

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 449 483**

51 Int. Cl.:

C12N 9/10 (2006.01)

A61K 38/45 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.07.2008 E 08796592 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2181190**

54 Título: **Enzimas lecitina-colesterol aciltransferasa modificadas**

30 Prioridad:

26.07.2007 US 952007 P

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

19.03.2014

73 Titular/es:

**AMGEN, INC (100.0%)
Patent Operations, M/S 28-2-C One Amgen Center
Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**ZHOU, MINGYUE;
BOONE, THOMAS;
MEININGER, DAVID PARK;
SCHWARTZ, MARGRIT;
SHAN, BEI y
SHEN, WENYAN**

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 449 483 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

Enzimas lecitina-colesterol aciltransferasa modificadas.

Campo de la invención

5 Esta invención se refiere en general al campo de la medicina y, más específicamente, a composiciones y a métodos para tratar cardiopatía coronaria, aterosclerosis, trastornos inflamatorios y trastornos asociados con trombosis.

Antecedentes de la invención

10 Más de 50 millones de estadounidenses tienen problemas cardiovasculares, y muchos otros países se enfrentan a tasas altas y crecientes de enfermedad cardiovascular. Es la causa número uno de muerte y discapacidad en los Estados Unidos y la mayoría de los países europeos. En el momento en el que se detectan problemas cardiacos, la causa subyacente, la aterosclerosis, habitualmente está bastante avanzada, habiendo progresado durante décadas.

15 La aterosclerosis es una enfermedad compleja poligénica de mamíferos caracterizada por los depósitos o placas de lípidos y otros derivados sanguíneos en las paredes arteriales (aorta, arterias coronarias y carótida). Estas placas pueden estar calcificadas en un mayor o menor grado según la progresión del proceso. También están asociadas con la acumulación de depósitos grasos que consisten principalmente en ésteres de colesterol en las arterias. El colesterol se acumula en las células espumosas de la pared arterial, estrechando de ese modo la luz y disminuyendo el flujo de sangre. Esto va acompañado por un engrosamiento de la pared arterial, con hipertrofia del músculo liso, la aparición de células espumosas y la acumulación del tejido fibroso. Por tanto, la hipercolesterolemia puede dar como resultado patologías cardiovasculares muy graves tales como infarto, enfermedad vascular periférica, accidente cerebrovascular, muerte súbita, descompensación cardíaca, accidentes vasculares cerebrales y similares.

20 El colesterol se porta en la sangre por diversas lipoproteínas incluyendo las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), las lipoproteínas de baja densidad (LDL) y las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Las VLDL se sintetizan en el hígado y se convierten en LDL en la sangre, lo que hace posible suministrar colesterol a los tejidos periféricos. En cambio, las HDL capturan moléculas de colesterol de los tejidos periféricos y las transportan al hígado en el que se convierten en ácidos biliares y se excretan. El desarrollo de aterosclerosis y el riesgo de cardiopatía coronaria (CPC) se correlacionan de manera inversa con los niveles de HDL en el suero. Gordon *et al.* (1989) N. Engl. J. Med. 321: 1311; Goldbourt *et al.* (1997) Thromb Vasc. Biol. 17: 107. Se producen a menudo bajos niveles de colesterol HDL en el contexto de obesidad central, diabetes y otras características del síndrome metabólico. Goldbourt *et al.*, citado anteriormente. Se ha sugerido que bajos niveles de colesterol HDL están asociados con un aumento del riesgo de CPC, mientras que altas concentraciones de HDL tienen un efecto protector frente al desarrollo de aterosclerosis prematura. Gordon *et al.* (1986) Circulation 74: 1217. Estudios demostraron que el riesgo de desarrollo de aterosclerosis clínica en hombres desciende un 2-3% con cada aumento de 1 mg/dl en la concentración de HDL en plasma. Gordon *et al.* (1989) N. Engl. J. Med. 321: 1311. Se ha establecido que pueden reducirse las concentraciones de colesterol LDL mediante tratamiento con estatinas, inhibidores de la enzima de biosíntesis de colesterol 3-hidroxil-3-metilglutaril coenzima A reductasa y de ese modo este tratamiento se ha usado como enfoque satisfactorio para reducir el riesgo de aterosclerosis cuando la indicación primaria es un nivel de LDL alto. Sin embargo, sigue estando poco claro si las estatinas son beneficiosas para pacientes cuya anomalía lipídica primaria es colesterol HDL bajo.

40 La lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) es una enzima que cataliza la esterificación de colesterol libre mediante la transferencia de un grupo acilo de la fosfatidilcolina sobre el grupo 3-hidroxilo del colesterol, formando éster de colesterilo y lisofosfatidilcolina. McLean *et al.* (1986) Proc. Natl. Acad Sci. 83: 2335 y McLean *et al.* (1986) Nucleic Acids Res. 14(23): 9397. Se sintetiza LCAT en el hígado y se secreta al plasma, donde se combina con HDL, denominadas lipoproteínas antiaterogénicas. Estas partículas de HDL tienen la capacidad de aceptar el colesterol en exceso, que entonces se esterifica mediante LCAT en las partículas de HDL. Las moléculas de éster de colesterilo en las partículas de HDL o bien se transportan al hígado directamente a través del receptor SR-BI, o bien se transfieren a lipoproteínas que contienen apoB, incluyendo lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y LDL, mediada por CETP, y entonces se transportan al hígado a través de la ruta del receptor de LDL. Este mecanismo, denominado transporte de colesterol inverso (Glomset (1968) J. Lipid Res. 9:155), permite la eliminación del colesterol en exceso del cuerpo, y por tanto está implicado en la prevención de la aterogénesis. LCAT desempeña un papel clave en este proceso creando un gradiente de colesterol libre entre las membranas plasmáticas y las lipoproteínas circulantes.

Wang *et al.* (2000). Biochim. Biophys. Acta 1488 (3), 268-277 tratan la importancia de los grupos sulfhidrido libres de LCAT para determinar su sensibilidad a la inactivación oxidativa.

55 Esta invención proporciona proteínas LCAT modificadas con estabilidad y/o actividad enzimática aumentada y métodos para el tratamiento de cardiopatía coronaria, aterosclerosis, trastornos inflamatorios y trastornos asociados con trombosis usando estas proteínas LCAT modificadas.

Sumario de la invención

La invención se refiere a:

1. Una proteína lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) modificada, en la que la proteína LCAT modificada comprende una modificación en la secuencia de aminoácidos de LCAT madura expuesta en SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2 tal como se expone en la figura 2; y la modificación consiste en una sustitución en el residuo de aminoácido C31 seleccionada del grupo que consiste en C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31R y C31H.
2. Una proteína lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) modificada, en la que la proteína LCAT modificada comprende una modificación en la secuencia de aminoácidos de LCAT madura expuesta en SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2 tal como se expone en la figura 2; y la modificación consiste en una sustitución en el residuo de aminoácido C31 seleccionada del grupo que consiste en C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31R y C31H, y una sustitución adicional en una posición de residuo de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en F1, L4, N5, V28, P29, G30, L32, G33 y N34.
3. La proteína LCAT modificada de 2, en la que la sustitución adicional se selecciona del grupo que consiste en F1A, L4F, N5E, N5Q, N5D, N5A, V28A, V28I, V28C, V28T, V28R, P29G, P29F, P29T, G30A, G30I, L32A, L32I, L32M, L32F, L32C, L32W, L32Y, L32T, L32S, L32N, L32H, L32E, G33I, G33M, G33F, G33S, G33H, N34A, N34C, N34S y N34R.
4. La proteína LCAT modificada de 2, en la que la sustitución C31 es una sustitución C31Y y la sustitución adicional es en una posición de residuo de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en F1, L4, N5, L32 y N34.
5. La proteína LCAT modificada de 4, en la que la sustitución adicional se selecciona del grupo que consiste en F1S, F1W, L4F, L4M, N5D, L4K, N34S, L32F y L32H.
6. La proteína LCAT modificada de 5, que comprende una sustitución L4F y una sustitución C31Y.
7. La proteína LCAT modificada de 5, que comprende una sustitución C31Y, en la que la sustitución adicional es una sustitución N5D.
8. La proteína LCAT modificada de 4, que comprende una sustitución N5 y una sustitución C31Y.
9. La proteína LCAT modificada de 4, que comprende una sustitución L4 y una sustitución C31Y.
10. La proteína LCAT modificada de uno cualquiera de 1-9, que tiene una actividad enzimática mayor que la proteína LCAT silvestre expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tal como se determina en un ensayo de tasa de esterificación de colesterol (CER) de la actividad de LCAT plasmática.
11. Una proteína LCAT modificada que comprende la proteína LCAT de cualquiera de 1-10 y un vehículo.
12. La proteína LCAT modificada de 11, en la que el vehículo se selecciona del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina (Fc), un polímero soluble en agua y polietilenglicol.
13. Una composición farmacéutica que comprende una proteína LCAT modificada de uno cualquiera de 1-12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
14. Una proteína LCAT modificada de uno cualquiera de 1-12 para su uso en terapia.
15. Una proteína LCAT modificada de uno cualquiera de 1-12, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LCAT.
16. La proteína LCAT modificada de 15 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LCAT, seleccionándose el trastorno relacionado con LCAT del grupo que consiste en aterosclerosis, inflamación, trombosis, cardiopatía coronaria, tensión arterial alta, síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades y angina de pecho.
17. La proteína LCAT modificada de 15, en la que la terapia es para aumentar el colesterol HDL, o prevenir la acumulación de colesterol.
18. La proteína LCAT modificada de 15, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular.

19. La proteína LCAT modificada de 15, para su uso en el tratamiento o la prevención de aterosclerosis.

20. La proteína LCAT modificada de uno cualquiera de 15-19, administrándose la proteína LCAT en combinación con un agente adicional.

5 21. La proteína LCAT modificada de 20, en la que el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en una citocina, un fármaco contra la aterosclerosis, un fármaco hipocolesterolemiante, un inhibidor de ACE, un fármaco antiinflamatorio y un fármaco antitrombosis y un fármaco antidiabético.

10 Se dan a conocer en el presente documento proteínas LCAT modificadas que comprenden una sustitución de aminoácido en una secuencia de aminoácidos de proteína LCAT silvestre. En una realización, la proteína LCAT modificada es más activa enzimáticamente que la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada. En otra realización, la proteína LCAT modificada aumenta los niveles de lipoproteína de alta densidad (HDL) en un grado que es mayor que la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada. En otra realización, la proteína LCAT modificada es más estable *in vivo*, o menos inmunogénica que la proteína silvestre de la que se derivó.

15 En una divulgación, la proteína LCAT modificada comprende una sustitución de residuo de aminoácido en la posición 31 en SEQ ID NO: 1 o se sustituye en una posición en una secuencia de aminoácidos de proteína LCAT silvestre ortóloga correspondiente a la posición 31 en SEQ ID NO: 1. En diversas realizaciones y divulgaciones, la proteína LCAT modificada se deriva de proteína LCAT silvestre de rata, de ratón, de hámster, de mono, de conejo o de ser humano.

20 En otra divulgación, la proteína LCAT modificada se deriva de una secuencia de aminoácidos de LCAT silvestre expuesta en SEQ ID NO: 1, e incluye una sustitución en la posición F1, L3, L4, N5, L7, C31, N384 o E416. En diversas divulgaciones, la sustitución es F1A, F1G, F1I, F1L, F1M, F1P, F1V, F1C, F1Y, F1T, F1Q, F1N, F1H o F1D. En otras divulgaciones, la sustitución es L3I, L3F, L3C, L3W o L3Y. Todavía en otras divulgaciones, la sustitución es L4A, L4I, L4M, L4F, L4V, L4W, L4Y, L4T, L4Q o L4R. Todavía en otras divulgaciones, la sustitución es N5A, N5M, N5H, N5K, N5D o N5E. Aún en otras divulgaciones, la sustitución es L7M, L7F o L7E. En determinados aspectos y divulgaciones, la sustitución es C31A, C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31T, C31R o C31H. Todavía en otras divulgaciones, la sustitución es N384C, N384Q o E416C.

30 En otras realizaciones y divulgaciones, la proteína LCAT modificada comprende una sustitución en la posición C31 en SEQ ID NO: 1 y una sustitución en la posición de residuo de aminoácido F1, L4, N5, V28, P29, G30, L32, G33 o N34. En diversos aspectos y divulgaciones, la sustitución es F1A, L4F, N5E, N5Q, N5D, N5A, V28A, V28I, V28C, V28T, V28R, P29G, P29F, P29T, G30A, G30I, L32A, L32I, L32M, L32F, L32C, L32W, L32Y, L32T, L32S, L32N, L32H, L32E, G33I, G33M, G33F, G33S, G33H, N34A, N34C, N34S o N34R. En otros aspectos y divulgaciones, la sustitución en la posición C31 es C31A, C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31T, C31R o C31H. En una realización, la proteína LCAT modificada comprende una sustitución C31Y y una sustitución de adición F1, L4, L32, o N34, y en determinados aspectos, estas sustituciones son F1S, F1W, L4M, L4K, N34S, L32F o L32H.

35 Todavía en otras realizaciones, una proteína LCAT modificada descrita en el presente documento incluye además un vehículo, y en diversas realizaciones, el vehículo es una región constante de inmunoglobulina (Fc) o un polímero soluble en agua o, más específicamente, un polímero soluble en agua que es polietilenglicol.

40 En otras divulgaciones, una LCAT modificada tal como se proporciona en el presente documento incluye una región de secuencia de aminoácidos amino-terminal de proteína LCAT silvestre que está duplicada y unida covalentemente a un extremo terminal de la proteína LCAT modificada. En una divulgación, la región de secuencia de aminoácidos amino-terminal de proteína LCAT silvestre tiene de 10 a 15 aminoácidos de longitud. En otras divulgaciones, la región de la secuencia de aminoácidos de proteína LCAT silvestre está duplicada y unida covalentemente al extremo amino-terminal de la proteína LCAT modificada, el extremo carboxilo-terminal de la proteína LCAT modificada o ambos.

45 También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden una proteína LCAT modificada tal como se proporciona en el presente documento y un portador farmacéuticamente aceptable.

50 También se proporcionan usos de tratamiento de un trastorno relacionado con LCAT que comprenden la etapa de administrar una cantidad de una proteína LCAT modificada proporcionada en el presente documento en una cantidad eficaz para tratar dicho trastorno. En diferentes realizaciones, la LCAT modificada se administra por vía intravenosa o se administra mediante un bolo. En diversos aspectos en los usos, el trastorno relacionado con LCAT es aterosclerosis, inflamación, trombosis, cardiopatía coronaria, tensión arterial alta, síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades y/o angina de pecho.

55 También se proporciona un uso para aumentar el colesterol HDL en un sujeto que comprende la etapa de administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína LCAT modificada proporcionada en el presente documento.

La invención proporciona además un uso para prevenir la acumulación de colesterol en un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína LCAT modificada tal como se proporciona en el presente documento.

Descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 proporciona números de acceso de Genbank para proteínas LCAT silvestres que pueden producir proteínas LCAT modificadas.

La figura 2 proporciona la secuencia de aminoácidos del número de acceso de Genbank AAA59499 (SEQ ID NO: 2).

Descripción detallada de la invención

I. Definiciones

- 10 El término "LCAT" o "lecitina-colesterol aciltransferasa", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una enzima glicoproteica silvestre que cataliza la síntesis de ésteres de colesterol y lisolecitina a partir de fosfatidilcolina y colesterol no esterificado presentes en lipoproteínas. Esta enzima se produce principalmente por el hígado y circula en la sangre unida de manera reversible a lipoproteínas. LCAT humana (SEQ ID NO: 1; n.º de acceso de Genbank AAB34898) tiene una masa de polipéptido de 49 kDa, o alrededor de 67 kDa con la masa de hidratos de carbono añadidos. Se representan en la figura 1 diversas secuencias de aminoácidos de LCAT para obtener una proteína LCAT modificada útil en esta invención.

LCAT humana (SEQ ID NO: 1; n.º de acceso de Genbank AAB34898)

```
FWLLNVLFPP HTTPKAELSN HTRPVILVPG CLGNQLEAKL DKPDVVNWMC
YRKIEDFFTI WLDLNMFLCL GVDCWIDNTR VVYNRSSGLV SNAPGVQIRV
PGFGKTYSE YLDSSKLAGY LHTLVQNLVN NGYVRDETVR AAPYDWRLEP
GQQEYYRKL AGLVEEMHAA YGKPVFLIGH SLGCLHLLYF LLRQPQAWKD
RFIDGFISLG APWGGSIKPM LVLASGDNQG IPIMSSIKLK EEQRITTTSP
WMFPSRMAWP EDHVFISTPS FNYTGRDFQR FFADLHFEEG WYMWLQSRDL
LAGLPAPGVE VYCLYGVGLP TPRTYIYDHG FPYTDPVGLV YEDGDDTVAT
RSTELCGLWQ GRQPQPVHLL PLHGIQHLNM VFSNLTLEHI NAILLGAYRQ
GPPASPTASP EPPPPE
```

- 20 El término "LCAT modificada" se refiere a lecitina-colesterol aciltransferasa tal como se definió anteriormente, en la que uno o más aminoácidos en la proteína LCAT silvestre se sustituyen por otro aminoácido, o uno o más aminoácidos se añaden a o bien el extremo o bien el medio de la LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada. Las proteínas LCAT modificadas contempladas tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas en comparación con la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada. Más específicamente, una proteína LCAT modificada tiene o bien (i) actividad enzimática aumentada en comparación con la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada tal como se mide en las mismas condiciones de ensayo *in vitro*, (ii) capacidad aumentada para aumentar los niveles de HDL *in vivo* en comparación con la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada, (iii) tiempo de vida media o estabilidad en plasma aumentada, es decir, vida media circulatoria aumentada, en comparación con la estabilidad en plasma de la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada, y/o (iv) inmunogenicidad disminuida (es decir, provoca menos respuesta inmunitaria) en comparación con la proteína LCAT silvestre de la que se deriva la proteína LCAT modificada. Los ensayos para medir la actividad enzimática de LCAT incluyen, por ejemplo, el uso de un ensayo de apoAI-liposoma y el uso de un ensayo de actividad de LCAT en plasma, que determinan la tasa de esterificación de colesterol en un sistema artificial y en un sistema fisiológicamente relevante, respectivamente. Los ensayos para medir la estabilidad de LCAT *in vivo* incluyen ELISA, que determina la vida media de la proteína LCAT recombinante en la sangre tras la administración de proteína LCAT. Se contemplan fragmentos biológicamente activos de una proteína LCAT modificada en la medida en que el fragmento incluya el/los cambio(s) de aminoácido introducido(s) en la secuencia de aminoácidos de LCAT silvestre.

- Los términos "derivatizar", "derivado" o "derivatizado" comprenden procedimientos y proteínas LCAT modificadas resultantes en las que, por ejemplo y sin limitación, (1) el compuesto tiene una parte cíclica; por ejemplo, reticulación entre residuos de cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto está reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto tiene un residuo de cisteinilo y por tanto forma dímeros reticulados en cultivo o *in vivo*; (3) se reemplazan uno o más enlaces peptídicos por un enlace no peptídico; (4) se reemplaza el extremo N-terminal por -NRR₁, NRC(O)R₁, -NRC(O)OR₁, -NRS(O)₂R₁, -NHC(O)NHR, un grupo succinimida, o benciloxicarbonil-NH-sustituido o no sustituido, en el que R y R₁ y los sustituyentes del anillo son tal como se definen a continuación en el presente documento; (5) el extremo C-terminal se reemplaza por -C(O)R₂ o -NR₃R₄ en el que R₂, R₃ y R₄ son tal como se definen a continuación en el presente documento; y (6) compuestos en los que se modifican restos de

aminoácido individuales a través de tratamiento con agentes que pueden reaccionar con residuos terminales o cadenas laterales seleccionadas. La derivatización de una proteína LCAT modificada no cambia adicionalmente la secuencia de aminoácidos de proteína LCAT modificada, excepto en la medida en que la derivatización incluya la adición de uno o más residuos de aminoácido en el extremo carboxilo-terminal de la secuencia de aminoácidos de proteína LCAT modificada, el extremo amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de proteína LCAT modificada, o tanto el extremo carboxilo-terminal como el extremo amino-terminal de la secuencia de aminoácidos de proteína LCAT modificada. Además, una proteína LCAT modificada puede derivatizarse con una modificación de cadena lateral en un residuo de aminoácido, con la condición de que la modificación de cadena lateral de cisteína en la posición 31 en la secuencia de LCAT humana silvestre, y residuos de cisteína correspondientes en proteínas homólogas y ortólogas humanas tal como se identifican mediante alineación de secuencias de aminoácidos, incluyendo huecos necesarios, se excluyan del alcance de la invención. Además, se entenderá que siempre que se mencione “proteína LCAT modificada” en el presente documento, se contempla también un derivado de proteína LCAT modificada para ese aspecto de la invención descrita.

El término “farmacológicamente activo” significa que una sustancia así descrita se determina que tiene una actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, tensión arterial, recuento de células sanguíneas, nivel de colesterol) o estado patológico (por ejemplo, aterosclerosis, trastornos inflamatorio y de trombosis).

El término “sales fisiológicamente aceptables” comprende cualquier sal que se sepa o se descubra posteriormente que es farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos específicos son: acetato; trifluoroacetato; hidrácidos halogenados, tales como clorhidrato y bromhidrato; sulfato; citrato; tartrato; glicolato; y oxalato.

“Sustancialmente homogéneo” tal como se usa en el presente documento con referencia a una preparación de la invención significa que la preparación incluye una única especie de un compuesto terapéutico detectable en la preparación de moléculas terapéuticas totales en la preparación, a menos que se establezca lo contrario a un porcentaje específico de moléculas terapéuticas totales. En general, una preparación sustancialmente homogénea es lo suficientemente homogénea como para presentar las ventajas de una preparación homogénea, por ejemplo, facilidad de aplicación clínica y predictibilidad de la farmacocinética de lote a lote.

