en la mayoría de los países. Sin embargo, algunas poblaciones distribuidas por el mundo, tales como los canadienses franceses, los afrikaners de Sudáfrica, los libaneses y los fineses tienen una prevalencia mucho mayor debida a un efecto fundador. Se ha calculado que existen 10.000.000 personas con FH en el mundo. La FH es un problema de salud pública mundial debido a la alta incidencia de enfermedad cardiovascular prematura (<55 años en hombres y <65 en mujeres), principalmente CHD, y a la reducción en la esperanza de vida observada en muchas familias con FH. Aproximadamente 85% de los hombres y 50% de las mujeres sufrirán un acontecimiento coronario antes de los 65 años si no se tratan. Hasta 9% de la CHD prematura total en el este de Finlandia y Alemania está asociada con FH (Civeira, 2004).

- 30 Hasta la fecha se han indicado más de 800 mutaciones que provocan FH, y se han dividido en varias clases basándose en sus efectos fenotípicos sobre la proteína (Kong, Liu *et al.*, 2006). La penetración de la FH es de casi 100%, lo cual significa que la mitad de los descendientes de un progenitor afectado tendrán un nivel de colesterol plasmático gravemente alto desde su nacimiento, estando hombres y mujeres igualmente afectados. Unos niveles de LDL plasmática elevados son el resultado de un catabolismo de LDL más lento y una sobreproducción de lipoproteínas paradójica. El LDLc en sujetos con FH heterocigótica (heFH) no tratada generalmente está en el intervalo de 190-400 mg/dl (4,9-10,3 mmol/l). De modo similar, los hepáticos LDLR (-/-) de ratón segregan apoB100 con una tasa 3,5 veces mayor que los hepatocitos de tipo salvaje. Además, en células LDLR (-/-), menos del 20% de la apoB recién sintetizada se degrada, comparado con 55% en hepatocitos de tipo salvaje. Así, unos LDLR hepáticos funcionales son fundamentales para reducir la LDL en la circulación (Twisk, Gillian-Daniel *et al.*, 2000). Considerando que <100 mg/dl (2,6 mmol/l) es la concentración óptima de LDL, según se define en las directrices del Third Report of the National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel (NCEP-ATPIII), sería necesario lograr unas reducciones medias entre 50% y 75% en pacientes con heFH para alcanzar este objetivo. Siempre debe instituirse una modificación del estilo de vida, pero no es probable que produzca unos niveles de LDLc aceptables. Un LDLc<100 mg/dl (2,6 mmol/l) sigue siendo el nivel óptimo y el objetivo a conseguir para los sujetos con CVF sintomática (Civeira, 2004). Así, se requiere la combinación de varios medios para reducir el LDLc sérico, en especial en pacientes con FH.

Los tratamientos actuales para la heFH incluyen (<http://www.emedicine.com/med/TOPIC1072.HTM>):

- 45 - Una dieta que limite drásticamente las grasas saturadas, las grasas-trans, y el colesterol. Debe alcanzarse un peso deseable. Una pérdida de peso significativa mejoraría todos los parámetros de lípidos (LDLc, HDLc, triglicéridos).
- El ejercicio aeróbico y tonificador mejora los niveles de lípidos sanguíneos si se realiza durante más de 30 minutos, 4 o más días a la semana.
- 50 - Debido a que si se dobla la dosis de cualquier inhibidor de HMG-Coa reductasa se disminuye el LDLc sólo en 6-7%, es más eficaz una combinación de diferentes medicaciones para disminuir el colesterol. Esta combinación debe incluir una dosis alta de una de las tres estatinas más potentes y una o más medicaciones distintas para disminuir la LDL, tales como secuestrantes de ácidos biliares, ezetimiba, o niacina. Para disminuir el riesgo de miopatía debe considerarse un escalón menor de la dosis máxima de la estatina. Resulta beneficioso añadir un tercer o incluso un cuarto agente. Con 50% de receptores de LDL funcionales, los pacientes con FH heterocigótica tienen una respuesta excelente a los fármacos para disminuir el colesterol habituales, pero el tratamiento sigue siendo difícil. La terapia de sustitución de estrógeno en mujeres postmenopáusicas también ayuda a disminuir los niveles de LDLc, pero esta terapia no se recomienda debido a sus efectos adversos en mujeres más mayores, aunque a veces los beneficios sean mayores que los riesgos.
- 55 - Los pacientes con CHD documentada cuyos niveles de LDLc no pueden disminuir por debajo de 200 mg/dl

mediante una terapia convencional son candidatos para la aféresis de LDL. Los pacientes sin CHD pero con un nivel de LDLc mayor que 300 mg/dl también son apropiados para esta intervención. Sin embargo, la cobertura del seguro médico no es automática, y las decisiones se toman caso por caso debido al coste, que es de aproximadamente 3.000 dólares para cada tratamiento, cada 2 semanas, durante toda la vida del paciente.

5 Las lectinas de tipo C representan una gran familia de lectinas dependientes de Ca^{2+} que comparten una homología estructural primaria en sus dominios de reconocimiento de carbohidratos. Esta familia muy grande, que incluye muchos receptores endocíticos, muchos proteoglicanos, y todas las colectinas y las selectinas conocidas, aparece a lo largo de todo el reino animal. Sin embargo, la mayoría de los miembros de esta familia se diferencian con respecto a los tipos de estructuras de carbohidratos que reconocen con alta afinidad.

10 La primera lectina identificada en animales fue el receptor de asialoglicoproteínas hepático o el receptor de Gal/GalNAc hepático. Las glicoproteínas desialiladas son retiradas de la circulación con mucha más rapidez que las glicoproteínas de origen. Además, los penúltimos restos galactosa expuestos tras la desialilación son fundamentales para la depuración. Las asialoglicoproteínas retiradas de la circulación son secuestradas en el hígado y principalmente en los lisosomas. Un receptor dependiente de Ca^{2+} específico para las asialoglicoproteínas fue
15 identificado en fracciones de membranas plasmáticas de hepatocitos. La lectina hepática se une a glicoproteínas que contienen galactosa o GalNAc terminal no reductora.

Todas las lectinas dependientes de Ca^{2+} comparten un motivo estructural común. La homología de secuencia se advirtió en CRD, y las proteínas con este motivo se clasifican como miembros de la familia de lectinas de tipo C. El descubrimiento de CRD para las lectinas de tipo C abrió el camino para caracterizar otras proteínas relacionadas
20 que también muestran unión dependiente de Ca^{2+} a ligandos de carbohidratos. Hasta la fecha se han identificado más de 20 proteínas diferentes que contienen un CRD de lectinas de tipo C en seres humanos, y también se han encontrado homólogos correspondientes en muchos otros animales superiores. Esta gran cantidad de lectinas de tipo C en animales superiores se ha clasificado en subfamilias, basándose en su función o su localización exclusiva.

Las lectinas hepáticas representan una clase de lectinas de tipo C capaces de mediar en la endocitosis de ligandos unidos. La vía endocítica implica el reconocimiento por parte de la lectina de ligandos en la superficie celular, la internalización a través de fosas revestidas, y el transporte del complejo hacia compartimentos endosómicos en los que el pH bajo induce la disociación del ligando y la lectina. Las lectinas se reciclan hacia la superficie celular y se repite el proceso (Essentials of Glycobiology, Varki, A. *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

30 Una de las lectinas de tipo C muy conocida y estudiada a fondo en mamíferos es el receptor de asialoglicoproteínas (ASGP-R) que se encuentra exclusivamente en hepatocitos. Este receptor de alta capacidad se une a ligandos con galactosa o N-acetilgalactosamina (GalNAc) terminal y los dirige a los lisosomas antes de reciclarse hacia la superficie celular. Se cree que los ligandos naturales para el ASGP-R son glicoproteínas séricas que pierden su ácido siálico terminal durante la circulación, exponiendo agrupamientos de restos Gal subterminales sobre sus N-glicanos. Por tanto, se cree que el ASGP-R está principalmente implicado en el mantenimiento de la concentración sérica de glicoproteínas diversas desde el punto de vista estructural.
35

En fechas más recientes, se ha descubierto que el ASGP-R depura con rapidez la familia menos abundante de glicoproteínas cuyos N-glicanos terminan con GalNAc sialilada, mientras que la mayoría de las glicoproteínas cuyos N-glicanos terminan con Gal sialilada son retiradas o depuradas fundamentalmente tras la eliminación del ácido siálico terminal por el receptor de partícula de galactosa presente en las células de Kupffer hepáticas. En efecto, la afinidad del ASGP-R por los N-glicanos que terminan con GalNAc es aproximadamente 50 veces mayor que por los que terminan con Gal.
40

La técnica indica el modo de generar glicoproteínas recombinantes cuyo resto sacárido terminal sea GalNAc en lugar de Gal. Así, la transfección estable de células CHO lec8, que carecen de un transportador de UDP-Gal funcional, con β GalNAc transferasa (β GalNAcT) da como resultado la expresión de glicoproteínas cuyos N-glicanos son triantenarios, tetraantenarios y estructuras aún superiores que tienen en penúltimo lugar β GalNAc en lugar de β Gal (Kawar, Haslam *et al.*, 2005). Pueden utilizarse estas células CHO en lugar de las células CHO normales para la expresión de glicoproteínas recombinantes que portan un β GalNAc en penúltimo lugar.
45

El ASGP-R es muy abundante en hepatocitos, que pueden portar 150.000-500.000 sitios de unión/célula. El número de hepatocitos presentes en el hígado es de aproximadamente 2×10^8 por ratón, y la velocidad de internalización del ASGP-R es de 0,1 pmol/min por 10^6 células. Basándose en estos cálculos, el hígado de ratón es capaz de depurar aproximadamente 1,2 nmol/h de ligado a través de los ASGP-R, o el equivalente de 2,4 $\mu\text{g/h}$ de una glicoproteína con un peso molecular de 20.000 Da (Park, Mi *et al.*, 2005). La extrapolación al hígado humano sugiere una velocidad de depuración potencial casi ilimitada de más de 5 mg/h o 120 mg/día. En el caso de una proteína con un
50 peso molecular de 2×10^6 Da, estos valores aumentan hasta 5 g/h o 120 g/día.
55

Se han desarrollado varias estrategias para reducir la LDL sérica basándose en el ASGP-R hepático. Una estrategia se ha basado en la síntesis de un glicolípido que contiene restos GalNAc terminales. La idea es que el componente hidrófobo del glicolípido, un ácido graso de cadena larga, penetrará con rapidez y de modo irreversible en las

partículas de LDL, permitiendo su unión al ASGP-R hepático y su posterior internalización. Aunque este glicolípido no muestra señales de toxicidad aguda, tampoco muestra especificidad por la LDL y de hecho puede unirse a la HDL y a cualquier membrana citoplásmica. Además, su estructura global similar a un detergente aumenta el riesgo de toxicidad a largo plazo. No obstante, este estudio es un estudio demostrativo preliminar, puesto que se observó aproximadamente 30% de reducción en el colesterol sérico, lo cual sugiere que la vía del ASGP-R es factible (Rensen, van Leeuwen *et al.*, 2004; Rensen, Sliedregt *et al.*, 2006).

En un estudio anterior se empleó una estrategia más específica de LDL, empleando fragmentos Fab de anticuerpos dirigidos contra LDL humana. Se acopló lactosa a estos fragmentos Fab mediante una aminación reductora con cianoborohidruro de sodio, y se demostró la depuración de LDL humana radiomarcada en ratas (Bernini, Tanenbaum *et al.*, 1986). Esta estrategia está limitada por el uso de anticuerpos o sus fragmentos Fab, que en sí mismos pueden ser inmunogénicos, conduciendo a la formación de anticuerpos antiidiotípicos, en especial cuando se administran de modo regular en las cantidades bastante grandes requeridas para la unión al LDL sérica.

