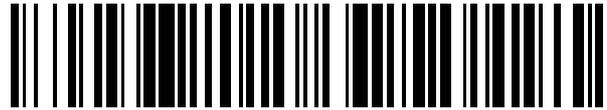


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 654**

51 Int. Cl.:

A61K 38/45 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

A61P 7/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2010 E 10725944 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2440240**

54 Título: **Uso de LCAT para tratar la anemia y la disfunción de los glóbulos rojos**

30 Prioridad:

10.09.2009 US 241223 P

12.06.2009 US 186668 P

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

01.12.2015

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One Medimmune Way
Gaithersburg, Maryland 20878, US**

72 Inventor/es:

**AUERBACH, BRUCE;
KRAUSE, BRIAN y
HOMAN, REYNOLD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 552 654 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Uso de LCAT para tratar la anemia y la disfunción de los glóbulos rojos

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la medicina y, en particular, al tratamiento de las enfermedades caracterizadas por la anemia y/o los glóbulos rojos que tienen una función anómala en cuanto a capacidad de deformación, oxigenación, agregación, metabolismo del ácido nítrico o esperanza de vida.

10

Antecedentes

La calidad y cantidad de glóbulos rojos (RBC, *Red Blood Cell*) en la corriente sanguínea se degradan normalmente durante periodos de estrés físico aumentado, produciendo anemia y aumento del riesgo de morbilidad y mortalidad. Los estreses físicos que se han relacionado con el desarrollo de la anemia incluyen enfermedades autoinmunitarias, cirugía mayor, trauma, enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedad crítica, diabetes, enfermedades del hígado, fallo cardíaco y enfermedades parasíticas. La inflamación sistémica es una característica común a todas estas situaciones como se manifiesta por la presencia de niveles aumentados de citocinas inflamatorias en la circulación. Incluso en personas predispuestas a padecer anemia, debido a hemoglobinopatía, por ejemplo, enfermedad de células falciformes o talasemia, los niveles de las citocinas inflamatorias se elevan frecuentemente y pueden agravar los síntomas de las enfermedades, en particular durante los episodios de crisis.

15

20

25

30

Una consecuencia de los niveles de citocinas inflamatorias elevadas es una reducción en la producción hepática de la enzima, la lecitina colesterol aciltransferasa (LCAT). Normalmente, la LCAT se libera al plasma desde el hígado para facilitar la renovación de lípidos plasmáticos y mantener el balance del colesterol y los fosfolípidos en la sangre y en los tejidos perfundidos por la sangre. El colesterol en exceso se retira de los tejidos, tales como arterias, y se envía al hígado por excreción en la bilis por un proceso conocido como transporte de colesterol inverso (RCT). En la primera etapa del RCT, el colesterol pasa desde las células tisulares a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) de la circulación. En la segunda etapa, la enzima LCAT potencia la capacidad de transportar colesterol de las HDL catalizando la transesterificación de un ácido graso a partir de fosfatidilcolina (PC) (también conocida como lecitina) del colesterol para formar éster de colesterol (CE). El producto CE se acumula en el interior de las HDL hasta que se retira en los receptores para HDL en el hígado. Los CE transportados al hígado por las HDL se convierten en colesterol y ácidos biliares que se excretan en la bilis.

35

40

Las consecuencias en la salud de la actividad disminuida de la LCAT plasmática son más evidentes en personas con Deficiencia Familiar de la LCAT (FLD), una rara enfermedad genética en la que la actividad de la LCAT plasmática está ausente. La ausencia de actividad de la LCAT da como resultado niveles altamente disminuidos de CE plasmáticos, reflejados en las HDL y lipoproteínas de baja densidad disminuidas y en la acumulación de exceso de sustrato de la LCAT en el plasma. Las consecuencias de la salud principales de la FLD son visión reducida que resulta de un crecimiento difuso de lípidos en las córneas, fallo renal eventual debido a la acumulación de lípidos renales (glomeruloesclerosis) y anemia hemolítica.

45

50

55

Las distorsiones en las composiciones de los lípidos de las lipoproteínas plasmáticas debidas a los trastornos metabólicos de los lípidos tales como los que resultan de la baja actividad de la LCAT se han asociado a cambios en el contenido lipídico de los RBC. Un cambio en los lípidos de los RBC en respuesta a los cambios de los lípidos plasmáticos puede alterar el rendimiento y la supervivencia de los RBC ya que estas propiedades son dependientes del contenido lipídico celular. Los tipos de cambios de los lípidos de los RBC que pueden darse son evidentes en los sujetos con FLD donde los RBC se enriquecen en colesterol y PC y disminuyen el contenido de esfingomielina (SM). Se obtuvo la evidencia de que estas anomalías de los lípidos de los RBC dependen de los disturbios en los lípidos de las lipoproteínas plasmáticas como resultado de la deficiencia de la LCAT en un experimento donde ocurría una normalización temporal del contenido de colesterol de los RBC siguiendo a la infusión de plasma normal en un sujeto con FLD (Muryama et al. *Am. J. Hematol.* 16:129 - 137, 1984). Esta normalización temporal de los lípidos de los RBC podría deberse al relleno de LCAT, HDL, apolipoproteína A-1 u otros factores plasmáticos que están ausentes o generalmente reducidos en pacientes con FLD.

60

No se ve un enlace entre la anemia y la actividad de la LCAT en casos menos graves de actividad de la LCAT plasmática reducida. Por ejemplo, los pacientes con enfermedad de ojo de pez, una forma más suave de la deficiencia de la LCAT, muestran menos del 30 % de actividad de la LCAT plasmática normal pero tienen hemoglobina y hematocrito normales (Roussel et al. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.* 16:163-1, 2009). De forma similar, los estudios en sujetos con enfermedad hepática no encontraron correlación entre la actividad disminuida de la LCAT y la anemia (LW Powell et al. (1975) *Aust. N.Z.J.Med.* 5:101-107) o entre la actividad de la LCAT y las anomalías de los lípidos de los RBC (RA Cooper et al. (1972) *J Clin. Invest.* 51:3182-3192).

65

Aunque hay evidencia de alteraciones lipídicas deletéreas en los RBC en personas bajo estrés físico que son similares a aquellas detectadas en los pacientes con FLD, no hay relación aparente entre la LCAT y el nivel o los lípidos de los RBC. Los ejemplos de una composición de lípidos de los RBC anómala incluyen informes de una

relación aumentada PC/SM en los RBC a partir de personas con enfermedad hepática y en personas con dislipidemia debida a deficiencia de la lipoproteína lipasa o Enfermedad de Tangier. Los autores de la presente invención (Figura 1) y otros, han encontrado también un aumento en la relación PC/SM en los RBC de pacientes con la enfermedad falciforme que no están en crisis. Adicionalmente, hay informes de enriquecimiento de colesterol en los RBC de personas con diabetes, enfermedad cardíaca (incluyendo síndromes coronarios agudos), hipercolesterolemia, anemia celular falciforme y en personas después de vuelos espaciales.