“Bioeficacia” se refiere a la capacidad para producir un efecto biológico deseado. La bioeficacia de diferentes compuestos, o diferentes dosificaciones del mismo compuesto, o diferentes administraciones del mismo compuesto se normalizan generalmente con respecto a la cantidad de compuesto(s) para permitir una comparación apropiada.

“Aterosclerosis” se refiere a un estado caracterizado por el endurecimiento y/o estrechamiento de las arterias provocado por la acumulación de placa ateromatosa dentro de las paredes arteriales. La placa ateromatosa se divide en tres componentes, (1) el ateroma, una acumulación nodular de un material escamoso blando en el centro de placas grandes, compuesto por macrófagos más próximos a la luz de la arteria; (2) zonas subyacentes de cristales de colesterol; (3) calcificación en la base externa de lesiones más avanzadas. Los indicadores de aterosclerosis incluyen, por ejemplo, el desarrollo de placas en las arterias, su calcificación, cuya magnitud puede determinarse mediante tinción con Sudán IV, o el desarrollo de células espumosas en las arterias. El estrechamiento de las arterias puede determinarse mediante angioplastia coronaria, CT ultrarrápida o ultrasonidos.

“Inflamación” o “trastorno inflamatorio” se refiere a una respuesta localizada, protectora provocada por lesión o destrucción de tejidos, que sirve para destruir, diluir o separar (secuestrar) tanto el agente perjudicial como el tejido lesionado. El término “enfermedad inflamatoria” o “estado inflamatorio” tal como se usa en el presente documento significa cualquier enfermedad en la que una respuesta inflamatoria excesiva o no regulada conduce a síntomas inflamatorios excesivos, daño al tejido huésped o pérdida de función tisular. Adicionalmente, el término “enfermedad autoinmunitaria”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquier grupo de trastornos en los que la lesión tisular está asociada con respuesta humoral o mediada por células a los propios constituyentes del cuerpo. El término “enfermedad alérgica”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquier síntoma, daño tisular o pérdida de función tisular que resulta de alergia. El término “enfermedad artrítica”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquiera de una gran familia de enfermedades que se caracterizan por lesiones inflamatorias de las articulaciones atribuibles a una variedad de etiologías. El término “dermatitis”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquiera de una gran familia de enfermedades de la piel que se caracterizan por inflamación de la piel atribuible a una variedad de etiologías. El término “rechazo de trasplante”, tal como se usa en el presente documento, significa cualquier reacción inmunitaria dirigida contra tejido injertado (incluyendo órganos y células (por ejemplo, médula ósea)), caracterizado por una pérdida de función de los tejidos injertados y circundantes, dolor, hinchazón, leucocitosis y trombocitopenia.

“Trombosis” y “trastorno relacionado con trombosis” se refieren a una formación de trombos anómala que provoca obstrucción de vasos sanguíneos y estados asociados con tal obstrucción. Los vasos sanguíneos funcionan bajo tensiones de cizallamiento significativas que son una función de la velocidad de cizallamiento del flujo de sangre. Frecuentemente, hay daño a vasos sanguíneos pequeños y capilares. Cuando se dañan estos vasos, se desencadena la hemostasia para detener la hemorragia. En circunstancias típicas, una lesión de este tipo se trata a través de una serie de acontecimientos denominados comúnmente “formación de trombos”. La formación de trombos depende de la adhesión, activación y agregación plaquetarias y la cascada de la coagulación que culmina en la conversión de fibrinógeno soluble en coágulo de fibrina insoluble. La formación de trombos en el sitio de la

herida previene la extravasación de componentes sanguíneos. Posteriormente, se produce la cicatrización de la herida y la disolución del coágulo y se restaura el flujo y la integridad del vaso sanguíneo.

El término "HDL" se refiere a las lipoproteínas de alta densidad.

El término "LDL", tal como se usa en el presente documento, significa las lipoproteínas de baja densidad.

5 El término "VLDL" se refiere a las lipoproteínas de muy baja densidad.

El término "tratamiento" o "tratar" incluye la administración a un sujeto que lo necesita de una cantidad farmacológicamente activa de una proteína LCAT modificada de la invención que inhibirá, disminuirá o revertirá el desarrollo de, por ejemplo, una aterosclerosis patológica, un trastorno inflamatorio o un trastorno relacionado con trombosis. En otro aspecto, tratamiento tal como se usa en el presente documento significa la administración, a un
10 sujeto que lo necesita, de una cantidad de un compuesto de la invención, que, con respecto a la aterosclerosis, aumentará los niveles de colesterol HDL. "Inhibir", en relación con inhibir la aterosclerosis, pretende significar prevenir, retardar, estabilizar o revertir la formación o el crecimiento de placas ateromatosas, trastorno inflamatorio o trastorno relacionado con trombosis. El tratamiento de enfermedades y trastornos en el presente documento pretende incluir también la administración terapéutica de una proteína LCAT modificada de la invención (o una sal farmacéutica, un derivado o un profármaco de la misma) o una composición farmacéutica que contiene la proteína LCAT modificada a un sujeto que se cree que necesita tratamiento para enfermedades y trastornos, tales como, por
15 ejemplo, trastornos inflamatorios, trastornos de trombosis, cardiopatía coronaria, tensión arterial alta, síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades, angina de pecho y similares. El tratamiento también abarca la administración de la proteína LCAT modificada o composición farmacéutica a sujetos a los que no se les ha diagnosticado que tienen una necesidad de la misma, es decir, administración profiláctica al sujeto, para la prevención de un estado o trastorno. Generalmente, al sujeto le diagnostica inicialmente un médico titulado y/o profesional médico autorizado, y se sugiere, recomienda o prescribe un régimen para el tratamiento profiláctico y/o terapéutico (agudo o crónico) mediante administración de la(s) proteína(s) LCAT modificada(s) o composiciones de
20 la invención.

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz" es la cantidad del compuesto de la invención que logrará el objetivo de mejora en la gravedad del trastorno y la frecuencia de incidencia. La mejora en la gravedad del trastorno incluye, por ejemplo con respecto a la aterosclerosis, la prevención de la acumulación de colesterol en las paredes de los vasos aumentando los niveles sanguíneos de colesterol HDL, la reversión de la aterosclerosis, así como la ralentización de
30 la progresión de la aterosclerosis, la prevención o el tratamiento de trastornos inflamatorios, y la prevención o el tratamiento de estados relacionados con trombosis.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sujeto" pretende significar un ser humano u otro mamífero, que presenta, o corre el riesgo de desarrollar, aterosclerosis, un trastorno inflamatorio o un trastorno relacionado con trombosis. Un individuo de este tipo puede tener, o puede correr el riesgo de desarrollar, por ejemplo, estados tales
35 como inflamación, trombosis, cardiopatía coronaria, tensión arterial alta, síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades, angina de pecho y similares. El pronóstico y las indicaciones clínicas de estos estados se conocen en la técnica.

II. Proteínas LCAT modificadas

40 A. Ensayos

Se conocen en la técnica ensayos para determinar la actividad enzimática de LCAT, la estabilidad en plasma (vida media de la enzima en el plasma) o los niveles de proteína LCAT en plasma. La actividad de LCAT absoluta en el suero y la tasa de esterificación de colesterol endógeno pueden determinarse tal como se describe, por ejemplo, en Albers J. *et al.* (1986) *Methods in Enzymol.* 129: 763-783; Dobiasova M. *et al.* (1983) *Adv. Lipid Res.* 20: 107-194. En
45 un aspecto, la actividad de LCAT puede determinarse midiendo la conversión de colesterol radiomarcado en éster de colesterol tras la incubación de sustratos de LCAT y LCAT radiomarcado que contienen Apo A-I. La tasa de esterificación de colesterol (CER, nmol de CE/ml por hora) puede medirse determinando la tasa de conversión de colesterol marcado en éster de colesterol tras la incubación de plasma que está radiomarcado con una cantidad traza de colesterol radiactivo mediante equilibrado con una mezcla de [¹⁴C] colesterol-albúmina a 4°C. La tasa de esterificación de colesterol endógeno (tal como se determina con el ensayo de actividad de LCAT en plasma) se refleja no sólo en la masa de LCAT, sino también en la naturaleza y cantidad de sustrato de LCAT y cofactor presentes en el suero, y por tanto proporciona una medida mejor de la actividad terapéutica de LCAT.

También se conocen en la técnica ensayos para medir la estabilidad de LCAT (vida media) en la sangre y la concentración de proteína LCAT en plasma. Tras su administración, pueden medirse los niveles de proteína LCAT recombinante en el plasma usando un ELISA descrito por JR Crowther: *ELISA theory and practice, methods in molecular Biology volumen 42*). Los reactivos para medir la estabilidad de LCAT y la concentración de proteína incluyen anticuerpos anti-LCAT, que están disponibles comercialmente de varios proveedores. Se facilitan a
55 continuación ejemplos de uso de este ensayo para determinar la actividad y/o estabilidad de la LCAT modificada.

B. Modificaciones de aminoácidos

Se proporcionan proteínas LCAT modificadas que comprenden una sustitución de aminoácido en una secuencia de aminoácidos de proteína LCAT silvestre. Debido a que la secuencia de aminoácidos en una proteína LCAT silvestre se modifica a través de sustitución de uno o más aminoácidos, la proteína LCAT modificada es, en un aspecto, una proteína que no se produce de manera natural. Las proteínas LCAT modificadas se derivan de cualquier proteína LCAT silvestre, exponiéndose proteínas LCAT silvestre a modo de ejemplo en la figura 1.

Para aspectos de la invención que incluyen el tratamiento de estados de seres humanos que surgen de trastornos relacionados con LCAT, la invención proporciona proteínas LCAT modificadas en las que una proteína LCAT humana se modifica para que incluya una o más sustituciones de aminoácidos, o una o más adiciones de aminoácidos, y en un aspecto, la secuencia de aminoácidos de LCAT humana silvestre se expone en SEQ ID NO: 1. En la discusión de aminoácidos específicos en la secuencia de proteína LCAT humana expuesta en SEQ ID NO: 1, el experto de experiencia habitual en la técnica entenderá que se contemplan y abarcan la misma o similar modificación en el mismo residuo de aminoácido o correspondiente en otras secuencias de aminoácidos de LCAT humana (es decir, variantes alélicas u otras secuencias de LCAT que se producen de manera natural) o en secuencias de aminoácidos de LCAT ortólogas. Con respecto a SEQ ID NO: 1, se contemplan sustituciones de aminoácidos en (usando designaciones de aminoácidos de una única letra seguido por la posición en la secuencia de proteína, es decir, "F1" indica fenilalanina en la posición 1 en SEQ ID NO: 1: F1, W2, L3, L4, N5, V6, L7, F8, P9, P10, H11, T12, T13, P14, K15, A16, E17, L18, S19, N20, H21, T22, R23, P24, V25, I26, L27, V28, P29, G30, C31, L32, G33, N34, Q35, L36, E37, A38, K39, L40, D41, K42, P43, D44, V45, V46, N47, W48, M49, C50, Y51, R52, K53, T54, E55, D56, F57, F58, T59, I60, W61, L62, D63, L64, N65, M66, F67, L68, C69, L70, G71, V72, D73, C74, W75, I76, D77, N78, T79, R80, V81, V82, Y83, N84, R85, S86, S87, G88, L89, V90, S91, N92, A93, P94, G95, V96, Q97, I98, R99, V100, P101, G102, F103, G104, K105, T106, Y107, S108, V109, E110, Y111, L112, D113, S114, S115, K116, L117, A118, G119, Y120, L121, H122, T123, L124, V125, Q126, N127, L128, V129, N130, N131, G132, Y133, V134, R135, D136, E137, T138, V139, R140, A141, A142, P143, Y144, D145, W146, R147, L148, E149, P150, G151, Q152, Q153, E154, E155, Y156, Y157, R158, K159, L160, A161, G162, L163, V164, E165, E166, M167, H168, A169, A170, Y171, G172, K173, P174, V175, F176, L177, I178, G179, H180, S181, L182, G183, C184, L185, H186, L187, L188, Y189, F190, L191, L192, R193, Q194, P195, Q196, A197, W198, K199, D200, R201, F202, I203, D204, G205, F206, I207, S208, L209, G210, A211, P212, W213, G214, G215, S216, I217, K218, P219, M220, L221, V222, L223, A224, S225, G226, D227, N228, Q229, G230, I231, P232, I233, M234, S235, S236, I237, K238, L239, K240, E241, E242, Q243, R244, I245, T246, T247, T248, S249, P250, W251, M252, F253, P254, S255, R256, M257, A258, W259, P260, E261, D262, H263, V264, F265, I266, S267, T268, P269, S270, F271, N272, Y273, T274, G275, R276, D277, F278, Q279, R280, F281, F282, A283, D284, L285, H286, F287, E288, E289, G290, W291, Y292, M293, W294, L295, Q296, S297, R298, D299, L300, L301, A302, G303, L304, P305, A306, P307, G308, V309, E310, V311, Y312, C313, L314, Y315, G316, V317, G318, L319, P320, T321, P322, R323, T324, Y325, I326, Y327, D328, H329, G330, F331, P332, Y333, T334, D335, P336, V337, G338, V339, L340, Y341, E342, D343, G344, D345, D346, T347, V348, A349, T350, R351, S352, T353, E354, L355, C356, G357, L358, W359, Q360, G361, R362, Q363, P364, Q365, P366, V367, H368, L369, L370, P371, L372, H373, G374, I375, Q376, H377, L378, N379, M380, V381, F382, S383, N384, L385, T386, L387, E388. H389, I390, N391, A392, I393, L394, L395, G396, A397, Y398, R399, Q400, G401, P402, P403, A404, S405, A406, T407, A408, S409, P410, E411, P412, P413, P414, P415 y/o E416. Los aminoácidos en una o más de estas posiciones se sustituyen por cualquier aminoácido que se produce de manera natural o que no se produce de manera natural. Por ejemplo y sin limitación, la LCAT modificada comprende una sustitución C31Y y una sustitución en uno o más de residuos de aminoácido F1, L4, L32 y N34. En un aspecto, esta segunda sustitución es F1S, F1W, L4M, L4K, N34S, L32F y/o L32H.

En diversos aspectos, se proporcionan sustituciones particulares. Por ejemplo, y sin limitación, se sustituye un residuo de aminoácido alifático (G, A, V, L o I) por otro alifático, se sustituye un residuo de aminoácido aromático (F, Y o W) por otro residuo aromático, se reemplaza un residuo de cadena lateral de hidroxilo alifático (S o T) por otro residuo de cadena lateral de hidroxilo alifático, se reemplaza un residuo básico (K, R o H) por otro residuo de aminoácido básico, se reemplaza un residuo ácido (D o E) por otro residuo de aminoácido ácido, se reemplaza un residuo de cadena lateral de amida (N o Q) por otro residuo de cadena lateral de amida, se reemplaza un residuo hidrófobo (norleucina, M, A, V, L o I) por otro residuo hidrófobo, se reemplaza un residuo de aminoácido neutro (C, S, T, N o Q) por otro residuo neutro, se reemplaza un residuo que influye en la orientación de la cadena (G o P) por otro residuo que influye en la orientación de la cadena y/o se reemplaza un residuo de cadena lateral que contiene azufre (C o M) por otro residuo de cadena lateral que contiene azufre.

En otras divulgaciones, se introducen sustituciones conservativas en una secuencia de aminoácidos de LCAT silvestre.

Tabla 1

Residuo original	Sustituciones conservativas a modo de ejemplo
A	G, S
R	K
N	Q, H

D	E
C	S
Q	N
E	D
G	A, P
H	N, Q
I	L, V
L	I, V
K	R, Q, E
M	L, Y, I
F	M, L, Y
S	T
T	S
W	Y
Tyr	W, F
Val	I, L

Todavía otras sustituciones contempladas incluyen, también sin limitación, las expuestas en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Residuo original	Sustituciones a modo de ejemplo
A	V, L, I
R	K, Q, N
N	Q
D	E
C	S, A
Q	N
E	D
G	P, A
H	N, Q, K, R
I	L, V, M, A, F, Norleucina
L	Norleucina, I, V, M, A F
K	R, ácido 1-4-diamino-butírico, Q, N
M	L, F, I
F	L, V, I, A, Y
P	A
S	T, A, C
T	S
W	Y, F
Y	W, F, T, S
V	I, M, L, F, A, Norleucina

C. Derivados

- 5 Además de las proteínas LCAT modificadas descritas anteriormente, se contempla que una proteína LCAT modificada descrita anteriormente pueda sustituirse por otros “derivados” de proteínas LCAT modificadas. Tales derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, vida media biológica, y similares de los compuestos. Alternativamente, los restos pueden eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de los compuestos y similares.
- 10 Tales derivados de proteínas LCAT modificadas incluyen aquellos en los que:
1. Las proteínas LCAT modificadas o alguna parte de las mismas son cíclicas. Por ejemplo, la parte peptídica puede modificarse para que contenga dos o más residuos de cisteína (por ejemplo, en el ligador), que podrían ciclarse mediante formación de enlaces disulfuro.
 - 15 2. La proteína LCAT modificada se reticula o se hace que pueda reticularse entre moléculas. Por ejemplo, la parte peptídica puede modificarse para que contenga un residuo de cisteína y de ese modo pueda formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar. La proteína también puede reticularse a través de su extremo C-terminal.
 - 20 3. Se reemplaza uno o más enlaces peptídicos [-C(O)NR-] (uniones) por un enlace no peptídico. Enlaces no peptídicos a modo de ejemplo son -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-], fosfonato, -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-], urea [-NHC(O)NH-], -CH₂-amina secundaria y péptido alquilado [-C(O)NR₆- en el que R₆ es alquilo

inferior].

4. Se derivatiza el extremo N-terminal. Normalmente, el extremo N-terminal puede acilarse o modificarse para dar una amina sustituida. Los grupos derivados N-terminales a modo de ejemplo incluyen $-NRR^1$ (distinto de $-NH_2$), $-NRC(O)R^1$, $-NRC(O)OR^1$, $-NRS(O)_2R^1$, $-NHC(O)NHR^1$, succinimida o benciloxicarbonil-NH-(CBZ-NH-), en los R y R^1 son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo inferior con la condición de que R y R^1 no sean ambos hidrógeno y en los que el anillo de fenilo puede estar sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C_1-C_4 , alcoxilo C_1-C_4 , cloro y bromo; para dar un grupo succinimida; para dar un grupo benciloxicarbonil-NH-(CBZ-NH-); y péptidos en los que el extremo C-terminal libre se derivatiza para dar $-C(O)R_2$ en el que R_2 se selecciona del grupo que consiste en alcoxilo inferior y $-NR^3R^4$ en el que R^3 y R^4 se seleccionan independientemente del grupo que consiste en hidrógeno y alquilo inferior. Por "inferior" quiere decirse un grupo que tiene desde 1 hasta 6 átomos de carbono.

5. Se derivatiza el extremo C-terminal. Normalmente, el extremo C-terminal se esterifica o se amida. Por ejemplo, pueden usarse métodos descritos en la técnica para añadir $(NH-CH_2-CH_2-NH_2)_2$ a compuestos de esta invención en el extremo C-terminal. Asimismo, pueden usarse métodos descritos en la técnica para añadir $-NH_2$ a compuestos de esta invención en el extremo C-terminal. Los grupos derivados C-terminales a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, $-C(O)R_2$ en el que R_2 es alcoxilo inferior o $-NR^3R^4$ en el que R^3 y R^4 son independientemente hidrógeno o alquilo C_1-C_8 (o alquilo C_1-C_4).

6. Se reemplaza un enlace disulfuro por otro resto de reticulación, por ejemplo, más estable (por ejemplo, un alquilenos). Véase, por ejemplo, Bhatnagar *et al.* (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9; Alberts *et al.* (1993) Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9.

7. Se modifican uno o más residuos de aminoácido individuales. Se sabe que diversos agentes de derivatización reaccionan específicamente con residuos terminales o cadenas laterales seleccionadas, tal como se describe en detalle a continuación.

Adicionalmente, pueden introducirse modificaciones de aminoácidos individuales en la secuencia de aminoácidos de LCAT modificada haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana de la proteína con un agente de derivatización orgánico que puede reaccionar con residuos terminales o cadenas laterales seleccionadas. Las siguientes son a modo de ejemplo.

Pueden hacerse reaccionar residuos terminales de lisinilo y amino con anhídrido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico. La derivatización con estos agentes tiene el efecto de invertir la carga de los residuos de lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; piridoxal fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.

Pueden modificarse residuos de arginilo mediante reacción con uno o varios reactivos convencionales, entre ellos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginina requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al alto pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden hacerse reaccionar con los grupos de la lisina así como el grupo guanidino de arginina.

La modificación específica de residuos de tirosilo *per se* se ha estudiado extensamente, con particular interés en la introducción de marcadores espectrales en residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos de diazonio aromáticos o tetranitrometano. Lo más comúnmente, pueden usarse N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetilrosilo y derivados de 3-nitro, respectivamente.

Pueden modificarse selectivamente grupos laterales de carboxilo (aspartilo o glutamilo) mediante reacción con carbodiimidias ($R'-N=C=N-R'$) tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil)carbodiimida. Además, pueden convertirse residuos de aspartilo y glutamilo en residuos de asparaginilo y glutaminilo mediante reacción con iones amonio.

Se desamidán frecuentemente residuos de glutaminilo y asparaginilo para dar los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Alternativamente, estos residuos pueden desamidarse en condiciones ligeramente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra dentro del alcance de esta invención.

Pueden reemplazarse residuos de cisteinilo en una posición distinta del residuo 31 por residuos de aminoácido u otros restos o bien para eliminar la unión por enlaces disulfuro o bien, a la inversa, para estabilizar la reticulación. Véase, por ejemplo, Bhatnagar *et al.* (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9.

La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales con una matriz de soporte insoluble en agua u otros transportadores macromoleculares. Los agentes de reticulación comúnmente usados incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres disuccinimidílicos tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes de derivatización tales como 3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato de metilo producen

productos intermedio fotoactivables que pueden formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, pueden emplearse matrices insolubles en agua reactivas tales como hidratos de carbono activados con bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 para la inmovilización de proteínas.