Una estrategia alternativa para transportar una sustancia seleccionada presente en fluidos extracelulares, tales como sangre o linfa, hacia el interior de las células se proporciona en el documento USP 6.858.578, expedido el 22 de febrero de 2005. Según un ejemplo del documento USP 6.858.578, se genera una quimera que comprende LDLR soluble y transferrina y se emplea para la captación de LDL hacia el interior de las células. Aunque esta estrategia es factible, no dirige a la LDL específicamente al hígado. El receptor de transferrina se expresa en la mayoría de los tipos celulares y en todos los órganos. Un exceso de colesterol que entrase en la mayoría de las células sería segregado de nuevo hacia la circulación. Así, aún es necesario dirigir el exceso de colesterol específicamente al hígado, en donde puede metabolizarse en ácidos biliares y segregarse hacia el tracto digestivo.

Los documentos USP 5.958.408 (Griffiths *et al.*, 28 de septiembre de 1999) y 5.965.131 (Griffiths *et al.*, 12 de octubre de 1999) describen el transporte de agentes de diagnóstico y terapéuticos hacia un sitio diana. Según estas invenciones, una "especie de transporte dirigido" es un agente de diagnóstico o terapéutico acoplado a una proteína. Dicha proteína, por ejemplo, un anticuerpo específico de tumor, dirige a dicho agente hacia el tejido diana. Se proporciona un "agente de depuración", que es un complemento de unión específica a la especie de transporte dirigido. Los ejemplos de dichos agentes de depuración son anticuerpos antiidiotípicos. En una realización de la invención, el agente de depuración se conjuga con galactosa, que se une al receptor de asialoglicoproteínas hepático, con lo que el agente de depuración y los complejos de agente de depuración-especie de transporte dirigido primaria son reconocidos con rapidez por los hepatocitos hepáticos. La idea es eliminar el exceso de agente terapéutico o el exceso de agente de diagnóstico que se ha administrado al paciente, obteniendo con ello una mejor especificidad de unión de estos agentes a sus tejidos diana.

La LDL oxidada es la principal lipoproteína proaterogénica. A diferencia de su LDL de origen, no se une al LDLR y por tanto no puede ser depurada por la captación hepática. Estudios exhaustivos que emplean oxLDL como ligando representativo describen al menos 11 receptores diferentes, que se clasifican colectivamente como "familia de receptores captadores". Se han estudiado independientemente los productos finales de la glicación avanzada (AGE) y sus sistemas de receptores hasta el descubrimiento reciente de que las proteínas-AGE también son reconocidas como ligandos activos por los mismos receptores captadores. Estos receptores pertenecen a diversas subfamilias, que incluyen los receptores captadores de clase A (SR-A), los receptores captadores de clase B, tales como CD36 y SR-BI, el receptor captador de tipo D (OLR1/LOX1) y FEEL-1/FEEL-2. La captación endocítica de oxLDL y proteínas-AGE por macrófagos o células derivadas de macrófagos está mediada principalmente por SR-A y CD36 (Horiuchi, Sakamoto *et al.*, 2003). SR-A es una glicoproteína transmembrana expresada sobre macrófagos. Su precursor consiste en 451 restos aminoácidos de los cuales los 50 N-terminales son citoplásmicos, seguidos de 26 restos que abarcan la membrana, y 375 restos de dominio extracelular. El dominio extracelular incluye 7 sitios de N-glicosilación potenciales.

OLR1/LOX-1 es un receptor de lectina de tipo C implicado en la depuración hepática de oxLDL y proteínas-AGE plasmáticas. Es una glicoproteína transmembrana de pase único con un peso molecular monomérico de 40 kDa, pero está presente como un dímero de 80 kDa a través de un enlace disulfuro en Cys140 (Xie, Matsunaga *et al.*, 2004). El precursor de OLR1/LOX-1 consiste en 273 restos aminoácidos, de los cuales los 216 restos C-terminales componen la región extracelular, que contiene el dominio de unión al ligando. Se expresa en el endotelio vascular y en órganos muy vascularizados, tales como pulmones, médula espinal y médula ósea (Sawamura, Kume *et al.*, 1997). Los restos extracelulares 73 y 139 son sitios de N-glicosilación potenciales (Shi, Niimi *et al.*, 2001). Media en el reconocimiento, la internalización y la degradación de oxLDL por células endoteliales vasculares y macrófagos.

Se ha identificado una forma soluble de OLR1/LOX-1 en medios de cultivo de células endoteliales aórticas. Se generó mediante el desprendimiento proteolítico del receptor asociado a membranas por una ruptura después de Arg86 o Lys89 (Murase, Kume *et al.*, 2000). Los estudios preliminares no han podido demostrar la unión de OLR1/LOX-1 soluble a oxLDL (Murase, Kume *et al.*, 2000). Sin embargo, esto puede ser debido a la pérdida de un N-glicano fundamental en el resto 73, puesto que se ha demostrado que la glicosilación es fundamental para la unión del ligando a OLR1/LOX-1 asociado a membranas (Kataoka, Kume *et al.*, 2000). Sin embargo, más recientemente, un receptor soluble que se corresponde con el dominio de unión al ligando de OLR1/LOX-1 ha inhibido la captación de oxLDL en células endoteliales (Smirnova, Sawamura *et al.*, 2004).

Se han propuesto los receptores solubles o las proteínas de unión como medio para neutralizar e inhibir la acción de diversas citoquinas. Sin embargo, debido a su tamaño grande, el complejo de citoquina-receptor soluble resultante tiene una semivida más larga en la circulación, comparado con sus constituyentes individuales. Además, la formación del complejo es reversible y así puede actuar como una fuente de citoquinas de acción prolongada. Así, es necesario proporcionar medios para una depuración rápida de los complejos formados entre receptores solubles y sus ligandos.

El documento US 2006/0040353 A1 se refiere a células hospedantes de eucariotas inferiores que producen glicoproteínas similares a las humanas que se caracterizan porque tienen un resto beta-galactosa terminal y fundamentalmente carecen de restos fucosa y ácido siálico, así como a métodos para catalizar la transferencia de un resto galactosa desde UDP galactosa a un sustrato aceptor en una célula hospedante de eucariota inferior, que puede utilizarse como glicoproteína terapéutica.

El documento US 2004/0136986 A1 describe preparaciones de glicofomas de glicoproteínas que comprenden glicofomas de Fc concretas, y métodos para producir, detectar, enriquecer y purificar las glicofomas.

El documento WO 2005/000227 A2 se refiere a métodos para tratar trastornos mediados por TNF-alfa, implicando dichos métodos en general administrar a un individuo que lo necesita cantidades eficaces de pirfenidona o de un análogo de pirfenidona, y un segundo agente terapéutico que reduce la síntesis de TNF-alfa o que reduce la unión de TNF-alfa al receptor de TNF.

El documento US 2004/0115186 A1 describe composiciones farmacéuticas para su uso para inhibir el crecimiento de células de cáncer en un sujeto mamífero. La composición incluye una enzima ureasa, y una entidad química asociada con la ureasa para potenciar el transporte de la enzima a las células de cáncer, en la que la composición se administra al sujeto.

El documento WO 92/01469 se refiere a composiciones que proporcionan una mayor depuración de sustancias bioactivas de la corriente sanguínea.

Weigel y Yik (Biochimica et Biophysica Acta, vol. 1572, 2002, 341-363) indican el papel de los glicanos como señales de endocitosis en los casos de receptores de asialoglicoproteínas y hialuronano/sulfato de condroitina.

Sumario de la invención

El alcance de la invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas.

En un aspecto, la invención se refiere a un receptor soluble modificado con glicanos de la superfamilia de receptores de TNF, que se ha modificado para que porte una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal. También se describe un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos que se une a una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada, tal como un receptor de LDL soluble o un homólogo relacionado; un receptor captador soluble; un OLR1/LOX-1 soluble, y un FLk-1 soluble, que se ha modificado para que porte una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.

Los ejemplos de receptor soluble modificado con glicanos son asialo-TNFR soluble (as-sTNFR), asialo, agalacto-TNFR soluble (as-ag-sTNFR), TNFR soluble lactosaminado (lac-sTNFR), TNFR soluble N-acetilgalactosaminado (sTNFR-Gn), LDLR soluble N-acetilgalactosaminado (sLDLR-Gn). También se describe OLR1/LOX-1 soluble N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn), y FLk-1 soluble lactosaminado (lac-sFLK-1).

También se describe el uso de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos de la invención para la fabricación de un medicamento para facilitar la depuración de una citoquina o un factor del crecimiento en la circulación capaz de unirse a dicho receptor soluble o proteína de unión.

Las lipoproteínas o las lipoproteínas oxidadas descritas son LDL, VLDL, LDL oxidada o una lipoproteína remanente.

Las citoquinas o los factores del crecimiento descritos son IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4/IL-13, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-29, activina, apor2L/TRAIL, APRIL, BAFF, TNFSF9, BMP-2, CD27L, BMP-3, BMP-7, CD30L, CD40L, CNTF, EGF, VEGF, FASL, FGF, CSF, FLT3, G-CSF, GDNF, GITRL, GM-CSF, GH, HGF, IGF I y II, IFN- α , IFN- γ , LIGHT, linfotóxina, M-CSF, MSP, NGF, NT-3, NT-4, OX-40L, PDGF, prolactina, SCF, TGF- α , TGF- β , TPO, TRANCE, TSLP y TWEAK.

También se describe el uso de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos de la invención, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada.

También se indica que la patogénesis o el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección es exacerbado por un exceso de un factor del crecimiento, o que el desarrollo de una enfermedad, un trastorno o una afección se mitiga reduciendo los niveles de un factor del crecimiento.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de un receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF.

- 5 Los ejemplos de enfermedad, trastorno o afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF incluyen, pero no se limitan a enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn y psoriasis.

En una realización de la invención, el sTNFR es as-sTNFR, as-ag-sTNFR, lac-sTNFR y/o sTNFR-Gn.

En otra realización de la invención, el sTNFR es sTNFRp55.

- 10 También se describe el uso de un receptor de LDL soluble (sLDL) modificado con glicanos, o sus homólogos relacionados, que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar la hipercolesterolemia.

También se indica que el medicamento es para tratar la hipercolesterolemia familiar.

También se indica que el receptor soluble es sLDLR-Gn.

- 15 También se describe el uso de un OLR1/LOX-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la aterosclerosis en un individuo.

También se indica que el individuo tiene un riesgo elevado de contraer la aterosclerosis.

También se indica que el receptor soluble es sOLR1/LOX-1-Gn.

- 20 También se describe el uso de un FLk-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer primario o la metástasis.

También se indica que el receptor soluble es FLk-1 soluble lactosaminado (lac-sFLK-1).

También se describe una composición farmacéutica que comprende un receptor soluble modificado con glicanos de la invención, y un vehículo farmacéuticamente aceptable para facilitar la depuración de una citoquina o un factor del crecimiento de la circulación.

- 25 La invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un receptor soluble modificado con glicanos seleccionado de asialo-TNFR soluble (as-sTNFR), asialo, agalacto-TNFR soluble (as-ag-sTNFR), TNFR soluble lactosaminado (lac-sTNFR), TNFR soluble N-acetilgalactosaminado (sTNFR-Gn). También se describe LDLR soluble N-acetilgalactosaminado (sLDLR-Gn), OLR1/LOX-1 soluble N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn), y FLk-1 soluble lactosaminado (lac-sFLK-1), para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación.
- 30

También se describe un método para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos de la invención.

- 35 También se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos de la invención.

- 40 También se describe un método para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.

