

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 185**

51 Int. Cl.:

C12N 1/19 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 9/127 (2006.01)
A61K 47/42 (2007.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 33/26 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2012 PCT/GB2012/000461**
87 Fecha y número de publicación internacional: **29.11.2012 WO12160333**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2012 E 12727897 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017 EP 2714888**

54 Título: **Levadura recombinante**

30 Prioridad:
24.05.2011 US 201113114429

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.03.2018

73 Titular/es:
**CHYNA LLC (100.0%)
955 Beach Avenue
Hershey, PA 17033, US**

72 Inventor/es:
**CONNOR, JAMES, R. y
KEIL, RALPH LAUREN**

74 Agente/Representante:
ELZABURU, S.L.P

ES 2 659 185 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

Levadura recombinante

La presente solicitud se refiere a nuevas cepas de levadura recombinante y a composiciones que comprenden la levadura.

5 **Antecedentes de la invención.**

10 El hierro es un nutriente esencial que no solo es necesario para transportar oxígeno a través del torrente circulatorio sino que también es un componente vital de las enzimas necesarias para la respiración oxidativa. El déficit de hierro es la deficiencia de nutrientes más común del mundo, y está presente en el 25% de los niños menores de 2 años (DeMaeyer, E. y Adiels-Tegman, M., *World Health Stat. Q.* 38: 302 - 316); 1985, Beard, J. y Stoltzfus, R., *J. Nutr.* 131: 563S - 703S, 2000). Las secuelas neurológicas del déficit de hierro infantil crónico y grave incluyen el bajo rendimiento escolar, la disminución de la capacidad cognitiva y los problemas de conducta (Beard, J., y Connor, J., *Annu. Rev. Nutr.* 23: 41-58, 2003; Lozoff, B., et al., *Nutr. Rev.* 64: S34 - S43, 2006), la mayoría de las cuales persisten después de la suplementación de hierro en la dieta (Felt, B., et al., *Behav Brain Res.* 171: 261 - 270; Lozoff, B., et al., *Nutr. Rev.* 64: S34 - S43, 2006). El cerebro tiene la tasa de metabolismo oxidativo más alta que la de cualquier otro órgano y requiere cantidades de hierro relativamente altas. Las deficiencias dietéticas de hierro durante el desarrollo posnatal temprano pueden ocasionar tanto trastornos mentales como deficiencias motrices graves que pueden persistir hasta la adultez. El proceso de mielinización parece ser particularmente dependiente de la disponibilidad de hierro, especialmente durante el período crítico de crecimiento (véase, Hulet, S.W., et al., *J. Neurochem.* 72: 868 - 874, 1999 para las citas).

20 Se han desarrollado varios suplementos dietéticos de hierro, pero tienen una eficacia limitada porque el hierro se absorbe escasamente o el suplemento depende de las condiciones ambientales para generar un nivel constante de hierro. El estándar de atención en los países desarrollados es la ingestión de 325 mg de sulfato ferroso tres veces al día. Esta altísima dosis de hierro es necesaria a causa de la escasa absorción del hierro en esta forma. Sin embargo, debido al hecho de que un régimen de dosificación tan alto tiene como resultado molestias gastrointestinales y una elevada tasa de incumplimiento, se mantiene la necesidad de un suplemento oral de hierro más eficiente y rentable para el tratamiento de los trastornos por déficit de hierro.

30 Tradicionalmente, se ha considerado a la transferrina como el mecanismo primario para el suministro celular de hierro, y se ha identificado un sistema de transporte mediado por transferrina en la barrera hematoencefálica (Jefferies W. A., et al., *Nature* 312: 162 - 163, 1984; Fishman J., et al., *J. Neurosci. Res.* 18: 299 - 304, 1987). Sin embargo, se ha sugerido el suministro de hierro al cerebro independiente de la transferrina a partir de experimentos con ratones hipotransferrinémicos (Malecki E. A., et al., *J. Neurol. Sci.* 170: 112 - 118, 1999), y puede implicar la ferritina.

35 La ferritina, proteína de almacenamiento de hierro intracelular principal en muchos procariontes y eucariotas, es un complejo grande de múltiples subunidades (casi 480 kDa) que comprende 24 subunidades de polipéptido. Este complejo de almacenamiento de hierro, que se encuentra en concentraciones elevadas en el suero, es capaz de contener hasta 4.500 átomos de iones de hierro (Fe^{3+}) dentro de un núcleo de óxido férrico hidratado. En mamíferos, hay dos clases de subunidades distintas, tipo pesado (H) y tipo ligero (L), con un peso molecular de aproximadamente 21 kDa y 19 kDa, respectivamente, que comparten aproximadamente el 54% de identidad de secuencia. Las subunidades H y L parecen tener funciones diferentes: la subunidad L potencia la estabilidad del núcleo de hierro, mientras que la subunidad H tiene una actividad de ferroxidasa que parece ser necesaria para la rápida absorción de hierro ferroso. Las ferritinas ricas en H se localizan en tejidos que experimentan cambios rápidos en la concentración local de iones. Por ejemplo, la expresión de la subunidad H aumenta preferencialmente con respecto a la subunidad L en células que experimentan diferenciación, desarrollo, proliferación y estrés metabólico.