Las consecuencias de la composición de lípidos de los RBC no se conocen completamente pero en el caso del colesterol de los RBC elevado hay evidencias de que las actividades de las proteínas de membrana se vuelven anormales. Los RBC enriquecidos en colesterol de los pacientes con enfermedad hepática muestran actividades reducidas de la Mg⁺⁺-ATPasa y de la acetilcolina esterasa. El enriquecimiento en colesterol se ha unido a la transferencia mejorada de la fosfatidilserina desde el interior hacia la superficie de membrana extracelular, que es una señal para la holgura mejorada de los RBC por el sistema retículo-endotelial. El colesterol de los RBC aumentado puede reducir la capacidad de deformación de los RBC e inducir morfologías de los RBC anormales, ambas de las cuales pueden perjudicar el tránsito de los RBC a través de los capilares. El intercambio de gas transmembrana, una función esencial de los RBC, también se impacta por la elevación del colesterol.

Las pruebas actuales sugieren que las composiciones de lípidos de los RBC pueden tener un efecto perjudicial en la función de los glóbulos rojos y por lo tanto hay una necesidad de métodos que normalicen la composición de los lípidos de los RBC y métodos para tratar la disfunción de los glóbulos rojos.

Sumario de la invención

No hay consenso en las referencias bibliográficas en la correlación entre el HDL-C y la actividad de LCAT endógena. Los presentes inventores hicieron sorprendentemente el descubrimiento de que un aumento en los niveles de la LCAT plasmática por inyección de LCAT humana recombinante da como resultado rápidamente una retirada del colesterol de los tejidos. Adicionalmente, el HDL-C aumentó rápidamente. Dado el equilibrio que existe entre el HDL y los RBC, estos resultados sorprendentes indican que la infusión de LCAT podría usarse también para corregir rápidamente anomalías de los lípidos de las células sanguíneas y mejorar la función de las células sanguíneas.

Se informa normalmente que los niveles plasmáticos de HDL-C se reducen en casos de estrés físico, por ejemplo: enfermedades autoinmunitarias, cirugía mayor, traumatismos, enfermedades infecciosas, cáncer, enfermedades críticas, diabetes, enfermedades hepáticas, enfermedades renales, fallo cardíaco y enfermedades parasitarias y pueden ser un factor importante en la distorsión del contenido lipídico de los RBC, a la luz del intercambio lipídico directo entre los RBC y las lipoproteínas. La anemia es altamente prevalente en los casos en los que se reduce el HDL.

La presente divulgación se refiere a métodos que modulen el contenido lipídico de las membranas de los glóbulos rojos aumentando la concentración de la LCAT y/o la actividad sobre la concentración de la LCAT humana normal y/o la actividad administrando una dosis terapéuticamente eficaz de LCAT.

Una realización de la divulgación es la LCAT en una cantidad terapéuticamente eficaz para usar tratando a un paciente que tiene una afección seleccionada de enfermedad de células falciformes, talasemia y anemia de inflamación.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra la composición de fosfolípidos de los RBC de sujetos normales y de sujetos con Enfermedad de Células Falciformes.

La Figura 2 es un gráfico que representa el aumento en el HDL-C plasmático en ratones transgénicos ApoA-I humanos después de la inyección con LCAT.

La Figura 3 representa el contenido de colesterol de los tejidos de ratones transgénicos LCAT-knock-out/apolipoproteína A-I después de la inyección con LCAT recombinante humana.

Descripción detallada

La frase "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de LCAT que provocará el efecto o la respuesta terapéuticos deseados cuando se administra de acuerdo con el régimen de tratamiento deseado. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad de LCAT que aumenta el nivel de LCAT plasmática por encima de niveles normales.

Como se usa en el presente documento "nivel de LCAT" se refiere a la concentración en plasma de LCAT.

Como se usa en el presente documento, un "nivel normal" de LCAT significa la concentración plasmática de la LCAT que está presente en un sujeto sin tratar sano medio que no está actualmente en ninguna medicación que pueda

alterar los niveles de LCAT. "Nivel normal" y "nivel endógeno" se usan intercambiamente en el presente documento.

5 Para evitar la duda, las referencias en el presente documento a "tratamiento" o a "tratar" incluyen tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

"Sujeto" y "Paciente" se usan intercambiamente.

10 Entre como se usa en el presente documento con referencia a la cantidad eficaz o a la unidad de dosificación es inclusivo, por ejemplo, "entre 1 mg y 5000 mg" incluye 1 mg y 5000 mg.

"De" como se usa en el presente documento con referencia a la cantidad eficaz o la unidad de dosificación es inclusivo, por ejemplo, "de 1 mg a 5000 mg" incluye 1 mg y 5000 mg.

15 "FC" es una abreviatura para colesterol libre y como se usa en el presente documento significa colesterol no esterificado.

20 "Función óxido nítrico" significa procesos mediados por RBC que son dependientes del óxido nítrico incluyendo la producción de óxido nítrico, el transporte de óxido nítrico a la microvasculatura, la inhibición de la adhesión de las plaquetas y los leucocitos, la vasodilatación, la capacidad de deformación y la supervivencia de los RBC.

"PC" es una abreviatura para fosfatidilcolina.

25 "SM" es una abreviatura para esfingomielina.

"Capacidad de deformación de los RBC" significa la capacidad de las células para adaptar su forma a las condiciones de flujo dinámicamente cambiante para minimizar su resistencia al flujo y para posibilitar su paso a través de pequeños vasos sanguíneos. La capacidad de deformación reducida se iguala con la rigidez aumentada.

30 "Fragilidad osmótica" significa una sensibilidad de una célula a la ruptura debido a cambios en la presión osmótica que la rodea.

"Capacidad de agregación de los RBC" significa la capacidad de formar agregados multicelulares, normalmente en una forma de pilas de monedas, en presencia de proteínas plasmáticas u otras macromoléculas.

35 "LCAT" se usa de manera intercambiable con "lecitin colesterol aciltransferasa"

40 "LCAT" o "polipéptido de LCAT" cuando se usa en el presente documento incluye la secuencia nativa de la LCAT, variantes de la LCAT, LCAT modificada y LCAT quimérica. Especificando las posiciones de aminoácidos en la secuencia de la LCAT, se hace referencia a la ID de SEC n°:1.