- 45 También se describe un método para tratar o prevenir la hipercolesterolemia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor de LDL soluble (sLDLR) modificado con glicanos, o sus homólogos relacionados, que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.

También se describe un método para tratar o prevenir la aterosclerosis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un OLR1/LOX-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.

- 50 También se describe un método para tratar el cáncer primario o la metástasis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un FLk-1 soluble modificado con glicanos que porta

una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.

Breve descripción de las figuras

5 La figura 1 muestra una SDS-PAGE de sLDLR expresado en células CHO antes y después de un tratamiento con PNGasa (también denominada N-glicosidasa F, una amidasa que efectúa la ruptura entre la GlcNAc más interna y los restos asparagina de los oligosacáricos complejos, híbridos y con alto contenido en manosa de las glicoproteínas N-enlazadas). Las muestras se ensayaron en un gel con gradiente y se tiñeron con azul de Coomassie.

La figura 2 muestra los resultados de una ELISA de sLDLR de fracciones obtenidas mediante cromatografía de exclusión molecular de sLDLR en una columna Superose 6 en presencia (línea continua) o en ausencia (línea discontinua) de LDL.

10 Descripción detallada de la invención

Se describe un receptor soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, y su uso para facilitar la rápida depuración de un componente no deseado en la circulación capaz de unirse a dicho receptor soluble o proteína de unión.

15 La expresión “receptores solubles y proteínas de unión” se refiere a proteínas en circulación y artificiales que se unen con alta afinidad y especificidad a diversas citoquinas, factores del crecimiento, hormonas polipeptídicas y otras proteínas efectoras en la circulación. La expresión “proteínas de unión” según la invención excluye a anticuerpos y sus fragmentos. Un receptor soluble incluye el dominio extracelular de unión al ligando del correspondiente receptor de la superficie celular. Estos receptores solubles pueden generarse, por ejemplo, a través de un ARNm que codifica el receptor soluble o mediante desprendimiento enzimático del dominio extracelular de unión al ligando del receptor de la superficie celular. Se describe una serie de receptores relacionados denominados “receptores señuelo” que actúan para secuestrar ligandos segregados. Los ejemplos de dichos receptores señuelo son DcR1, DcR2, DcR3 y osteoprotegerina (OPG). Los ejemplos de proteínas de unión incluyen, pero no se limitan a proteínas de unión a citoquinas que no se corresponden con un receptor de la superficie celular, tales como la proteína de unión a IL-18 (IL-18BP).

25 El sistema circulatorio (conocido desde el punto de vista científico como sistema cardiovascular) es un sistema de órganos que mueve sustancias hacia las células y desde las células; también puede ayudar a estabilizar la temperatura y el pH corporal (parte de la homeostasis) (Wikipedia). Los componentes principales del sistema circulatorio son el corazón, la sangre, y los vasos sanguíneos.

30 El descubrimiento de que las formas solubles de los receptores y las proteínas de unión a citoquinas están implicados en la regulación endógena de la actividad de las citoquinas ha suscitado un interés considerable en su aplicación potencial como agentes inmunoterapéuticos. Como tales, los receptores de citoquinas solubles tienen muchas ventajas, incluyendo su especificidad, baja inmunogenicidad y alta afinidad. La capacidad de muchos receptores de citoquinas solubles para inhibir la unión y la actividad biológica de sus ligandos los hace ser unos antagonistas de citoquinas muy específicos. En general, la mayoría de los agentes basados en receptores de citoquinas solubles han resultado seguros, han sido bien tolerados y han mostrado sólo pequeños efectos secundarios en la mayoría de los pacientes. Los receptores de citoquinas solubles constituyen una nueva generación de agentes terapéuticos con un tremendo potencial para aplicaciones en una amplia diversidad de enfermedades humanas (Idriss y Naismith, 2000).

40 Los receptores solubles o las proteínas de unión a citoquinas proinflamatorias han sido propuestos para neutralizar e inhibir la acción de dichas citoquinas proinflamatorias. Generalmente, estos receptores solubles o proteínas de unión se administran en exceso para neutralizar la acción de su respectiva citoquina proinflamatoria. Sin embargo, debido a su gran tamaño, el complejo de receptor/proteína de unión-citoquina resultante puede tener una semivida más larga en la circulación, comparado con sus constituyentes individuales. Además, la formación del complejo es reversible y así el complejo puede actuar como una fuente de acción prolongada de la citoquina proinflamatoria. La modificación de los receptores solubles según la presente invención facilita la rápida depuración del complejo de la circulación sin alterar la capacidad de unión del receptor soluble a la citoquina proinflamatoria, concretamente TNF. Así, la invención proporciona un receptor soluble para la citoquina proinflamatoria, que se modifica con glicanos para que porte una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal para ayudar a la unión del complejo a receptores específicos que son responsables de la depuración de proteínas de la circulación, tales como ASGP-R o cualquier otro receptor de la superficie celular de tipo lectina. Por tanto, se proporciona la administración de dichos receptores solubles modificados con glicanos según la invención, para facilitar la rápida depuración de citoquinas proinflamatorias de la circulación. De modo similar, se proporcionan receptores solubles de factores del crecimiento, que se modifican para que porten una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal según la invención. Se proporciona la administración de dichos receptores solubles de factores del crecimiento según la invención para una depuración eficaz y rápida de factores del crecimiento en la circulación no deseados, por ejemplo, factores del crecimiento que apoyan la proliferación de células tumorales o la proliferación de células endoteliales vasculares.

Otro componente no deseado cuya depuración de la circulación puede facilitarse utilizando el correspondiente

receptor o proteína de unión modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal es una lipoproteína o una lipoproteína oxidada.

También se describe un receptor o una proteína de unión modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, y su uso para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de un componente capaz de unirse a dicho receptor o proteína de unión. Los ejemplos de dichos componentes incluyen, pero no se limitan a una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína y una lipoproteína oxidada.

En una realización, la invención proporciona un receptor soluble de la citoquina TNF- α (p55), expresado en células de mamífero, cuya estructura de N-glicanos ha sido modificada según la invención. Este receptor de TNF soluble modificado (m-sTNFR) es útil, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades caracterizadas por un exceso de TNF, tal como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis y diversas otras enfermedades autoinmunitarias. La administración de m-sTNFR a pacientes que tienen dichas enfermedades conduce a la formación de un complejo entre el TNF en la circulación y el m-sTNFR. El complejo resultante se retira con rapidez de la circulación mediante su unión a ASGP-R o a cualquier otro receptor de la superficie celular de tipo lectina. Después de la unión al receptor de tipo lectina, el complejo ternario, que consiste en el receptor de tipo lectina, m-sTNFR y TNF- α , se internaliza a través de un receptor de lectina, el complejo se disocia, m-sTNFR y TNF- α se degradan en el lisosoma, mientras que el receptor de tipo lectina se recicla dirigiéndose de nuevo hacia la superficie celular. Estos receptores de tipo lectina son abundantes en el hígado, en macrófagos, en células del endotelio vascular, y en muchos otros tipos celulares.

En la técnica se conocen varios métodos generales para generar glicoproteínas modificadas que tienen Gal, GlcNAc o GalNAc terminales. Estos métodos pueden clasificarse en tres grupos principales: (1) sistemas de expresión dirigidos hacia la biosíntesis de glicoproteínas con estructuras de glicanos modificadas; (2) transformaciones enzimáticas de glicoproteínas; y (3) modificaciones químicas de proteínas. Estos métodos pueden emplearse para generar receptores de citoquinas solubles o proteínas de unión de la invención que tienen Gal, GlcNAc o GalNAc terminales. En una realización de la invención, sTNFR p55, expresado en células CHO, se trata con neuraminidasa, que retira el ácido N-acetilneuramínico terminal, exponiendo con ello el penúltimo resto galactosa. En otra realización de la invención, dicho sTNFR se trata con neuraminidasa, seguida de β -galactosidasa, para exponer el resto GlcNAc. La glicoproteína truncada resultante puede utilizarse tal cual o incluso hacerse reaccionar con UDP-GalNAc en presencia de GalNAc transferasa (β GalNAcT) (Rice, Thomas *et al.*, 2003). Como alternativa, sTNFR puede expresarse en un sistema que incorpora GalNAc al resto N-glicano. Por ejemplo, células CHO-lec8 pueden cotransfectarse de modo estable con vectores que expresan β GalNAcT y sTNFR p55. Estas células expresarán y segregarán sTNFR en el que los restos Gal están reemplazados por GalNAc. El tratamiento de la glicoproteína resultante con neuraminidasa expondrá la penúltima GalNAc (Kawar, Haslam *et al.*, 2005). En otra estrategia, sTNFR p55 puede tratarse con neuraminidasa, seguida de β -galactosidasa para eliminar el ácido N-acetilneuramínico terminal y la penúltima β -galactosa. La glicoproteína truncada resultante puede hacerse reaccionar entonces con UDP-GalNAc en presencia de GalNAcT (Rice, Thomas *et al.*, 2003). El sTNFR resultante con GalNAc terminal puede aislarse en una columna de agarosa-lectina de *Wisteria floribunda*, que muestra una alta especificidad por las glicoproteínas que terminan con GalNAc (Do, Do *et al.*, 1997).

Como alternativa, GalNAc puede añadirse de modo químico a sTNFR expresado en células CHO o en un sistema de expresión procariota, tal como *E. coli*. Por ejemplo, es posible acoplar GalNAc o lactosa directamente a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en sTNFR mediante una aminación reductora con cianoborohidruro de sodio. De modo similar, dos restos de GalNAc pueden acoplarse a los grupos ϵ - y α -amino de la L-lisina, y el derivado resultante se activa mediante una carbodiimida hidrosoluble y después se acopla a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en sTNFR, generando con ello un espaciador entre el resto GalNAc y el esqueleto de sTNFR. Otros sintones de GalNAc adecuados para el acoplamiento con sTNFR se describen en la bibliografía. Por ejemplo, los compuestos 5 y 8f de Westerlind *et al.* (Westerlind, Westman *et al.*, 2004) pueden des-O-acetilarse con un álcali suave, activarse mediante una carbodiimida hidrosoluble y después acoplarse a sTNFR.

Puesto que todas las citoquinas y los factores del crecimiento actúan a través de receptores de la superficie celular específicos, es posible expresar los dominios extracelulares de dichos receptores o proteínas de unión, y después modificar sus N- u O-glicanos según se describe para los N-glicanos de sTNFR p55. Como alternativa, pueden añadirse de modo químico restos sacáridos deseados a dichos receptores solubles o proteínas de unión. La siguiente lista de citoquinas y factores del crecimiento presenta ejemplos de moléculas efectoras que pueden retirarse de la circulación con rapidez y eficacia utilizando el correspondiente receptor soluble o proteína de unión cuyo resto glicano ha sido modificado empleando uno o más de los métodos descritos anteriormente para sTNFR p55: IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4/IL-13, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-29, activina, apor2L/TRAIL, APRIL, BAFF, TNFSF9, BMP-2, CD27L, BMP-3, BMP-7, CD30L, CD40L, CNTF, EGF, VEGF, FASL, FGF, CSF, FLT3, G-CSF, GDNF, GITRL, GM-CSF, GH, HGF, IGF I y II, IFN- α , IFN- γ , LIGHT, linfotoxina, M-CSF, MSP, NGF, NT-3, NT-4, OX-40L, PDGF, prolactina, SCF, TGF- α , TGF- β , TPO, TRANCE, TSLP y TWEAK.