- 5 Otras posibles modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, la fosforilación de grupos hidroxilo de residuos de serilo o treonilo, la oxidación del átomo de azufre en cisteína, la metilación de los grupos alfa-amino de cadenas laterales de lisina, arginina e histidina (Creighton, T.E., *Proteins: Structure and Molecule Properties*, W. H. Freeman & Co., San Francisco, págs. 79-86 (1983)), la acetilación de la amina N-terminal y, en algunos casos, la amidación de los grupos carboxilo C-terminales.
- 10 Tales restos derivatizados mejoran preferiblemente una o más características incluyendo actividad enzimática, solubilidad, absorción, vida media biológica, y similares de los compuestos de la invención. Alternativamente, los restos derivatizados dan como resultado compuestos que tienen las mismas, o esencialmente las mismas, características y/o propiedades del compuesto que no está derivatizado. Alternativamente, los restos pueden eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de los compuestos y similares.
- 15 Pueden unirse convenientemente grupos hidrato de carbono (oligosacárido) a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, se unen oligosacáridos unidos a O a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que se unen oligosacáridos unidos a N a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos que se producen de manera natural distintos de prolina. Las estructuras de oligosacáridos unidos a N y unidos a O y los residuos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es ácido N-acetilneuroamínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal de oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el ligador de los compuestos de esta invención y se glicosilan preferiblemente por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamíferos tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden glicosilarse además mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

- Pueden cambiarse proteínas LCAT modificadas de la presente invención al nivel del ADN, también. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede cambiarse a codones más compatibles con la célula huésped elegida. Para *E. coli*, que es la célula huésped en un aspecto, se conocen en la técnica codones optimizados. Pueden sustituirse codones para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar en el procesamiento del ADN en la célula huésped seleccionada. El vehículo, ligador y las secuencias de ADN del péptido pueden modificarse para incluir cualquiera de los cambios de secuencia precedentes.
- 30

- Otro conjunto de derivados útiles son las moléculas descritas anteriormente conjugadas con toxinas, trazadores o radioisótopos. Tal conjugación es especialmente útil para moléculas que comprenden secuencias peptídicas que se unen a células tumorales o patógenos. Tales moléculas pueden usarse como agentes terapéuticos o como ayuda en cirugía (por ejemplo, cirugía radioinmunoguiada o RIGS) o como agentes de diagnóstico (por ejemplo, radioinmunodiagnóstico o RID).
- 35

- Como agentes terapéuticos, estos derivados conjugados presentan varias ventajas. Facilitan el uso de toxinas y radioisótopos que serían tóxicos si se administrasen sin la unión específica proporcionada por la secuencia peptídica. También pueden reducir los efectos secundarios que acompañan al uso de radiación y quimioterapia facilitando la disminución de las dosis eficaces del compañero de conjugación.
- 40

Los compañeros de conjugación útiles incluyen:

- radioisótopos, tales como ⁹⁰itrio, ¹³¹yodo, ²²⁵actinio y ²¹³bismuto;
- 45 • toxina ricina A, toxinas derivadas de microbios tales como endotoxina de *Pseudomonas* (por ejemplo, PE38, PE40), y similares;
- moléculas compañeras en sistemas de captura (véase a continuación);
- biotina, estreptavidina (útiles como o bien moléculas compañeras en sistemas de captura o bien como trazadores, especialmente para uso de diagnóstico); y
- 50 • agentes citotóxicos (por ejemplo, doxorubicina).

- Una adaptación útil de estos derivados conjugados es su uso en un sistema de captura. En un sistema de este tipo, la molécula de la presente invención comprendería una molécula de captura benigna. Esta molécula de captura podría unirse específicamente a una molécula efectora separada que comprende, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo. Tanto la molécula conjugada con vehículo como la molécula efectora se administrarían al paciente. En un sistema de este tipo, la molécula efectora tendría una vida media corta excepto cuando está unida a la molécula
- 55

de captura conjugada con vehículo, minimizando por tanto cualquier efecto secundario tóxico. La molécula conjugada con vehículo tendría una vida media relativamente larga pero sería benigna y no tóxica. Las partes de unión específica de ambas moléculas pueden ser parte de una pareja de unión específica conocida (por ejemplo, biotina, estreptavidina) o pueden resultar de métodos de generación de péptidos tales como los descritos en el presente documento.

Tales derivados conjugados pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica. En el caso de moléculas efectoras proteicas (por ejemplo, endotoxina de *Pseudomonas*), tales moléculas pueden expresarse como proteínas de fusión a partir de constructos de ADN correlativos. Pueden prepararse derivados conjugados con radioisótopos, por ejemplo, tal como se describe para el anticuerpo BEXA (Coulter).

Pueden prepararse derivados que comprenden agentes citotóxicos o toxinas microbianas, por ejemplo, tal como se describe para el anticuerpo BR96 (Bristol-Myers Squibb). Pueden prepararse moléculas empleadas en sistemas de captura, por ejemplo, tal como se describe mediante las patentes, solicitudes de patente y publicaciones de NeoRx. Pueden prepararse moléculas empleadas para RIGS y RID, por ejemplo, mediante las patentes, solicitudes de patente y publicaciones de NeoProbe.

D. Vehículos/grupos transportadores

Los compuestos de la invención también pueden asociarse covalente o no covalentemente con una molécula transportadora, tal como un polímero lineal (por ejemplo, polietilenglicol, polilisina, dextrano, etc.), un polímero de cadena ramificada (véase, por ejemplo, la patente estadounidense 4.289.872; la patente estadounidense 5.229.490; el documento WO 93/21259); un lípido; un grupo colesterol (tal como un esteroide); o un hidrato de carbono u oligosacárido. Otros posibles transportadores incluyen restos de anticuerpo, y en particular regiones constantes derivadas de un anticuerpo. Todavía otros posibles transportadores incluyen una o más uniones a polímeros solubles en agua tales como polioxietilenglicol o polipropilenglicol tal como se describe en las patentes estadounidenses n.ºs: 4.640.835, 4.496.689, 4.301.144, 4.670.417, 4.791.192 y 4.179.337. Todavía otros polímeros útiles conocidos en la técnica incluyen monometoxi-polietilenglicol, dextrano, celulosa u otros polímeros a base de hidratos de carbono, poli-(N-vinilpirrolidona)-polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, un copolímero de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxetilados (por ejemplo, glicerol) y poli(alcohol vinílico), así como mezclas de estos polímeros.

1. Vehículos/transportadores de región constante de inmunoglobulina

En una realización, una proteína LCAT modificada de la invención incluye al menos un vehículo unido a la proteína a través del extremo N-terminal, el extremo C-terminal o una cadena lateral de uno de los residuos de aminoácido. En una realización, un dominio Fc es un vehículo. Por tanto, puede fusionarse un dominio Fc con los extremos N- o C-terminales de los péptidos o los extremos tanto N- como C-terminales. También pueden usarse múltiples vehículos, tal como se muestra a modo de ejemplo en el presente documento; por ejemplo, un Fc en cada extremo terminal o un Fc en un extremo terminal y un grupo PEG en el otro extremo terminal o una cadena lateral.

En diversas realizaciones, el componente de Fc es o bien un Fc nativo o bien una variante de Fc. A modo de ejemplo y sin limitación, el componente de Fc es una región Fc de la cadena pesada de IgG1 de inmunoglobulina humana o un fragmento, derivado o dímero biológicamente activo de la misma, véase Ellison, J.W. *et al.*, Nucleic Acids Res. 10:4071-4079 (1982). Sin embargo, se entiende que una región Fc para su uso en la invención puede derivarse de una IgG, IgA, IgM, IgE o IgD de cualquier especie. Los dominios Fc nativos están constituidos por polipéptidos monoméricos que pueden unirse para dar formas dimericas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y/o no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas oscila entre 1 y 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por enlaces disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison *et al.* (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9).

En diversas realizaciones, las secuencias de Fc contempladas incluyen las conocidas en la técnica tales como, por ejemplo, Fc IgG1 (n.º de acceso de GenBank P01857), Fc IgG2 (n.º de acceso de GenBank P01859), Fc IgG3 (n.º de acceso de GenBank P01860), Fc IgG4 (n.º de acceso de GenBank P01861), Fc IgA1 (n.º de acceso de GenBank P01876), Fc IgA2 (n.º de acceso de GenBank P01877), Fc IgD (n.º de acceso de GenBank P01880), Fc IgM (n.º de acceso de GenBank P01871) y Fc IgE (n.º de acceso de GenBank P01854).

Pueden construirse variantes, análogos o derivados de la parte de Fc, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias. En una realización, se incorpora una variante de Fc que comprende una molécula o secuencia que se humaniza a partir de una Fc nativa no humana. Alternativamente, una variante de Fc comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios de Fc nativos o residuos que afectan a o están implicados en (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con el complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto de un receptor salvaje o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), cada uno de los cuales se describe en detalle en la solicitud de patente estadounidense n.º

20040087778.

Los restos de polipéptido de Fc variantes (o análogos) incluyen cualquier variante de inserción, en la que uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de Fc. Las inserciones pueden estar ubicadas en cualquiera o ambos extremos terminales de la proteína, o pueden estar colocadas dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de Fc. Variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales, pueden incluir por ejemplo proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores o etiquetas de aminoácido. Por ejemplo, la molécula de Fc puede contener opcionalmente una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

En variantes de delección de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de Fc. Las deleciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido de Fc, o con eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de Fc. Las variantes de delección, por tanto, incluyen todos los fragmentos de una secuencia de polipéptido de Fc.

En variantes de sustitución de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido de Fc y se reemplazan por residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa y se conocen bien en la técnica sustituciones conservativas de este tipo. Alternativamente, la invención abarca sustituciones que son también no conservativas.

Por ejemplo, pueden deleccionarse o reemplazarse residuos de cisteína por otros aminoácidos para impedir la formación de parte o toda la reticulación por disulfuros de las secuencias de Fc. Cada residuo de cisteína puede eliminarse y/o sustituirse por otros aminoácidos, tales como Ala o Ser. Como otro ejemplo, también pueden hacerse modificaciones para introducir sustituciones de aminoácidos para (1) suprimir el sitio de unión a receptor de Fc; (2) suprimir el sitio de unión al complemento (C1q); y/o (3) suprimir el sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (CCDA). Tales sitios se conocen en la técnica, y cualquier sustitución conocida está dentro del alcance de Fc tal como se usa en el presente documento. Por ejemplo, véase *Molecular Immunology*, vol. 29, n.º 5, 633-639 (1992) con respecto a sitios de CCDA en IgG1.

Asimismo, pueden reemplazarse uno o más residuos de tirosina por residuos de fenilalanina. Además, también se contemplan otras inserciones, deleciones y/o sustituciones de aminoácidos variantes y están dentro del alcance de la presente invención. En una realización, éstas podrían ser sustituciones de aminoácidos conservativas. Además, las alteraciones pueden estar en forma de aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos.

Tal como se indicó anteriormente, tanto Fc nativo como variantes de Fc son dominios Fc adecuados para su uso dentro del alcance de esta invención. Un Fc nativo puede modificarse extensamente para formar una variante de Fc siempre que se mantenga la unión al receptor salvaje; véanse por ejemplo los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478. En tales variantes de Fc, pueden eliminarse uno o más sitios de un Fc nativo que proporcionan características estructurales o actividad funcional mediante las moléculas de fusión de esta invención. Pueden eliminarse estos sitios, por ejemplo, sustituyendo o deleccionando residuos, insertando residuos en el sitio o truncando partes que contienen el sitio. Los residuos insertados o sustituidos también pueden ser aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos. Pueden ser deseables variantes de Fc por varios motivos, varios de los cuales se describen a continuación. Las variantes de Fc a modo de ejemplo incluyen moléculas y secuencias en las que:

1. Se eliminan sitios implicados en la formación de enlaces disulfuro. Tal eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula huésped usada para producir las moléculas de la invención. Para este fin, puede truncarse el segmento que contiene cisteína en el extremo N-terminal o pueden deleccionarse o sustituirse residuos de cisteína por otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). Incluso cuando se eliminan residuos de cisteína, los dominios Fc de cadena sencilla pueden formar todavía un dominio Fc dimérico que se mantiene junto de manera no covalente.

2. Se modifica un Fc nativo para hacerlo más compatible con una célula huésped seleccionada. Por ejemplo, puede eliminarse la secuencia PA cerca del extremo N-terminal de un Fc nativo típico, que puede reconocerse por una enzima digestiva en *E. coli* tal como prolina iminopeptidasa. También puede añadirse un residuo de metionina N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

3. Se elimina una parte del extremo N-terminal de un Fc nativo para impedir la heterogeneidad N-terminal cuando se expresa en una célula huésped seleccionada. Para este fin, puede deleccionarse cualquiera de los primeros 20 residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, particularmente aquellos en las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.

4. Se eliminan uno o más sitios de glicosilación. Residuos que normalmente están glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir respuesta citolítica. Tales residuos pueden deleccionarse o sustituirse por residuos no glicosilados (por ejemplo, alanina).

5. Se eliminan sitios implicados en interacción con el complemento, tal como el sitio de unión a C1q. Por ejemplo, puede deleccionarse o sustituirse la secuencia EKK de IgG1 humana. El reclutamiento del complemento puede no ser

ventajoso para las moléculas de esta invención y de ese modo puede evitarse con una variante de Fc de este tipo.

6. Se eliminan sitios que afectan a la unión a receptores de Fc distintos de un receptor salvaje. Un Fc nativo puede tener sitios para la interacción con determinados glóbulos blancos que no se requieren para la fusión de moléculas de la presente invención y por tanto pueden eliminarse.

5 7. Se elimina el sitio de CCDA. Los sitios de CCDA se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a sitios de CCDA en IgG1. Estos sitios tampoco se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y por tanto pueden eliminarse.

10 8. Cuando el Fc nativo se deriva de un anticuerpo no humano, el Fc nativo puede humanizarse. Normalmente, para humanizar un Fc nativo, se sustituirán residuos seleccionados en el Fc nativo no humano por residuos que se encuentran normalmente en Fc nativo humano. Se conocen bien en la técnica técnicas para la humanización de anticuerpos.

15 Debe indicarse que monómeros de Fc se dimerizarán espontáneamente cuando están presentes los residuos de cisteína apropiados, a menos que estén presentes condiciones particulares que impidan la dimerización a través de la formación de enlaces disulfuro. Incluso si se eliminan los residuos de cisteína que forman normalmente enlaces disulfuro en el dímero de Fc o se reemplazan por otros residuos, las cadenas monoméricas formarán generalmente un dímero a través de interacciones no covalentes. El término "Fc" en el presente documento se usa para querer decir cualquiera de estas formas: el monómero nativo, el dímero nativo (unido por enlaces disulfuro), dímeros modificados (unidos por disulfuros y/o de manera no covalente) y monómeros modificados (es decir, derivados).

20 También pueden derivatizarse secuencias de Fc, es decir, que llevan modificaciones distintas de inserción, delección, o sustitución de residuos de aminoácido. En un aspecto, las modificaciones son de naturaleza covalente, e incluyen por ejemplo, enlaces químicos con polímeros, lípidos, otros restos orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, también se contemplan modificaciones no covalentes. Pueden prepararse derivados de la invención para aumentar la vida media circulante, o pueden diseñarse para mejorar la capacidad de direccionamiento del polipéptido a células, tejidos u órganos deseados.

25 También es posible usar el dominio de unión al receptor salvaje de la molécula de Fc intacta como la parte de Fc de un compuesto de la invención, tal como se describe en el documento WO 96/32478, titulado "Polipéptidos alterados con vida media aumentada". Miembros adicionales de la clase de moléculas designadas como Fc en el presente documento son aquéllas que se describen en el documento WO 97/34631, titulado "Dominios de tipo inmunoglobulina con vida medias aumentadas".

30 2. Vehículos de polímero soluble en agua

Tal como se indicó anteriormente, también se contemplan vehículos de polímero. Actualmente están disponibles diversos medios para unir restos químicos útiles como vehículos, véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 96/11953, titulada "Composiciones de proteínas modificadas químicamente de manera N-terminal y métodos". Esta publicación PCT da a conocer, entre otras cosas, la unión selectiva de polímeros solubles en agua al extremo N-terminal de proteínas.

35 Por tanto, la invención contempla compuestos que comprenden un polímero soluble en agua ("*water-soluble polymer*", WSP). Los WSP adecuados, clínicamente aceptables incluyen sin limitación PEG, polietilenglicol propionaldehído, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, poli(alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli-β-aminoácidos (o bien homopolímeros o bien copolímeros al azar), poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros poli(óxidos de alquileo), copolímeros de poli(óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxielados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polioles polioxielados, sorbitol polioxielado o glucosa polioxielada, ácidos colónicos u otros polímeros de hidratos de carbono, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos. De hecho, se proporciona cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas, tales como y sin limitación mono-alcoxi (C1-C10)- o ariloxi-polietilenglicol. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua.

45 El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio de PEG contemplado para su uso en la invención oscila entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. En otro aspecto, el resto de PEG tiene un peso molecular de desde aproximadamente 6 kDa hasta aproximadamente 25 kDa. Los grupos PEG generalmente se unen a péptidos o proteínas por medio de acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en el resto de PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) con un grupo reactivo en la proteína o el péptido diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster). Usando métodos descritos en el presente documento, puede prepararse una mezcla de moléculas de conjugados de polímero/péptido, y la ventaja proporcionada en el presente documento es la capacidad para seleccionar la proporción de conjugado de polímero/péptido que va a incluirse en la mezcla. Por tanto, si se desea, puede prepararse una mezcla de péptidos con diversos números de restos de polímero unidos

(es decir, cero, uno o dos) con una proporción determinada de conjugado de polímero/proteína.

Una estrategia útil para la pegilación de péptidos sintéticos consiste en combinar, a través de la formación de un enlace de conjugado en disolución, un péptido y un resto de WSP (PEG), llevando cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva hacia la otra. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos se "preactivan" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan completamente antes de reaccionar con el resto de PEG. El ligamiento del péptido con PEG tiene lugar habitualmente en fase acuosa y puede monitorizarse fácilmente mediante HPLC analítica de fase inversa. Los péptidos pegilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de desorción láser.

Los polímeros de polisacáridos son otro tipo de WSP que pueden usarse para la modificación de proteínas. Los dextranos son polímeros de polisacáridos compuestos por subunidades individuales de glucosa unidas de manera predominante mediante enlaces α 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, y está fácilmente disponible en pesos moleculares de desde aproximadamente 1 kD hasta aproximadamente 70 kD. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para su uso en la presente invención como vehículo por sí mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/11953 y WO 96/05309. Se ha notificado el uso de dextrano conjugado a inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico; véase, por ejemplo, la publicación de patente europea n.º 0 315 456. Se prefiere dextrano de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 20 kD cuando se usa dextrano como vehículo según la presente invención.

El resto de WSP de la molécula puede estar ramificado o no ramificado. Para uso terapéutico de la preparación de producto final, el polímero es farmacéuticamente aceptable. En general, se selecciona un polímero deseado basándose en consideraciones tales como si el conjugado de polímero se usará terapéuticamente, y si es así, la dosificación deseada, el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otras consideraciones. En diversos aspectos, el peso molecular promedio de cada WSP es de entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa. Aún en otro aspecto el peso molecular de cada polímero es de entre aproximadamente 6 kDa y aproximadamente 25 kDa. El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento y todo el tiempo, indica que en preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido. Generalmente, cuanto más alto sea el peso molecular o más ramificaciones haya, más alta será la razón de polímero/proteína. Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado incluyendo por ejemplo la duración de la liberación sostenida; los efectos, si hay alguno, sobre la actividad; la facilidad en la manipulación; el grado o la falta de antigenicidad y otros efectos conocidos de un polímero soluble en agua sobre una proteína terapéutica.

El WSP debe unirse a la proteína teniendo en consideración los efectos sobre dominios funcionales o antigénicos del péptido o la proteína. En general, puede realizarse derivatización química en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los grupos de activación que pueden usarse para unir el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen sin limitación sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Si se une al péptido mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo de modo que el grado de polimerización se controle.

3. Vehículos alternativos

Los vehículos alternativos incluyen una proteína, un polipéptido, un péptido o una molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto peptidomimético) que puede unirse a un receptor salvaje. Por ejemplo, podría usarse como vehículo un polipéptido tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.739.277. También podrían seleccionarse péptidos mediante presentación en fago para la unión al receptor salvaje FcRn. Tales compuestos de unión a receptor salvaje también se incluyen dentro del significado de "vehículo" y están dentro del alcance de esta invención. Tales vehículos deben seleccionarse para lograr un aumento de la vida media (por ejemplo, evitando secuencias reconocidas por proteasas) y una disminución de la inmunogenicidad (por ejemplo, favoreciendo secuencias no inmunogénicas, tal como se descubre en la humanización de anticuerpos).

III. Producción de proteínas LCAT modificadas/métodos de preparación

A. Polinucleótidos

Las proteínas descritas en el presente documento en gran parte pueden prepararse en células huésped transformadas usando técnicas de ADN recombinante. Para hacer esto, se prepara una molécula de ADN recombinante que codifica para el péptido. Se conocen bien en la técnica métodos de preparación de tales moléculas de ADN. Por ejemplo, podrían cortarse del ADN secuencias que codifican para los péptidos usando enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química, tales como el método de fosforamido. Además, podría usarse una combinación de estas técnicas.

La solicitud también da a conocer un vector que puede expresar los péptidos en un huésped apropiado. El vector comprende la molécula de ADN que codifica para los péptidos operativamente unida a secuencias de control de la expresión apropiadas. Se conocen bien métodos para efectuar esta unión operativa, o bien antes o bien después de insertarse la molécula de ADN en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión a ribosomas, señales de iniciación, señales de terminación, señales de caperuza, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o la traducción.