ID de SEC n°: 1 de LCAT humana (n° de acceso del GenBank AAB34898)

```
FWLLNVLFPP HTPKAELSN HTRPVILVPG CLGNQLEAKL
DKPDVNVNWC YRKTEDFFTI WLDLNMFLCL GVDCWIDNTR
VVYNRSSGLV SNAPGVQIRV PGFGKTYAVE YLDSSKLAGY
LHTLVQNLVN NGYVRDETVR AAPYDWRLEP GQEEYRKL
AGLVEEMHAA YGKPVFLIGH SLGCLHLLYF LLRQPQAWKD
RFIDGFISLG APWGGSIKPM LVLASGDNQG IPIMSSIKLK
EEQRI TTTSP WMFPSRMWP EDHVFI STPS FNYTGRDFQR
FFADLHFEEG WYMWLQSRDL LAGLPAPGVE VYCLYGVGLP
TPRTYIYDHG FPYTDPVGV L YEDGDDTVAT RSTELCGLWQ
GRQPQPVHLL PLHGIQHLNM VFSNLTLEHI NAILLGAYRQ
GPPASPTASP EPPPE
```

45 Los aminoácidos específicos en la secuencia proteica de la LCAT humana nativa se describen usando la designación de aminoácidos de una sola letra seguida de la posición en la secuencia proteica, por ejemplo W2 indica que la posición 2 es un triptófano. Para representar una sustitución en una posición particular, el aminoácido sustituido sigue la posición, por ejemplo W2Y indica que el triptófano de la posición 2 se reemplaza con una tirosina.

50 Una "LCAT de secuencia nativa" comprende un polipéptido que tiene la misma secuencia de aminoácidos que una LCAT derivada de la naturaleza. De esta manera, la secuencia nativa de LCAT abarca específicamente formas truncadas de origen natural de la LCAT y variantes alélicas de origen natural de la LCAT, formas variantes de origen natural (por ejemplo, formas de corte y empalme alternativas). La secuencia nativa preferida de la LCAT es una secuencia nativa madura de la LCAT.

“LCAT modificada” significa un polipéptido en el que uno o más aminoácidos en el polipéptido de la LCAT nativa se sustituyen por otro aminoácido, o uno o más aminoácidos se añaden a una porción del polipéptido nativo, incluyendo, pero no limitados a, el aminoácido N-terminal o C-terminal. Por ejemplo y sin limitación la LCAT modificada puede ser una proteína de LCAT modificada como se describe en la Solicitud de Patente de Estados Unidos nº 12/179.815. En otras realizaciones el uno o más aminoácidos se sustituyen con una sustitución conservativa. Las sustituciones conservativas ejemplares no limitantes se proporcionan en la Tabla 2. En otras realizaciones, el uno o más aminoácidos se sustituyen con un aminoácido de origen no natural. Además, los polipéptidos de LCAT modificados incluyen derivados de la LCAT o LCAT modificadas. Estos derivados pueden, por ejemplo, mejorar la solubilidad, la absorción, la vida media biológica de los polipéptidos. Los derivados de los polipéptidos se conocen bien en la técnica. Un experto en la materia sabrá cómo derivatizar polipéptidos para mejorar sus propiedades farmacológicas.

TABLA 2

Resto original	Sustituciones conservativas ejemplares
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

El nivel de LCAT y/o la actividad pueden aumentarse por administración directa de LCAT. Preferentemente la LCAT administrada en los métodos de acuerdo con la divulgación es LCAT humana producida recombinantemente (por ejemplo, usando animales, células de mamíferos, hongos, células de insectos o plantas como un sistema de expresión de proteínas recombinantes). Los métodos para producir proteínas recombinantemente se conocen bien en la técnica. La LCAT puede prepararse en formas de dosificación a granel o unitarias estables.

Aumentar los niveles de LCAT rápidamente provoca la transferencia neta de FC desde los RBC al HDL, cambiando de esta manera la composición de la membrana de los RBC a un estado más fluido. Esta acción aumenta la oxigenación de los RBC, mejora la reología (aumenta la capacidad de deformación, flujo, disminuye la externalización de la fosfatidilserina, disminuye la propensión a la adhesión y a la agregación), disminuye la anemia (disminuye el estrés mecánico y la destrucción asociados a la capacidad de deformación disminuida, aumentando la vida de los RBC) y aumenta la capacidad de los RBC de oxigenar los tejidos, especialmente los tejidos periféricos. En algunas realizaciones la eritropoyesis se aumenta siguiendo a la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de LCAT. Hay muchas condiciones en las que las membranas celulares de los RBC tienen niveles aumentados de FC en relación a los niveles de fosfolípidos. El contenido de FC aumentado en las membranas de las células sanguíneas está presente en un número de estados de enfermedades incluyendo, pero no limitado a, enfermedad de células falciformes, diabetes, talasemia, enfermedad reumatoide, enfermedad autoinmunitaria, artritis, enfermedad hepática, cirrosis, hepatitis, acantosis, sepsis, demencia, anemia o trastornos microvasculares, trastornos inflamatorios, enfermedad parasítica, disfunción eréctil, cáncer, pre-eclampsia, enfermedad crítica o traumatismo.

Aunque no a una patología primaria en estas enfermedades, el cambio en la composición y la función de los RBC da lugar a la exacerbación de la morbilidad de los trastornos subyacentes. De esta manera, una realización de la

presente invención es el uso de LCAT en un método para tratar a un paciente con la enfermedad de células falciformes, talasemia o anemia de inflamación.

5 Las mutaciones en los genes de la hemoglobina, tales como en la enfermedad de células falciformes (SCD), en las talasemias y en la hemoglobina E (HbE) pueden dar como resultado una diversidad de patologías que disminuyen la capacidad de deformación de los RBC y la capacidad de llevar/transportar oxígeno. Como un ejemplo, la SCD es un trastorno hereditario, producido por un único reemplazamiento de un aminoácido en la subunidad beta-globulina de la hemoglobina (HbS). En condiciones de bajos niveles de oxígeno, la HbS polimeriza (se agrega), dando lugar a cambios en la forma de los RBC, pasando de tener una forma cóncava normal a una "forma falciforme". La formación de polímeros de HbS rígidos disminuye la elasticidad o la capacidad de deformación de los RBC, que va en detrimento de su función, ya que deben ser capaces de pasar repetidamente a través de los capilares cuatro veces más pequeños que su propio tamaño para oxigenar los tejidos. Por lo tanto, la falciformación da lugar a la enfermedad vasooclusiva debido a la oclusión de las vénulas postcapilares de todos los tamaños y a la mayor fragilidad de los RBC, dando lugar a la lisis y a la anemia hemolítica. Aunque en condiciones de bajos niveles de oxígeno la falciformación produce crisis agudas y los problemas principales asociados a la enfermedad, los RBC de los pacientes que no son falciformes, en condiciones normales de oxígeno, tienen las membranas más rígidas con capacidad de deformación disminuida y capacidad de agregación aumentada. El análisis químico de las membranas eritrocíticas de SCD también demuestra un contenido de FC aumentado. Adicionalmente, estos pacientes tienen normalmente bajo HDL con un contenido de CE disminuido, infiriendo una actividad de LCAT disminuida o una deficiencia de LCAT funcional. De hecho, en un estudio, se mostró que la actividad de LCAT disminuía un 30 % en pacientes con SCD. En consecuencia, una realización de la presente divulgación es LCAT para usar tratando a un paciente que tiene la enfermedad de células falciformes.