Pueden encontrarse herramientas en la técnica para las técnicas moleculares, bioquímicas, microbiológicas y de

ADN recombinante en la siguiente bibliografía: Selected Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., Nueva York (1980); Oligonucleotide Synthesis, Gait, M.J., ed. (1984); Transcription and Translation, Hames, B.D., y Higgins, S.J., eds. (1984); Animal Cell Culture, Freshney, R.I., ed. (1986); Immobilized Cells and Enzymes, IRL Press, (1986); Nucleic Acid Hybridization, Hames, B.D., y Higgins, S.J., eds. (1985); A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley & Sons, Nueva York (1988); Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook *et al.* (1989), Academic Press; PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications, Academic Press, San Diego, CA (1990); Perbal, Watson *et al.*, Recombinant DNA, Scientific American Books, Nueva York; Birren *et al.* (eds.), Genome Analysis: A Laboratory Handbook, Cellis, J.E., ed. (1994); Current Protocols in Immunology, Coligan, J.E., ed. (1994); Stites *et al.* (eds.), Basic and Clinical Immunology, Appleton & Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell y Shiigi (eds.), Marshak *et al.*, Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual, CSHL Press (1996); y A Laboratory Manual Series, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (1998), Methods in Enzymology, vol. 1-137.

Debido a que ASGP-R es muy abundante en hepatocitos, que portan 150.000-500.000 sitios de unión/célula, y debido a que otros receptores de lectina también están presentes sobre muchos tipos celulares, la depuración de los complejos que consisten en citoquinas o factores del crecimiento con sus respectivos receptores solubles que portan Gal, GlnNAc o GalNAc expuestas será muy rápida. La información disponible sólo para uno de estos receptores de tipo lectina, el ASGP-R, demuestra la eficacia de la depuración. Así, el número de hepatocitos presentes en el hígado es de aproximadamente 2×10^8 por ratón, y la velocidad de internalización de ASGP-R es de 0,1 pmol/min por 10^6 células. Basándose en estos cálculos, el hígado del ratón es capaz de depurar aproximadamente 1,2 nmol/h de ligando a través de los ASGP-R, o el equivalente de 2,4 $\mu\text{g/h}$ de una glicoproteína con un peso molecular de 20.000 (Park, Mi *et al.*, 2005). La extrapolación al hígado humano sugiere una velocidad de depuración potencial casi ilimitada de más de 5 mg/h o 120 mg/día de, por ejemplo, TNF- α complejo con m-sTNFR.

Los inventores han aislado una proteína soluble que se corresponde con el dominio de unión al ligando del LDLR humano (sLDLR) en virtud de su actividad antivírica contra el virus de la estomatitis vesicular (Fischer, Tal *et al.*, 1993). Han caracterizado un sLDLR recombinante que se expresa en células de ovario de hámster chino (CHO) (restos aminoácidos 25-352 del precursor de LDLR; n° de registro P01130, base de datos SwissProt/ExpASY). De modo inesperado, se descubrió que este LDLR soluble (sLDLR) está N-glicosilado, según se determina mediante SDS-PAGE antes y después de una ruptura con PNGasa (figura 1). Se descubrió que el sitio de la N-glicosilación estaba sobre Asn272 del precursor de LDLR comparando el perfil espectrofotométrico de masas de digestiones de péptidos trípticos antes y después de un tratamiento con PNGasa (tabla 1). Se descubrió que el sLDLR N-glicosilado se une a la LDL y que la unión resiste la disociación en condiciones fisiológicas, según se determina mediante una cromatografía de exclusión molecular en disolución salina tamponada con fosfato, pH 7,4 (figura 2). Por tanto, se describe un sLDLR, que porta una GalNAc terminal (sLDLR-Gn). El sLDLR-Gn puede incluir, por ejemplo, un polipéptido de un precursor de LDLR que abarca los restos aminoácidos 25 a 352 que contiene siete repeticiones imperfectas que comprenden el sitio de unión a LDL completo, así como una repetición A del dominio homólogo al precursor de EGF (que se ha indicado que contribuye a la unión al ligando); y un polipéptido del precursor de LDLR que abarca los restos aminoácidos 25 a 313 que contiene siete repeticiones imperfectas que comprenden el sitio de unión a LDL completo. Se describe la administración de sLDLR-Gn para facilitar la reducción eficaz y rápida del colesterol en la circulación. Esta administración resulta beneficiosa para individuos con hipercolesterolemia familiar debida a un LDLR mutado o a una cantidad menor de LDLR, así como para otras personas cuyos niveles de LDLR o función de LDLR son reducidas. La administración de sLDLR-Gn también resulta beneficiosa para individuos que no toleran otros medios para reducir el colesterol sérico, tales como inhibidores de HMG-CoA. La administración de sLDLR-Gn es particularmente valiosa para pacientes, tales como ciertos pacientes con hipercolesterolemia familiar, que no pueden controlar su colesterol sérico mediante ninguno de los métodos existentes y por tanto dependen de la aféresis de LDL.

Pueden utilizarse varios métodos generales conocidos en la técnica para generar sLDLR, o sus homólogos relacionados, que portan una GalNAc terminal. Las células CHO-lec8 pueden cotransfectarse de modo estable con vectores que expresan la β -GalNAc transferasa (β GalNAcT) y sLDLR. Estas células expresarán y segregarán sLDLR-Gn, que puede tratarse con neuraminidasa para exponer la penúltima GalNAc (Kawar, Haslan *et al.*, 2005). En otra estrategia, el sLDLR puede expresarse en una célula hospedante, tal como una célula CHO, y recogerse del sobrenadante del cultivo. El sLDLR producido puede tratarse con neuraminidasa, seguida de β -galactosidasa, para retirar el ácido N-acetilneramínico terminal y la penúltima β -galactosa. La glicoproteína truncada resultante puede hacerse reaccionar entonces con UDP-GalNAc en presencia de GalNAcT (Rice, Thomas *et al.*, 2003). El sLDLR-Gn resultante puede aislarse en una columna de agarosa-lectina de *Wisteria floribunda*, que muestra una alta especificidad por las glicoproteínas que terminan con GalNAc (Do, Do *et al.*, 1997).

Como alternativa, GalNAc puede añadirse de modo químico a sLDLR, o a sus homólogos relacionados. Por ejemplo, es posible acoplar N-acetilgalactosamina (GalNAc) directamente a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en sLDLR mediante una aminación reductora con cianoborohidruro de sodio. De modo similar, dos restos de GalNAc pueden acoplarse a los grupos ϵ - y α -amino de la L-lisina, y el derivado resultante se activa mediante una carbodiimida hidrosoluble y después se acopla a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en sLDLR, generando con ello un espaciador entre el resto GalNAc y el esqueleto de sLDLR. Otros sintones de GalNAc adecuados para el acoplamiento con sLDLR se describen en la bibliografía. Por ejemplo, los compuestos 5 y 8f de Westerlind *et al.*

(Westerlind, Westman *et al.*, 2004) pueden des-O-acetilarse con un álcali suave, activarse mediante una carbodiimida hidrosoluble y después acoplarse a sLDLR.

La velocidad de síntesis y catabolismo de la apoB es de $8,0 \pm 0,7$ mg/kg/día en individuos normales, de $13,8 \pm 3,6$ mg/kg/día en individuos con FH heterocigótica, y de $26,4 \pm 10$ mg/kg/día en individuos con FH homocigótica (Bilheimer, Stone *et al.*, 1979). Así, la velocidad catabólica se normaliza en individuos con FH heterocigótica si se eliminan $5,8 \pm 3,6$ mg/kg/día de apoB plasmática. Puesto que la masa molecular del sLDLR glicosilado es de 34.000 y la de la apoB es de 550.000 (Johs, Hammel *et al.*, 2006), la administración de al menos $0,36 \pm 0,22$ mg/kg/día de un derivado de sLDLR-Gn normaliza la velocidad catabólica del LDLR en individuos con FH heterocigótica, suponiendo una eficacia del 100%. Sin embargo, la captación potenciada resultante de colesterol por los hepatocitos infrarregula aún más la expresión del LDLR de la superficie celular, lo cual requiere una escalada de la dosis. En el caso extremo, una dosis de $0,85 \pm 5$ mg/kg/día de un derivado de sLDLR-Gn internalizará la producción total de colesterol de los pacientes con heFH. La unión de sLDLR a lipoproteínas que contienen apoE también se está produciendo. Puesto que la apoE está presente en VLDL muy grande y en HDL-apoE mucho más pequeño, el efecto preciso de la presencia de apoE en lipoproteínas no puede evaluarse y la dosis óptima de sLDLR-Gn deberá determinarse de modo experimental.

Se dice que dos o más estructuras son homólogas si son parecidas debido a un ancestro común. A menudo se concluye la homología entre proteínas y ADN basándose en la similitud de la secuencia, en especial utilizando la bioinformática. Por ejemplo, en general, si dos genes tienen una secuencia de ADN casi idéntica es probable que sean homólogos. Existen muchos algoritmos para agrupar secuencias de proteínas en familias de secuencias, que son conjuntos de secuencias mutuamente homólogas. La homología de secuencia puede ser de dos tipos: ortóloga o paróloga. Dos genes similares en dos especies diferentes que se han originado a partir de un ancestro común son ortólogos. Las secuencias homólogas son ortólogas si se han separado por medio un acontecimiento de especiación: si un gen existe en una especie, y esa especie diverge en dos especies, entonces las copias divergentes de este gen en las especies resultantes son ortólogos. Una segunda definición de ortólogo describe dos genes cualesquiera en dos especies diferentes con funciones muy similares. Las secuencias homólogas son parálogas si se han separado por medio de un acontecimiento de duplicación de genes: si un gen en un organismo se duplica para ocupar dos posiciones diferentes en el mismo genoma, entonces las dos copias son parálogas. Los genes que codifican la mioglobina y la hemoglobina se consideran parálogos antiguos.

Se describen métodos similares para expresar receptores captadores solubles que se corresponden con los dominios de unión al ligando extracelulares de sus respectivos receptores asociados a células y que portan GalNAc en lugar de Gal. Estos receptores solubles modificados se unen a lipoproteínas oxidadas, tales como oxLDL y oxRLP, las conducen hasta el hígado, en donde el complejo se une rápidamente a ASGP-R, se internaliza y se degrada. Como en el caso del sLDLR, los receptores captadores solubles recombinantes pueden expresarse en células hospedantes, tales como células CHO-lec8, y cotransfectarse de forma estable con vectores que expresan β GalNAcT. Las construcciones del receptor captador soluble tienen una composición general que incluye una secuencia que codifica un péptido señal, seguida de un ADN que codifica cualquiera de los dominios extracelulares de dichos receptores captadores. El producto segregado puede tratarse con neuraminidasa para exponer la penúltima GalNAc (Kawar, Haslam *et al.*, 2005). En otra estrategia, cualquiera de los receptores captadores solubles puede expresarse en una célula hospedante, tal como una célula CHO, y aislarse del medio de cultivo. Después del aislamiento, el receptor soluble puede tratarse con neuraminidasa, seguida de β -galactosidasa para eliminar el ácido N-acetilneuramínico terminal y la penúltima β -galactosidasa. La glicoproteína troncada resultante puede hacerse reaccionar entonces con UDP-GalNAc en presencia de GalNAcT (Rice, Thomas *et al.*, 2003). El receptor captador soluble modificado resultante puede aislarse en una columna de agarosa-lectina de *Wisteria floribunda*, que muestra una alta especificidad por las glicoproteínas que terminan con GalNAc (Do, Do *et al.*, 1997).