45 El cerebro impone desafíos agudizados a la adquisición de hierro debido a las ceñidas uniones altamente desarrolladas que se unen a las células endoteliales vecinas que conforman la microvasculatura del cerebro. Estas uniones evitan el flujo paracelular de moléculas al cerebro. La barrera hematoencefálica resultante es un mecanismo altamente efectivo para proteger al cerebro de sustancias potencialmente nocivas que circulan en la sangre. Una consecuencia de tal bloqueo, sin embargo, es que los mecanismos de transporte específicos deben diseñarse para las muchas sustancias tróficas, como el hierro, que se requieren para la función normal del cerebro. Además, los métodos tradicionales de medida de los niveles de hemoglobina y hematocrito en muestras de sangre no se dirigen a si el hierro está cruzando la barrera hematoencefálica o proporciona alguna indicación de concentraciones de hierro en el cerebro (Beard, et al., *J. Neurosci. Res.* 79: 254 - 261, 2005; Malecki et al., *J. Neurosci. Res.* 56: 113 - 122, 1999).

55 Aunque se ha demostrado que la ferritina H suministra hierro a ratas deficientes en hierro, la restauración de los niveles de hemoglobina y hematocrito en animales alimentados con ferritina H en estos estudios no fue mejor que en animales a los que se ha administrado $FeSO_4$, norma asistencial actual (Chang, Y-J., et al., *Nutrition* 21: 520 -

524, 2005). Por consiguiente, se mantiene la necesidad de un método mejorado para tratar los trastornos por deficiencia de hierro.

El documento WO2009/120168 describe el uso de ferritina para tratar trastornos por deficiencia de hierro. El documento KR20040087539 describe un método para producir ferritina heteropolimérica. El documento WO02/40695 describe un método para la producción masiva de ferritina humana usando levaduras metilotróficas recombinantes. El documento WO2007/009231 describe un sistema para la expresión de un gen de interés en levadura. Seo et al. (2003), *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol.63, no.1, página 57 - 63, describen una mejor expresión y caracterización funcional de los genes de las cadenas H y L de la ferritina humana en *Saccharomyces cerevisiae*.

10 **Sumario de la invención.**

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, se proporciona una levadura recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ferritina H de mamífero o un homólogo de la misma que tiene al menos un 80% de identidad con la ferritina H humana bajo el control del promotor transcripcional TDH3 constitutivo de la levadura, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica ferritina H de mamífero o un homólogo de la misma que tiene al menos un 80% de identidad con la ferritina H humana se integra en el cromosoma de levadura en el sitio TDH3.

También se describe en el presente texto una casete de expresión de ferritina H para *S. cerevisiae* que expresa ferritina H humana bajo el control del promotor transcripcional TDH3 constitutivo de la levadura.

Preferiblemente, la casete de expresión comprende un marco de lectura abierto que codifica ferritina H humana.

20 Preferiblemente, la casete de expresión comprende un terminador transcripcional, preferiblemente del gen CYC1 de levadura.

Preferiblemente, la casete de expresión comprende uno o más sitios *loxP*, preferiblemente dos sitios *loxP*.

Preferiblemente, la casete de expresión comprende un marcador seleccionable, preferiblemente *URA3*.

25 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una composición que comprende una levadura recombinante de la presente invención.

Preferiblemente, la composición es una composición farmacéutica.

Preferiblemente, la composición es un alimento médico.

Preferiblemente, la composición es un suplemento nutricional.

30 Preferiblemente, las composiciones de la presente invención comprenden uno o más compuestos activos adicionales. Preferiblemente, el compuesto o los compuestos activos adicionales son compuestos terapéuticamente activos, por ejemplo en forma de un compuesto terapéutico adicional para la administración conjunta con las composiciones descritas en el presente texto.

Preferiblemente, la composición es para administración oral.

35 Preferiblemente, la composición es para administración al paciente en un transfundido de sangre, pulverización nasal o mediante el consumo en un líquido.

De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una levadura recombinante o composición de la presente invención para su uso en terapia.

También se describe el uso de una levadura recombinante o composición de la presente invención en terapia.

Preferiblemente, la terapia comprende el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

40 Preferiblemente, la enfermedad o trastorno es un trastorno del hierro.

Preferiblemente, la ferritina H de mamífero es ferritina H humana o un homólogo de la misma.

El homólogo tiene al menos un 80% de identidad de secuencia con la ferritina H humana.

45 También se describe en el presente texto un método para el tratamiento de un trastorno del hierro en un paciente, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de un complejo de ferritina-hierro.

Preferiblemente, el complejo de ferritina-hierro comprende ferritina H.

Preferiblemente, la ferritina H es ferritina H recombinante.

Preferiblemente, la ferritina H recombinante se produce en levaduras, bacterias o baculovirus.

Preferiblemente, el trastorno del hierro es anemia ferropénica.

Preferiblemente, el trastorno del hierro está relacionado con una deficiencia de hierro en el cerebro.

- 5 Preferiblemente, el trastorno del hierro es un trastorno neurológico o un trastorno neurodegenerativo.

Preferiblemente, el trastorno del hierro se selecciona entre el grupo que consiste en enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, depresión, insomnio, esclerosis múltiple, síndrome de piernas inquietas, trastorno por déficit de atención y esclerosis lateral amiotrófica.

- 10 Preferiblemente, el trastorno del hierro comprende deficiencias neurológicas, cognitivas, conductuales o motrices asociadas con la deficiencia de hierro durante el desarrollo postnatal.

Preferiblemente, el trastorno del hierro es un trastorno de sobrecarga de hierro.

Preferiblemente, el complejo de ferritina de subunidades múltiples tiene una capacidad de unión de hierro inferior al 100%.