25 Inyectar altos niveles de LCAT, por ejemplo, una cantidad que dé como resultado una duplicación de la actividad endógena a 1000 veces la actividad endógena de la LCAT en pacientes de SCD, forzaría un movimiento de FC desde los RBC y conjuntamente un aumento en los niveles de HDL-C en plasma. Una reducción del contenido de FC de los RBC daría lugar a un aumento en la capacidad de deformarse de los RBC y a un aumento de la tasa de intercambio de O₂. La función mejorada de los RBC puede disminuir los eventos oclusivos, debido tanto a las propiedades de flujo mejoradas de la sangre como a disminución de la tasa de falciformación (debido a una mejor re-oxigenación de los RBC). En otra realización el uso de la LCAT aumenta la capacidad de deformación de los RBC y la oxigenación de los RBC. En algunas realizaciones el margen de vida de los RBC se aumenta siguiendo al uso de la LCAT.

35 Anemia de células diana y acantocitos (Acantocitosis): Las células diana y los acantocitos tienen un contenido de FC aumentado que da lugar a una función disminuida y una hemólisis aumentada y anemia.

40 En afecciones tales como la anemia de inflamación hay patologías muy numerosas tales como la capacidad de deformación de los RBC disminuida y la reología anormal que da lugar a complicaciones adicionales. El daño a los tejidos y a los sistemas de los órganos debido a la oxigenación disminuida y a la agregación de los RBC aumentada da lugar a una morbilidad y una mortalidad aumentadas desde la injuria inflamatoria inicial. De esta manera otra realización es LCAT para usar reduciendo la capacidad de agregación de los RBC. La LCAT también puede actuar sobre los fosfolípidos oxidados generados durante la inflamación. Los lípidos oxidados son muy reactivos y pueden aumentar el daño a las células y a los sistemas de los órganos. Normalizar los lípidos de membrana de los RBC mejoraría el flujo y la oxigenación tisular y disminuiría la concentración de los lípidos oxidados reactivos. Esto sería útil posteriormente a una cirugía, donde infecciones ocultas pueden disminuir la función de los RBC, aumentando el tiempo de curación de las heridas.

50 Como se demuestra en el Ejemplo 1 de la presente divulgación, los ratones con aproximadamente 30 veces el nivel normal de actividad de LCAT tenían una masa de RBC aumentada si se compara con ratones normales, demostrando que la actividad de LCAT es un factor principal en la regulación de la masa de los RBC y puede limitar la tasa con respecto a esto.

55 De esta manera, administrando una alta dosis de LCAT, por ejemplo, de 1 vez a 1000 veces el nivel endógeno de LCAT o de 1 vez a 500 veces el nivel endógeno de LCAT o de 1 vez a 100 veces el nivel endógeno de LCAT a un paciente que tiene una afección caracterizada por reología anormal (anemia, capacidad de deformación disminuida, agregación aumentada, flujo disminuido, margen de vida de los RBC disminuido) daría como resultado una mejora de la afección.

60 De esta manera, otra realización es LCAT para usar tratando a un paciente con enfermedad de células falciformes, talasemia o anemia de inflamación.

Otra realización es LCAT modificada para usar tratando a un paciente con enfermedad de células falciformes, talasemia o anemia de inflamación.

65 En algunas realizaciones la LCAT modificada comprende una sustitución de aminoácidos conservativa. En una realización la LCAT modificada comprende una sustitución en la posición F1, L3, L4, N5, L7, C31, N384 o E416. En

diversas realizaciones la LCAT modificada comprende una sustitución de aminoácidos en la posición 31. En otras realizaciones la LCAT modificada comprende una sustitución C31Y y una sustitución en uno o más de los restos de aminoácidos F1, L4, L32 o N34. En otra realización la LCAT modificada comprende una sustitución C31Y y una o más de las siguientes sustituciones: F1S, F1W, L4M, L4K, N34S, L32F o L32H. En diversas realizaciones la LCAT modificada comprende una o más de las siguientes sustituciones: F1A, FIG, F1I, F1L, F1M, F1P, F1V, F1Y, FIT, F1Q, FIN, F1H, F1D, L3I, L3F, L3C, L3W, L3Y, L4A, L4I, L4M, L4F, L4V, L4W, L4Y, L4T, L4Q, L4R, N5A, N5M, N5H, N5K, N5D, N5E, L7M, L7R, L7E, C31A, C31I, C31M, C31F, C31V, C31W, C31Y, C31T, C31R, C31H, N384C, N384Q, o E416C.

En los usos de acuerdo con la presente divulgación, la LCAT se administra generalmente al sujeto en una composición farmacéutica que comprende un vehículo o un diluyente farmacéuticamente aceptables. Una composición farmacéutica puede formularse de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada a la ruta elegida de administración, es decir, oralmente, parenteralmente, por ruta intravenosa, intramuscular o subcutánea.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para el transporte de compuestos de la presente invención y los métodos para su preparación serán fácilmente aparentes para los expertos en la materia. Tales composiciones y métodos para su preparación pueden encontrarse, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a Edición (Mack Publishing Company, 1995).

Las composiciones pueden tomar formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleaginosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, de estabilización y de dispersión. De manera alternativa, el principio activo puede estar en forma de polvos para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua apirógena estéril, antes de usar. Típicamente tales composiciones son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Las composiciones pueden estar en un envase herméticamente sellado, tal como una ampolla, una jeringa o un vial con o sin un conservante añadido.

Un vehículo líquido o vehículo puede ser un disolvente o un medio de dispersión líquido que comprende, por ejemplo, agua, etanol, un poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicoles líquidos y similares), aceites vegetales, ésteres de glicerilo no tóxicos y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada puede mantenerse, por ejemplo, mediante la formación de liposomas, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones o mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de los microorganismos puede provocarse por diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido sórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, tampones o cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede llevarse a cabo mediante el uso en las composiciones de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

De acuerdo con la presente divulgación, la LCAT puede usarse sola o en terapia de combinación con otros fármacos usados para tratar las siguientes afecciones. Tales terapias incluyen, pero sin limitación, la administración simultánea o secuencial de los fármacos implicados. Por ejemplo, las formulaciones de LCAT pueden administrarse con fármacos que se usan comúnmente como un cuidado convencional para una afección particular. Por ejemplo la LCAT puede administrarse junto con agentes estimulantes de la eritropoyesis (ESA) tales como eritropoyetina, metoxipolietileno-glicol-epoetina-beta, darbepoetina- α , romiplostim y epoetina- α para el tratamiento de la anemia. O por ejemplo la LCAT puede administrarse junto con hidroxiurea, hidroxycarbamida, decitabina o butirato para el tratamiento de la enfermedad de células falciformes.