El vector resultante que tiene la molécula de ADN en el mismo se usa para transformar un huésped apropiado. Esta transformación puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y bien conocidas en la práctica de esta divulgación. La selección de un huésped particular depende de un gran número de factores reconocidos por la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la tasa de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, las características de expresión, la bioseguridad y los costes. Debe encontrarse un equilibrio de estos factores con la comprensión de que no todos los huéspedes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas directrices generales, los huéspedes microbianos útiles incluyen bacterias (tales como *E. coli* sp.), levaduras (tales como *Saccharomyces* sp.) y otros hongos, insectos, plantas, células de mamíferos (incluyendo seres humanos) en cultivo, u otros huéspedes conocidos en la técnica.

A continuación, el huésped transformado se cultiva y se purifica. Las células huésped pueden cultivarse en condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen los compuestos deseados. Tales condiciones de fermentación se conocen bien en la técnica. Finalmente, los péptidos se purifican del cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Las proteínas LCAT modificadas también pueden prepararse mediante métodos sintéticos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de síntesis en fase sólida. Se conocen bien en la técnica técnicas adecuadas e incluyen las descritas en Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, págs. 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis *et al.* (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; patente estadounidense n.º 3.941.763; Finn *et al.* (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es una técnica contemplada de preparación de péptidos individuales puesto que es el método más económico de preparación de péptidos pequeños.

B. Vectores

Para la expresión de proteínas recombinantes, la solicitud da a conocer un vector que codifica para una proteína LCAT modificada que puede expresarse en un huésped apropiado. Un vector de este tipo comprende un polinucleótido que codifica para una proteína LCAT modificada, con o sin una modificación con vehículo, operativamente unido a secuencias de control de la expresión apropiadas. Se conocen bien en la técnica métodos para efectuar la unión operativa, o bien antes o bien después de insertarse la molécula de ADN en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión a ribosomas, señales de iniciación, señales de terminación, señales de caperuza, señales de poliadenilación y/u otras señales implicadas en el control de la transcripción o la traducción. El experto en la técnica apreciará que pueden utilizarse diversas combinaciones de estas secuencias de control, dependiendo de, por ejemplo, la elección de la célula huésped en la que va a expresarse la proteína LCAT modificada. El vector resultante se transforma en un huésped apropiado usando métodos bien conocidos en la técnica.

C. Células huésped

Se usa cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y bien conocidas para expresar una proteína LCAT modificada. La selección de un huésped depende de varios factores incluyendo, por ejemplo y sin limitación, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de la proteína LCAT modificada expresada codificada por un polinucleótido transformado, la tasa de transformación, la facilidad de recuperación de la proteína LCAT modificada expresada, las características de expresión, el grado y el tipo de glicosilación, si se desea, la bioseguridad y los costes. Debe encontrarse un equilibrio de estos factores con la comprensión de que no todos los huéspedes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una proteína LCAT modificada particular. Dependiendo de la célula huésped empleada, el producto de expresión de LCAT modificada puede glicosilarse con hidratos de carbono de mamíferos u otros eucariotas, o puede estar no glicosilado. El producto de expresión de LCAT modificada también puede incluir un residuo de aminoácido de metionina inicial (en la posición de residuo de aminoácido -1) si se expresa en, por ejemplo, una célula huésped bacteriana. Dentro de estas directrices generales, las células huésped adecuadas incluyen bacterias, levaduras y otros hongos, insectos, plantas, células de mamíferos (incluyendo seres humanos) en cultivo, u otras células huésped conocidas en la técnica. Las células huésped se cultivan en condiciones de fermentación convencionales bien conocidas en la técnica para permitir la expresión de los compuestos deseados y el producto de expresión de LCAT modificada se purifica usando técnicas también conocidas en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar la proteína LCAT modificada, pueden unirse convenientemente grupos de hidratos de carbono (oligosacáridos) a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, se unen oligosacáridos unidos a O a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que se unen oligosacáridos unidos a N a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos que se producen de manera natural sin contar la prolina. Las estructuras de oligosacáridos unidos a N y unidos a O y los residuos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es el ácido N-acetilneuroamínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal de oligosacáridos tanto unidos a N como unidos a O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el ligador de los compuestos de esta invención y se glicosilan preferiblemente por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden glicosilarse además mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

15 D. Modificación con vehículo de una proteína LCAT modificada

Dependiendo del método de unión a WSP elegido, la proporción de moléculas de WSP unidas a la molécula de proteína diana variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la razón óptima (en cuanto a eficacia de la reacción porque no hay proteína o polímero sin reaccionar en exceso) se determina mediante el peso molecular del WSP seleccionado. Además, cuando se usan métodos que implican unión no específica y purificación posterior de una especie deseada, la razón puede depender del número de grupos reactivos (normalmente grupos amino) disponibles.

En general, se añade un WSP a una proteína LCAT modificada por medio de acilación, alquilación reductora, adición de Michael, alquilación con tiol u otros métodos de conjugación/ligamiento quimioselectivos a través de un grupo reactivo en el WSP (es decir, un grupo aldehído, amino, éster, tiol, α -haloacetilo, maleimido o hidrazina) con un grupo reactivo en la diana.

Por tanto, también se contempla un procedimiento para preparar derivados de conjugación. Por tanto, un aspecto de esta invención es un procedimiento que comprende preparar un agente de LCAT modificada que comprende al menos un vehículo mediante cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otra forma en la técnica. A modo de ejemplo y sin limitación, puede utilizarse un procedimiento de modificación química mediante alquilación reductora. Se usa un método alternativo para la modificación con WSP descrito en Francis *et al.*, en: Stability of protein pharmaceuticals: *in vivo* pathways of degradation and strategies for protein stabilization (Eds. Ahern., T. and Manning, M. C.) Plenum, N. Y., 1991. Todavía en otro aspecto, el método descrito en Delgado *et al.*, "Coupling of PEG to Protein By Activation with Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell Preparation", En: Fisher *et al.*, eds., Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Plenum Press, N.Y., N.Y., 1989 págs. 211-213, que implica el uso de cloruro de tresilo, lo que da como resultado ningún grupo de enlace entre el resto de WSP y la proteína LCAT modificada. Sin embargo, este método alternativo puede ser difícil de usar para producir productos terapéuticos ya que el uso de cloruro de tresilo puede producir subproductos tóxicos. En otros aspectos, la unión de un WSP se efectúa a través del uso de ésteres N-hidroxilsuccinimidílicos de carboximetilmetoxipoliétilenglicol, tal como se conoce bien en la técnica.

40 1. Alquilación reductora

En una realización, la unión covalente de un WSP a una proteína LCAT modificada se lleva a cabo mediante procedimientos de modificación química por alquilación reductora tal como se proporciona en el presente documento para modificar selectivamente el grupo α -amino N-terminal, y sometiendo a prueba el producto resultante para determinar la característica biológica deseada, tal como los ensayos de actividad biológica proporcionados en el presente documento.

La alquilación reductora para la unión de un WSP a una proteína o un péptido se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (por ejemplo, lisina frente al N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se logra una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un polímero que contiene grupo carbonilo.

Usando alquilación reductora, el agente reductor debe ser estable en disolución acuosa y preferiblemente debe poder reducir sólo la base de Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Se seleccionan agentes reductores de, y sin limitación, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, borato de dimetilamina, borato de trimetilamina y borato de piridina.

El pH de la reacción afecta a la razón de polímero con respecto a proteína que va a usarse. En general, si el pH de la reacción es inferior al pKa de un grupo reactivo diana, se deseará un mayor exceso de polímero con respecto a proteína. Si el pH es superior al pKa diana, la razón de polímero:proteína no necesita ser tan grande (es decir, están disponibles más grupos reactivos, de ese modo se necesitan menos moléculas de polímero).

Por consiguiente, la reacción se realiza en un aspecto a un pH que permite aprovechar las diferencias en pKa entre

los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el del grupo α -amino del residuo N-terminal de la proteína. Mediante tal derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína; la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo N-terminal de la proteína y no se produce modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de lisina.

- 5 En una divulgación, por tanto, se proporcionan métodos para la unión covalente de un WSP a una proteína LCAT modificada diana que proporcionan una preparación sustancialmente homogénea de moléculas de conjugado de WSP/proteína, en ausencia de purificación extensa adicional tal como se requiere usando otras químicas de modificación química. Más específicamente, si se usa polietilenglicol, los métodos descritos permiten la producción de una proteína pegilada de manera N-terminal que carece de grupos de enlace posiblemente antigénicos, es decir, el resto de polietilenglicol está acoplado directamente al resto de proteína sin subproductos potencialmente tóxicos.

E. Purificación de un compuesto modificado con WSP

El método de obtención de una preparación de WSP-proteína LCAT sustancialmente homogénea es, en un aspecto, mediante purificación de una especie predominantemente única de LCAT modificada que tiene un resto de WSP unido a partir de una mezcla de especies de LCAT modificada que tienen varias uniones a WSP en diversas ubicaciones en la secuencia de proteína LCAT modificada. A modo de ejemplo, se separa en primer lugar una especie de LCAT modificada sustancialmente homogénea mediante cromatografía de intercambio iónico para obtener material que tiene una característica de carga de una única especie (aún cuando puedan estar presentes otras especies que tienen la misma carga aparente), y entonces se separa la especie deseada usando cromatografía de exclusión molecular. Se notifican y contemplan otros métodos por la invención, incluyendo por ejemplo el documento WO 90/04606, que describe un procedimiento para fraccionar una mezcla de aductos de PEG-proteína que comprende repartir los aductos de PEG/proteína en un sistema bifásico acuoso que contiene PEG. Un sistema de separación de este tipo puede modificarse para su uso con proteínas LCAT modificadas que tienen otras uniones (es decir, distintas de a PEG).

Por tanto, la presente divulgación incluye un método para preparar un conjugado de WSP-LCAT modificada que comprende (a) hacer reaccionar una proteína LCAT modificada que tiene más de un grupo amino con un resto de polímero soluble en agua en condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para activar selectivamente el grupo α -amino en el extremo amino-terminal del resto de proteína de modo que dicho polímero soluble en agua se une selectivamente a dicho grupo α -amino; y (b) obtener el producto de reacción. Opcionalmente, y particularmente para un producto terapéutico, los productos de reacción se separan de los restos sin reaccionar.

30 IV. Composiciones farmacéuticas que comprenden LCAT modificada y métodos de administración

Aunque puede ser posible administrar los compuestos de la invención solos, en los métodos descritos, el compuesto administrado está presente generalmente como un principio activo en una formulación unitaria de dosificación deseada, tal como una composición farmacéuticamente aceptable que contiene portadores farmacéuticamente aceptables convencionales. Por tanto, en otro aspecto de la invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende un compuesto de esta invención en combinación con un portador farmacéuticamente aceptable. Los portadores farmacéuticos aceptables incluyen generalmente diluyentes, excipientes, adyuvantes y similares tal como se describe en el presente documento.

Una composición farmacéutica de la invención puede comprender una cantidad eficaz de un compuesto de la invención o una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de la invención. Una cantidad de dosificación eficaz de un compuesto de la invención incluye una cantidad menor que, igual a o mayor que una cantidad eficaz del compuesto. Por ejemplo, una composición farmacéutica en la que se requieren dos o más dosificaciones unitarias, tales como en comprimidos, cápsulas y similares, para administrar una cantidad eficaz del compuesto, o alternativamente, una composición farmacéutica de múltiples dosis, tal como polvos, líquidos y similares, en la que puede administrarse una cantidad eficaz del compuesto administrando una parte de la composición. "Dosificación unitaria" se define como una cantidad diferenciada de una composición terapéutica dispersada en un portador adecuado. Los expertos habituales en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones eficaces y los regímenes de administración tal como se determina mediante la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse generalmente mezclando una o más proteínas LCAT modificadas con uno o más portadores, excipientes, aglutinantes, adyuvantes, diluyentes, conservantes, solubilizantes, emulsionantes y similares farmacéuticamente aceptables, para formar una formulación administrable deseada para tratar o mejorar una variedad de enfermedades. Tales composiciones incluyen diluyentes de diverso contenido en tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica; aditivos tales como detergentes y agentes de solubilización (por ejemplo, Tween 80, polisorbato 80), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, Thimersol, alcohol bencílico) y sustancias de carga (por ejemplo, lactosa, manitol); incorporación del material en preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), etc. o en liposomas. También puede usarse ácido hialurónico, y esto puede tener el efecto de promover una duración sostenida en la circulación. Tales composiciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de las presentes proteínas y

derivados. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Las composiciones pueden prepararse en forma líquida, o pueden estar en polvo secado, tal como forma liofilizada. También se contemplan formulaciones de liberación sostenida implantables, como las formulaciones transdérmicas.

- 5 Las composiciones farmacéuticas pueden someterse a operaciones farmacéuticas convencionales tales como esterilización y/o pueden contener adyuvantes convencionales, tales como conservantes, estabilizantes, agentes humectantes, emulsionantes, tampones, etc. Los compuestos farmacéuticamente activos de esta invención pueden procesarse según métodos convencionales de farmacia para producir agentes medicinales para su administración a pacientes, incluyendo seres humanos y otros mamíferos.
- 10 Pueden fabricarse composiciones farmacéuticas mediante métodos bien conocidos en la técnica tales como procedimientos de granulación, mezclado, disolución, encapsulación, liofilización, emulsionamiento o levigación convencionales, entre otros. Las composiciones pueden estar en forma de, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, jarabe, supositorios, inyecciones, emulsiones, elixires, suspensiones o disoluciones. Las presentes composiciones pueden formularse para diversas vías de administración, por ejemplo, mediante administración oral, mediante administración transmucosa (incluyendo administración pulmonar y nasal), administración parenteral (incluyendo administración subcutánea), administración transdérmica (tópica) o mediante administración rectal, así como inyección intratecal, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intranasal, intraocular o intraventricular. El compuesto o compuestos de la presente invención también pueden administrarse de un modo local en vez de sistémico, tal como inyección como una formulación de liberación sostenida.
- 15
- 20 Además de las formas farmacéuticas representativas descritas en el presente documento, los expertos en la técnica conocen generalmente excipientes y portadores farmacéuticamente aceptables y por tanto se incluyen en la presente invención. Tales excipientes y portadores se describen, por ejemplo, en "Remingtons Pharmaceutical Sciences" Mack Pub. Co., Nueva Jersey (2000); y "Pharmaceutics The Science of Dosage Form Design, 2ª ed. (Aulton, ed.) Churchill Livingstone (2002). Las siguientes formas farmacéuticas se facilitan a modo de ejemplo y no debe interpretarse que limitan la invención.
- 25

A. Administración oral

- Para administración oral, bucal y sublingual, son aceptables polvos, suspensiones, gránulos, comprimidos, píldoras, cápsulas, cápsulas de gelatina, trociscos o pastillas para chupar, cachets, grageas y comprimidos oblongos como formas farmacéuticas sólidas (y formas farmacéuticas unitarias) y se describen generalmente en el capítulo 89 de Remington's Pharmaceutical Sciences (1990), 18ª ed., Mack Publishing Co. Easton PA 18042. Las formas farmacéuticas sólidas también incluyen encapsulación proteínica o liposómica (por ejemplo, microesferas proteínicas notificadas en la patente estadounidense n.º 4.925.673). Puede usarse encapsulación liposómica y los liposomas pueden derivatizarse con diversos polímeros (por ejemplo, patente estadounidense n.º 5.013.556). Se facilita una descripción de posibles formas farmacéuticas sólidas para el producto terapéutico en el capítulo 10 de Marshall, K., Modern Pharmaceutics (1979), editado por G. S. Banker y C. T. Rhodes. En general, la formulación incluye la proteína LCAT modificada, y componentes inertes que permiten la protección frente al entorno del estómago, y la liberación del material biológicamente activo en el intestino.
- 30
- 35

- Si es necesario, los compuestos se modifican químicamente para potenciar la bioeficacia de la administración oral. Generalmente, la modificación química contemplada es la unión de al menos un resto a la propia molécula de compuesto, en la que dicho resto permite (a) la inhibición de la proteólisis; y (b) la captación en el torrente sanguíneo desde el estómago o el intestino. También se desea el aumento en la estabilidad global del compuesto y el aumento en el tiempo de circulación en el cuerpo. También pueden usarse restos útiles como vehículos unidos covalentemente en esta invención para este fin. Los ejemplos de tales restos incluyen: PEG, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona y poliprolina así como otros restos descritos en el presente documento. Véase también, por ejemplo, Abuchowski y Davis, Soluble Polymer-Enzyme Adducts, Enzymes as Drugs (1981), Hocenberg y Roberts, eds., Wiley-Interscience, Nueva York, NY, págs. 367-83; Newmark, *et al.* (1982), J. Appl. Biochem. 4: 185-9. Otros polímeros que podrían usarse son poli-1,3-dioxolano y poli-1,3,6-tioxocano. En un aspecto, se proporcionan restos de PEG para uso farmacéutico, tal como se indicó anteriormente.
- 40
- 45

- 50 Para formas farmacéuticas de administración oral, también es posible usar una sal de un aminoácido alifático modificado, tal como N-(8-[2-hidroxibenzoil]amino)caprilato de sodio (SNAC), como portador para potenciar la absorción de los compuestos terapéuticos de esta invención. Se ha demostrado la eficacia clínica de una formulación de heparina usando SNAC en un ensayo de fase II realizado por Emisphere Technologies. Véase la patente estadounidense n.º 5.792.451, "Composición de administración de fármacos orales y métodos".

- 55 Los compuestos de esta invención pueden incluirse en la formulación como materiales microparticulados finos en forma de gránulos o grageas de tamaño de partícula de aproximadamente 1 mm. La formulación del material para la administración de cápsulas también podría ser como un polvo, tapones ligeramente comprimidos o incluso como comprimidos. El producto terapéutico también podría prepararse mediante compresión.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas orales, por ejemplo, mezclando uno o más compuestos de la presente invención con al menos un aditivo o excipiente tal como un almidón u otro aditivo y prepararse en comprimidos, encapsularse o prepararse en otras formas deseables para administración convencional. Aditivos o excipientes adecuados son sacarosa, lactosa, azúcar de celulosa, manitol, maltitol, dextrano, sorbitol, almidón, agar, alginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatinas, colágenos, caseína, albúmina, polímeros o glicéridos sintéticos o semisintéticos, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa y/o polivinilpirrolidona. Opcionalmente, las formas farmacéuticas orales pueden contener otros componentes para ayudar en la administración, tales como un diluyente inactivo, o lubricantes tales como estearato de magnesio, o conservantes tales como parabeno o ácido sórbico, o antioxidantes tales como ácido ascórbico, tocoferol o cisteína, un agente disgregante, aglutinantes, espesantes, tampones, edulcorantes, agentes aromatizantes o agentes de perfume. Adicionalmente, pueden añadirse tintes o pigmentos para su identificación. Pueden tratarse adicionalmente comprimidos y píldoras con materiales de recubrimiento adecuados conocidos en la técnica.

Las formas farmacéuticas líquidas para administración oral pueden estar en forma de emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones, suspensiones espesas y disoluciones farmacéuticamente aceptables, que pueden contener un diluyente inerte, tal como agua. Pueden prepararse formulaciones farmacéuticas como suspensiones o disoluciones líquidas usando un líquido estéril, tal como, pero sin limitarse a, un aceite, agua, un alcohol y combinaciones de estos. Pueden añadirse tensioactivos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, y similares farmacéuticamente adecuados para administración oral o parenteral.

Más específicamente, diversos aspectos de composiciones farmacéuticas orales incluyen uno o más de los siguientes aditivos.

Pueden incluirse todos los colorantes y agentes aromatizantes. Por ejemplo, la proteína (o derivado) puede formularse (tal como mediante encapsulación en liposomas o microesferas) y luego contenerse adicionalmente dentro de un producto comestible, tal como una bebida refrigerada que contiene colorantes y agentes aromatizantes.

Puede diluirse o aumentarse el volumen del compuesto de la invención con un material inerte. Estos diluyentes podrían incluir hidratos de carbono, especialmente manitol, lactosa, lactosa anhidra, celulosa, sacarosa, dextranos modificados y almidón. También pueden usarse determinadas sales inorgánicas como cargas incluyendo trifosfato de calcio, carbonato de magnesio y cloruro de sodio. Algunos diluyentes disponibles comercialmente son Fast-Flo, Emdex, STA-Rx 1500, Emcompress y Avicell.

Pueden incluirse disgregantes en la formulación del producto terapéutico para dar una forma farmacéutica sólida. Los materiales usados como disgregantes incluyen pero no se limitan a almidón incluyendo el disgregante comercial basado en almidón, Explotab. Pueden usarse todos de glicolato sódico de almidón, Amberlite, carboximetilcelulosa de sodio, ultramilopectina, alginato de sodio, gelatina, piel de naranja, carboximetilcelulosa ácida, esponja natural y bentonita. Otra forma de los disgregantes son las resinas de intercambio catiónico insolubles. Pueden usarse gomas en polvo como disgregantes y como aglutinantes y éstas incluyen gomas en polvo tales como agar, karaya o tragacanto. Ácido algínico y su sal de sodio son también útiles como disgregantes.

Pueden usarse aglutinantes para mantener el agente terapéutico junto para formar un comprimido duro e incluyen materiales de productos naturales tales como goma arábiga, goma tragacanto, almidón y gelatina. Otros incluyen metilcelulosa (MC), etilcelulosa (EC) y carboximetilcelulosa (CMC). Pueden usarse tanto polivinilpirrolidona (PVP) como hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC) en disoluciones alcohólicas para granular el producto terapéutico.

Puede incluirse un agente antifricción en la formulación del producto terapéutico para evitar que se pegue durante el proceso de formulación. Pueden usarse lubricantes como capa entre el producto terapéutico y la pared del troquel, y estos pueden incluir pero sin limitarse a ácido esteárico incluyendo sus sales de magnesio y calcio, politetrafluoroetileno (PTFE), parafina líquida, aceites vegetales y ceras. También pueden usarse lubricantes solubles tales como laurilsulfato de sodio, laurilsulfato de magnesio, polietilenglicol de diversos pesos moleculares, Carbowax 4000 y 6000.