- 15 Preferiblemente, el complejo de ferritina de subunidades múltiples comprende ferritina H de mamífero o un homólogo de la misma.

Preferiblemente, el trastorno del hierro se elige entre el grupo que consiste en talasemia y hemocromatosis.

Preferiblemente, el complejo ferritina-hierro o una apoferritina son administrados al paciente en una transfusión de sangre, pulverización nasal o mediante el consumo en un líquido.

- 20 Se describe además un método para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de hierro al cerebro, que comprende administrar un complejo ferritina-hierro a un paciente, con lo que una cantidad terapéuticamente eficaz de hierro se transporta a través de la barrera hematoencefálica y se suministra al cerebro.

Preferiblemente, el complejo ferritina-hierro comprende además un resto de direccionamiento.

Preferiblemente, el resto de direccionamiento se elige entre el grupo que consiste en un anticuerpo, aptámero, receptor, ligando y un fragmento de unión del mismo.

- 25 Preferiblemente, el resto de direccionamiento reconoce un marcador específico de la barrera cerebral o la barrera hematoencefálica.. También se describe en el presente texto un método para usar ferritina H como resto de direccionamiento, que comprende unir ferritina H a un liposoma, con lo que el liposoma se dirige al cerebro. Preferiblemente, el paciente se selecciona entre un paciente predispuesto para el desarrollo de uno o más trastornos de deficiencia de hierro, un sujeto que tiene uno o más trastornos de deficiencia de hierro pero que no presenta ningún síntoma clínico, o un sujeto que tiene uno o más trastornos de deficiencia de hierro y que padece los síntomas de uno o más trastornos de deficiencia de hierro.
- 30

Preferiblemente, el paciente es un mamífero, tal como un ser humano, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un cerdo, un roedor o un primate.

Preferiblemente, el paciente es un ser humano.

- 35 En el presente texto se describen métodos para tratar un trastorno de hierro en un paciente, que comprenden administrar a un paciente necesitado de ello una cantidad terapéuticamente efectiva de un complejo de ferritina-hierro. Se proporcionan una levadura recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ferritina H humana integrada en el cromosoma de la levadura y una composición que comprende la levadura recombinante, que pueden usarse en estos métodos. También se describen métodos para suministrar al cerebro una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro, que comprenden administrar un complejo ferritina-hierro a un paciente, con lo cual se proporciona una cantidad terapéuticamente efectiva de hierro a través de la barrera hematoencefálica y se suministra al cerebro.
- 40

Se describen además métodos para usar ferritina H como resto de direccionamiento, que comprenden unir ferritina H a un liposoma, con lo que el liposoma se dirige al cerebro.

- 45 Dentro de esta memoria descriptiva, las formas de realización se han descrito de una manera que permite escribir una especificación clara y concisa, pero se pretende y se apreciará que las formas de realización se pueden combinar o separar de diversas maneras sin apartarse de la invención.

Los ejemplos de la presente invención se describirán ahora con referencia a las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos.