En una realización la cantidad terapéuticamente eficaz de la LCAT se administra por inyección subcutánea. En otra realización la cantidad terapéuticamente eficaz de la LCAT se administra por inyección intramuscular. En otra realización la cantidad terapéuticamente eficaz de la LCAT se administra por inyección o infusión intravenosa. En algunas realizaciones la cantidad terapéuticamente eficaz de la LCAT es de 1 mg a 5000 mg o de 1 mg a 2000 mg o de 10 mg a 5000 mg o de 10 mg a 1000 mg o de 10 mg a 500 mg o de 5 mg a 100 mg.

En algunas realizaciones la cantidad terapéuticamente eficaz de la LCAT es de 1 vez a 1000 veces, de 25 veces a 1000 veces, de 50 veces a 1000 veces, de 1 vez a 100 veces, de 50 veces a 500 veces o de 1 vez a 500 veces el nivel endógeno de la LCAT.

La dosificación específica usada puede variar. Por ejemplo, la dosificación puede depender de un número de factores que incluyen, pero no se limitan a, la frecuencia de dosificación, la actividad específica de la enzima LCAT recombinante, el peso corporal del paciente, los requisitos especiales del paciente, las condiciones especiales del paciente (por ejemplo, función renal o hepática anormal), la afección que se trata, etc. La frecuencia de dosificación y la cantidad pueden, a criterio del médico, caer fuera del intervalo típico dado en el presente documento. Estas dosificaciones se basan en un sujeto humano medio que tiene un peso de aproximadamente 60 kg a 70 kg. La determinación de las dosificaciones óptimas para un paciente particular se conoce bien por los expertos en la materia. El médico será fácilmente capaz de determinar las dosis para los sujetos cuyo peso caiga dentro de este intervalo, tales como niños y ancianos.

Dependiendo del trastorno y del paciente a tratar, un experto en la materia (es decir un médico) podría determinar que una dosis inicial que es mayor que las siguientes dosis sea apropiada. Por ejemplo, a un paciente que se presenta con un estado de crisis de la enfermedad de células falciformes puede administrarse una dosis inicial de 30 veces el nivel "normal". Una vez que el nivel de oxigenación de los RBC del paciente alcanza el nivel deseado la dosis se reduciría por ejemplo a 3 veces el nivel "normal".

La eficiencia de una dosis particular puede evaluarse por referencia a los biomarcadores o la mejora en ciertos parámetros fisiológicos. Los biomarcadores adecuados incluyen, pero no se limitan a, la relación de FC a PL, de FC a proteínas de membrana, de PM a SM o a los niveles de HDL-C. Los parámetros fisiológicos incluyen, pero no se limitan a, anemia reducida, reología mejorada como se mide por un aumento en los RBC, capacidad de deformación de los RBC, flujo sanguíneo y/o capacidad de agregación de los RBC, fragilidad osmótica o nivel de oxigenación de los RBC; un aumento en uno cualquiera de estos parámetros indica mejora. La medida de los niveles de los biomarcadores y los parámetros descritos anteriormente pueden medirse usando métodos que se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, la anemia reducida puede medirse por el hematocrito o la hemoglobina o los productos de descomposición de la hemoglobina (por ejemplo, bilirrubina sin conjugar) aumentados con técnicas convencionales, bien establecidas clínicas. La capacidad de deformación puede medirse por filtración, viscometría, ectacitometría y por el uso de micropipetas. La agregación puede medirse por una diversidad de instrumentos incluyendo ectacitómetros y agregómetros. La oxigenación de los RBC puede medirse por oximetría de pulso convencional y análisis de gases en sangre; la oxigenación tisular puede medirse con sondas directas con tonómetros sialásticos con sensores de oxígeno. Un experto en la materia entendería el significado de los resultados y puede elegir ajustar la dosis basándose en evaluaciones tales como las descritas anteriormente.

Como se describe en el Ejemplo 4 y se muestra en la Figura 2, siguiendo a la administración de LCAT a ratones transgénicos con apolipoproteína A-1 humana los niveles de HDL-C en plasma aumentaron. El aumento fue sorprendentemente rápido; los niveles de HDLC en plasma aumentaron aproximadamente el 70 % del control en 4 horas y aproximadamente el 120 % en 24 horas. De esta manera, otra realización de la divulgación es un método para tratar a un paciente que tiene una afección caracterizada por anemia o disfunción de los glóbulos rojos que comprende administrar a un sujeto en necesidad de la misma, una cantidad terapéuticamente eficaz de LCAT en el que el nivel de HDL-C en plasma del sujeto se aumenta rápidamente después de la administración de la LCAT. En una realización particular el nivel de HDL-C en plasma en el sujeto 4 horas después de la administración de la LCAT se aumenta al menos un 30 % o al menos un 40 % o al menos un 50 % o al menos un 70 % o al menos un 80 % del nivel de HDL-C en plasma antes de la administración de LCAT. Todavía en otra realización el nivel de HDL-C en plasma en el sujeto 12 horas después de la administración de la LCAT se aumenta al menos un 40 % o al menos un 50 % o al menos un 60 % o al menos un 70 % o al menos un 80 % o al menos un 90 % o al menos un 100 % o al menos un 110 % o al menos un 120 % del nivel de HDL-C en plasma antes de la administración de LCAT. Todavía en otra realización el nivel de HDL-C en plasma en los sujetos 24 horas después de la administración de la LCAT se aumenta al menos el 40 % o al menos el 50 % o al menos el 60 % o al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos el 90 % o al menos el 100 % o al menos el 10 % o al menos el 120 % o al menos el 130 % o al menos el 140 % o al menos el 150 % del nivel de HDL-C en plasma antes de la administración de la LCAT.

Como se describe en el ejemplo 5 y se muestra en la Figura 3, la administración de la LCAT a ratones transgénicos LCAT-knock-out/apolipoproteína I dio como resultado un aumento en el colesterol tisular (aorta e hígado) y un aumento en los niveles del colesterol en plasma. Los datos combinados de los ejemplos 4 y 5 demuestran que la inyección de LCAT redistribuye rápidamente los lípidos desde los tejidos al HDL en plasma. Dado el efecto de la inyección de LCAT en el contenido de colesterol del hígado y la aorta se esperaría que un cambio similar se observara rápidamente en los glóbulos rojos.

Una transferencia de FC desde los RBC al HDL debería cambiar la composición de la membrana de los RBC a un estado más normal. Esta acción aumentará la oxigenación de los RBC, mejorará la reología (capacidad de deformación aumentada, flujo, disminuirá la propensión a la adhesión y a la agregación), disminuirá la anemia (disminuirá el estrés mecánico y la destrucción asociados a la capacidad de deformación disminuida, aumentando la vida de los RBC) y aumentará la capacidad de los RBC de oxigenar los tejidos, especialmente en tejidos periféricos.