Pueden añadirse deslizantes que mejorarán las propiedades de flujo del fármaco durante la formulación y para ayudar en la redistribución durante la compresión. Los deslizantes pueden incluir almidón, talco, sílice pirogénica y silicoaluminato hidratado.

Para ayudar a la disolución del compuesto de esta invención en el entorno acuoso, puede añadirse un tensioactivo como agente humectante. Los tensioactivos pueden incluir detergentes aniónicos tales como laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio. Pueden usarse detergentes catiónicos y pueden incluir cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. La lista de posibles detergentes no iónicos que pueden incluirse en la formulación como tensioactivos son lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Estos tensioactivos pueden estar presentes en la formulación de la proteína o derivado o bien solos o bien como una mezcla en diferentes razones.

También pueden incluirse aditivos en la formulación para potenciar la captación del compuesto. Aditivos que tienen potencialmente esta propiedad son por ejemplo los ácidos grasos ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico.

Puede ser deseable una formulación de liberación controlada. El compuesto de esta invención puede incorporarse en una matriz inerte que permite la liberación mediante mecanismos de o bien difusión o bien lixiviación, por ejemplo, gomas. También pueden incorporarse matrices que se degeneran lentamente en la formulación, por ejemplo, alginatos, polisacáridos. Otra forma de una liberación controlada de los compuestos de esta invención es mediante un método basado en el sistema terapéutico Oros (Alza Corp.), es decir, el fármaco se encierra en una membrana semipermeable que permite que entre agua y empuje el fármaco fuera a través de una única abertura pequeña debido a efectos osmóticos. Algunos recubrimientos entéricos tienen también un efecto de liberación retardada.

Pueden usarse otros recubrimientos para la formulación. Estos incluyen una variedad de azúcares que pueden aplicarse en una cubeta de recubrimiento. El agente terapéutico también puede administrarse en un comprimido recubierto con película y los materiales usados en este caso se dividen en 2 grupos. El primero son los materiales no entéricos e incluyen metilcelulosa, etilcelulosa, hidroxietilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, providona y los polietilenglicoles. El segundo grupo consiste en los materiales entéricos que son comúnmente ésteres de ácido ftálico.

Puede usarse una mezcla de materiales para proporcionar el recubrimiento de película óptimo. El recubrimiento de película puede llevarse a cabo en una recubridora de cubeta o en un lecho fluidizado o mediante recubrimiento por compresión.

B. Formas de administración pulmonar

También se contempla en el presente documento la administración pulmonar de la presente proteína (o derivados de la misma). La proteína (o derivado) se administra a los pulmones de un mamífero mientras se inhala y atraviesa el revestimiento epitelial de los pulmones hasta el torrente sanguíneo. Otros informes de esto incluyen Adjei *et al.*, *Pharma. Res.* (1990) 7: 565-9; Adjei *et al.* (1990), *Internat. J. Pharmaceutics* 63: 135-44 (acetato de leuprolida); Braquet *et al.* (1989), *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13 (supl. 5): s.143-146 (endotelina-1); Hubbard *et al.* (1989), *Annals Int. Med.* 3: 206-12 (α 1-antitripsina); Smith *et al.* (1989), *J. Clin. Invest.* 84: 1145-6 (α 1-proteinasa); Oswein *et al.* (marzo de 1990), "Aerosolization of Proteins" *Proc. Symp. Resp. Drug Delivery II*, Keystone, Colorado (hormona de crecimiento humana recombinante); Debs *et al.* (1988), *J. Immunol.* 140: 3482-8 (interferon- γ y factor de necrosis tumoral α) y Platz *et al.*, patente estadounidense n.º 5.284.656 (factor estimulante de las colonias de granulocitos).

Se contemplan para su uso en la práctica de esta invención una amplia gama de dispositivos mecánicos diseñados para la administración pulmonar de productos terapéuticos, incluyendo pero sin limitarse a nebulizadores, inhaladores de dosis medida e inhaladores de polvo, todos los cuales son familiares para los expertos en la técnica. Algunos ejemplos específicos de dispositivos disponibles comercialmente adecuados para la práctica de esta invención son el nebulizador Ultravent, fabricado por Mallinckrodt, Inc., St. Louis, Missouri; el nebulizador Acorn II, fabricado por Marquest Medical Products, Englewood, Colorado; el inhalador de dosis medida Ventolin, fabricado por Glaxo Inc., Research Triangle Park, Carolina del Norte; y el inhalador de polvo Spinhaler, fabricado por Fisons Corp., Bedford, Massachusetts.

Todos los dispositivos de este tipo requieren el uso de formulaciones adecuadas para la dispensación del compuesto de la invención. Normalmente, cada formulación es específica para el tipo de dispositivo empleado y puede implicar el uso de un material propelente apropiado, además de diluyentes, adyuvantes y/o portadores útiles en terapia.

El compuesto de la invención debe prepararse lo más ventajosamente en forma particulada con un tamaño de partícula promedio de menos de 10 μ m (o micrómetros), lo más preferiblemente de 0,5 a 5 μ m, para la administración más eficaz al pulmón distal.

Los portadores farmacéuticamente aceptables para administración pulmonar incluyen hidratos de carbono tales como trehalosa, manitol, xilitol, sacarosa, lactosa y sorbitol. Otros componentes para su uso en formulaciones pueden incluir DPPC, DOPE, DSPC y DOPC. Pueden usarse tensioactivos naturales o sintéticos. Puede usarse PEG (incluso aparte de su uso en la derivación de la proteína o análogo). Pueden usarse dextranos, tales como ciclodextrano. Pueden usarse ácidos biliares y otros potenciadores relacionados. Pueden usarse celulosa y derivados de celulosa. Pueden usarse aminoácidos, tal como se usan en una formulación de tampón.

Además, se contempla el uso de liposomas, microcápsulas o microesferas, complejos de inclusión, u otros tipos de transportadores.

Formulaciones adecuadas para su uso con un nebulizador, o bien de chorro o bien ultrasónico, comprenderán normalmente el compuesto de la invención disuelto en agua a una concentración de aproximadamente 0,1. Las formulaciones pueden ser una pulverización o un aerosol que contiene un disolvente apropiado y opcionalmente otros compuestos tales como, pero sin limitarse a, estabilizantes, agentes antimicrobianos, antioxidantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Un propelente para una formulación de aerosol puede incluir aire comprimido, nitrógeno, dióxido de carbono o un disolvente de bajo punto de ebullición a base de hidrocarburos. El compuesto o compuestos de la presente invención se

administran convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de un nebulizador o similar.

D. Administración parenteral

5 Las formas farmacéuticas inyectables para administración parenteral incluyen generalmente suspensiones acuosas o suspensiones oleosas, que pueden prepararse usando un agente de suspensión y un agente humectante o dispersante adecuado. Las formas inyectables pueden estar en fase de disolución o un polvo adecuado para su reconstitución como una disolución. Ambos se preparan con un disolvente o diluyente. Los disolventes o vehículos aceptables incluyen agua esterilizada, solución de Ringer o una solución salina acuosa isotónica. Alternativamente, pueden emplearse aceites estériles como disolventes o agentes de suspensión. Normalmente, el aceite o ácido graso es no volátil, incluyendo aceites naturales o sintéticos, ácidos grasos, mono-, di- o tri-glicéridos. Para inyección, las formulaciones pueden contener opcionalmente estabilizantes, modificadores del pH, tensioactivos, modificadores de la biodisponibilidad y combinaciones de estos. Los compuestos pueden formularse para administración parenteral mediante inyección tal como mediante inyección en bolo o infusión continua. Una forma farmacéutica unitaria para inyección puede estar en ampollas o en recipientes de múltiples dosis.

15 E. Administración rectal

Para administración rectal, las formulaciones farmacéuticas pueden estar en forma de un supositorio, una pomada, un enema, un comprimido o una crema para la liberación del compuesto en los intestinos, flexión sigmoidea y/o recto. Se preparan supositorios rectales mezclando uno o más compuestos de la presente invención, o sales o tautómeros farmacéuticamente aceptables del compuesto, con vehículos aceptables, por ejemplo, manteca de cacao o polietilenglicol, que está en fase sólida a temperatura ambiente pero en fase líquida a las temperaturas adecuadas para liberar un fármaco dentro del cuerpo, tal como en el recto. Pueden usarse otros diversos agentes y aditivos en la preparación de supositorios tal como conocen bien los expertos en la técnica.

F. Dosificaciones y formulaciones farmacéuticas

25 Las formulaciones de la invención pueden diseñarse para que sean de actuación corta, de liberación rápida, de actuación larga y de liberación sostenida tal como se describe a continuación. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden formularse también para liberación controlada o para liberación lenta. Las presentes composiciones pueden comprender también, por ejemplo, micelas o liposomas, o alguna otra forma encapsulada, o pueden administrarse en una forma de liberación extendida para proporcionar un efecto de administración y/o almacenamiento prolongado. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas pueden comprimirse para dar grageas o cilindros e implantarse por vía intramuscular o por vía subcutánea como inyecciones de depósito o como implantes tales como endoprótesis. Tales implantes pueden emplear materiales inertes conocidos tales como siliconas y polímeros biodegradables.

35 Pueden ajustarse dosificaciones específicas dependiendo de los estados de enfermedad, la edad, el peso corporal, los estados de salud general, el sexo y la dieta del sujeto, los intervalos de dosis, las vías de administración, la tasa de excreción y las combinaciones de fármacos. Cualquiera de las formas farmacéuticas anteriores que contenga cantidades eficaces está bien dentro de los límites de la experimentación de rutina y, por tanto, bien dentro del alcance de la presente invención.

40 Una dosis terapéuticamente eficaz puede variar dependiendo de la vía de administración y la forma farmacéutica. Normalmente, el compuesto o compuestos de la presente invención se seleccionan para proporcionar una formulación que presenta un alto índice terapéutico. El índice terapéutico es la razón de dosis entre efectos tóxicos y terapéuticos que puede expresarse como la razón entre DL_{50} y DE_{50} . La DL_{50} es la dosis letal para el 50% de la población y la DE_{50} es la dosis terapéuticamente eficaz en el 50% de la población. La DL_{50} y la DE_{50} se determinan mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos de células animales o animales experimentales.

45 El régimen de dosificación para tratar enfermedades mediadas por LCAT y otros trastornos descritos en el presente documento con una proteína LCAT modificada y/o composiciones se basa en una variedad de factores, incluyendo el tipo de enfermedad, la edad, el peso, el sexo, el estado médico del paciente, la gravedad del estado, la vía de administración y el compuesto particular empleado. Por tanto, el régimen de dosificación puede variar ampliamente, pero puede determinarse rutinariamente usando métodos convencionales. Niveles de dosificación del orden de desde aproximadamente 0,01 mg hasta 30 mg por kilogramo de peso corporal al día, por ejemplo desde 50 aproximadamente 0,1 mg hasta 10 mg/kg, o desde aproximadamente 0,25 mg hasta 1 mg/kg son útiles para todos los métodos de uso dados a conocer en el presente documento. Generalmente, el régimen diario debe estar en el intervalo de 0,1-1000 microgramos del compuesto por kilogramo de peso corporal, preferiblemente 0,1-150 microgramos por kilogramo.

1. Dosificaciones orales

55 Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, una cápsula, un comprimido, una suspensión o un líquido. La composición farmacéutica puede prepararse en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad dada del principio activo. Por ejemplo, éstas pueden contener una

cantidad de principio activo de desde aproximadamente 1 hasta 2000 mg, por ejemplo desde aproximadamente 1 hasta 500 mg, o desde aproximadamente 5 hasta 150 mg, o desde 10 hasta 100 mg. Una dosis diaria adecuada para un ser humano u otro mamífero puede variar ampliamente dependiendo del estado del paciente y otros factores, pero, una vez más, puede determinarse usando métodos de rutina.

5 2. Dosificaciones inyectables

El principio activo puede administrarse también mediante inyección como una composición con portadores adecuados incluyendo solución salina, dextrosa o agua. El régimen de dosificación parenteral diaria será de desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal total, tal como desde aproximadamente 0,1 hasta aproximadamente 10 mg/kg, o desde aproximadamente 0,25 mg hasta 1 mg/kg.

10 3. Dosificaciones tópicas

Las formulaciones adecuadas para administración tópica incluyen preparaciones líquidas o semilíquidas adecuadas para su penetración a través de la piel (por ejemplo, linimentos, lociones, pomadas, cremas o pastas) y gotas adecuadas para su administración al ojo, el oído o la nariz.

15 Una dosis tópica adecuada de principio activo de un compuesto de la invención es de 0,1 mg a 150 mg administrados de una a cuatro, por ejemplo una o dos veces al día. Para administración tópica, el principio activo puede comprender desde el 0,001% hasta el 10% p/p, por ejemplo, desde el 1% hasta el 2% en peso de la formulación, aunque puede comprender tanto como el 10% p/p, pero normalmente no más del 5% p/p. En un aspecto, la concentración es de desde el 0,1% hasta el 1% de la formulación.

G. Regímenes de administración

20 La administración de las composiciones puede ser sistémica o local, y puede comprender una inyección en un único sitio o la infusión de una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición de proteína LCAT modificada. Se contempla cualquier vía conocida por los expertos en la técnica para la administración de una composición terapéutica de la invención incluyendo, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, subcutánea o un catéter para administración a largo plazo. Alternativamente, se contempla que la composición terapéutica pueda administrarse al paciente en múltiples sitios. Las administraciones múltiples pueden hacerse simultáneamente o pueden administrarse a lo largo de un periodo de tiempo. En determinados casos, puede ser beneficioso proporcionar un flujo continuo de la composición terapéutica. Puede administrarse una terapia adicional en una base de periodos, por ejemplo, diaria, semanal o mensualmente. En determinadas realizaciones, el polipéptido de LCAT modificada se proporciona localmente al sitio de reperusión.

30 V. Métodos de tratamiento

A. Aterosclerosis, enfermedad cardiovascular o una enfermedad asociada

En un aspecto, los métodos de tratamiento de la invención son terapéuticos, y los compuestos y las composiciones de la invención se administran a un sujeto que ya padece aterosclerosis, enfermedad cardiovascular o una enfermedad asociada. En otro aspecto, los métodos de tratamiento son profilácticos y los compuestos y las composiciones se administran a los sujetos que corren el riesgo de desarrollar aterosclerosis. Para determinar si un sujeto corre el riesgo de, por ejemplo, aterosclerosis, puede evaluarse el perfil de lipoproteínas aterogénicas. Por ejemplo, una razón de colesterol sérico con respecto a HDL de 5:1 o superior indica un riesgo superior al promedio de desarrollar aterosclerosis. Otros factores incluyen un nivel de colesterol sérico de 240 mg/dl o superior, un nivel de HDL de 35 mg/dl o inferior, o un nivel de LDL de 190 mg/dl o superior, un nivel de proteína LCAT en plasma inferior al normal (<5 µg/ml), y una disminución de la tasa de esterificación de colesterol en plasma (<60 nmol/ml/h).

45 La cantidad de proteína LCAT modificada eficaz para disminuir la acumulación de colesterol depende de varios factores, incluyendo la especie, la manera de administración, la salud general del sujeto, el resultado deseado (por ejemplo, profilaxis o tratamiento terapéutico) y el juicio del médico encargado. Por ejemplo, el profesional sanitario puede decidir qué niveles de riesgo para una cardiopatía indican tratamiento profiláctico, y que nivel diana de la proteína LCAT modificada está indicado para el tratamiento de una persona que ya padece aterosclerosis.

En seres humanos, la tasa de esterificación de colesterol normal oscila entre aproximadamente 60 nmol/ml/h y aproximadamente 130 nmol/m por hora. El tratamiento eficaz de aterosclerosis en seres humanos puede implicar la administración de las composiciones de la invención para lograr una tasa de esterificación de colesterol de aproximadamente 200 nmol/ml/h.

50 La invención proporciona usos para el tratamiento, la prevención o la gestión de una enfermedad cardiovascular. Tal como se usa en el presente documento, el término "enfermedades cardiovasculares" se refiere a enfermedades del corazón y el sistema circulatorio. Las enfermedades cardiovasculares para las que las composiciones de la presente invención son útiles para la prevención o el tratamiento incluyen pero no se limitan a arteriosclerosis; aterosclerosis; accidente cerebrovascular; isquemia; disfunciones del endotelio, en particular las disfunciones que afectan a la elasticidad de los vasos sanguíneos; enfermedad vascular periférica; cardiopatía coronaria; infarto de miocardio,

infarto cerebral y reestenosis, trombosis, tensión arterial alta y angina de pecho. En un aspecto, la invención incluye métodos de administración de los compuestos y las composiciones de la invención para tratamiento crónico. En otro aspecto, la invención contempla usos para tratamiento agudo.

- 5 Otras enfermedades para las que las composiciones de la presente invención son útiles para la prevención o el tratamiento incluyen síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades.

B. Estados inflamatorios

10 Los usos, los compuestos y las composiciones de la invención son útiles en la supresión de la activación de células inflamatorias. El término "activación de células inflamatorias", tal como se usa en el presente documento, significa la inducción mediante un estímulo (incluyendo, pero sin limitarse a, citocinas, antígenos o autoanticuerpos) de una respuesta celular proliferativa, la producción de mediadores solubles (incluyendo pero sin limitarse a citocinas, radicales de oxígeno, enzimas, prostanooides o aminos vasoactivas) o la expresión en la superficie celular de nuevos mediadores o números aumentados de los mismos (incluyendo, pero sin limitarse a, antígenos mayores de histocompatibilidad o moléculas de adhesión celular) en células inflamatorias (incluyendo pero sin limitarse a

15 monocitos, macrófagos, linfocitos T, linfocitos B, granulocitos, leucocitos polimorfonucleares, mastocitos, basófilos, eosinófilos, células dendríticas y células endoteliales). Los expertos en la técnica apreciarán que la activación de uno o una combinación de estos fenotipos en estas células puede contribuir a la iniciación, perpetuación o exacerbación de un estado inflamatorio.

20 Los usos, los compuestos y las composiciones de la invención son útiles en el tratamiento de enfermedades tales como enfermedades artríticas (tales como artritis reumatoide), osteoartritis, artritis gotosa, espondilitis, oftalmopatía asociada al tiroides, enfermedad de Behcet, septicemia, choque septicémico, choque endotóxico, septicemia por bacterias Gram-negativas, septicemia por bacterias Gram-positivas, síndrome de choque tóxico, asma, bronquitis crónica, rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, conjuntivitis vernal, granuloma eosinofílico, síndrome de dificultad respiratoria (aguda) del adulto (SDRA), enfermedad inflamatoria pulmonar crónica (tal como enfermedad pulmonar

25 obstructiva crónica), silicosis, sarcoidosis pulmonar, lesión por reperfusión del miocardio, el cerebro o las extremidades, lesión cerebral o de la médula espinal debida a traumatismo menor, fibrosis incluyendo fibrosis quística, formación de queloides, formación de tejido cicatricial, aterosclerosis, enfermedades autoinmunitarias, tales como lupus eritematoso sistémico (LES) y trastornos de rechazo de trasplante (por ejemplo, reacción de injerto frente a huésped (GvH) y rechazo de aloinjerto), glomerulonefritis crónica, enfermedades inflamatorias del intestino,

30 tales como enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, enfermedades linfocíticas proliferativas, tales como leucemias (por ejemplo leucemia linfocítica crónica; LLC) (véanse Munoz *et al.*, J. Exp. Med. 172:95-103 (1990); Mentz *et al.*, Blood 88:2172-2182 (1996)), y dermatosis inflamatorias, tales como dermatitis atópica, psoriasis o urticaria.

C. Estados relacionados con trombosis

35 También se contempla que los compuestos y las composiciones de la presente invención se usen en el tratamiento de una variedad de trastornos en los que hay una necesidad de prevenir o tratar trombosis y la pérdida o disminución posterior del flujo de sangre. Los ejemplos de trastornos trombóticos incluyen pero no se limitan a aterosclerosis, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular e isquemia renal, y trombosis en cualquier parte del cuerpo de un mamífero. La composición de la presente invención se usará también en la prevención y el tratamiento de microangiopatía en la que la formación de microtrombos o la unión de factor de von Willebrand (VWF) a

40 plaquetas provoca un consumo excesivo de plaquetas y/o VWF conduciendo a diatesis hemorrágica posterior. Los ejemplos de estos últimos trastornos incluyen pero no se limitan a púrpura trombocitopénica trombótica, enfermedad de von Willebrand (VWD) de tipo plaquetario y de tipo II. Los compuestos o usos terapéuticos de combinación de la presente invención inhiben la adhesión y agregación plaquetarias dependientes de VWF. Los compuestos, las composiciones y los usos también son útiles en la prolongación del tiempo de hemorragia en un mamífero y, como

45 tales, son útiles como agentes antitrombóticos en métodos tanto terapéuticos como profilácticos. Como tales, estos compuestos, composiciones y usos son útiles como agentes anticoagulantes y/o agentes antiplaquetarios. Además, la presente invención proporciona compuestos, composiciones y usos para el tratamiento de trombosis y otros trastornos del sistema circulatorio cardiovascular que requieren un aumento en el flujo o una reducción en el bloqueo de los vasos.