- 5 La FIG. 1A muestra la absorción *in vivo* de ^{59}Fe a partir de la ferritina H humana recombinante (ferritina rH) en comparación con la ferritina del bazo de caballo (la ferritina del bazo está enriquecida en ferritina L) en órganos después de 48 horas de circulación. La ferritina rH o del bazo marcada con ^{59}Fe fue inyectada en las venas de la cola de rata adulta y se dejó circular durante 48 horas. Se determinó la cantidad de radioactividad en 1,0 gramo de cada órgano y se determinó el porcentaje total/g de peso del tejido calculando la cantidad de μCi por gramo de tejido en comparación con el total inyectado. Las dos estructuras cerebrales se muestran en esta misma escala para revelar las cantidades relativas. $p < 0,05^*$. Se presenta el valor medio de 3 animales \pm S. E. (error estándar).
- 10 La FIG. 1B muestra la absorción *in vivo* de ^{59}Fe a partir de la ferritina rH en el cerebro de la rata. Las ratas fueron inyectadas a través de la vena de la cola con ferritina rH o del bazo marcada con ^{59}Fe , como se describe en la leyenda de la FIG. 1A. El porcentaje total se calculó determinando μCi en un hemisferio del cerebro/ μCi total inyectado $\times 100\%$. $p < 0,005^{**}$. Se presenta el valor medio de 3 animales \pm S. E.
- 15 La FIG. 2A muestra la absorción de ^{59}Fe de ferritina rH en órganos sistémicos de ratones con déficit en ferritina H (-/+) y ratones de tipo silvestre (+/+). Los animales recibieron cantidades iguales de ferritina rH inyectada por vía intraperitoneal. La ferritina circuló durante 48 horas. Los órganos mostrados (incluido el cerebro, véase la FIG. 2B) se extirparon y se determinó el porcentaje de radioactividad total para cada órgano basándose en 0,1 g. $p < 0,05^*$.
- 20 La FIG. 2B muestra la absorción de ^{59}Fe en cerebros de ratones deficientes en ferritina H (+/-) frente a cerebros de ratones de tipo silvestre (+/+) suministrado por medio de ferritina rH. Estos datos provienen de los cerebros de los ratones que se usaron para generar los datos de la FIG. 2A. El porcentaje de radioactividad en el cerebro se determinó comparando los recuentos de desintegración/min de ^{59}Fe obtenidos del cerebro con el μCi total inyectado. $p < 0,05^*$. Se muestra el valor medio para tres animales, \pm S. E.
- 25 La FIG. 3A muestra la absorción de ^{59}Fe en órganos sistémicos en ratones deficientes en ferritina H (-/+) y silvestres (+/+) suministrados a través de ferritina de bazo (enriquecida en L). Los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal con ferritina de bazo que contiene ^{59}Fe . Después de 48 horas, se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos. El gráfico muestra el porcentaje de radioactividad total inyectada por gramo de tejido que está presente en cada tejido. Se presenta el valor medio de tres animales, \pm S.E. Ninguna de las diferencias alcanzó significación estadística.
- 30 La FIG. 3B muestra la absorción en el cerebro de ^{59}Fe en cerebros deficientes en ferritina H (+/-) frente a cerebros de ratones de tipo silvestre (+/+) suministrado a través de ferritina del bazo. Estos datos son de los ratones usados en la FIG. 3A. La cantidad de radioactividad reportada es el porcentaje del total inyectado en los animales. Los resultados presentan el valor medio de tres animales, \pm S. E. Estos datos no llegaron a mostrar significación estadística.
- 35 La FIG. 4A es un gráfico que muestra el flujo de ferritina rH marcada con fluoresceína a través de una monocapa de cultivo de células endoteliales de retina bovina (BREC) desarrollada en una placa de cultivo Transwell de dos cámaras. Se muestra la velocidad de transporte de ferritina rH marcada con FITC en la cámara basal durante un período de 4 h. La velocidad de transporte se determinó como se describe en el Ejemplo 1. Los datos se expresan como los valores medios de la velocidad de flujo, obtenida como la pendiente (cm/s) de las representaciones de la fluorescencia de la cámara inferior por unidad de fluorescencia de la cámara superior (Bf/Tf) frente al tiempo, y el error estándar de las medias. El transporte de ferritina rH es estadísticamente significativo en comparación con el control de dextrano y ferritina del bazo ($p < 0,01^{**}$).
- 40 En la figura 4B se muestra la detección de ferritina rH marcada con FITC en la cámara inferior por fluorescencia y la unión específica al anticuerpo ferritina H. La presencia de ferritina H en la cámara inferior demuestra que la ferritina H realiza transcitosis a través de la capa de células BREC. Calles: 1) 10 μl de medio de la cámara basal concentrado procedente de cultivos de control (ferritina no marcada); 2) 10 μl de proteína concentrada del medio de la cámara basal de cultivos de ferritina rH marcada con FITC; 3) marcadores de peso molecular; 4) 30 μl de medio de la cámara basal concentrado a partir de cultivos de control; 5) 30 μl de proteína concentrada procedente del medio de la cámara basal de cultivos de ferritina rH marcada con FITC; 6) ferritina rH no marcada; 7) ferritina rH marcada con FITC.
- 45 La FIG. 5A es un gráfico que muestra las curvas de saturación para ^{125}I -ferritina rH y ^{125}I -ferritina de bazo que se unen a los homogenizados de células BREC. Este gráfico ilustra que la unión de la ferritina H a las células BREC es saturable, mientras que no hay evidencia de que la ferritina del bazo se una a las células BREC. La unión de saturación se realizó a 4 °C durante 2 horas. Se determinó que la Kd es de $2,7 \pm 0,9$ nM y la Bmax es de $465,7 \pm 63,1$ fmol/mg de proteína.
- 50 La FIG. 5B muestra curvas de saturación para ^{125}I -ferritina rH y ^{125}I -ferritina de bazo en microvasos aislados de cerebros de rata. Las curvas muestran una unión saturable para la ferritina H, pero no unión a la ferritina del bazo. La Kd es $7,9 \pm 1,6$ nM y la Bmax es $572,6 \pm 64,0$ fmol/mg de proteína.
- 55

La FIG. 6A es un gráfico que muestra la competencia por los sitios de unión de ^{125}I -ferritina rH en el homogenado BREC por la ferritina rH no marcada, pero no por la ferritina del bazo. Este gráfico muestra que la unión de la ^{125}I -ferritina rH al homogenado de BREC se inhibe competitivamente mediante concentraciones crecientes de ferritina rH no marcada, pero no mediante ferritina del bazo.

- 5 La FIG. 6B es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de unión competitiva en microvasos de rata. Este gráfico ilustra que la unión de ^{125}I -ferritina rH puede disociarse de una manera dependiente de la concentración mediante ferritina rH no marcada pero no mediante ferritina de bazo no marcada.

- 10 La FIG. 7 es una transferencia Western (4 - 20% de gradiente) que muestra la expresión de la ferritina rH en levadura recombinante. En el carril 1 es un patrón (ferritina H humana recombinante). Los carriles 2 y 4 son dos colonias diferentes de levadura que fueron transformadas con L-ferritina humana. Los carriles 3 y 5 son dos colonias de levadura diferentes que se transformaron con ferritina H humana. El anticuerpo utilizado en este estudio es HS-59 anti-HF (1: 40.000 durante 16 horas), que es un ratón monoclonal para ferritina H generosamente proporcionado por Paolo Arosio (Brescia Italia).

- 15 La FIG. 8 es una transferencia western teñida para hierro. Las proteínas se separaron primero por electroforesis en gel y el gel se tiñó con reactivo de Perl, una tinción histológica estándar para hierro que se usa para demostrar el contenido de hierro de la ferritina. Los carriles 1 y 2 son de colonias de levadura que fueron transformadas con L-ferritina. No se observa ningún producto de reacción para el hierro en estos carriles ya que la L-ferritina no puede cargar hierro. Los carriles 3 y 4 son extractos proteicos de levadura que expresa ferritina H desarrollada en un medio suplementado con hierro (Carril 3) y bajo condiciones de medio de hierro normales (Carril 4). Se usó un patrón de ferritina H como control (Carril 5). El carril 6 contiene marcadores de peso molecular para indicar el tamaño de la ferritina.