En algunas realizaciones la LCAT se auto-administra por el paciente bien por inyección subcutánea o bien intramuscular. La auto-administración es una realización preferida para el tratamiento crónico de, que incluye, pero no se limita a, pacientes que padecen enfermedad de células falciformes.

Ejemplo 1

Efecto del nivel de LCAT en el hematocrito en ratones

Se tomaron muestras de sangre de 3 grupos de ratones: ratones deficientes en LCAT (LCAT-KO), transgénicos que sobre-expresan LCAT (actividad LCAT ~30x normal) y control C57/b6. Las membranas de los RBC se aislaron de la muestra de sangre y se midieron los fosfolípidos que contenían colina (Wako Phospholipids B, Richmond) como un sustituto para la masa de RBC o hematocrito. La masa de los RBC era significativamente menor en los ratones

deficientes en LCAT si se compara con los ratones normales ($402 \pm 22,0$ $\mu\text{g/ml}$ de sangre completa frente a $486 \pm 25,7$ $\mu\text{g/ml}$ de sangre completa, respectivamente). La anemia en los ratones deficientes en LCAT demostrada en el presente documento es similar al grado de anemia observado en los pacientes de FLD. Sorprendentemente la masa de RBC era significativamente elevada en los ratones transgénicos que sobre-expresan LCAT si se compara con los ratones con actividad LCAT normal ($556 \pm 20,1$ $\mu\text{g/ml}$ de sangre completa frente a $486 \pm 25,7$ $\mu\text{g/ml}$ de sangre completa, respectivamente). Estos resultados muestran que hay una relación positiva entre los niveles de LCAT y el hematocrito. Adicionalmente, y más importante, los niveles sobre-normales de LCAT pueden aumentar el hematocrito en animales no considerados anémicos. Estos estudios muestran que aumentar los niveles es una opción terapéutica viable para los pacientes con anemia debida a una diversidad de causas, incluso en pacientes con actividad LCAT normal.

Ejemplo 2

Composición de fosfolípidos de membranas fantasma de RBC preparada a partir de sujetos normales y SCD (no en crisis).

Se prepararon muestras de los RBC lavados en solución salina con tampón fosfato a partir de sangre reciente extraída de sujetos normales ($n=7$) y pacientes SCD ($n=6$). Se suspendieron alícuotas de cincuenta microlitros de RBC empaquetados en 0,95 ml de solución salina con tampón fosfato. Los lípidos se extrajeron combinando alícuotas de 0,4 ml de cada suspensión de RBC con 20 μl de una solución 1 mg/ml de 1-eicosanol en acetato de etilo:acetona (2:1) (patrón interno) y 2 ml de acetato de etilo:acetona:metanol (6:3:1) en tubos de vidrio. Los tubos sellados se agitaron durante dos minutos y después se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min. La fase orgánica superior se transfirió a viales de HPLC de 12x32 mm. El disolvente se evaporó de los viales en una corriente de N_2 seguido de al menos 1 h de alto vacío. Los lípidos secos se reconstituyeron en 200 μl de trimetilpentano:metanol:tetrahidrofurano (95:5:2). Los lípidos de membrana se cromatografiaron por cromatografía líquida de alto rendimiento en una columna de sílice. Se detectaron fosfatidilcolina (PC) y esfingomielina (SM) y se cuantificaron con un detector de dispersión de luz evaporativo. Los resultados muestran que los lípidos de los RBC en pacientes de SCD se enriquecieron en PC y disminuyeron el contenido de SM, en comparación con sujetos normales (Figura 1), dando como resultado un aumento en la relación PC/SM de 0,67 a 0,98 para el control y el SCD, respectivamente. Los RBC SCD analizados en el presente estudio muestran un patrón de composición de fosfolípidos que es distinto de los RBC normales. La composición lipídica de los RBC SCD es análoga a la informada para los RBC en otros casos de baja actividad de LCAT plasmática.

Ejemplo 3

Preparación de LCAT recombinante humana

El plásmido pCMV6-XL4/LCAT que codifica la proteína LCAT humana se obtuvo en Origene Technologies (Rockville, MD) y se ligó en el vector pcDNA3.1/Hygro (Invitrogen, Carlsbad, CA). Dicho vector pcDNA3.1 se transfirió en células HEK293f. Las células transfectadas de forma estable se seleccionaron con 200 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B y crecieron en un medio asérico Freestyle 293 (Invitrogen) en matraces de agitación de 10 l durante 4 días. La rhLCAT se aisló del medio de cultivo por precipitación con cloruro de cinc seguido de captura en lotes y elución con fenilsefarsa.

Ejemplo 4

Aumento del colesterol HDL en ratones transgénicos para la apolipoproteína A-I humana inyectados con LCAT

Los ratones transgénicos machos que expresan el gen de la apolipoproteína A-I humana (Jackson Laboratory) se mantuvieron en una dieta de pienso normal, a discreción. A los ratones se les dio una inyección intravenosa única de solución salina o de LCAT recombinante humana en solución salina (4 mg/kg) a través del seno retro-orbital. La sangre se recogió en el plexo orbital en animales anestesiados con isoflurano a 0, 1, 4, 24, 48 y 72 horas post-inyección. La concentración de colesterol en plasma se determinó con kits de ensayo enzimáticos comerciales. La cantidad de colesterol en HDL (HDL-C) se determinó por electroforesis en gel de agarosa con el sistema SPITE de Helena Labs. La figura 2 muestra que los ratones a los que se administró LCAT mostraron un aumento significativo en los niveles del HDL-C en plasma tanto como un 120 % del control. El nivel de HDL-C se mantuvo en niveles aumentados durante la duración del experimento (72 horas). La subida del HDL en plasma fue sorprendentemente rápida mostrando un aumento de aproximadamente el 70 % del control a 4 horas y de aproximadamente el 120 % en 24 horas.

Ejemplo 5

Efecto de la infección de LCAT en el contenido de colesterol en tejidos de ratones transgénicos LCAT-knock-out/apolipoproteína A-I

Los ratones transgénicos que expresan la apolipoproteína A-I humana (Jackson Laboratory) se cruzaron con ratones LCAT-KO para obtener ratones LCAT-KO/apoA-I-Tg. Los ratones LCAT-KO/apoA-I-Tg se mantuvieron con un pienso de roedores normal, a discreción. Las inyecciones intravenosas (IV) de solución salina o 0,4 mg de LCAT se realizaron diariamente durante 4 días a través del seno retroorbital. Los animales se sacrificaron el quinto día. Los animales se anestesiaron y se exanguinaron por perfusión con solución salina heparinizada. Un lóbulo hepático y la aorta se retiraron de cada animal y se extrajeron con una solución de cloroformo y metanol. El colesterol en los lípidos recuperados de los tejidos extraídos se midió con un kit de ensayo enzimático comercial.