50 Los compuestos, las composiciones y los usos también son útiles para el tratamiento de cualquier trastorno que se trate actualmente usando terapia anticoagulante. Tales trastornos incluyen embolia pulmonar, angina de pecho inestable, infarto de miocardio, trombosis venosa profunda, fibrilación auricular con embolización, coagulopatías aguda y crónica (coagulación intravascular diseminada), para la prevención de la coagulación en cirugía arterial y cardiaca, para la profilaxis y el tratamiento de embolia arterial periférica. Los compuestos, las composiciones y los

55 usos se usan también para tratar púrpura trombocitopénica trombótica, otros tipos de microangiopatía que están mediados por la interacción espontánea entre VWF y plaquetas, enfermedades de von Willebrand de tipo plaquetario y de tipo IIb en las que hay un aumento de la unión de VWF a plaquetas (provocado por un defecto en o bien GPIb o bien VWF). Los compuestos, las composiciones y los usos descritos en el presente documento son útiles como agentes antiplaquetarios en transfusiones sanguíneas, circulación extracorpórea, procedimientos de diálisis así

60 como toma de muestras de sangre para procedimientos de laboratorio. Los compuestos, las composiciones y los

5 usos se usan también para mantener la permeabilidad de un dispositivo de venopunción permanente que está
 usándose para inyección intermitente o terapia de infusión o toma de muestras de sangre. Los compuestos, las
 composiciones y los usos son particularmente útiles en procedimientos quirúrgicos para prevenir la formación de
 coágulos de sangre. Tales indicaciones son particularmente deseables para pacientes que se someten a cirugía
 abdominal para reducir el riesgo de complicaciones tromboembólicas, pacientes que se someten a terapia de
 sustitución de la rodilla o la cadera durante y tras el procedimiento de sustitución, así como un profiláctico general
 para prevenir la formación de coágulos en un estadio posterior. Los compuestos, las composiciones y los usos son
 útiles además en el tratamiento de sujetos que corren el riesgo de complicaciones tromboembólicas debido a
 movilidad gravemente restringida, por ejemplo, durante una enfermedad grave. Cualquiera de tales trastornos puede
 10 tratarse fácilmente mediante las composiciones descritas en el presente documento. Los usos terapéuticos incluyen
 tanto administración profiláctica como/o terapéutica médica, según sea apropiado.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "inhibe la agregación plaquetaria" incluye su significado
 generalmente aceptado que incluye prohibir, ralentizar o reducir la gravedad o el grado de la agregación plaquetaria.
 Una inhibición de este tipo puede medirse como una función del tiempo que tarda una muestra en coagular. En otras
 15 realizaciones, modelos animales de trombosis. Los métodos de determinación de la eficacia de los agentes incluyen
 pruebas de coagulación, monitorización del tiempo de hemorragia, determinación de los niveles de hemoglobina de
 un animal y similares.

VI. Terapia de combinación

La invención proporciona además usos de combinación, en los que los compuestos y/o las composiciones de la
 invención se administran con uno o más agentes adicionales. En general, los usos terapéuticos, las composiciones y
 los compuestos pueden emplearse también en combinación con otros productos terapéuticos en el tratamiento de
 diversos estados patológicos, administrándose los agentes adicionales simultánea o secuencialmente con una
 composición de la invención.

A. Citocinas

25 Los factores hematopoyéticos o las citocinas a modo de ejemplo para tal administración conjunta incluyen IL-1 alfa,
 IL-1 beta, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, factor estimulante de colonias-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, factor
 estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), EPO, interferón-alfa (IFN-alfa), interferón consenso, IFN-beta, IFN-
 gamma, IFN-omega, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20, IL-21, IL-22, IL-
 30 23, IL-24, IL-31, IL-32 alfa, IL-33, trombopoyetina (TPO), angiopoyetinas, por ejemplo Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y,
 los polipéptidos similares a angiopoyetina humana ANGPTL1 a 7, vitronectina, factor de crecimiento endotelial
 vascular (VEGF), angiogenina, activina A, activina B, activina C, proteína morfogénica ósea-1, proteína morfogénica
 ósea-2, proteína morfogénica ósea-3, proteína morfogénica ósea-4, proteína morfogénica ósea-5, proteína
 morfogénica ósea-6, proteína morfogénica ósea-7, proteína morfogénica ósea-8, proteína morfogénica ósea-9,
 35 proteína morfogénica ósea-10, proteína morfogénica ósea-11, proteína morfogénica ósea-12, proteína morfogénica
 ósea-13, proteína morfogénica ósea-14, proteína morfogénica ósea-15, receptor IA de proteína morfogénica ósea,
 receptor IB de proteína morfogénica ósea, receptor II de proteína morfogénica ósea, factor neurotrófico derivado del
 cerebro, cardiotrofina-1, factor neurotrófico ciliar, receptor de factor neurotrófico ciliar, cripto, críptico, factor
 quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 1, factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 α ,
 40 factor quimiotáctico de neutrófilos inducido por citocinas 2 β , factor de crecimiento de células endoteliales β ,
 endotelina 1, factor de crecimiento epidérmico, epigen, epiregulina, atrayente de neutrófilos derivado del epitelio,
 factor de crecimiento de fibroblastos 4, factor de crecimiento de fibroblastos 5, factor de crecimiento de fibroblastos
 6, factor de crecimiento de fibroblastos 7, factor de crecimiento de fibroblastos 8, factor de crecimiento de
 fibroblastos 8b, factor de crecimiento de fibroblastos 8c, factor de crecimiento de fibroblastos 9, factor de crecimiento
 45 de fibroblastos 10, factor de crecimiento de fibroblastos 11, factor de crecimiento de fibroblastos 12, factor de
 crecimiento de fibroblastos 13, factor de crecimiento de fibroblastos 16, factor de crecimiento de fibroblastos 17,
 factor de crecimiento de fibroblastos 19, factor de crecimiento de fibroblastos 20, factor de crecimiento de
 fibroblastos 21, factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico, receptor de
 factor neurotrófico derivado de la línea celular glial α 1, receptor de factor neurotrófico derivado de la línea celular
 50 glial α 2, proteína relacionada con el crecimiento, proteína relacionada con el crecimiento α , proteína relacionada con
 el crecimiento β , proteína relacionada con el crecimiento γ , factor de crecimiento epidérmico de unión a heparina,
 factor de crecimiento de hepatocitos, receptor de factor de crecimiento de hepatocitos, factor de crecimiento
 derivado del hepatoma, factor de crecimiento similar a la insulina I, receptor de factor de crecimiento similar a la
 insulina, factor de crecimiento similar a la insulina II, proteína de unión a factor de crecimiento similar a la insulina,
 55 factor de crecimiento de queratinocitos, factor inhibidor de leucemia, receptor de factor inhibidor de leucemia α ,
 factor de crecimiento nervioso, receptor de factor de crecimiento nervioso, neuropoyetina, neurotrofina-3,
 neurotrofina-4, oncostatina M (OSM), factor de crecimiento de la placenta, factor de crecimiento de la placenta 2,
 factor de crecimiento de células endoteliales derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las
 plaquetas, cadena A de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento derivado de las
 60 plaquetas AA, factor de crecimiento derivado de las plaquetas AB, cadena B de factor de crecimiento derivado de las
 plaquetas, factor de crecimiento derivado de las plaquetas BB, receptor α de factor de crecimiento derivado de las
 plaquetas, receptor β de factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor estimulante del crecimiento de

células pre-B, factor de células madre (SCF), receptor de factor de células madre, TNF, incluyendo TNF0, TNF1, TNF2, factor de crecimiento transformante α , factor de crecimiento transformante β , factor de crecimiento transformante $\beta 1$, factor de crecimiento transformante $\beta 1.2$, factor de crecimiento transformante $\beta 2$, factor de crecimiento transformante $\beta 3$, factor de crecimiento transformante $\beta 5$, factor de crecimiento transformante $\beta 1$ latente, proteína de unión I a factor de crecimiento transformante β , proteína de unión II a factor de crecimiento transformante β , proteína de unión III a factor de crecimiento transformante β , linfopoyetina estromal tímica (TSLP), receptor de factor de necrosis tumoral tipo I, receptor de factor de necrosis tumoral tipo II, receptor de activador del plasminógeno de tipo urocinasa, factor de crecimiento endotelial vascular y proteínas quiméricas y fragmentos biológica o inmunológicamente activos de los mismos.

10 B. Fármacos contra la aterosclerosis

Agentes activos adicionales pueden actuar en rutas sinérgicas o complementarias con la proteína LCAT modificada cuando se usan para tratar y prevenir la aterosclerosis o gestionar el colesterol o trastornos relacionados tales como enfermedad cardiovascular.

15 En un aspecto, pueden usarse los compuestos de la invención con estatinas. Las estatinas son fármacos que inhiben competitivamente la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa, "HMG-CoA reductasa", que es la enzima que cataliza una etapa temprana, limitante de la velocidad en la biosíntesis de colesterol. Hebert *et al.*, JAMA 1997, 278: 313-21. Esta combinación, además de elevar los niveles de HDL y disminuir los niveles de LDL, también puede disminuir los triglicéridos y reducir la inflamación. Se cree que la combinación puede tener efectos terapéuticos adicionales, por ejemplo, la combinación puede disminuir la tensión arterial; proteger frente a una cardiopatía, por ejemplo, reduciendo la proliferación de músculo liso, reducir los ataques al corazón, reducir la agregación plaquetaria y reducir los accidentes cerebrovasculares así como la arteriopatía periférica (obstrucción de las arterias a las piernas).

25 Ejemplos de estatinas incluyen, pero no se limitan a, mevastatina, pitavastatina, rosuvastatina, pentostatina (Nipent®), nistatina, lovastatina (Mevacor®), simvastatina (Zocor®), pravastatina (Pravachol®), fluvastatina (Lescol®), atorvastatina (Lipitor®), cerivastatina (Baycol®), o combinaciones de las mismas. También se dan a conocer estatinas adecuadas para su uso en las composiciones y los usos de la invención en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.681.893; 5.273.995; 5.356.896; 5.354.772; 5.686.104; 5.969.156; y 6.126.971. Ya que algunas estatinas pueden existir en una forma inactiva, tal como una lactona (por ejemplo, simvastatina), la invención abarca el uso de la forma activa (por ejemplo, forma de b-hidroxiácido) de las mismas. Véase Physicians Desk Reference, 54^a ed. (2000) págs. 1917-1920.

35 Los fibratos o derivados de ácido fibrico se consideran agentes moduladores de lípidos de amplio espectro porque aunque su acción principal es disminuir los triglicéridos séricos, también tienden a reducir el colesterol LDL y a elevar el colesterol HDL. Se cree que el uso combinado de los compuestos de la invención y un fibrato puede reducir el riesgo de acontecimientos de cardiopatía coronaria en aquéllos con bajo colesterol HDL o con triglicéridos elevados acelerando la descomposición química (es decir, catabolismo) de lipoproteínas ricas en triglicéridos que circulan en el cuerpo.

Los fibratos incluyen, pero no se limitan a, bezafibrato, ciprofibrato, fenofibrato, gemfibrozilo, clofibrato o combinaciones de los mismos. Se dan a conocer fibratos adecuados para su inclusión en las composiciones o su administración en los usos de la invención en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.895.762; 6.074.670; y 6.277.405.

40 Las biguanidas para su uso en las composiciones y los usos de la invención incluyen, pero no se limitan a, metformina, fenformina, buformina o combinaciones de las mismas. También se dan a conocer biguanidas adecuadas para su uso en las composiciones o los métodos de la invención en la patente estadounidense n.^o 6.303.146. El uso combinado de los compuestos de la invención y una biguanida puede mejorar el control glucémico potenciando la sensibilidad a la insulina en el hígado y en el músculo. La combinación puede reducir o evitar factores de riesgo cardiovasculares tales como dislipidemia, niveles elevados de inhibidor de activador del plasminógeno 1, otras anomalías fibrinolíticas, hiperinsulinemia, resistencia a la insulina y es un agente terapéutico seguro y eficaz para el tratamiento de diabetes tipo 2.

50 En otra realización, los compuestos de la invención pueden usarse en combinación con glitazonas, que pueden aumentar la captación de glucosa en el músculo y reducir la producción de glucosa endógena. Las glitazonas incluyen 5-((4-(2-(metil-2-piridinilamino)etoxi)-fenil)metil)-2,4-tiazolidindiona, troglitazona, pioglitazona, ciglitazona, WAY-120.744, englitazona, AD 5075, darglitazona, rosiglitazona, combinaciones de las mismas, o una sal, solvato, clatrato, polimorfo, profármaco o metabolito farmacológicamente activo farmacéuticamente aceptable de las mismas. Se dan a conocer glitazonas adecuadas para su uso en las composiciones o los métodos de la invención en las patentes estadounidenses n.^{os} 4.687.777; 5.002.953; 5.741.803; 5.965.584; 6.150.383; 6.150.384; 6.166.042; 6.166.043; 6.172.090; 6.211.205; 6.271.243; 6.288.095; 6.303.640; y 6.329.404.

Composiciones que comprenden proteínas LCAT modificadas de la invención y una sulfonilurea o un derivado de la misma pueden aumentar la liberación de insulina a partir del páncreas y pueden aumentar adicionalmente los niveles de insulina reduciendo el aclaramiento hepático de la hormona. Los fármacos a base de sulfonilurea para su

uso en las composiciones y los métodos de la invención incluyen, pero no se limitan a, glisoxepid, gliburida, acetohexamida, clorpropamida, glibomurida, tolbutamida, tolazamida, glipizida, gliclazida, gliquidona, glihexamida, fenbutamida, tolclclamida, combinaciones de las mismas, o una sal, solvato o clatrato farmacéuticamente aceptable.

5 Las composiciones de combinación también pueden incluir agentes que inhiben CETP. Tales agentes son, por ejemplo, Torcetrapib y propanotioato de S-(2[[1-(2-etilbutil)ciclohexil]carbonil]amino]fenil)-2-metiló.

10 Los agentes activos adicionales incluyen también fármacos cardiovasculares. Los fármacos cardiovasculares para su uso en combinación con los compuestos de la invención para prevenir o tratar enfermedades cardiovasculares incluyen fármacos antiadrenérgicos periféricos, fármacos antihipertensivos de actuación central (por ejemplo, metildopa, metildopa HCl), vasodilatadores directos antihipertensivos (por ejemplo, diazoxida, hidralazina HCl), fármacos que afectan al sistema de renina-angiotensina, vasodilatadores periféricos, fentolamina, fármacos antianginosos, glucósidos cardíacos, inodilatadores (por ejemplo, amrinona, milrinona, enoximona, fenoximona, imazodán, sulmazol), fármacos antidisríticos, bloqueantes de la entrada de calcio, ranitina, bosentán y rezulina.

Dependiendo del trastorno para el que se busca tratamiento, los compuestos y las composiciones de la invención se usan en terapia de combinación con otros productos terapéuticos que logran un efecto biológico específico.

15 1. Fármacos hipocolesterolemiantes

Diversos medicamentos pueden disminuir los niveles de colesterol en sangre. Pueden prescribirse individualmente o en combinación con otros fármacos. Algunos de los tipos comunes de fármacos hipocolesterolemiantes incluyen estatinas, resinas y ácido nicotínico (niacina), gemfibrozilo y clofibrato. Por tanto, se contempla una terapia de combinación utilizando, por ejemplo, clofibrato (Atromid-S, que eleva los niveles de colesterol HDL y disminuye los niveles de triglicéridos), gemfibrozilo (Lopid, que eleva los niveles de colesterol HDL), ácido nicotínico (que funciona en el hígado afectando a la producción de grasas sanguíneas y se usa para disminuir los triglicéridos y el colesterol LDL, y elevar el colesterol HDL ("bueno")), resinas (que se denominan también fármacos de unión a ácidos biliares y funcionan en los intestinos promoviendo un aumento de la eliminación de colesterol), incluyendo colestiramina (Questran, Prevalite, Lo-Cholest), colestipol (Colestid) y colesevelam (WelChol), y estatinas incluyendo atorvastatina (Lipitor), fluvastatina (Lescol), lovastatina (Mevacor), pravastatina (Pravachol), rosuvastatina cálcica (Crestor) y simvastatina (Zocor).

30 Los fármacos de primera elección para colesterol LDL elevado son los inhibidores de HMG CoA reductasa, por ejemplo, atorvastatina, fluvastatina, lovastatina, pravastatina, rosuvastatina y simvastatina. Los fármacos de estatinas son eficaces para disminuir los niveles de colesterol LDL, tienen pocos efectos secundarios a corto plazo inmediatos, son fáciles de administrar, tienen una alta aceptación por el paciente y tienen pocas interacciones fármaco-fármaco.

Otra clase de fármacos para disminuir LDL son los secuestrantes de ácidos biliares (colesevelam, colestiramina y colestipol) y ácido nicotínico (niacina), que se ha mostrado que reducen el riesgo de cardiopatía coronaria en ensayos clínicos controlados. Ambas clases de fármacos parecen estar libres de efectos secundarios graves. Pero ambos pueden tener efectos secundarios molestos y requieren una educación del paciente considerable para lograr la adherencia. El ácido nicotínico puede usarse por pacientes con niveles de triglicéridos que superan 250 mg/dl porque los secuestrantes de ácidos biliares tienden a elevar los niveles de triglicéridos.

35 2. Inhibidores de ACE

La angiotensina II provoca que los vasos sanguíneos se contraigan y de ese modo estrecha los vasos sanguíneos. El estrechamiento de los vasos aumenta la tensión dentro de los vasos y puede provocar tensión arterial alta (hipertensión). La angiotensina II se forma a partir de angiotensina I en la sangre mediante la enzima, enzima convertidora de angiotensina (ACE). Los inhibidores de ACE disminuyen la producción de angiotensina II. Como resultado, los vasos sanguíneos se agrandan o dilatan, y se reduce la tensión arterial. Los inhibidores de ACE que están disponibles en los Estados Unidos incluyen captopril (Capoten), benazepril (Lotensin), enalapril (Vasotec), lisinopril (Prinivil, Zestril) fosinopril (Monopril), ramipril (Altace), perindopril (Aceon), quinapril (Accupril), moexipril (Univasc) y trandolapril (Mavik).

C. Fármacos antiinflamatorios

En la prevención y el tratamiento de inflamación, se contempla terapia de combinación con, por ejemplo, ácido acetilsalicílico (Aspirina, Ecotrin), salicilato de colina y magnesio (Trilisate), diclofenaco (Voltaren, Cataflam, Voltaren-XR), diflunisal (Dolobid), etodolaco (Lodine), fenoprofeno (Nalfon), flurbiprofeno (Ansaid), ibuprofeno (Advil, Motrin, Medipren, Nuprin), indometacina (Indocin, Indocin-SR), ketoprofeno (Orudis, Oruvail), meclofenamato (Meclomen), nabumetona (Relafen), naproxeno (Naprosyn, Naprelan, Anaprox, Aleve), oxaprozina (Daypro), fenilbutazona (Butazolidine), piroxicam (Feldene), salsalato (Disalcid, Salflex), tolmetina (Tolectin), valdecoxib (Bextra) y fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) selectivos de COX-2 incluyendo Bextra, Celebrex, Naproxen y Vioxx. Los AINE de venta bajo receta incluyen ibuprofeno (Brufen), aceclofenaco (Preservex), acemetacina (Emflex), azapropazona (Rheumox), celecoxib (Celebrex), dexketoprofeno (Keral), diclofenaco (Voltarol, Diclomax, Arthrotec), diflunisal (Dolobid), etodolaco (Lodine), fenbufeno (Lederfen), fenoprofeno (Fenopron), flurbiprofeno (Froben),

indometacina, ketoprofeno (Orudis, Oruvail), ácido mefenámico, meloxicam (Mobic), nabumetona (Relifex), naproxeno (Naprosyn, Synflex), fenilbutazona (Butacote), piroxicam (Feldene), sulindaco (Clinoril), tenoxicam (Mobiflex) y ácido tiaprofénico (Surgam).

D. Fármacos antitrombosis

5 En usos para la prevención y el tratamiento de estados relacionados con trombosis, se contempla terapia de combinación con fármacos antitrombosis tales como fármacos anticoagulantes, que inhiben la capacidad de la sangre para formar coágulos, o coagular, e incluyen dalteparina (Fragmin), danaparoides (Orgaran), enoxaparina (Lovenox), heparina (diversos), tinzaparina (Innohep), warfarina (Coumadin) y lepirudina (Refludan), y fármacos antiplaquetarios tales como aspirina, ticlopidina (Ticlid), clopidogrel (Plavix), tirofiban (Aggrastat) y eptifibatida (Integrilin).
 10 Todavía otros métodos incluyen el uso de bivalirudina (inhibidor de trombina selectivo y reversible), argatrobán (inhibidor reversible de trombina) y heparinas de bajo peso molecular (LMWH), incluyendo enoxaparina (Lovenox), dalteparina (Fragmin), ardeparina (Normiflo), fondaparinux e idraparinux. Todavía otros fármacos antitrombosis contemplados para su uso en métodos de la invención incluyen fragmina (inyección de dalteparina sódica), lovenox (enoxaparina sódica), Normiflo (ardeparina sódica), Orgaran (danaparoides sódico), inhibidores de FXa indirectos (dependientes de antitrombina) tales como fondaparinux (Arixtra®) e idraparinux, inhibidores de FXa directos (independientes de antitrombina) tales como BAY 59-7939 [Bayer], DPC-423 [Bristol-Myers Squibb], DX-9065a [Daiichi], LY517717, razaxabán (DPC906), lepirudina (Refludan®), desirudina (Revasc®), bivalirudina (Hirulog®, Angiomax®), argatrobán (Novastan®), melagatrán y ximelagatrán (Exanta®).

Debe entenderse que el trastorno que puede tratarse usando las composiciones de la presente invención está limitado sólo por el hecho de que el trastorno necesita una intervención terapéutica que inhiba la agregación plaquetaria. Las dosis del agente pueden modificarse para cada sujeto individual. Para cada directriz particular sobre las vías de administración y los usos se remite a los expertos en la técnica al Physician's Desk Reference para descripciones generalizadas de formulaciones, vías de administración y monitorización de pacientes usados para agentes tales como Aggrastat™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1933-1937, PDR, 57ª edn., 2003), Aggrenox™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1023-1026, PDR, 57ª edn., 2003), Agrilin™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 3142-3143, PDR, 57ª edn., 2003), Flolan™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1516-1521, PDR, 57ª edn., 2003), Integrilin™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 2138-2142, PDR, 57ª edn., 2003), Presantine™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1052-2053, PDR, 57ª edn., 2003), Plavix™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1098-1101, PDR, 57ª edn., 2003), Pletal™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 2780-2782, PDR, 57ª edn., 2003), REoPro™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1866-1870, PDR, 57ª edn., 2003), Coumdin™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1074-1079, PDR, 57ª edn., 2003), Fragmin™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 2750-2754, PDR, 57ª edn., 2003), Hep-Lock™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 1284-1288, PDR, 57ª Edn., 2003), Lovenox™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 739-744, PDR, 57ª edn., 2003), Miradon™ (véase por ejemplo, la entrada en las páginas 3051-3052, PDR, 57ª edn., 2003). Estas entradas en el PDR se proporcionan para mostrar el nivel de experiencia en la técnica referente a la formulación y el uso de las composiciones como anticoagulantes y agentes antiplaquetarios.