- 20 La FIG. 9 muestra los resultados obtenidos usando un modelo de rata de deficiencia de hierro estándar. Los animales en una dieta deficiente en hierro (ID: Iron Deficient) tenían los niveles más bajos de hemoglobina (Hb). Los animales que recibieron levadura sin hierro (levadura sin Fe) tenían niveles de Hb similares a los animales ID. Se observaron mejoras en los niveles de Hb en los otros tres grupos, presentándose el aumento más rápido en la mejora en los animales que recibieron la levadura que fue suplementada con hierro y fortificada con ferritina H (levadura Fe + Ft).

- 25 La FIG. 10 representa los niveles de hematocrito a partir del grupo de animales ensayado en la FIG. 9. Estos datos muestran que la levadura como vehículo para el hierro es igualmente eficaz para corregir el hematocrito en presencia o en ausencia de ferritina H y ambos son significativamente mejores que el estándar de norma asistencial actual, el FeSO_4 . Los animales que continuaron con la dieta ID y los animales que recibieron levadura que no había sido suplementada con hierro no mostraron aumento en el hematocrito durante los 11 días examinados.

- 30 La FIG. 11 muestra los resultados de un ensayo que mide la biodisponibilidad de hierro en el grupo de animales ensayado en las Figs. 9 y 10. Estos datos muestran que la levadura suplementada con hierro fortificada con ferritina (levadura Fe + Ft) proporcionó el mayor aumento en la saturación de transferrina (Tf), seguida por la levadura suplementada con hierro sin ferritina (levadura no Ft). $p < 0,05$ para levadura Fe + Ft frente a todos los grupos excepto levadura no Ft.

- 35 La FIG. 12 muestra el estatus del hierro de dos áreas del cerebro importantes desde el punto de vista del desarrollo, el mesencéfalo ventral y el caudado. Los animales descritos en los análisis de Hb y Hct (FIGS. 9 y 10) fueron sacrificados a los 14 días de edad y se determinó la concentración de hierro del cerebro medio ventral (VMB) y el caudado. Los animales que recibieron la levadura que había sido fortificada con ferritina H y suplementada con hierro (levadura-Fe + Ft) tenían más hierro en ambas regiones del cerebro que cualquier otro grupo.

- 40 La FIG. 13 representa los niveles de hierro en las regiones del cerebro del núcleo accumbens (NA) y la corteza prefrontal (PFC). En esta figura, es evidente la especificidad regional del hierro liberado de la levadura suplementada con hierro fortificada con ferritina (levadura-Fe + Ft). En el NA (similar al VMB y al caudado mostrado en la figura 12), el contenido de hierro es elevado en comparación con los otros modos de suministro de hierro. En la PFC, sin embargo, el hierro liberado de la levadura enriquecida en hierro fortificada con ferritina es similar al encontrado para los otros grupos.

La FIG. 14A muestra la secuencia de aminoácidos de la ferritina H humana (SEQ ID NO: 1).

- 45 La FIG. 14B muestra la secuencia de cDNA de la ferritina H humana (SEQ ID NO: 2). Los codones de inicio (ATG) y de parada (TAA) están en negrita y los sitios de restricción *Bam*HI (en el extremo 5' de la secuencia) y *Xho*I (en el extremo 3' de la secuencia) están subrayados.

- 50 La FIG. 15 muestra una sección transversal del duodeno de rata adulta que localiza receptores de ferritina H inmunizados en vellosidades (a y c). Los núcleos están teñidos con DAPI (b y c). Las imágenes superpuestas se muestran en (c).

La FIG. 16 muestra la estructura de una casete génica para expresar ferritina H bajo el control del promotor transcripcional *TDH3* de levadura; ferritina H ORF - marco de lectura abierta que codifica ferritina H humana; *CYC1*ter - terminador transcripcional a partir del gen *CYC1* de levadura; rectángulos rellenos - sitios *loxP*; *URA3* - marcador seleccionable.

- 5 La FIG. 17 muestra una transferencia Western que demuestra el efecto del sitio cromosómico de integración sobre la expresión de ferritina H recombinante en levadura transformada. Carril 1 - ferritina H en RLK3190; Carriles 2 y 4: ferritina H en cepas de levadura que tienen otros sitios de integración cromosómica del gen de ferritina H; Carril 3 - ferritina H en RLK3177, que contiene un plásmido extracromosómico multicopia; Carril 5 - sin muestra; Carril 6 - ferritina rH marcada con His purificada; Carril 7 - marcadores de peso molecular.
- 10 La FIG. 18 presenta datos que muestran la biodisponibilidad superior del hierro suministrado por levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina. Los datos del día 14 de los experimentos representados por las Figuras 9 - 11 se representan para mostrar el cambio por mg de hierro consumido. A. Recuperación de la hemoglobina; B. recuperación del hematocrito; C. Saturación de transferrina; D. Comparación del porcentaje de saturación de transferrina para diferentes dietas, $p < 0,05^{**}$.
- 15 **Descripción detallada de la invención.**

La presente solicitud se refiere a nuevas cepas de levadura recombinante, a composiciones que comprenden la levadura y a composiciones para tratar los trastornos por deficiencia de hierro.