Como alternativa, GalNAc puede añadirse de modo químico a un receptor captador soluble. Por ejemplo, es posible acoplar N-acetilgalactosamina (GalNAc) directamente a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en dicho receptor captador soluble mediante una aminación reductora con cianoborohidruro de sodio. De modo similar, dos restos de GalNAc pueden acoplarse a los grupos ϵ - y α -amino de la L-lisina, y el derivado resultante se activa mediante una carbodiimida hidrosoluble y después se acopla a los grupos ϵ -amino de los restos Lys en cualquiera de los receptores captadores solubles, generando con ello un espaciador entre el resto GalNAc y el esqueleto de dicho receptor. Otros sintones de GalNAc adecuados para el acoplamiento a diversas proteínas se describen en la bibliografía. Por ejemplo, los compuestos 5 y 8f de Westerlind *et al.* (Westerlind, Westman *et al.*, 2004) pueden des-O-acetilarse con un álcali suave, activarse mediante una carbodiimida hidrosoluble y después acoplarse a cualquiera de los receptores captadores solubles.

La presente invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden una sustancia activa que comprende un receptor soluble modificado con glicanos, concretamente sTNFR, según la invención.

Las cantidades terapéuticamente eficaces de la proteína o proteínas activas estarán en función de muchas variables, por ejemplo, la vía de administración, y la condición clínica del paciente.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad que cuando se administra, el receptor soluble o la proteína

de unión modificado con glicanos muestra una actividad biológica. La dosificación administrada, en forma de una dosis única o múltiple, a un individuo variará dependiendo de una diversidad de factores, incluyendo las propiedades farmacocinéticas, la vía de administración, las condiciones y las características del paciente (sexo, edad, peso corporal, salud, y tamaño), el grado de los síntomas, los tratamientos concurrentes, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. El ajuste y la manipulación de los intervalos de dosificación establecidos están dentro de la capacidad de los expertos en la técnica, así como los métodos *in vitro* e *in vivo* para determinar el efecto sobre un individuo.

A continuación, la invención se ilustra mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

10 Ejemplo 1: Generación de asialo-sTNFR p55

Se inmovilizan 50.000 unidades de neuraminidasa (New England Biolabs, nº de catálogo P0720L) en 1 ml de PBS sobre Affigel 10 (1 ml de esferas cargadas, BioRad Labs) según las instrucciones del fabricante y se cargan en una columna. Se hace circular sTNFR p55 recombinante que se corresponde con los aminoácidos 22-211 de pro-TNF-R1 (<http://www.expasy.org/uniprot/P19438>), expresado en células CHO (1 g, laboratorios Merck Serono) en tampón citrato (50 mM, pH 6, 10 ml) a través de la columna de neuraminidasa inmovilizada durante 2 h a 25 °C. El asialo-sTNFR resultante (as-sTNFR) se recoge y se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar el ácido N-acetilneuramínico libre.

20 Ejemplo 2: Eliminación de β 1-3-galactosa del asialo-sTNFR p55

Se inmovilizan 10.000 unidades de β 1-3-galactosidasa (New England Biolabs, nº de catálogo P0726L) en 1 ml de PBS sobre Affigel 10 (1 ml de esferas cargadas, BioRad Labs) según las instrucciones del fabricante y se cargan en una columna. Se hace circular asialo-sTNFR p55, producido según se describe en el ejemplo 1 (1 g) en tampón acetato (50 mM, pH 4,5, 10 ml) a través de la columna de β -galactosidasa inmovilizada durante 2 h a 25 °C. El asialo, agalacto-sTNFR resultante (as-ag-sTNFR) se recoge y se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar la galactosa libre.

25 Ejemplo 3: Lactosaminación de sTNFR p55

Se añade lactosa (270 mg, 0,79 mmol, Sigma) a sTNFR p55 recombinante, que se corresponde con los aminoácidos 22-211 de pro-TNF-R1 (<http://www.expasy.org/uniprot/P19438>), expresado en *E. coli* (1 g, PeptoTech Inc.) en NaHCO₃ (50 mM, 10 ml, pH 8,4), seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio (48 mg, 0,79 mmol). La disolución se mantiene durante 170 h a temperatura ambiente. El sTNFR lactosaminado (lac-sTNFR) se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

30 Ejemplo 4: Expresión de sTNFR p55 recombinante con GalNAc terminal

Se transfectaron células CHO Lec8 (ATCC CRL-1737) según se ha descrito (Kawar, Haslam *et al.*, 2005) con un plásmido que codifica el marco de lectura abierto completo de Ce β 4GalNAcT bajo el control del promotor de CMV; este plásmido también codifica un gen de resistencia a geneticina. Las células se cultivaron en medio de Eagle modificado de Duplecco que contiene suero de ternero fetal al 10% y geneticina 600 μ g/ml (Invitrogen) para seleccionar las células transformadas de modo estable. Después de 4 semanas en cultivo, una línea celular que expresa la actividad Ce β 4GalNAcT (L8-GalNAcT) se clonó a partir de una única célula mediante cultivo de dilución limitante según se ha descrito (Kawar, Haslam *et al.*, 2005).

Las células L8-GalNAcT después se transfectan, como anteriormente, con un plásmido de expresión de mamífero pCDNA4/His (Invitrogen) que codifica el marco de lectura abierto del TNFR humano (p55) desde el codón 1 al 211, incluyendo el péptido señal cognado para la secreción (<http://www.expasy.org/uniprot/P19438>), seguido de un codón de fin bajo el control del promotor de CMV; este plásmido también codifica un gen de resistencia a zeocina. Las células después se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco que contiene suero de ternera fetal al 10%, geneticina 600 μ g/ml, y zeocina 400 μ g/ml (Invitrogen) para seleccionar las células transformadas de modo estable. Después de 4 semanas en cultivo, una línea celular que expresa GalNAcT y sTNFR se clona a partir de una única célula según se ha descrito (Selmaj, 2000; Kawar, Haslam *et al.*, 2005).

45 Ejemplo 5 (comparación): El sLDLR recombinante expresado en células CHO es una glicoproteína

Cummings *et al.* descubrieron que el LDLR humano contiene un único oligosacárido unido a Asn (Cummings, Kornfeld *et al.*, 1983) (véase el párrafo 3 en p. 15269, columna derecha). El sitio de N-glicosilación se localizó en Asn657 de pro-LDLR (<http://www.expasy.org/uniprot/P01130>). Todos los sitios de O-glicosilación están agrupados en un dominio extracelular adyacente a la membrana plasmática (Gent y Braakman, 2004). Por tanto, no se espera que sLDLR 25-352 esté glicosilado. Se produjo el sLDLR de 328 restos aminoácidos (que se corresponde con los restos aminoácidos Asp25 a Cys352 de pro-sLDLR) en células CHO (laboratorios InterPharm, Ness Ziona, Israel). Brevemente, el plásmido de expresión construido para la transfección de células CHO deficientes en DHFR contenía

tanto la secuencia de ADN que codifica el polipéptido que abarca los restos aminoácidos 1-352 de pro-hsLDLR (incluyendo el péptido señal de 24 aminoácidos cognado y los siguientes 328 restos aminoácidos del polipéptido maduro (que abarca los aminoácidos 25-352 de la proteína precursora de LDLR)) como el DHFR murino sobre el mismo plásmido, en el que la expresión de hsLDLR y DHFR es controlada por un promotor y elementos de terminación de la transcripción de SV40.

El fragmento de ADN que codifica los restos aminoácidos 1-352 de pro-hsLDLR se aisló mediante una amplificación con PCR utilizando el gen pro-LDLR completo como molde (ADNc de LDLR, Yamamoto *et al.*, Cell, 39:27-38, 1984). La amplificación se realizó empleando mezclas de reacción de PCR que contienen 1 ng de molde, 400 ng de cada cebador (directo e inverso), mezcla de dNTP 0,2 mM, MgCl₂ 2 mM, 5 U Pfu de ADN polimerasa, en el tampón suministrado con la enzima, en un volumen total de 100 microlitros. Se emplearon 31 ciclos térmicos (1 min a 94 °C, 1 min a 65 °C, 2 min a 72 °C), precedidos por 2 min de calentamiento a 94 °C y seguidos de 10 min a 72 °C. Los cebadores utilizados fueron el cebador directo (SEQ ID NO:1) 5' CCC AAGCTT CCACC ATG GGG CCC TGG GGC TG que incluye el sitio Hind III, la secuencia de Kozak y la secuencia que codifica los primeros 5 aminoácidos del pro-hsLDLR, y el cebador inverso (SEQ ID NO:2) 5' CCG GGATCC TTA CTA GCA TCT TCG CTG GGC CAC C que incluye el sitio BamHI, dos codones de fin y la secuencia de los últimos 6 aminoácidos, siendo el último Cys352. Se obtuvo un plásmido intermedio que incluye el módulo de expresión de hsLDLR digiriendo el producto de la PCR con HindIII y BamHI e introduciéndolo en el plásmido pSVE3 previamente digerido con HindIII y BclI (la digestión con estas enzimas elimina la mayor parte de la región temprana de SV40 de pSVE3). Se obtuvo un plásmido final que incluye los módulos de expresión de hsLDLR y DHFR mediante la digestión del plásmido intermedio con BamHI, el aislamiento del módulo de expresión de hsLDLR, y su acoplamiento al fragmento grande de pDHFR previamente digerido con BamHI. Después de la verificación de la construcción final mediante un cartografiado de restricción y un análisis de la secuencia mediante métodos conocidos en la técnicas, las células se transfectaron con el plásmido final y se sometieron a un medio selectivo para seleccionar las células DHFR-positivas. La transfección se realizó con liposomas catiónicos utilizando LipofectAmine (Gibco, BRL), según el protocolo descrito por el fabricante. Setenta y dos horas después de la transfección, las células se trasladaron a un medio selectivo que carecía de desoxi- y ribonucleótidos, y se suplementó con FCS dializado al 10%. Las células que expresan actividad DHFR son capaces de formar colonias en el medio selectivo, que se aislaron alzando las células con discos de papel empapados de tripsina. Las células aisladas se cultivaron y se seleccionaron para la actividad antiviral r-hsLDLR, fundamentalmente tal como se describe en el ejemplo 9 de la patente de EEUU 6849720. Las células transfectadas que producen r-hsLDLR entonces se sometieron a una amplificación génica aumentando gradualmente las concentraciones de MTX, seguido de una subclonación y una selección de los clones productores estables. El r-hsLDLR se produjo en el medio de dicho clon productor CHO estable, fundamentalmente tal como se indica en el ejemplo 1 de la patente de EEUU 6849720 que describe la producción de una versión más corta de hsLDLR que carece de Cys313 (que abarca los aminoácidos 25-312 de pro-sLDLR, denominada en la patente forma 291) y así contiene un número impar de restos Cys.

El r-hsLDLR producido se digirió con PNGasa (15.000 unidades, New England Biolabs, nº de catálogo P0704S) según las instrucciones del fabricante. Una parte alícuota de sLDLR no digerido y digerido (1 µg de cada uno) se resolvió en un gradiente de gel de poliacrilamida (acrilamida al 8-15%) y después se tiñó con azul de Coomassie. Se observó un significativo aumento en la movilidad del r-hsLDLR después de la digestión, lo cual indica que el r-hsLDLR 25-352 expresado en células CHO es una glicoproteína (figura 1).

Ejemplo 6 (comparación): Determinación del punto de glicosilación en sLDLR

Las bandas que se corresponden con r-hsLDLR no tratado y digerido con PNGasa del ejemplo 5 se retiraron del gel, se redujeron y se alquilaron, y después se digirieron con tripsina. Las mezclas peptídicas resultantes se sometieron a una espectrometría de masas MALDI-TOF. La comparación de los péptidos identificados en las dos preparaciones reveló un nuevo péptido (péptido 17) que emergió tras la PNGasa (tabla 1). Este péptido se corresponde con el péptido DMSDEVGCVNVTLCCEGPNK, que contiene un sitio de N-glicosilación potencial en Asn272 e proLDLR.