La Figura 3 muestra el contenido de colesterol de (A) hígado, (B) aorta y (C) plasma para ratones inyectados con solución salina (Ctrl) o LCAT (Exp). El tratamiento con la LCAT redujo significativamente los niveles de colesterol en el hígado y la aorta y subieron significativamente el nivel de colesterol en plasma. Los datos combinados para los ejemplos 4 y 5 demostraron que la inyección de la LCAT redistribuye rápidamente los lípidos desde los tejidos al HDL plasmático. Dado el efecto de la inyección de LCAT en el contenido de colesterol del hígado y de la aorta se esperaba que se observara un cambio similar en los glóbulos rojos.

Ejemplo 6

Un niño (30 kg) en crisis de células falciformes se admite en el hospital. Junto con el tratamiento convencional de cuidados, recibe una infusión de 5 mg/kg de LCAT recombinante humana (rhLCAT) durante un periodo de 1 hora en un total de 100 ml de solución salina. Después del tratamiento, los niveles de oxígeno en sangre se miden y se habían mejorado. Conforme la crisis se abate, se observa la morfología de las células rojas y se miden las características físicas (capacidad de deformación de los RBC, capacidad de agregación de los RBC y fragilidad osmótica) y los resultados se comparan con los resultados de la muestra de sangre tomada después de la admisión. Las mejoras en las características físicas y la oxigenación de los RBC se mantienen con inyecciones subcutáneas semanales de rhLCAT a una dosis de 0,5 mg/kg.

Ejemplo 7

Una mujer de 35 años (55 kg) presenta artritis reumatoide y tiene anemia con un nivel de hemoglobina de 9 g/dl (intervalo normal 12 - 14 g/dl). Se extrae una muestra de sangre y se detecta que sus glóbulos rojos son menos deformables y que se agregan más fácilmente que los glóbulos rojos normales. A la paciente se le prescribe inyecciones semanales de rhLCAT a una dosis de mg/kg para administrarse por vía subcutánea. El hematocrito y los niveles de hemoglobina se miden después de 6 inyecciones semanales y se detecta que han aumentado un 20 %. Después de 6 meses de tratamiento, la hemoglobina es de 14 g/dl. El médico decide mantener a la paciente con rhLCAT a una dosis de 1 mg/kg inyectada bi-semanalmente.

Ejemplo 8

Un hombre de 65 años (80 kg) tiene programada una cirugía de derivación cuádruple. Se solicita al paciente que deje de tomar clopidogrel cinco días antes de la cirugía para reducir la posibilidad de una hemorragia post-operatoria. Para reducir el riesgo de activación de las plaquetas, trombosis o agregación de los RBC, el paciente recibió en el consultorio una infusión de 1 mg/kg de rhLCAT cinco días antes de la cirugía. El paciente recibió una infusión con 1 mg/kg de rhLCAT directamente después de la cirugía, 7 días después de la cirugía y 14 días después de la cirugía. Después de la recuperación (21 días después de la cirugía), el paciente volvió a su tratamiento crónico con clopidogrel.

Ejemplo 9

Transferencia génica para la sobre-expresión hepática específica de LCAT

Un paciente presenta artritis reumatoide acompañada de anemia crónica. Al paciente se le administra una dosis de 4×10^{12} partículas adenovíricas (AdrLCAT)/kg por inyección a través de un catéter intra-portal. Los niveles de LCAT se monitorizan semanalmente después del tratamiento. Cuatro semanas después del tratamiento el paciente tiene unos niveles de LCAT de 10 mg/ml o aproximadamente dos veces más que la concentración en un sujeto no artrítico. Ocho semanas después del tratamiento, el paciente se monitoriza mensualmente. Si el nivel de LCAT del paciente disminuye por debajo de 5 mg/l se repite el procedimiento.

Ejemplo 10

Un niño (30 kg) en crisis de células falciformes se admite en el hospital. Junto con el tratamiento convencional de cuidados, recibe una infusión de 5 mg/kg de LCAT humana recombinante (rhLCAT) durante un periodo de 1 hora en un total de 100 ml de solución salina. Después del tratamiento, se miden los niveles de oxígeno en sangre y habían mejorado. Conforme la crisis se abate, se observa la morfología de las células rojas y se miden las características físicas (capacidad de deformación de los RBC, capacidad de agregación de los RBC y fragilidad osmótica) y los resultados se comparan con los resultados de la muestra de sangre tomada después de la admisión. Después, el paciente tuvo un procedimiento en el que se colocó un dispositivo médico bajo la piel. El dispositivo médico

comprende células de mamífero diseñadas con ingeniería genética para secretar LCAT activa. Se libera LCAT suficiente por las células para elevar la actividad de la LCAT endógena a más del 100 % de los niveles de LCAT normales.

- 5 Apréciase que el alcance de la presente invención ha de definirse por las reivindicaciones y no ha de limitarse por las realizaciones descritas específicamente y por los ejemplos del presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

- 10 <110> AlphaCore Pharma, LLC
Auerbach, Bruce J.
Krause, Brian R.
Homan, Reynold
- 15 <120> Métodos para tratar la disfuncion de los glóbulos rojos
<130> 223373-000000
- 20 <150> 61/186.668
<151> 12-06-2009
- <150> 61/241.223
<151> 10-09-2009
- 25 <160> 1
<170> PatentIn versión 3.5
- 30 <210> 1
<211> 416
<212> PRT
<213> Humano
- 35 <400> 1

ES 2 552 654 T3

Phe Trp Leu Leu Asn Val Leu Phe Pro Pro His Thr Thr Pro Lys Ala
 1 5 10 15
 Glu Leu Ser Asn His Thr Arg Pro Val Ile Leu Val Pro Gly Cys Leu
 20 25 30
 Gly Asn Gln Leu Glu Ala Lys Leu Asp Lys Pro Asp Val Val Asn Trp
 35 40 45
 Met Cys Tyr Arg Lys Thr Glu Asp Phe Phe Thr Ile Trp Leu Asp Leu
 50 55 60
 Asn Met Phe Leu Cys Leu Gly Val Asp Cys Trp Ile Asp Asn Thr Arg
 65 70 75 80
 Val Val Tyr Asn Arg Ser Ser Gly Leu Val Ser Asn Ala Pro Gly Val
 85 90 95
 Gln Ile Arg Val Pro Gly Phe Gly Lys Thr Tyr Ser Val Glu Tyr Leu
 100 105 110
 Asp Ser Ser Lys Leu Ala Gly Tyr Leu His Thr Leu Val Gln Asn Leu
 115 120 125
 Val Asn Asn Gly Tyr Val Arg Asp Glu Thr Val Arg Ala Ala Pro Tyr
 130 135 140