- 20 En esta memoria descriptiva se han descrito las formas de realización de una manera que permite escribir una memoria clara y concisa, pero se pretende y se apreciará que las formas de realización se pueden combinar o separar de muchas maneras sin apartarse de la invención.

Se describe un método superior para tratar la deficiencia de hierro y otros trastornos del hierro, que hace aumentar la biodisponibilidad del hierro y restaura los niveles normales de hierro más rápida y eficazmente que el FeSO_4 , la actual norma asistencial.

- 25 En una forma de realización de la descripción, se presenta un nuevo planteamiento dietético para aliviar la deficiencia de hierro. Este planteamiento se originó en el descubrimiento por los autores de la presente invención, de receptores para la ferritina H en el intestino y en el cerebro, y la demostración de que la ferritina H es la forma preferida de captación de hierro, en relación con la ferritina rica en L. La secuencia del gen y la estructura de la proteína de la ferritina H están muy conservadas a través del reino animal. Por tanto, la aplicación de ferritina H como proteína de suministro de hierro no se limita a los seres humanos.

- 30 Como se usa en el presente texto, un "trastorno del hierro" incluye un trastorno o enfermedad relacionada con la deficiencia de hierro, la absorción de hierro y/o el metabolismo del hierro. Los ejemplos de trastornos por deficiencia de hierro incluyen, pero sin limitarse a ellos, la anemia ferropénica (por deficiencia de hierro), como la anemia por deficiencia de hierro causada por la ingesta dietética insuficiente o la absorción de hierro. La anemia por deficiencia de hierro puede estar relacionada, por ejemplo, con desnutrición, embarazo (incluido el período postparto), hemorragia uterina intensa, enfermedad crónica (incluida enfermedad renal crónica), cáncer, diálisis renal, complicaciones de la cirugía de derivación gástrica, síndrome de piernas inquietas (RLS, enfermedad de Ekbom), esclerosis múltiple, diabetes (p. ej., diabetes tipo I y tipo II), resistencia a la insulina y trastornos por déficit de atención. Los trastornos relacionados con la absorción de hierro y el metabolismo del hierro incluyen, entre otros, sobrecarga de hierro, enfermedad de Huntington, neurodegeneración con acumulación cerebral de hierro (NBIA), enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, hipomielinización y esclerosis múltiple.
- 35
- 40

- En una forma de realización de la descripción, el trastorno de deficiencia de hierro o anemia ferropénica se relaciona con niveles deficientes de hierro en el cerebro, como ocurre en diversas enfermedades neurológicas y neurodegenerativas entre las que se incluyen la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, el síndrome RLS, el rendimiento cognitivo subóptimo asociado con la anemia en mujeres, la depresión y el insomnio. En otra forma de realización, el trastorno por deficiencia de hierro comprende déficit neurológico asociado con deficiencia cerebral de hierro durante el desarrollo postnatal, que incluye hipomielinización y desarrollo cerebral lento como resultado de la deficiencia de hierro en el desarrollo que conduce a un rendimiento cognitivo y discapacidades motrices deficientes, y trastorno de hiperactividad por déficit de atención (ADHD).
- 45

- La carencia de hierro y la síntesis reducida de dopamina en el cerebro son factores importantes en los trastornos de deficiencia de hierro tales como, por ejemplo, el RLS y la deficiencia de hierro en el desarrollo de los niños. La dopamina es un transmisor neuronal sintetizado en el cerebro que es esencial para la función apropiada del sistema nervioso central (SNC). En la síntesis de dopamina, el hierro es un cofactor para la enzima tirosina hidroxilasa, que es la etapa limitante de la velocidad en el metabolismo de la dopamina (Cooper et al., 1991) *The Biochemical Basis of Neuropharmacology*, Oxford University Press, Nueva York, N. Y.). El hierro en el sistema dopaminérgico parece ser un componente importante en la fisiopatología del RLS y en los déficits conductuales en los niños, incluido el ADHD. Los pacientes con RLS tienen un 65% menos de ferritina en el líquido cefalorraquídeo (CSF) y tres veces más transferrina en el CSF (proteína sanguínea de transporte de hierro), a pesar de los niveles séricos normales de
- 50
- 55

ferritina y transferrina en suero tanto de pacientes con RLS como de controles. Las concentraciones de hierro varían en todo el cerebro, el sitio de la síntesis de dopamina; los pacientes con RLS tienen menos hierro en la sustancia negra y en las regiones del putamen del cerebro. En general, el grado de disminución en los niveles de ferritina en suero es indicativo de la gravedad de los síntomas del RLS. También existen publicaciones de niveles disminuidos de ferritina sérica en niños con ADHD.