Tabla 1: Péptido trípticos identificados mediante MS MALDI-TOF de sLDLR antes y después de una desglicosilación con PNGasa

Péptido nº	Péptido resultante	Longitud	Control	PNGasa
1	CERNEFQCQDGKCTSYK	12	X	
2	NEFQCQDGK	9		X
3	NEFQCQDGKCSISK	14	X	
4	CISK	5	X	X
5	SGDFSCGGR	9	X	X

6	SGDFSCGGRVNR	12	X	
7	CIPQFWR	7	X	X
8	VNRCIPQFWR	10		X
9	TCSQDEFR	8	X	X
10	CHDKG	5	X	
11	CHDGKICISR	9	X	X
12	QFVCDSDR	8	X	
13	CDGGPDCK	8		X
14	DKSDEENCAVATCR	14	X	
15	QCDREYDCK	9	X	
16	EYDCK	5	X	
17	DMSDEGCVNVTLCGPNK	19		X
18	CHSGECITLDK	11	X	X
19	VCNMAR	6	X	
20	VCNMARDCR	9	X	X
21	DWSPEPIK	8	X	X

Ejemplo 7 (comparación): El sLDLR recombinante se une a LDL

Los intentos de demostrar la unión del sLDLR recombinante producido en células CHO a la LDL mediante resonancia de plasmón de superficie (BIAcore) no tuvieron éxito. Por tanto, los inventores emplearon otro método para ensayar la unión de sLDLR a LDL. Para este fin, se incubó durante 1 h a 37 °C una disolución de LDL (Biomedical Technologies, Inc., MA, EEUU) y el r-hsLDLR del ejemplo 5 a una concentración final de 7 micromolar cada uno en PBS más cloruro de calcio 10 micromolar (PBS+). Una parte alícuota de 0,1 ml se sometió a una cromatografía de exclusión molecular en una columna Superose 6 HR 10/30 (GHE Healthcare Life Sciences, nº de catálogo 17-5172-01). La columna se eluyó con PGS+ a un caudal de 0,4 ml/min y se recogieron fracciones de 0,5 ml. La concentración de r-hsLDLR se determinó mediante un ELISA específico como sigue.

Se utilizó Mab nº 28 anti-sLDLR humano (5 microgramos/ml en PBS, se corresponden con un Mab del clon de hibridoma 28 depositado en el CNCM con nº 1-2391-patente de EEUU 6849720) para revestir placas de ELISA de 96 pocillos a 0,1 ml/pocillo durante la noche a temperatura ambiente. Las placas después se lavaron 3x con PBS que contenía Tween-20 al 0,05% y después se bloquearon con 0,3 ml de tampón de bloqueo (albúmina de suero bovino al 1%, sacarosa al 5%, azida de sodio 0,05% en PBS). Las placas después se lavaron 3x con PBS. Se añadió un patrón de sLDLR 25-352 recombinante expresado en células CHO (125 ng/ml, InterPharm Laboratories, Ness Ziona, Israel) en 0,1 ml de PBS a un primer pocillo y se diluyó en serie en dos veces. Se añadieron muestras que contenían cantidades desconocidas de sLDLR al primer pocillo de las otras filas y también se diluyeron en serie en dos veces. Las placas entonces se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y después se lavaron 3x con tampón de bloqueo. El Mab nº 29.8 anti-sLDLR humano biotinilado (que se corresponde con un Mab del clon de hibridoma 29,8 depositado en el CNCM con nº 1-2392-patente de EEUU 6849720), diluido hasta 4 microgramos/ml en diluyente reactivo (albúmina de suero bovino al 1% en PBS, 0,1 ml), se añadió a cada pocillo y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas entonces se lavaron 3x con diluyente reactivo. Se añadió estreptavidina HRP (R&D Systems) en diluyente reactivo a una dilución de trabajo (0,1 ml) a cada pocillo según las instrucciones del fabricante (R&D Systems), y las placas se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. Las placas entonces se lavaron 3x con diluyente reactivo, se añade una disolución de sustrato (0,1 ml de TMB/E, Chemicon) a cada pocillo, y las placas se leyeron a los 5 min a 630 nm o se detuvieron con H₂SO₄ (2 N, 0,05 ml) y se leyeron a 450 nm. Las imperfecciones ópticas de la placa se corrigieron restando la lectura a 540 nm o 570 nm.

Una cromatografía del sLDLR solo (figura 2, línea discontinua) reveló un pico de sLDLR libre que eluye en las fracciones 27-35, alcanzando un máximo en la fracción 31. Una cromatografía del complejo de LDL-sLDLR reveló un pico de sLDLR que eluye a una masa molecular mayor en las fracciones 20-26, idéntico la migración de la LDL (masa media 2,5 x 10⁶ Da), así como un pico grande de sLDLR libre. Basándose en la proporción de los dos picos,

según se determina mediante ELISA de sLDLR y suponiendo una dilución en 5 veces frente a la concentración inicial, se calculó una KD del complejo de LDL-sLDLR en el intervalo de 10 nanomolar.

Ejemplo 8 (comparación): N-acetilgalactosaminación del sLDLR expresado en *E. coli*

5 Se expresa sLDLR recombinante (aminoácidos 25-352 del proLDLR, <http://www.expasy.org/uniprot/P01130>) en *E. coli*, se vuelve a plegar y se purifica fundamentalmente como se ha descrito (Simmons, Newhouse *et al.*, 1997). Se añade N-acetilgalactosamina (100 mg, 0,46 mmol, Calbiochem) a 1 g de sLDLR 25-352 en tampón NaHCO₃ (50 mM, pH 8,4, 10 ml), seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio (Sigma, 28 mg, 0,46 mmol). La disolución se mantuvo durante 170 h a temperatura ambiente. El sLDLR 25-352 N-acetilgalactosaminado (sLDLR-Gn) se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

10 **Ejemplo 9 (comparación): N-acetilgalactosaminación de un fragmento de sLDLR expresado en *E. coli***

Se expresa un fragmento de sLDLR recombinante capaz de unirse de modo selectivo a lipoproteínas que contienen apoE (aminoácidos 146-233 del proLDLR, <http://www.expasy.org/uniprot/P01130>) en *E. coli*, se vuelve a plegar y se purifica fundamentalmente como se ha descrito (Fisher, Abdul-Aziz *et al.*, 2004). Se añade N-acetilgalactosamina (340 mg, 1,5 mmol) a 1 g de sLDLR 146-233 en NaHCO₃ (50 mM, pH 8,4, 10 ml), seguido de la adición de cianoborohidruro de sodio (91 mg, 1,5 mmol). La disolución se mantuvo durante 170 h a temperatura ambiente. El sLDLR 146-233 N-acetilgalactosaminado se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

Ejemplo 10 (comparación): Expresión de sLDLR con GalNAc terminal

20 Se transfectaron células L8-GalNAcT del ejemplo 4, como anteriormente, con un plásmido pCDNA4/His (Invitrogen), que codifica el marco de lectura abierto del LDLR humano desde el codón 1 al 315, incluyendo el péptido señal cognado para la secreción (<http://www.expasy.org/uniprot/P01130>), seguido de un codón de fin bajo el control del promotor de CMV; este plásmido también codifica un gen de resistencia a zeocina. Las células después se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco que contiene suero de ternera fetal al 10%, geneticina 600 µg/ml, y zeocina 400 µg/ml para seleccionar las células transformadas de modo estable. Después de 4 semanas en cultivo, una línea celular que expresa GalNAcT según se determina mediante RT-PCR, y sLDLR según se determina mediante ELISA, descrita en el ejemplo 7, se clona a partir de una única célula igual que anteriormente. El sLDLR que tiene una penúltima GalNAc en lugar de Gal en sus N-glicanos (sLDLR-Gn) se aísla de los sobrenadantes del cultivo de estas células CHO y se purifica utilizando métodos cromatográficos conocidos en la técnica. El sLDLR-Gn se trata con neuraminidasa inmovilizada para eliminar los restos ácido N-acetilneuramínico terminales. El sLDLR-Gn se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

Ejemplo 11 (comparación): N-acetilgalactosaminación de un fragmento del receptor de oxLDL soluble expresado en *E. coli*

35 Un fragmento recombinante de OLR1/LOX-1 capaz de unirse de modo selectivo a oxLDL (aminoácidos 143-273 de OLR1/LOX-1) se expresa en *E. coli*, se vuelve a plegar y se purifica fundamentalmente como se ha descrito (Smirnova, Sawamura *et al.*, 2004) (Ishigaki, Ohki *et al.*, 2005). Se añade N-acetilgalactosamina (340 mg, 1,5 mmol) a 1 g de sOLR1/LOX-1 143-273 en NaHCO₃ (50 mM, pH 8,4, 10 ml), seguido de cianoborohidruro de sodio (91 mg, 1,5 mmol). La disolución se mantuvo durante 170 h a temperatura ambiente. El sOLR1/LOX-1 143-273 N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn) se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

40 **Ejemplo 12 (comparación): Expresión de sOLR1/LOX-1 con GalNAc terminal**

Se transfectaron las células L8-GalNAcT del ejemplo 4, como anteriormente, con un plásmido pCDNA4/His (Invitrogen), que codifica el péptido señal, seguido de los codones 58-273 del marco de lectura abierto del OLR1/LOX-1 humano (<http://www.expasy.org/uniprot/P78380>), seguido de un codón de fin bajo el control del promotor de CMV. Este plásmido también codifica un gen de resistencia a zeocina. Las células después se cultivan en medio de Eagle modificado de Dulbecco que contiene suero de ternera fetal al 10%, geneticina 600 µg/ml, y zeocina 400 µg/ml para seleccionar las células transformadas de modo estable. Después de 4 semanas en cultivo, una línea celular que expresa GalNAcT y sOLR1/LOX-1 se clona a partir de una única célula igual que anteriormente. El sOLR1/LOX-1 que tiene una penúltima GalNAc en lugar de Gal en sus N-glicanos (sOLR1/LOX-1-Gn) se aísla de los sobrenadantes del cultivo de estas células CHO y se purifica utilizando métodos cromatográficos conocidos en la técnica. El sLDLR-Gn se trata con neuraminidasa inmovilizada para eliminar los restos ácido N-acetilneuramínico terminales. El sOLR1/LOX-1 N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn) se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

Ejemplo 13 (comparación): Expresión del receptor 2 de sVEGF con galactosa terminal

55 Una forma soluble del receptor 2 de VEGF (sFlk-1) desde el aminoácido 20 al 764 (<http://www.expasy.org/uniprot/P35968>) se expresa en un sistema de baculovirus fundamentalmente como se ha

5 descrito (Huang, Gottstein *et al.*, 1998). El sFLk-1 resultante se purifica empleando métodos cromatográficos muy conocidos en la técnicas, y se trata con PNGasa (15,000 unidades, New England Biolabs, nº de catálogo P0704S), se inmoviliza sobre Affigel 10 (1 ml de esferas cargadas, BioRad Labs) según las instrucciones del fabricante, seguido de una lactosaminación química, según se describe en el ejemplo 3, para producir sFLk-1 lactosaminado (lac-sFLK-1). El lac-sFLK-1 se dializa contra PBS (500 ml, tres cambios) para eliminar los componentes de bajo peso molecular.

Ejemplo 14: Eliminación del exceso de TNF-alfa de la circulación en ratas

10 Se inyecta TNF-alfa humano en PBS (1 mg/ml en 0,1 ml de PBS) en la vena de la cola de ratas adultas anestesiadas (300 g), bien con PBS (0,1 ml), bien con sTNFR p55 (5 mg/ml en 0,1 ml de PBS), o bien con asialo-sTNFR p55 del ejemplo 1 (5 mg/ml en 0,1 ml de PBS). Comenzando en el momento 0, se extrajeron muestras de sangre (0,1 ml) a intervalos de 20 min durante 120 min. Se recoge el suero y se determina el nivel del TNF sérico mediante ELISA. La semivida del TNF sérico es de 30 min. Aumenta tras la coadministración de sTNFR p55 y disminuye tras la coadministración de asialo-sTNFR p55.