ES 2 552 654 T3

Asp Trp Arg Leu Glu Pro Gly Gln Gln Glu Glu Tyr Tyr Arg Lys Leu
 145 150 155 160

Ala Gly Leu Val Glu Glu Met His Ala Ala Tyr Gly Lys Pro Val Phe
 165 170 175

Leu Ile Gly His Ser Leu Gly Cys Leu His Leu Leu Tyr Phe Leu Leu
 180 185 190

Arg Gln Pro Gln Ala Trp Lys Asp Arg Phe Ile Asp Gly Phe Ile Ser
 195 200 205

Leu Gly Ala Pro Trp Gly Gly Ser Ile Lys Pro Met Leu Val Leu Ala
 210 215 220

Ser Gly Asp Asn Gln Gly Ile Pro Ile Met Ser Ser Ile Lys Leu Lys
 225 230 235 240

Glu Glu Gln Arg Ile Thr Thr Thr Ser Pro Trp Met Phe Pro Ser Arg
 245 250 255

Met Ala Trp Pro Glu Asp His Val Phe Ile Ser Thr Pro Ser Phe Asn
 260 265 270

Tyr Thr Gly Arg Asp Phe Gln Arg Phe Phe Ala Asp Leu His Phe Glu
 275 280 285

Glu Gly Trp Tyr Met Trp Leu Gln Ser Arg Asp Leu Leu Ala Gly Leu
 290 295 300

Pro Ala Pro Gly Val Glu Val Tyr Cys Leu Tyr Gly Val Gly Leu Pro
 305 310 315 320

Thr Pro Arg Thr Tyr Ile Tyr Asp His Gly Phe Pro Tyr Thr Asp Pro
 325 330 335

Val Gly Val Leu Tyr Glu Asp Gly Asp Asp Thr Val Ala Thr Arg Ser
 340 345 350

Thr Glu Leu Cys Gly Leu Trp Gln Gly Arg Gln Pro Gln Pro Val His
 355 360 365

Leu Leu Pro Leu His Gly Ile Gln His Leu Asn Met Val Phe Ser Asn
 370 375 380

Leu Thr Leu Glu His Ile Asn Ala Ile Leu Leu Gly Ala Tyr Arg Gln
 385 390 395 400

Gly Pro Pro Ala Ser Pro Thr Ala Ser Pro Glu Pro Pro Pro Pro Glu
 405 410 415

REIVINDICACIONES

- 5 1. LCAT en una cantidad terapéuticamente eficaz para usar tratando a un paciente que tiene una afección seleccionada de, enfermedad de células falciformes, talasemia y anemia de inflamación.
2. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que los glóbulos rojos del paciente demuestran una capacidad reducida para deformarse, oxigenación reducida, agregación y adhesión aumentada, función de óxido nítrico reducida, margen de vida disminuido o cualquier combinación de los mismos.
- 10 3. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la afección es anemia.
4. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la afección es enfermedad de células falciformes o talasemia.
- 15 5. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 2, monitorizándose una mejora en la afección por un método que comprende:
- a) obtener una medida de línea basal de uno o más de los siguientes:
- 20 nivel de hemoglobina, nivel del hematocrito, capacidad de deformación de los RBC, oxigenación de los RBC, agregación y adhesión de los RBC o margen de vida de los RBC;
- b) administrar el agente;
- c) obtener una medida posterior al tratamiento de uno o más de los siguientes:
- 25 nivel de hemoglobina, nivel del hematocrito, capacidad de deformación de los RBC, oxigenación de los RBC, agregación y adhesión de los RBC o margen de vida de los RBC;
- d) comparar la medida de línea basal con la medida posterior al tratamiento en la que la aparición de uno o más de los siguientes: un aumento en el nivel de hemoglobina, nivel del hematocrito, un aumento en la capacidad de deformación de los RBC, un aumento en la oxigenación de los RBC, una disminución en la agregación y adhesión de los RBC o un aumento en el margen de vida de los RBC, indica una mejora en la afección.
- 30 6. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de LCAT es una cantidad que aumenta el nivel plasmático de LCAT por encima del nivel plasmático normal de LCAT o aumenta la actividad de LCAT en plasma por encima del nivel de actividad de LCAT.
- 35 7. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad de LCAT administrada es de 10 mg a 5000 mg.
- 40 8. LCAT para usar de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la cantidad terapéuticamente eficaz de LCAT administrada está entre 1 vez y 1000 veces el nivel normal de LCAT.
- 45 9. LCAT para usar de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en las que la LCAT es una LCAT modificada.

FIGURA 1

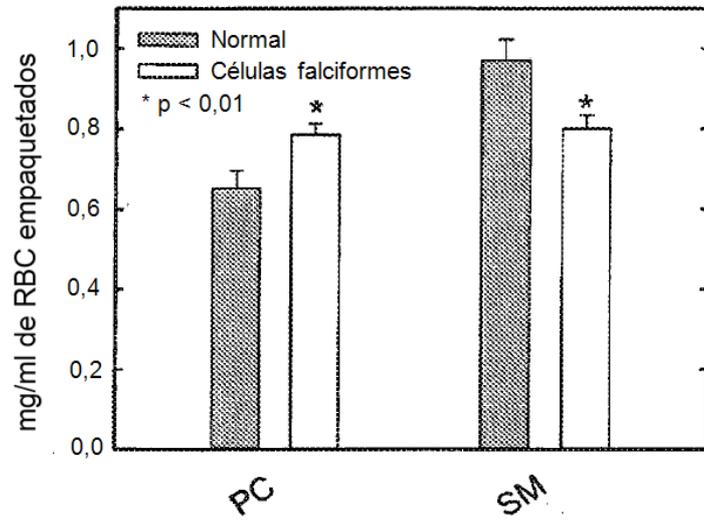


FIGURA 2

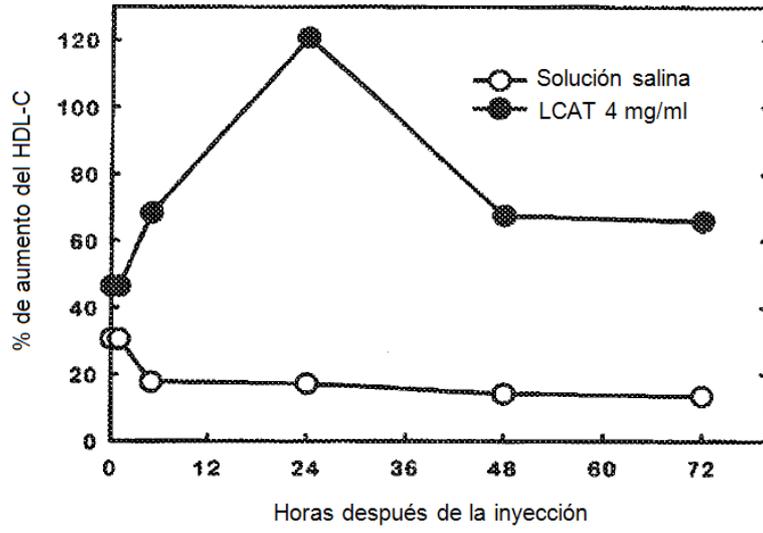


FIGURA 3