La expresión "complejo de ferritina-hierro" se refiere a un complejo de proteína que comprende múltiples subunidades de ferritina y átomos de hierro. Los complejos de ferritina-hierro adecuados comprenden subunidades de ferritina H y ferritina L de mamífero. Se han identificado las secuencias de aminoácidos de las subunidades de ferritina H de diversas especies de mamíferos (véase, por ejemplo, Orino Koichi et al., *Veterinary Biochem.* 42: 7 - 11 (2005); número de registro: 06A006486). En una forma de realización, la ferritina H es ferritina H humana (SEQ ID NO: 1; véase la FIG. 14A). La ferritina H puede ser también un homólogo o variante natural o sintética de la ferritina H humana. En ciertas formas de realización, el homólogo de ferritina H tiene de aproximadamente 80% a aproximadamente 100% de identidad de secuencia con la ferritina H humana, tal como al menos 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad de secuencia con la ferritina H humana. El homólogo de ferritina H conserva la capacidad de unirse al hierro y formar un complejo de ferritina-hierro de subunidades múltiples, pero puede mutarse para proporcionar diferentes fuerzas de unión y disociación entre el hierro y la ferritina. El complejo ferritina-hierro comprende subunidades de ferritina H, pero también puede comprender algunas subunidades de ferritina L. En ciertas formas de realización, el componente de la subunidad de ferritina del complejo comprende al menos un 20% de ferritina H en comparación con la ferritina L, tal como aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, o 100% de ferritina H en comparación con la ferritina L. En una forma de realización, todas las subunidades de ferritina en el complejo ferritina-hierro (es decir, el 100% de las subunidades de ferritina) son ferritina H. La ferritina H puede ser ferritina H recombinante. Por ejemplo, en una forma de realización, la ferritina H puede ser ferritina H humana, o un homólogo de la misma, producida en una cepa de levadura que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica la ferritina H bajo el control de un promotor de levadura apropiado. La ferritina H producida en levadura puede purificarse para uso terapéutico utilizando métodos estándar de purificación de proteínas.

El hierro en el complejo de ferritina-hierro puede ser un átomo de hierro, o puede estar en forma de complejo que contiene hierro. Los "complejos que contienen hierro" o los "complejos de hierro" son compuestos que contienen hierro en el estado de oxidación (II) o (III), complejado con un compuesto orgánico. Los complejos de hierro incluyen complejos de hierro polímero, complejos de hierro carbohidrato y complejos de hierro aminoglicosano. Estos complejos están disponibles comercialmente y/o pueden sintetizarse por métodos conocidos en la técnica.

Los ejemplos de complejos de hierro carbohidrato incluyen complejos de hierro sacárido, complejos de hierro oligosacárido y complejos de hierro polisacárido, tales como hierro carboximaltosa, hierro sacarosa, hierro poliisomaltosa (hierro dextrano), hierro polimaltosa (hierro dextrina), hierro gluconato, hierro sorbital y hierro dextrano hidrogenado, que pueden complejarse más con otros compuestos, como sorbitol, ácido cítrico y ácido glucónico (por ejemplo, complejo de hierro dextrina-sorbitol- ácido cítrico y complejo de hierro sacarosa-ácido glucónico), y mezclas de los mismos.

Los ejemplos de complejos de hierro aminoglicosano incluyen hierro sulfato de condroitina, hierro sulfato de dermatina, queratán sulfato de hierro, que pueden complejarse más con otros compuestos, y mezclas de los mismos. Los ejemplos de complejos de hierro polímero incluyen hierro ácido hialurónico, complejos de hierro proteína y mezclas de los mismos.

"Tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente texto, se refiere a la eliminación completa así como a cualquier reducción medible, clínica o cuantitativamente, de la condición para la cual está siendo tratado el paciente o sujeto. "Tratamiento" es una intervención realizada con la intención de prevenir el desarrollo o alterar la patología o los síntomas de un trastorno. En consecuencia, "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. El "tratamiento" también se puede especificar como cuidados paliativos. Entre los que necesitan tratamiento se incluyen aquellos que ya tienen uno o más trastornos por deficiencia de hierro, así como aquellos en los que se debe prevenir el trastorno.

En el tratamiento de un paciente necesitado del mismo, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de la presente composición de ferritina-hierro. Como se usa en el presente texto, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" es una cantidad de la composición indicada para el tratamiento que no excede de la cantidad que puede provocar efectos adversos significativos. Los métodos para evaluar la efectividad de los tratamientos terapéuticos son conocidos por los expertos en la técnica.

Un "paciente en necesidad de ello" o "paciente" se refiere a cualquier paciente o sujeto que podría beneficiarse del método de tratamiento. En ciertas formas de realización, un paciente que lo necesita o en necesidad de ello es un paciente predispuesto para el desarrollo de uno o más trastornos de deficiencia de hierro, un sujeto que tiene uno o más trastornos de deficiencia de hierro pero que no manifiesta ningún síntoma clínico o un sujeto que tiene uno o más trastornos de deficiencia de hierro y que padece los síntomas de uno o más trastornos de deficiencia de hierro. El paciente que lo necesita puede ser un mamífero, como un ser humano, un perro, un gato, una vaca, un caballo, un cerdo, un roedor o un primate. En una forma de realización, el paciente es un ser humano. En ciertas formas de

realización, los métodos encuentran uso en animales de experimentación, en aplicaciones veterinarias y de cría de animales, y/o en el desarrollo de modelos animales para enfermedades.

5 Las dosis a administrar son variables de acuerdo con el período de tratamiento, la frecuencia de administración, el huésped y la naturaleza y gravedad del trastorno. La dosis puede ser determinada por un experto en la técnica sin una cantidad de experimentación excesiva. Las composiciones de la invención se administran en concentraciones de dosificación suficientes para asegurar la liberación en el paciente de una unidad de dosificación suficiente del complejo ferritina-hierro para proporcionar el tratamiento deseado del trastorno por deficiencia de hierro. La dosificación real administrada estará determinada por factores físicos y fisiológicos tales como la edad, el peso corporal, la gravedad de la enfermedad y/o la historia clínica del paciente. Los ingredientes activos se pueden 10 administrar para alcanzar concentraciones plasmáticas *in vivo* del complejo ferritina-hierro de aproximadamente 50 μM a aproximadamente 1000 μM . Por ejemplo, los métodos pueden usar composiciones para proporcionar de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 o de aproximadamente 1 a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal/día del complejo de ferritina-hierro, tal como aproximadamente 30 mg/kg de peso corporal/día del complejo ferritina-hierro. Se entenderá, sin embargo, que también pueden ser adecuados niveles de dosificación que se 15 desvían de los intervalos proporcionados, en el tratamiento de un trastorno dado.