Ejemplo 15: Tratamiento de la artritis reumatoide con asialo-TNFR

15 El as-sTNFR del ejemplo 1 se administra a un paciente con artritis reumatoide por vía subcutánea a una dosis diaria de 50 mg/m².

Ejemplo 16 (comparación): Tratamiento de la hipercolesterolemia familiar con sLDLR-Gn

El sLDLR-Gn del ejemplo 8 o 10 se administra a un paciente cuyo colesterol sérico es mayor que 200 mg% por vía subcutánea o mediante infusión a una dosis diaria de 50 mg/m².

20 **Ejemplo 17 (comparación): Tratamiento de pacientes con un alto riesgo de desarrollar aterosclerosis con sOLR1/LOX-1-Gn**

El sOLR1/LOX-1-Gn del ejemplo 11 o 12 se administra a un paciente cuyo colesterol sérico es mayor que 200 mg% por vía subcutánea a una dosis diaria de 50 mg/m².

Ejemplo 18 (comparación): Tratamiento de pacientes con cáncer con lac-sFlk-1

25 El lac-sFLK-1 del ejemplo 13 se administra a un paciente con cáncer por vía subcutánea a una dosis diaria de 50 mg/m².

Lista de referencias

- Bernini, F., S. R. Tanenbaum, et al. (1986). "Enhanced catabolism of low density lipoproteins in rat by lactosaminated Fab fragment. A new carrier of macromolecules to the liver." *J Biol Chem* 261(20): 9294-9.
- 30 Bilheimer, D. W., N. J. Stone, et al. (1979). "Metabolic studies in familial hypercholesterolemia. Evidence for a gene-dosage effect in vivo." *J Clin Invest* 64(2): 524-33.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* 232(4746): 34-47.
- 35 Cardona, F., F. J. Tinahones, et al. (2003). "The elevated prevalence of apolipoprotein E2 in patients with gout is associated with reduced renal excretion of urates." *Rheumatology Oxford* 42(3): 468-72.
- Civeira, F. (2004). "Guidelines for the diagnosis and management of heterozygous familial hypercholesterolemia." *Atherosclerosis* 173(1): 55-68.
- Cummings, R. D., S. Kornfeld, et al. (1983). "Biosynthesis of N- and O-linked oligosaccharides of the low density lipoprotein receptor." *J Biol Chem* 258(24): 15261-73.
- 40 Do, K. Y., S. I. Do, et al. (1997). "Differential expression of LacdiNAc sequences (GalNAc beta 1-4GlcNAc-R) in glycoproteins synthesized by Chinese hamster ovary and human 293 cells." *Glycobiology* 7(2): 183-94.
- Fischer, D. G., N. Tal, et al. (1993). "An antiviral soluble form of the LDL receptor induced by interferon." *Science* 262(5131): 250-3.
- 45 Fisher, C., D. Abdul-Aziz, et al. (2004). "A two-module region of the low-density lipoprotein receptor sufficient for formation of complexes with apolipoprotein E ligands." *Biochemistry* 43(4): 1037-44.
- Gent, J. and I. Braakman (2004). "Low-density lipoprotein receptor structure and folding." *Cell Mol Life Sci* 61(19-20): 2461-70.

- Goldsmith, D. R. and A. J. Wagstaff (2005). "Spotlight on etanercept in plaque psoriasis and psoriatic arthritis." *BioDrugs* 19(6): 401-3.
- Grundny, S. M. (1983). "Absorption and metabolism of dietary cholesterol." *Annu Rev Nutr* 3: 71-96.
- 5 Hatters, D. M., C. A. Peters-Libeu, et al. (2006). "Apolipoprotein E structure: insights into function." *Trends Biochem Sci* 31(8): 445-54.
- Heaney, M. L. and D. W. Golde (1998). "Soluble receptors in human disease." *J Leukoc Biol* 64(2): 135-46.
- Horiuchi, S., Y. Sakamoto, et al. (2003). "Scavenger receptors for oxidized and glycated proteins." *Amino Acids* 25(3-4): 283-92.
- 10 Huang, X., C. Gottstein, et al. (1998). "Expression of soluble VEGF receptor 2 and characterization of its binding by surface plasmon resonance." *Biochem Biophys Res Commun* 252(3): 643-8.
- Hussain, M. M., D. K. Strickland, et al. (1999). "The mammalian low-density lipoprotein receptor family." *Annu Rev Nutr* 19: 141-72.
- Idriss, H. T. and J. H. Naismith (2000). "TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s)." *Microsc Res Tech* 50(3): 184-95.
- 15 Ishigaki, T., I. Ohki, et al. (2005). "Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of the ligand-binding domain of human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX-1)." *Acta Crystallograph Sect F Struct Biol Cryst Commun* 61(Pt 5): 524-7.
- Johs, A., M. Hammel, et al. (2006). "Modular structure of solubilized human apolipoprotein B-100. Low resolution model revealed by small angle neutron scattering." *J Biol Chem* 281(28): 19732-9.
- 20 Kataoka, H., N. Kume, et al. (2000). "Biosynthesis and post-translational processing of lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 (LOX-1). N-linked glycosylation affects cell-surface expression and ligand binding." *J Biol Chem* 275(9): 6573-9.
- Kawar, Z. S., S. M. Haslam, et al. (2005). "Novel poly-GalNAcbeta1-4GlcNAc (LacdiNAc) and fucosylated poly-LacdiNAc N-glycans from mammalian cells expressing beta1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase and alpha1,3-fucosyltransferase." *J Biol Chem* 280(13): 12810-9.
- 25 Kita, T., N. Kume, et al. (2001). "Role of oxidized LDL in atherosclerosis." *Ann N Y Acad Sci* 947: 199-205; discussion 205-6.
- Kong, W.-J., J. Liu, et al. (2006). "Human low-density lipoprotein receptor gene and its regulation." *J. Molec. Med.* 84(1): 29-36.
- 30 Mahley, R. W. (1988). "Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology." *Science* 240(4852): 622-30.
- McCormack, P. L. and K. Wellington (2004). "Etanercept: in ankylosing spondylitis." *BioDrugs* 18(3): 199-205; discussion 206.
- 35 Murase, T., N. Kume, et al. (2000). "Identification of soluble forms of lectin-like oxidized LDL receptor-1." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(3): 715-20.
- Murray, C. J. and A. D. Lopez (1997). "Global mortality, disability, and the contribution of risk factors: Global Burden of Disease Study." *Lancet* 349(9063): 1436-42.
- Nakajima, K., T. Nakano, et al. (2006). "The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma." *Clin Chim Acta* 367(1-2): 36-47.
- 40 Olofsson, S. O. and J. Boren (2005). "Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis." *J Intern Med* 258(5): 395-410.
- Park, E. I., Y. Mi, et al. (2005). "The asialoglycoprotein receptor clears glycoconjugates terminating with sialic acid alpha 2,6GalNAc." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(47): 17125-9.
- 45 Rensen, P. C., L. A. Sliedregt, et al. (2006). "Stimulation of liver-directed cholesterol flux in mice by novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids with high affinity for the asialoglycoprotein receptor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26(1): 169-75.

- Rensen, P. C., S. H. van Leeuwen, et al. (2004). "Design and synthesis of novel N-acetylgalactosamine-terminated glycolipids for targeting of lipoproteins to the hepatic asialoglycoprotein receptor." *J Med Chem* 47(23): 5798-808.
- 5 Rice, K. G., V. H. Thomas, et al. (2003). "Probing the binding specificity of C-type lectins in vivo." *Methods Enzymol* 363: 90-104.
- Robbesyn, F., R. Salvayre, et al. (2004). "Dual role of oxidized LDL on the NF-kappaB signaling pathway." *Free Radic Res* 38(6): 541-51.
- Sawamura, T., N. Kume, et al. (1997). "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." *Nature* 386(6620): 73-7.
- 10 Schwartzman, S., R. Fleischmann, et al. (2004). "Do anti-TNF agents have equal efficacy in patients with rheumatoid arthritis?" *Arthritis Res Ther* 6 Suppl 2: S3-S11.
- Segrest, J. P., M. K. Jones, et al. (2001). "Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins." *J Lipid Res* 42(9): 1346-67.
- 15 Selmaj, K. W. (2000). "Tumour necrosis factor and anti-tumour necrosis factor approach to inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system." *Ann Rheum Dis* 59 Suppl 1:i94-102.
- Shi, X., S. Niimi, et al. (2001). "Characterization of residues and sequences of the carbohydrate recognition domain required for cell surface localization and ligand binding of human lectin-like oxidized LDL receptor." *J Cell Sci* 114(Pt 7): 1273-82.
- 20 Simmons, T., Y. M. Newhouse, et al. (1997). "Human low density lipoprotein receptor fragment. Successful refolding of a functionally active ligand-binding domain produced in *Escherichia coli*." *J Biol Chem* 272(41): 25531-6.
- Smirnova, I. V., T. Sawamura, et al. (2004). "Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency." *Am J Physiol Renal Physiol* 287(1): F25-32.
- Spady, D. K. (1992). "Hepatic clearance of plasma low density lipoproteins." *Semin Liver Dis* 12(4): 373-85.
- 25 Tulenko, T. N. and A. E. Sumner (2002). "The physiology of lipoproteins." *J Nucl Cardiol* 9(6): 638-49.
- Twisk, J., D. L. Gillian-Daniel, et al. (2000). "The role of the LDL receptor in apolipoprotein B secretion." *J Clin Invest* 105(4): 521-32.
- Westerlind, U., J. Westman, et al. (2004). "Ligands of the asialoglycoprotein receptor for targeted gene delivery, part 1: Synthesis of and binding studies with biotinylated cluster glycosides containing N-acetylgalactosamine." *Glycoconj J* 21(5): 227-41.
- 30 Xie, Q., S. Matsunaga, et al. (2004). "Human lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 functions as a dimer in living cells." *DNA Cell Biol* 23(2): 111-7.
- Zhang, H., X. J. Li, et al. (2003). "Identification and quantification of N-linked glycoproteins using hydrazide chemistry, stable isotope labeling and mass spectrometry." *Nat Biotechnol* 21(6): 660-6.

35 También se describen los siguientes puntos:

1. Un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos que se une a una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada, que se ha modificado para que porte una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.
- 40 2. El receptor soluble o la proteína de unión modificado con glicanos de la reivindicación 1, seleccionado de un receptor soluble de la superfamilia de receptores de NGF, un receptor de LDL soluble o sus homólogos relacionados, un receptor captador soluble, OLR1/LOX-1 soluble, y FLk-1 soluble.
3. El receptor soluble o la proteína de unión modificado con glicanos de la reivindicación 1 o 2, seleccionado de TNFR soluble asialilado (as-sTNFR), asialo, agalacto-TNFR soluble (as-ag-sTNFR), TNFR soluble lactosaminado (lac-sTNFR), TNFR soluble N-acetilgalactosaminado (sTNFR-Gn), LDLR soluble N-acetilgalactosaminado (sLDLR-Gn), OLR1/LOX-1 soluble N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn), y FLk-1 soluble lactosaminado (lac-sFLK-1).
- 45 4. El uso de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación capaz de unirse a dicho receptor soluble o proteína de unión.