E. Fármacos antidiabéticos.

40 También se contempla terapia de combinación usando fármacos antidiabéticos que disminuyen los niveles de glucosa en sangre. Excepto para insulina, exenatida y pramlintida, los antidiabéticos se administran por vía oral y por tanto se denominan agentes hipoglucémicos orales o agentes antihiperoglucémicos orales. Los fármacos antidiabéticos se dividen en seis grupos: insulina, sulfonilureas, inhibidores de alfa-glucosidasa, biguanidas, meglitinidas y tiazolidindionas.

45 La insulina (Humulin, Novolin) controla los niveles de glucosa en sangre. Las formas incluyen suspensión de insulina isofana, suspensión de insulina de zinc y otras formulaciones que extienden la duración de la acción de la insulina. También se contempla el uso de formas inhaladas de insulina.

Las sulfonilureas aumentan la liberación de insulina a partir de las células beta del páncreas, e incluyen clorpropamida [Diabinese], tolazamida [Tolinase], glipizida [Glucotrol], glibemipirida (Amaril), tolbutamida (Orinase), acetohexamida (Dymelor), gliburida (Diabeta, Micronase, Glynase) y gliclazida (Diamicon).

50 Los inhibidores de alfa-glucosidasa inhiben la conversión de disacáridos e hidratos de carbono complejos en glucosa, y se usan en terapia de combinación con sulfonilureas u otros agentes hipoglucémicos. Este tipo de agente antidiabético incluye acarbosa [Precose] y miglitol [Glyset].

La clase de biguanidas de compuestos mencionados anteriormente disminuye la producción de glucosa hepática, disminuye la absorción intestinal de glucosa y aumenta la captación y el uso de glucosa periférica.

55 La clase de meglitinida de compuestos estimula la producción de insulina y puede usarse en combinación con metformina. Esta clase incluye repaglinida (Prandin) y nateglitinida (Starlix).

Un agente de tiazolidindiona reduce la producción de glucosa en el hígado y aumenta la captación de glucosa

dependiente de insulina en células musculares. Estos agentes pueden usarse en combinación con metformina o una sulfonilurea, e incluyen rosiglitazona (Avandia) y pioglitazona (Actos).

También se contempla terapia de combinación con análogos peptídicos antidiabéticos. Tales análogos incluyen incretinas que son secretagogos de insulina, incluyendo péptido similar a glucagón-1 (GLP-1) y péptido inhibidor gástrico (también conocido como péptido insulínico dependiente de glucosa o GIP). Tanto GLP-1 como GIP se inactivan mediante la dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4). Otros péptidos incluyen exenatida (también Exendin-4, comercializado como Byetta) que es un agonista de GLP y es más resistente a la degradación por DPP-4; inhibidores de dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4) que mantienen la concentración sanguínea de GLP-1 inhibiendo su degradación por dipeptidil peptidasa-4 (DPP-4), incluyendo esta clase de péptidos vildagliptina y sitagliptina, y análogos de agonistas de amilina que ralentizan el vaciado gástrico y suprimen los glucagones, incluyendo este tipo pramlintida.

Se entiende que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención para una situación o problema específico estará dentro de las capacidades de un experto habitual en la técnica en vista de las enseñanzas contenidas en el presente documento. A continuación aparecen ejemplos de los productos de la presente invención y procedimientos representativos para su aislamiento, uso y fabricación.

Ejemplo 1

Preparación de proteína LCAT modificada

Se clonó un polinucleótido que codifica para proteína LCAT humana silvestre (SEQ ID NO: 1) a partir de una biblioteca de ADNc de hígado humano. Se mutagenizó ADN que codifica para la proteína LCAT humana silvestre usando el kit de mutagénesis dirigida al sitio Quickchange (Stratagene) bien conocido y utilizado de manera rutinaria en la técnica.

En resumen, se incorporaron pares de cebadores que contenían las mutaciones diseñadas en las moléculas de ADN recién sintetizadas. Se etiquetó la secuencia que codifica para LCAT recién sintetizada con un polinucleótido que codifica para un fragmento Fc humano en el extremo C-terminal de la proteína codificada. Se digirió el molde original con endonucleasa Dpn I. Se transformó el ADN de vector cortado que contenía los mutantes deseados en *E. coli* XLI-Blue. Se recuperaron plásmidos que codifican para LCAT mutante a partir de la *E. coli* transformada. Se confirmó la presencia de las mutaciones en los plásmidos mediante análisis de secuenciación de ADN y se transfectoron constructos de LCAT-Fc mutantes en células CHO para la expresión de proteínas usando un conjunto de vectores a base de DHFR y medios definidos químicamente. Se aislaron proteínas mutantes de fusión LCAT humana recombinante-Fc (rhLCAT-Fc) (es decir, proteínas LCAT modificadas) de los medios de cultivo de células CHO transfectadas. Las producciones (es decir, fermentaciones) han implicado el crecimiento de células CHO transfectadas en o bien frascos agitadores o bien recipientes de biorreactores secretándose rhLCAT-Fc al medio.

Se realizó la purificación de proteínas LCAT humanas modificadas fusionadas a Fc tal como sigue. Se recogieron normalmente los cultivos tras 4-6 días de producción de proteínas y se aisló el sobrenadante bruto de las células mediante centrifugación o filtración por fibras huecas para producciones en frasco agitador y biorreactor, respectivamente. Entonces, la mezcla bruta o bien se cargó directamente o bien se concentró 10x - 20x y se intercambió el tampón a fosfato de sodio 20 mM, pH 7,2, NaCl 300 mM, azida al 0,05% y se cargó sobre resina mAbSelect Sure (GE Biosciences). Entonces se lavó la resina con el mismo tampón fosfato con alto contenido en sal 5 - 10 veces y se eluyó la proteína unida con citrato 300 mM, pH 3,4. Se neutralizaron las fracciones eluidas con tampón Tris 1 M, pH 8,0. Con el fin de enriquecer el material purificado por afinidad a proteína A hasta más del 90% de proteína de longitud completa, se utilizó cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) de alta resolución. Se cargó un conjunto con pH neutralizado directamente sobre una columna Biosuite Phenyl HIC preempaquetada (Waters) dando como resultado que el volumen de especies truncadas no se retuviese, y el volumen de la proteína de longitud completa se adhiriese a la columna. Se eluyeron las proteínas LCAT modificadas-Fc mediante un gradiente lineal hasta el 100% de H₂O Milli-Q. Se analizaron las fracciones para determinar el porcentaje de LCAT de longitud completa mediante la secuencia N-terminal (NTS) y se agruparon por consiguiente. Entonces se concentró un conjunto de HIC y se purificó adicionalmente mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) preparativa con PBS, pH 7,2, glicerol al 10%, EDTA 50 μM como fase móvil. Se concentró el producto de SEC no agregado hasta 5 mg/ml si es necesario, se alicuotó y se congeló inmediatamente.

Ejemplo 2

Exámenes de proteínas LCAT modificadas

Actividad enzimática de LCAT

Se determinó la actividad de las proteínas LCAT modificadas midiendo el cambio de la tasa de conversión de colesterol marcado con ³H (FC) en éster de colesterol (CE). En el ensayo de actividad de LCAT en plasma (CER), se equilibraron muestras de plasma humano con una cantidad traza de colesterol radiomarcado a 4°C y se midió la tasa de esterificación de colesterol mediante análisis de cromatografía en capa fina (CCF) tras incubación a 37°C (Dobiasova y Frohlich, *Physiol Res.* 1996; 45, 65-73).

5 Para medir la actividad del compuesto usando un formato de ensayo de apoAI-liposoma, se expresó proteína LCAT modificada en células CHO y se recogió la enzima secretada a partir de las células transfectadas de manera estable en el medio de cultivo libre de suero. Se determinó la actividad de la enzima LCAT modificada en los medios de cultivo usando sustratos de apoAI-liposoma preparados mediante el procedimiento de diálisis de colato convencional (Chen *et al.* (1982) *J. Lipid Res.* 23: 680-691). La mezcla inicial contenía fosfatidilcolina de huevo (PC) (Sigma), ³H-colesterol no esterificado/apoAI humana (razón molar de 250:12,5:0,8). Tras la diálisis, se incorporaron los proteoliposomas con la proteína LCAT modificada. Se determinó la actividad de LCAT midiendo la conversión de colesterol radiomarcado en éster de colesterol y se expresó en nmol de CE/ml por hora. Se midió la actividad de la enzima LCAT modificada en forma purificada usando el mismo ensayo, excepto porque se purificó la proteína LCAT recombinante o bien con una columna de afinidad a proteína A convencional que reconocía específicamente el fragmento de fusión de Fc de la proteína recombinante, o bien con resina de afinidad que reconoce específicamente la etiqueta de His de la proteína recombinante. Se expresó la actividad de LCAT de muestras purificadas en nmol de CE/μg/hora.

10 Se resumen los intervalos de actividad de las proteínas LCAT modificadas a modo de ejemplo en la tabla 3.

15

Tabla 3

Posición	Proteína LCAT modificada	Actividad de LCAT (nmol/h/μg)
Silvestre	Secuencia silvestre	+
	Adición de Q antes del primer aminoácido	++
	Adición de P entre los aminoácidos 1 y 2	++
	Usar el péptido señal de cadena kappa de ratón	++
	Usar el péptido señal de IgG1 humana	++
	Fusión de Fc de IgG1 humana N-terminal	-
	Adición de FWLLNV en el extremo N-terminal	++
	Adición de FWLLNVLFPP en el extremo N-terminal	++
	Adición de FWLLNVLFPP en el extremo C-terminal	+++
	F1	F1A
F1G		++
F1I		++
F1L		++
F1M		++
F1P		++
F1V		++
F1C		++
F1W		+++
F1Y		++
F1T		++
F1S		+++
F1Q		++
F1N		++
F1H	++	
L3	F1D	++
	L3I	++
	L3F	++
	L3C	++
	L3W	++
	L3Y	++
L4	L4A	++
	L4I	++
	L4M	++
	L4F	++
	L4V	++
	L4W	++
	L4Y	++
	L4T	++

ES 2 449 483 T3

	L4Q	++
	L4R	++
N5	N5A	++
	N5M	++
	N5M	++
	N5H	++
	N5K	++
	N5D	++
V6	N5E	++
	L7M	++
	L7F	++
	L7E	++
	C31A	++
L7	C31I	+++
	C31M	++
	C31F	+++
	C31V	++
	C31C	++
	C31W	++
	C31Y	+++
	C31T	++
	C31R	++
	C31H	++
C31	N384C	++
	N384Q	++
	E416C	++
	F1A-C31Y	++
	L4F-C31Y	+++
	N4E-C31Y	++
	N5Q-C31Y	++
	N5D-C31Y	+++
	N5A-C31Y	+++
T246N	V28A-C31I	++
N384	V28I-C31I	++
W2-C31	V28C-C31I	++
N5-C31	V28T-C31I	++
L4-C31	V28R-C31I	++
N5-C31	P29GC31-I	++
	P29F-C31I	++
	P29T-C31I	++
V28-C31	G30A-C31I	++
	G30I-IC31	++
	C21I-L32A	++
	IC31-IL32	++
	C31I-L32M	++
	C31I-L32F	+++
	C31I-L32C	++
	C31I-L32W	++
	C31I-L32Y	++
	C31I-L32T	++
	C31I-L32S	++
	C31I-L32N	++
	C31I-L32H	+++
P29-C31	C31I-L32E	++
	C31I-G33I	++
	C31I-G33M	++
	C31I-G33F	++
	C31I-G33S	++
	C31I-G33H	++
	C31I-N34A	++
G30-C31	G30A-C31I	++
	G30I-IC31	++
C31-L32	C21I-L32A	++
	IC31-IL32	++
	C31I-L32M	++
	C31I-L32F	+++

	C31-L32C	++
	C31-L32W	++
	C31-L32Y	++
	C31-L32T	++
	C31-L32S	++
	C31-L32N	++
	C31-L32H	+++
	C31-L32E	++
C31-G33	C31-G33I	++
	C31-G33M	++
	C31-G33F	++
	C31-G33S	++
	C31-G33H	++
C31-N34	C31-N34A	++
	C31-N34C	++
	C31-N34S	++
	C31-N34R++	+++

Tal como se usa en el presente documento, “+” es la actividad de la proteína silvestre; “++” – la actividad enzimática de LCAT está en el intervalo de desde el -20% hasta el +50% de la actividad de la proteína silvestre; “+++” – la actividad de LCAT es al menos el 50% superior a la de la proteína silvestre tal como se mide en el mismo entorno experimental. “-” indica que la actividad está por debajo del nivel detectable.

- 5 Se purificaron proteínas LCAT modificadas con actividad enzimática de al menos un 20% superior a la de la proteína LCAT silvestre en una escala mayor para determinar las secuencias N-terminales de la proteína LCAT modificada. Se sometieron las proteínas LCAT modificadas que mantenían una secuencia N-terminal intacta sin ningún truncamiento a evaluación adicional de la estabilidad y eficacia *in vivo*.

Estabilidad y eficacia *in vivo* de las entidades de proteína LCAT modificada

- 10 Se evaluaron moléculas de proteína LCAT modificada en modelos animales incluyendo ratones, hámsteres y conejos. Las lecturas para la evaluación *in vivo* incluían la eficacia del aumento de los niveles de colesterol HDL en plasma (HDL-C) y la estabilidad (PK). Se trataron los animales de elección con una dosificación única o una dosificación múltiple de proteína LCAT modificada y durante el periodo de tiempo de hasta 255 horas, se aislaron muestras de plasma de los animales y se realizaron las mediciones.

- 15 Se determinó HDL-C enzimáticamente usando enzima modificada con polietilenglicol (PGE) y sulfato de dextrano, tal como se describe en el kit de 3ª generación de HDL-C plus, cobas, (n.º de cat. 04713311 190), y usando un analizador automático Roche/Hitachi 904/911/912/MODULAR analyzers CAN 435.

- Se midió PK tal como sigue. En resumen, el ensayo usado para determinar las concentraciones de proteína LCAT recombinante-Fc era un método de ELISA de tipo sándwich desarrollado en Amgen. Se diluyó el clon de anti-LCAT de ratón 9B14A12 en solución salina tamponada con fosfato (PBS), entonces se recubrió sobre los pocillos de una placa de microtitulación de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) y se incubó durante la noche a $5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Se lavó la placa 3 veces con tampón de lavado 1X KPL. Se dispensó a los pocillos un tampón de bloqueo compuesto por leche desnatada en polvo al 10% (NFDM) en PBS + Tween-20 al 0,05% (PBST). Tras un mínimo de una hora de incubación a temperatura ambiente ambiental (TAA) sin agitación, se eliminó el tampón de bloqueo de los pocillos. A continuación, se añadieron a la placa los patrones de ensayo de LCAT-Fc, NSB y muestras de control de calidad (QC), que se prepararon en el 100% de suero de conejo blanco de Nueva Zelanda y se trataron previamente a un factor de dilución de 50 en PBST + NFDM al 10%, junto con muestras de suero de conejo que también se trataron previamente en PBST + NFDM al 10%. Tras una hora de incubación a TAA con agitación, se lavó la placa seis veces con tampón de lavado 1X KPL, luego se diluyó un anticuerpo de cabra anti-Fc de conejo marcado con peroxidasa del rábano con reactividad cruzada mínima con proteína sérica humana (Jackson; n.º 111-035-046) a un factor de dilución de 25.000 en NFDM al 10% que contenía suero de conejo reunido al 2% y se añadió a los pocillos para la detección de LCAT-Fc. Tras una hora de incubación a TAA con agitación, se lavó la placa y se reveló usando disolución de sustrato TMB (tetrametilbencidina y peróxido 1:1, Kirkegaard & Perry Laboratories). Se extinguió la reacción colorimétrica resultante con ácido fosfórico 1+9 (VWR; n.º VW3346-1) tras diez minutos de incubación a TAA y se determinaron las densidades ópticas (DO) a una longitud de onda de 450-650 nm. Se logró la conversión de los valores de DO en concentraciones para las muestras de QC y desconocidas a través de comparación mediada por software Watson con una curva patrón analizada simultáneamente, que se sometió a regresión según un modelo logístico de cuatro parámetros con un factor de ponderación de 1.

- 40 Los resultados mostraron que la proteína LCAT modificada sometida a prueba tenía una estabilidad mejorada en comparación con proteína LCAT silvestre y que se aumentó de manera robusta HDL de una manera dependiente de la dosis. Se analizaron adicionalmente las moléculas de proteína LCAT modificada que mostraban eficacia en la elevación de los niveles de HDL-C en plasma y estabilidad *in vivo* aceptable en modelos de aterosclerosis preclínicos.

Modelos animales de aterosclerosis

- Este estudio implicó el uso de conejos blancos de Nueva Zelanda (NZW) silvestres. Se trataron los animales con dieta aterogénica (alta en colesterol) durante 4 meses para inducir aterosclerosis, seguido por tratamiento usando LCAT modificada para la regresión de la aterosclerosis. Se dividieron los animales en 4 grupos para los tratamientos: a) vehículo; b) dosis de rLCAT baja y c) dosis de rLCAT alta; y d) sin tratamiento pero sacrificando los animales para la determinación de la línea basal de lesión de placas, respectivamente. Se fijó la duración del tratamiento durante 8-16 semanas dependiendo de si se producen efectos adversos a lo largo del transcurso. Al final del tratamiento, se evaluaron las lesiones ateroscleróticas. El procedimiento para evaluar la placa aterosclerótica fue el siguiente.
- En resumen, se anestesiaron los animales usando pentobarbital y luego se realizó una perfusión con solución salina, seguido por fijación con paraformaldehído. Se aisló la aorta retirando todos los órganos adheridos y los tejidos grasos y se separó desde la parte distal a la proximal. Entonces se inmovilizó la aorta sobre placas de cera y se tiñó usando Sudán IV. Se usó fotografía con microscopio óptico para cuantificar el área de la lesión de placas y se analizó la tinción usando el software Image-Pro.
- Ejemplo 3

Proteína LCAT recombinante con mutaciones dobles

- En vista de las mediciones de actividad observadas anteriormente con diversas mutaciones de LCAT, se prepararon varios mutantes dobles que comprendían una sustitución C31Y y una sustitución adicional, tal como se muestra a continuación, y se evaluaron para determinar la actividad mediante la capacidad para convertir colesterol radiomarcado (FC) en éster de colesterol (CE), tal como se describió anteriormente.

- Se muestran los resultados a continuación en la tabla 4 comparándose los mutantes dobles con proteína silvestre y la proteína C31Y LCAT mutante individual. Tal como se usó en la tabla 4, “-” indica que la actividad enzimática estaba por debajo del nivel de detección; “+” se muestra como la actividad de la proteína LCAT silvestre; “++” indica que la actividad enzimática estaba en el intervalo del -20% al +50% de la actividad de la proteína silvestre; “+++” indica actividad en el intervalo del +100% al +500% de la actividad de la proteína silvestre; y “++++” indica actividad enzimática mayor de +500% de la actividad de LCAT silvestre.

Tabla 4

Proteína LCAT	Actividad de LCAT (nmol/h/μg)
Silvestre	+
C31Y	+++
C31Y, F1S	+++
C31Y, F1W	++++
C31Y, L4M	++
C31Y, L4K	+
C31Y, N34S	+++
C31Y, L32F	+++
C31Y, L32H	+++
C31Y, L7N	-

Ejemplo 4

- Comparación *in vivo* entre proteínas LCAT modificada y silvestre

Con el fin de evaluar individualmente la actividad *in vivo* de una proteína LCAT modificada en comparación con LCAT silvestre individualmente, se llevó a cabo el siguiente experimento.

- Se expresaron proteína LCAT silvestre recombinante y LCAT modificada que comprende una sustitución C31Y en células CHO transfectadas de manera estable. Se expresó la LCAT C31Y modificada y una proteína de fusión con Fc, derivándose el vehículo de Fc de IgG o bien humana o bien de conejo. Se expresó la proteína humana silvestre con una etiqueta de histidina (His) carboxilo-terminal y se purificó con perlas de afinidad que se unen específicamente a esta etiqueta. Se purificó la proteína LCAT C31Y modificada-Fc usando perlas de afinidad a proteína A. Se solubilizaron ambas formas de proteínas rLCAT purificadas en tampón que contenía PBS pH 7,2, EDTA 50 μM y glicerol al 10%.

- Se alimentaron ratones silvestres con pienso normal antes del estudio. Se les administró a los animales (n=4 por grupo) una única dosis de proteínas o bien silvestres o bien modificadas a 10 mg/kg mediante inyección i.v. y se recogieron muestras de sangre a determinados puntos de tiempo a lo largo de las siguientes dos semanas. Se evaluó el suero de cada muestra para determinar el contenido en proteína LCAT modificada o silvestre usando ELISA convencional. Se evaluó la actividad de la proteína mediante la conversión de colesterol radiomarcado (FC)

en éster de colesterilo (CE). Se midieron los lípidos plasmáticos, colesterol total (CT), C de lipoproteínas de alta densidad (HDL-C) y triglicéridos (TG), usando un analizador clínico.

5 Los resultados indicaron que se aisló la proteína LCAT silvestre de los medios de cultivo de células CHO que tenía un peso molecular de 70 kD y una actividad de 20 nmol de CE/h/μg. Se mostró que la proteína silvestre tenía una vida media de menos de 30 minutos, y la actividad de LCAT en plasma en el plazo de 2 horas tras su administración aumentó del 30 al 40%. No se detectó ningún cambio en los niveles de HDL-C en plasma a lo largo del transcurso del estudio.