5. El uso según la reivindicación 4, en el que la lipoproteína o la lipoproteína oxidada se selecciona de LDL, VLDL, LDL oxidada, y lipoproteínas remanentes.
6. El uso según la reivindicación 4, en el que la citoquina o el factor del crecimiento se selecciona de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4/IL-13, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-29, activina, apor2L/TRAIL, APRIL, BAFF, TNFSF9, BMP-2, CD27L, BMP-3, BMP-7, CD30L, CD40L, CNTF, EGF, VEGF, FASL, FGF, CSF, FLT3, G-CSF, GDNF, GITRL, GM-CSF, GH, HGF, IGF I y II, IFN- α , IFN- γ , LIGHT, linfotoxina, M-CSF, MSP, NGF, NT-3, NT-4, OX-40L, PDGF, prolactina, SCF, TGF- α , TGF- β , TPO, TRANCE, TSLP y TWEAK.
7. El uso de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada.
8. El uso según el punto 7, en el que la patogénesis o el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección está asociado con un exceso de una lipoproteína o de una lipoproteína oxidada en la circulación.
9. El uso según el punto 8, en el que la lipoproteína o la lipoproteína oxidada se selecciona de LDL, VLDL, LDL oxidada, y lipoproteínas remanentes.
10. El uso según uno cualquiera de los puntos 7 a 9, en el que el trastorno es la hipercolesterolemia.
11. El uso según el punto 7, en el que la patogénesis o el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección está asociado con unos niveles o actividad de una citoquina o un factor del crecimiento seleccionado de IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4/IL-13, IL-5, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-14, IL-15, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-28A, IL-28B, IL-29, activina, apor2L/TRAIL, APRIL, BAFF, TNFSF9, BMP-2, CD27L, BMP-3, BMP-7, CD30L, CD40L, CNTF, EGF, VEGF, FASL, FGF, CSF, FLT3, G-CSF, GDNF, GITRL, GM-CSF, GH, HGF, IGF I y II, IFN- α , IFN- γ , LIGHT, linfotoxina, M-CSF, MSP, NGF, NT-3, NT-4, OX-40L, PDGF, prolactina, SCF, TGF- α , TGF- β , TPO, TRANCE, TSLP y TWEAK.
12. El uso según el punto 7, en el que la patogénesis o el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección es exacerbado por un exceso de un factor del crecimiento, o en el que el desarrollo de la enfermedad, el trastorno o la afección se mitiga reduciendo los niveles de un factor del crecimiento.
13. El uso según el punto 12, en el que la enfermedad es el cáncer.
14. El uso de un receptor de TNF (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF.
15. El uso según el punto 14, en el que la enfermedad, el trastorno o la afección está asociado con un exceso de TNF.
16. El uso según el punto 14 o 15, en el que la enfermedad es una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria.
17. El uso según el punto 16, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y la psoriasis.
18. El uso según el punto 16, en el que la enfermedad es la artritis reumatoide.
19. El uso según uno cualquiera de los puntos 14 a 16, en el que el receptor soluble se selecciona de as-sTNFR, as-ag-sTNFR, lac-sTNFR y/o sTNFR-Gn.
20. El uso según el punto 19, en el que el sTNFR es sTNFR p55.
21. El uso de un receptor de LDL soluble (sLDLR) modificado con glicanos, o sus homólogos relacionados, que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar la hipercolesterolemia.
22. El uso según el punto 21 para tratar la hipercolesterolemia familiar.
23. El uso según el punto 21 o 22, en el que el receptor soluble es sLDLR-Gn.
24. El uso de un OLR/LOX-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir la aterosclerosis en un individuo.
25. El uso según el punto 24, en el que el individuo está en alto riesgo de contraer aterosclerosis.

26. El uso según el punto 24 o 25, en el que el receptor soluble es sOLR1/LOX-1-Gn.
27. El uso de un FLk-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento del cáncer primario o la metástasis.
28. El uso según el punto 27, en el que el receptor soluble es FLk-1 lactosaminado (lac-sFLK-1).
- 5 29. Una composición farmacéutica que comprende un receptor soluble modificado con glicanos de uno cualquiera de los puntos 1 a 3 y un vehículo farmacéuticamente aceptable, para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación.
- 10 30. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable y un receptor soluble modificado con glicanos seleccionado de un asialo-TNFR soluble (as-sTNFR), asialo, agalacto-TNFR soluble (as-ag-sTNFR), TNFR soluble lactosaminado (lac-sTNFR), TNFR soluble N-acetilgalactosaminado (sTNFR-Gn), LDLR soluble N-acetilgalactosaminado (sLDLR-Gn), OLR1/LOX-1 soluble N-acetilgalactosaminado (sOLR1/LOX-1-Gn), y FLk-1 soluble lactosaminado (lac-sFLK-1), para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación.
- 15 31. Un método para facilitar la depuración de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada de la circulación, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos según uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
- 20 32. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos según uno cualquiera de los puntos 1 a 3.
- 25 33. Un método para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor de TNF soluble (sTNFR) que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.
- 30 34. Un método para tratar o prevenir la hipercolesterolemia, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un receptor de LDL soluble (sLDLR) modificado con glicanos, o sus homólogos relacionados, que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.
- 35 35. Un método para tratar o prevenir la aterosclerosis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un OLR1/LOX-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.
- 40 36. Un método para tratar el cáncer primario o la metástasis, que comprende administrar a un sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de un FLk-1 soluble modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal.
37. Un receptor soluble o una proteína de unión modificado con glicanos que se une a una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada, que se ha modificado para que porte una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para tratar o prevenir una enfermedad, un trastorno o una afección cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad de una citoquina, un factor del crecimiento, una lipoproteína o una lipoproteína oxidada.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, seleccionado de un asialo-TNFR soluble (as-sTNFR), asialo-agalacto-TNFR soluble (as-ag-sTNFR), TNFR soluble lactosaminado (lac-sTNFR), y TNFR soluble N-acetilgalactosaminado (sTNFR-Gn).
- 5 2.- El uso de un receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para la fabricación de un medicamento para tratar o prevenir una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles o la actividad del TNF.
- 3.- El uso según la reivindicación 2, en el que la enfermedad, el trastorno o la afección está asociado con un exceso de TNF y/o en el que el receptor soluble se selecciona de as-sTNFR, as-ag-sTNFR, lac-sTNFR y sTNFR-Gn.
- 10 4.- El uso según la reivindicación 2 o 3, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y la psoriasis.
- 5.- Una composición farmacéutica que comprende un receptor soluble modificado con glicanos de la reivindicación 1, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 15 6.- Un receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos que porta una Gal, GlcNAc o GalNAc terminal, para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad autoinmunitaria o una enfermedad inflamatoria cuya patogénesis o desarrollo está asociado con los niveles y/o la actividad del TNF.
- 7.- El receptor de TNF soluble (sTNFR) modificado con glicanos según la reivindicación 6, para su uso según se define en la reivindicación 6, en el que la enfermedad autoinmunitaria se selecciona de la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, y la psoriasis.

20

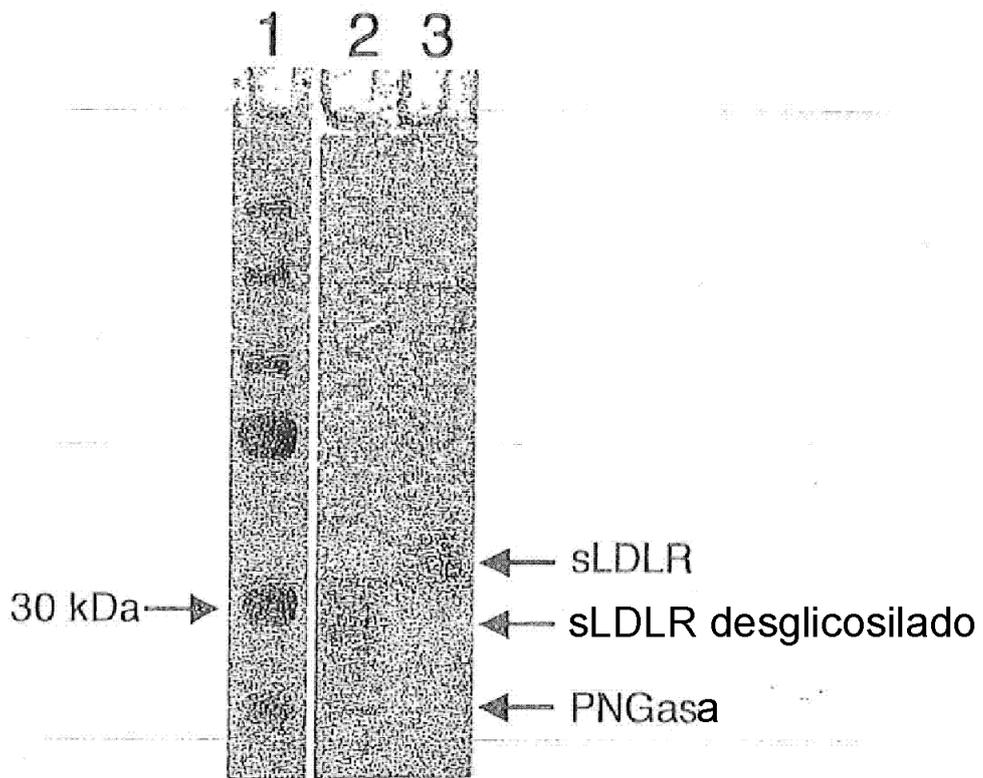


Figura 1

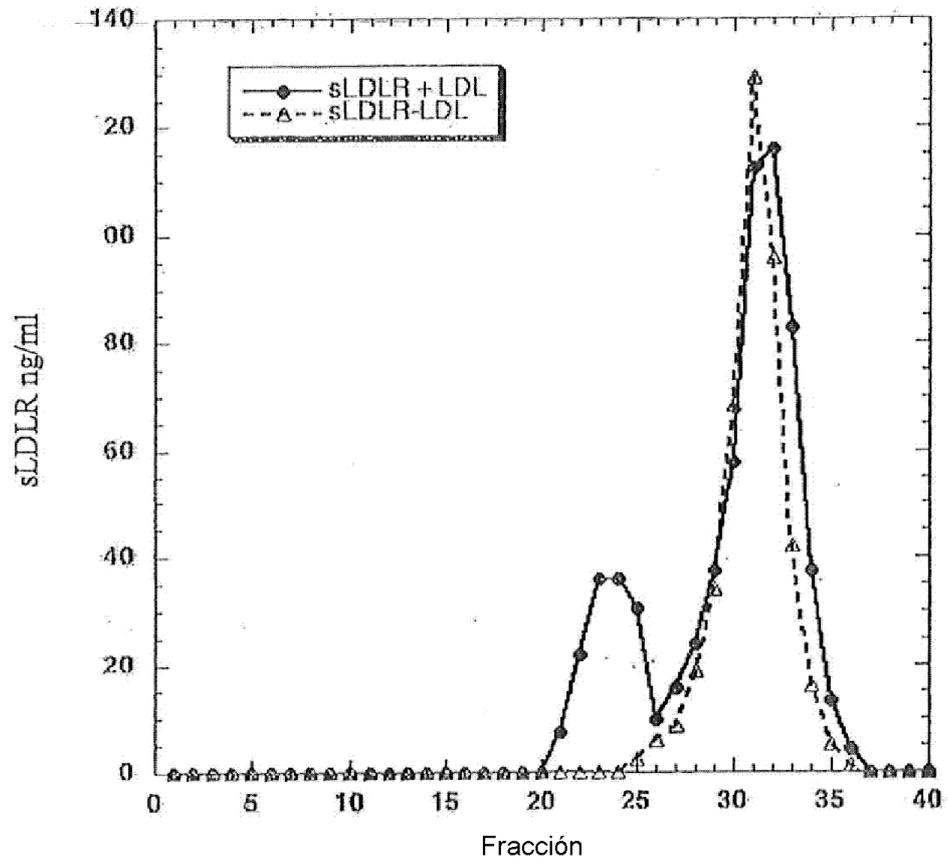


Figura 2