10 En cambio, se aisló la proteína LCAT modificada C31Y humana recombinante de los medios de cultivo de las células huésped con un peso molecular de 95 kD (monómero) y mostró una actividad de 200 nmol de CE/h/μg. Se determinó que la vida media para la proteína tras su administración era de aproximadamente 3 días, y en el plazo de 3 días tras su administración la actividad de LCAT en plasma aumentó hasta el 400%. Además, los niveles de HDL-C en plasma mostraron un aumento de aproximadamente 3,5 veces 24 horas tras la administración y duraron aproximadamente tres días antes de regresar al nivel basal.

Ejemplo 5

15 Evaluación de la actividad de LCAT modificada

Se diseñaron experimentos para evaluar la capacidad de una proteína LCAT modificada para restaurar los niveles de ApoA-I y HDL-C en ratones deficientes en *LCAT* (se generaron ratones deficientes en *LCAT* tal como se describe en la publicación *The Journal of Biological Chemistry*, 1997; 272: 15777-15781).

20 En resumen, se alimentó un grupo de ratones deficientes en *LCAT* y silvestres (n = 4 por grupo) con pienso normal antes del estudio. Entonces se trataron los animales mediante inyección i.v. de o bien proteína LCAT humana recombinante modificada [rhLCAT(C31Y)-huFc] a 10 mg/kg o bien tampón de vehículo e igual volumen (PBS pH 7,2, EDTA 50 μM, glicerol al 10%). Aproximadamente 24 horas tras la inyección, se sacrificaron los animales y se recogieron muestras de sangre. Se aislaron muestras de suero de la sangre. Se determinó la actividad de LCAT en plasma mediante la conversión de colesterol radiomarcado (FC) en éster de colesterilo (CE) con el uso de apoAI-proteoliposoma como sustrato. Se determinaron los niveles de proteína apoA-I en plasma mediante inmunotransferencia de tipo Western con el uso de anticuerpo anti-apoAI de ratón. Se midieron los lípidos plasmáticos (CT, HDL-C y TG) mediante un analizador clínico.

30 Los resultados mostraron que el tratamiento con la proteína rhLCAT modificada aumentó la actividad de LCAT en plasma en ratones silvestres y restauró la actividad de LCAT en plasma en ratones deficientes en *LCAT*. Además, el tratamiento con la proteína rhLCAT modificada restauró los niveles de proteína apoAI en plasma en ratones deficientes en *LCAT* hasta aproximadamente niveles normales (es decir, niveles de ratón silvestre), tal como se midió con inmunotransferencia de tipo Western. Además, el tratamiento con la proteína rhLCAT modificada restauró los niveles de HDL-C en plasma en ratones deficientes en *LCAT* hasta aproximadamente el nivel de ratón silvestre, tal como se midió con el analizador clínico indicado. Finalmente, el tratamiento con la proteína rhLCAT modificada suprimió los niveles de TG elevados en ratones deficientes en *LCAT* hasta los mismos niveles que el ratón silvestre con el mismo tratamiento, también tal como se midió.

Ejemplo 6

Evaluación *in vivo* adicional de la actividad de LCAT modificada

40 En otra serie de experimentos, se evaluó la actividad de rhLCAT modificada *in vivo* para determinar su efecto sobre los niveles de HDL-C en conejos.

45 En resumen, se alimentaron conejos blancos de Nueva Zelanda (peso corporal de ~2 kg cada uno) con pienso normal antes del estudio. Entonces se aleatorizaron los animales en tres grupos recibiendo cada grupo (n=4) tratamiento de o bien tampón de vehículo (PBS pH 7,2, EDTA 50 μM, glicerol al 10%) o bien proteína LCAT(C31Y)-rab Fc de conejo recombinante dosificada a 1,0 mg/kg o 10,0 mg/kg, respectivamente. A los puntos de tiempo indicados, se recogieron muestras de sangre para los análisis. Se aislaron muestras de suero de la sangre. Se determinó la actividad de LCAT en plasma mediante la conversión de colesterol radiomarcado (FC) en éster de colesterilo (CE) con el uso de apoAI-proteoliposoma como sustrato. Se midieron los lípidos plasmáticos (CT, HDL-C y TG) mediante un analizador clínico. Se usaron muestras de suero reunidas del mismo grupo de animales en fraccionamiento por FPLC, y se determinó el contenido en colesterol y TG en cada fracción mediante un analizador clínico.

55 Los resultados mostraron que el tratamiento con la proteína rLCAT modificada aumentó rápidamente la actividad de LCAT en plasma de maneras dependientes del tiempo y la dosis y también aumento de manera robusta los niveles de HDL-C en plasma, también de maneras dependientes del tiempo y la dosis. Además, la proteína rLCAT modificada moduló las partículas de HDL de manera dependiente de la dosis y reversiblemente sin aumentar los niveles de LDL o VLDL en plasma, tal como se indicó con el análisis de FPLC.

Ejemplo 7

Estudios de inmunogenicidad

Se llevaron a cabo estudios de inmunogenicidad con el fin de determinar si una secuencia de proteína LCAT modificada provocaría una respuesta inmunitaria desfavorable en seres humanos.

5 En resumen, se evaluaron dos péptidos de proteína LCAT mediante métodos *in silico* para determinar su potencial para inducir una respuesta inmunitaria. Un péptido tenía 33 residuos de longitud con la secuencia de aminoácidos de LCAT silvestre. El otro péptido tenía también 33 aminoácidos de longitud, pero incluía una modificación C16Y de la secuencia de LCAT silvestre, correspondiendo la mutación C16Y a la mutación de la secuencia de LCAT C31Y.

10 Los resultados mostraron que el péptido silvestre inducía una baja respuesta inmunitaria. Sorprendentemente, aún cuando se pronosticó que el péptido C16Y mutante induce una respuesta inmunitaria superior, se encontró que la respuesta inmunitaria real era bastante baja. En vista de este resultado, se cree que la proteína LCAT C31Y modificada es improbable que induzca una respuesta antiterapéutica cuando se administra *in vivo*.

15 La combinación de datos en este y en otros ejemplos en el presente documento indica que aunque una proteína LCAT silvestre es menos probable que induzca una respuesta inmunitaria, la actividad superior de la proteína LCAT modificada, y la baja capacidad de la proteína modificada para inducir una respuesta inmunitaria, hacen que la proteína LCAT modificada sea una alternativa terapéutica altamente deseable a la proteína silvestre.

La invención precedente se ha descrito en algún detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de comprensión.

REIVINDICACIONES

1. Proteína lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) modificada, en la que la proteína LCAT modificada comprende una modificación en la secuencia de aminoácidos de LCAT madura expuesta en SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2 tal como se expone en la figura 2; y
- 5 la modificación consiste en una sustitución en el residuo de aminoácido C31 seleccionada del grupo que consiste en C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31R y C31H.
2. Proteína lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) modificada, en la que la proteína LCAT modificada comprende una modificación en la secuencia de aminoácidos de LCAT madura expuesta en SEQ ID NO: 1; o SEQ ID NO: 2 tal como se expone en la figura 2; y
- 10 la modificación consiste en una sustitución en el residuo de aminoácido C31 seleccionada del grupo que consiste en C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31R y C31H, y una sustitución adicional en una posición de residuo de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en F1, L4, N5, V28, P29, G30, L32, G33 y N34.
3. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 2, en la que la sustitución adicional se selecciona del grupo que consiste en F1A, L4F, N5E, N5Q, N5D, N5A, V28A, V28I, V28C, V28T, V28R, P29G, P29F, P29T, G30A, G30I, L32A, L32I, L32M, L32F, L32C, L32W, L32Y, L32T, L32S, L32N, L32H, L32E, G33I, G33M, G33F, G33S, G33H, N34A, N34C, N34S y N34R.
- 15 4. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 2, en la que la sustitución C31 es una sustitución C31Y y la sustitución adicional es en una posición de residuo de aminoácido seleccionada del grupo que consiste en F1, L4, L32 y N34.
- 20 5. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 4, en la que la sustitución adicional se selecciona del grupo que consiste en F1S, F1W, L4F, L4M, N5D, L4K, N34S, L32F y L32H.
6. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 5, que comprende una sustitución L4F y una sustitución C31Y.
- 25 7. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 5, que comprende una sustitución C31Y, en la que la sustitución adicional es una sustitución N5D.
8. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 4, que comprende una sustitución N5 y una sustitución C31Y.
9. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 4, que comprende una sustitución L4 y una sustitución C31Y.
- 30 10. Proteína LCAT modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que tiene una actividad enzimática mayor que la proteína LCAT silvestre expuesta en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2 tal como se determina en un ensayo de tasa de esterificación de colesterol (CER) de la actividad de LCAT plasmática.
11. Proteína LCAT modificada que comprende la proteína LCAT según cualquiera de las reivindicaciones 1-10 y un vehículo.
- 35 12. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 11, en la que el vehículo se selecciona del grupo que consiste en una región constante de inmunoglobulina (Fc), un polímero soluble en agua y polietilenglicol.
13. Composición farmacéutica que comprende una proteína LCAT modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 40 14. Proteína LCAT modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en terapia.
15. Proteína LCAT modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 1-12, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LCAT.
16. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 15, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno relacionado con LCAT, en la que el trastorno relacionado con LCAT se selecciona del grupo que
- 45 consiste en aterosclerosis, inflamación, trombosis, cardiopatía coronaria, tensión arterial alta, síndrome de deficiencia de LCAT, enfermedad de Alzheimer, opacidad corneal, síndrome metabólico, dislipidemia, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, isquemia crítica de extremidades y angina de pecho.
17. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 15, en la que la terapia es para aumentar el colesterol HDL, o prevenir la acumulación de colesterol.

18. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 15, para su uso en un método de tratamiento o prevención de una enfermedad cardiovascular.
19. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 15, para su uso en el tratamiento o la prevención de aterosclerosis.
- 5 20. Proteína LCAT modificada según una cualquiera de las reivindicaciones 15-19, en la que la proteína LCAT se administra en combinación con un agente adicional.
21. Proteína LCAT modificada según la reivindicación 20, en la que el agente adicional se selecciona del grupo que consiste en una citocina, un fármaco contra la aterosclerosis, un fármaco hipocolesterolemiante, un inhibidor de ACE, un fármaco antiinflamatorio y un fármaco antitrombosis y un fármaco antidiabético.

10

FIGURA 1

- AAB20750 lecitina:colesterol aciltransferasa; LCAT [*Homo sapiens*]
- AAB34898 lecitina:colesterol aciltransferasa, LCAT [humana, plasma, péptido, 416 aa] (SEQ ID NO: 1))
- AAA59499 precursor de lecitina:colesterol aciltransferasa (SEQ ID NO: 2; mostrada en la figura 2)
- AAA59500 precursor de lecitina-colesterol aciltransferasa (EC 2.3.1.43)
- AAL11035 lecitina-colesterol aciltransferasa Lcat [*Mus musculus*]
- P04180 precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- NP_000220 precursor de lecitina-colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]
- NP_032516 lecitina colesterol aciltransferasa [*Mus musculus*]
- NP_058720 lecitina colesterol aciltransferasa [*Rattus norvegicus*]
- P53761 precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- NP_001075659 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Oryctolagus cuniculus*]
- O35840 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- O35573 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- Q08758 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa precursor (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- P18424 Precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- P30930_11 [Segmento 11 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- P30930_10 [Segmento 10 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
- P30930_9 [Segmento 9 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_8 [Segmento 8 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_7 [Segmento 7 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_6 [Segmento 6 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_5 [Segmento 5 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_4 [Segmento 4 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_3 [Segmento 3 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_2 [Segmento 2 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930_1 [Segmento 1 de 11] Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

P30930 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

O35724 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

O35502 Fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)

AAG22588 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Cavia porcellus*]

AAG22587 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Crocidura russula*]

AAG22586 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Didelphis marsupialis*]

AAB58992 lecitina:colesterol acil transferasa [*Microtus nivalis*]

AAG21089 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Erinaceus europaeus*]

AAG21088 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Didelphis marsupialis*]

AAG21087 lecitina:colesterol acil-transferasa [*Cavia porcellus*]

CAB56610 lecitina colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]

AAD28484 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]

AAB88662 lecitina:colesterol acil transferasa [*Akodon torques*]
AAB60791 lecitina:colesterol acil transferasa [*Marmota marmota*]
AAB59002 lecitina:colesterol acil transferasa [*Octodon lunatus*]
AAB59001 lecitina:colesterol acil transferasa [*Sciurus griseus*]
AAB59000 lecitina:colesterol acil transferasa [*Myoxus glis*]
AAB58999 lecitina:colesterol acil transferasa [*Eliomys quercinus*]
AAB58998 lecitina:colesterol acil transferasa [*Rhizomys pruinosus*]
AAB58997 lecitina:colesterol acil transferasa [*Nannospalax leucodon*]
AAB58996 lecitina:colesterol acil transferasa [*Spalax ehrenbergi*]
AAB58994 lecitina:colesterol acil transferasa [*Peromyscus maniculatus*]
AAB58993 lecitina:colesterol acil transferasa [*Cricetulus migratorius*]
AAB58990 lecitina:colesterol acil transferasa [*Clethrionomys glareolus*]
AAB58989 lecitina:colesterol acil transferasa [*Tatera kempii gambiana*]
AAB58988 lecitina:colesterol acil transferasa [*Micromys minutus*]
EDL92427 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_e [*Rattus norvegicus*]
EDL92426 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_d [*Rattus norvegicus*]
EDL92425 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_c [*Rattus norvegicus*]
EDL92424 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_b [*Rattus norvegicus*]
EDL92423 lecitina colesterol aciltransferasa, isoform CRA_a [*Rattus norvegicus*]
P53760 Precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
P16301 Precursor de fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa (lecitina-colesterol aciltransferasa) (fosfolípido-colesterol aciltransferasa)
ABN42857 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus leucopus*]
ABN42856 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42855 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]

ABN42853 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42852 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42851 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42850 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42849 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42848 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42847 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42846 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42845 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42844 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42843 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42842 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42841 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42840 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42839 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42838 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42837 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42836 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42835 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42834 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42833 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42832 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42831 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42830 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42829 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]

ABN42828 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42827 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42826 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42825 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42824 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42823 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42822 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42821 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42820 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42819 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42818 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42817 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42816 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42815 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42814 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42813 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42812 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42811 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42810 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42809 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42808 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42807 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42806 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42805 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42804 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABN42803 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]

EDL11335 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_b [*Mus musculus*]
EDL11334 lecitina colesterol aciltransferasa, isoforma CRA_a [*Mus musculus*]
EAW83190 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]
NP_001005715 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Xenopus tropicalis*]
CAD67533 lecitina colesterol acil transferasa [*Myomimus roachi*]
CAD67541 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphimys lorraineus*]
CAD67540 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphiurus parvus*]
CAD67539 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphiurus ocularis*]
CAD67534 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphiurus platyops*]
CAD67538 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphiurus microtis*]
CAD67537 lecitina colesterol acil transferasa [*Graphiurus murinus*]
CAD67532 lecitina colesterol acil transferasa [*Dryomys laniger*]
CAD67536 lecitina colesterol acil transferasa [*Eliomys melanurus*]
CAD67535 lecitina colesterol acil transferasa [*Aplodontia rufa*]
ABH06074 lecitina colesterol aciltransferasa [*Onychomys torridus*]
ABH06073 lecitina colesterol aciltransferasa [*Onychomys torridus*]
ABH06072 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus californicus*]
ABH06071 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus californicus*]
ABH06070 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus californicus*]
ABH06069 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus californicus*]
ABH06068 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus fraterculus*]
ABH06067 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus eva*]
ABH06066 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus eva*]
ABH06065 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus melanophrys*]
ABH06064 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus melanophrys*]

ABH06063 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus melanophrys*]
ABH06062 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus aztecus*]
ABH06061 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus aztecus*]
ABH06060 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus aztecus*]
ABH06059 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus mexicanus*]
ABH06058 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus mexicanus*]
ABH06057 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus mexicanus*]
ABH06056 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus mexicanus*]
ABH06055 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus truei*]
ABH06054 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus truei*]
ABH06053 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus truei*]
ABH06052 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus boylii*]
ABH06051 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus boylii*]
ABH06050 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus boylii*]
ABH06049 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus boylii*]
ABH06048 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus gossypinus*]
ABH06047 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus gossypinus*]
ABH06046 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus gossypinus*]
ABH06045 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus leucopus*]
ABH06044 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus leucopus*]
ABH06043 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus leucopus*]
ABH06042 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABH06041 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABH06040 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABH06039 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABH06038 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]

ABH06037 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus maniculatus*]
ABH06036 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus difficilis*]
ABH06035 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus difficilis*]
ABH06034 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus difficilis*]
ABH06033 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus difficilis*]
ABH06032 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus eremicus*]
ABH06031 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus eremicus*]
ABH06030 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus eremicus*]
ABH06029 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus crinitus*]
ABH06028 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus crinitus*]
ABH06027 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus crinitus*]
ABH06026 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus crinitus*]
ABH06025 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
ABH06024 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
ABH06023 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
ABH06022 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
ABH06021 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
ABH06020 lecitina colesterol aciltransferasa [*Peromyscus polionotus*]
AAH91155 Lecitina colesterol aciltransferasa [*Rattus norvegicus*]
AAH75304 Lecitina-colesterol aciltransferasa [*Xenopus tropicalis*]
AAH28861 Lecitina colesterol aciltransferasa [*Mus musculus*]
AAH14781 Lecitina-colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]
AAR03499 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Homo sapiens*]
AAF00979 lecitina colesterol aciltransferasa [*Mus musculus*]
AAD40188 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Rattus norvegicus*]
AAB86630 lecitina colesterol acil transferasa [*Canis familiaris*]

ES 2 449 483 T3

AAA59498 precursor de lecitina-colesterol aciltransferasa (EC 2.3.1.43)
CAA28651 lecitina-colesterol aciltransferasa (LCAT) [*Homo sapiens*]
CAA38029 Lecitina colesterol acil transferasa (LCAT); fosfatidilcolina-esterol aciltransferasa [*Mus musculus*]
BAA02839 precursor de lecitina-colesterol aciltransferasa [*Oryctolagus cuniculus*]
AAB65771 lecitina:colesterol aciltransferasa [*Rattus norvegicus*]
CAC18111 lecitina colesterol acil transferasa [*Acomys cahirinus*]
CAC18236 lecitina colesterol acil transferasa [*Uranomys ruddi*]
CAC18121 lecitina colesterol acil transferasa [*Mesocricetus auratus*]
CAC18122 lecitina colesterol acil transferasa [*Macrotarsomys ingens*]
CAC18114 lecitina colesterol acil transferasa [*Deomys ferrugineus*]
CAC18130 lecitina colesterol acil transferasa [*Steatomys sp.*]
CAC18118 lecitina colesterol acil transferasa [*Jaculus jaculus*]
CAC18129 lecitina colesterol acil transferasa [*Sicista kazbegica*]
CAC18124 lecitina colesterol acil transferasa [*Neotoma fuscipes*]
CAC18127 lecitina colesterol acil transferasa [*Otomys angoniensis*]
CAC18119 lecitina colesterol acil transferasa [*Lophuromys sikapus*]
CAC18123 lecitina colesterol acil transferasa [*Myospalax sp.*]
CAC18128 lecitina colesterol acil transferasa [*Phodopus roborovskii*]
CAC18126 lecitina colesterol acil transferasa [*Nesomys rufus*]
CAC18120 lecitina colesterol acil transferasa [*Mystromys albicaudatus*]
CAC18125 lecitina colesterol acil transferasa [*Napaeozapus insignis*]
CAC 18117 lecitina colesterol acil transferasa [*Dicrostonyx torquatus*]
CAC18115 lecitina colesterol acil transferasa [*Dendromus mystacalis*]
CAC18116 lecitina colesterol acil transferasa [*Dipus sagitta*]

CAC18113 lecitina colesterol acil transferasa [*Calomyscus mystax*]
CAC18112 Lecitina-colesterol acil transferasa [*Allactaga elater*]
AAQ10316 proteína similar a lecitina colesterol aciltransferasa [*Medicago truncatula*]
AAQ24609 lecitina-colesterol aciltransferasa [*Sus scrofa domestica*]
AAB58991 lecitina:colesterol acil transferasa [*Microtus nivalis*]
AAB60792 lecitina:colesterol acil transferasa [*Myocastor coypus*]
AAB60790 lecitina:colesterol acil transferasa [*Gerbillus henleyi*]
AAB59003 lecitina:colesterol acil transferasa [*Octodon lunatus*]
AAB58995 lecitina:colesterol acil transferasa [*Peromyscus maniculatus*]
AAA35388 lecitina colesterol aciltransferasa

FIGURA 2

AAA59499 precursor de lecitina:colesterol aciltransferasa (SEQ ID NO: 2)

LLLP AAFPFWLLNVLFPPHTTPKAELSNHTRPVILVPGCLGNQLEAKLDKPDVVNWMCYR
KTEDFFTIWLDLNMFLPLGVDCWIDNTRVVYNRSSGLVSNAPGVQIRVPGFGKTYSVEYL
DSSKLAGYLHTLVQNLVNGYVRDETVRAAPYDWRLEPGQQEYYRKLAGLVEEMHAAYG
KPVFLIGHSLGCLHLLYFLLRQPQAWKDRFIDGFISLGAPWGGSIKPLVLASGDNQGI P
HMSSIKLKEEQRITTTSPWMFPSRMAWPEDHVFISTPSFNYTGRDFQRFADLHFEEGWY
MWLQSRDLLAGLPAPGVEVYCLYGVGLPTPRTYIYDHGF PYTDPVGVLYEDGDDTVATRS
TELCGLWQGRQPQPVHLLPLHGIQHLNMVFSNLTLEHINA ILLGAYRQGPPASPTASPEP
PPPE