Los complejos de ferritina-hierro pueden estar en cualquier forma adecuada para la administración. Tales formas administrables incluyen comprimidos, comprimidos tamponados, píldoras, cápsulas, cápsulas con recubrimiento entérico, grageas, sellos, polvos, gránulos, aerosoles, liposomas, supositorios, cremas, lociones, pomadas, parches cutáneos, parenterales, pastillas, líquidos orales tales como suspensiones, soluciones y emulsiones (aceite en agua 20 o agua en aceite), colirios y líquidos inyectables, o formas de liberación sostenida de los mismos, y aerosoles. La dosis deseada puede proporcionarse en varios incrementos a intervalos regulares a lo largo del día, mediante infusión continua, o mediante formulaciones de liberación sostenida, o puede presentarse como un bolo, un electuario o una pasta.

En una forma de realización, se prepara una composición o formulación farmacéutica o nutracéutica que comprende 25 los complejos de ferritina-hierro, por mezcla con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. En algunos casos, el complejo ferritina-hierro puede administrarse como una composición que comprende complejos de ferritina-hierro y el tampón en el que se disolvieron las moléculas de hierro y las moléculas de ferritina para permitir la unión de hierro-ferritina (es decir, formación de los complejos de ferritina-hierro). Sin embargo, se pueden agregar otros productos, si se desea, para maximizar el suministro de hierro, la preservación o para optimizar un método particular de administración. Además, la presente invención incluye el uso de composiciones de combinación que comprenden 30 los complejos ferritina-hierro como se describe en el presente texto en combinación con otros agentes adecuados para el tratamiento de trastornos por deficiencia de hierro.

Como se usa en el presente texto, "farmacéuticamente aceptable" significa aceptable para uso en las técnicas farmacéutica y veterinaria, compatible con otros ingredientes de la formulación, y no tóxico o de otro modo 35 inaceptable de acuerdo con una relación beneficio/riesgo razonable. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" o "diluyente" incluye cualquiera y todos los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retardo de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica de una composición que comprende complejos ferritina-hierro. Los ejemplos de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero sin limitarse a ellos, agua, solución salina, soluciones de Finger y solución de dextrosa. El 40 volumen de la composición farmacéutica se basa en el modo de administración previsto y el volumen seguro para el paciente concreto, según determine un profesional médico.

La selección del vehículo también depende del modo de administración previsto. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar mediante cualquiera de varios medios convenientes que incluyen, pero no sin 45 limitarse a ellos, la administración sistémica (por ejemplo, inyección intravenosa, inyección intraparenteral, inhalación, administración transdérmica, administración oral, administración nasal, administración rectal) y/o administración local (por ejemplo, inyección directa en un tejido diana, suministro a un tejido mediante una cánula, administración en un tejido diana mediante implante de un material de liberación prolongada), administración a un tejido mediante una bomba, etc., por vía oral, parenteral, intraósea, en el fluido cerebroespinal o similar. Otros 50 modos de administración incluyen administración bucal, sublingual, vaginal, subcutánea, intramuscular o intradérmica.

En una realización, las composiciones a administrar por vía oral se preparan usando sustancias que se combinan adecuadamente con complejos de ferritina-hierro para ingestión oral. Tales sustancias incluyen, sin limitación, 55 azúcares tales como lactosa (hidratada, flujo rápido), glucosa y sacarosa; almidones tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, que incluyen celulosa microcristalina, carboximetilcelulosa sódica y acetatos de etilcelulosa y celulosa; tragacanto en polvo; dióxido de silicio coloidal; croscarmelosa sódica; malta; gelatina; talco; ácidos esteáricos; estearato de magnesio; sulfato de calcio; aceites vegetales, tales como aceites de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva y aceite de maíz; polioles tales como propilenglicol, glicerol, sorbitol, manitol y polietilenglicol; agar; ácidos alginicos; antiácidos tales como hidróxido de aluminio o hidróxido de magnesio; tampones tales como citrato, acetato o bicarbonato de sodio; agua; soluciones 60 salinas isotónicas y tampón de fosfato. También pueden estar presentes agentes humectantes, lubricantes tales

como laurilsulfato sódico, estabilizantes, agentes de formación de comprimidos, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes y aromatizantes.

5 Las composiciones o formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen, pero sin limitarse a ellas, soluciones de inyección estériles isotónicas acuosas y no acuosas, que pueden contener antioxidantes, tampones, agentes bacteriostáticos o solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre; y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en recipientes sellados de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, ampollas y viales, y pueden almacenarse en una condición liofilizada que requiere solamente la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. Se pueden preparar suspensiones y soluciones de inyección extemporáneas a partir de polvos, gránulos o comprimidos estériles, o similares.

10 Las composiciones o formulaciones adecuadas para administración intravenosa comprenden vehículos tales como solución salina fisiológica, agua bacteriostática, CREMOPHOR EL™ (BASF; Parsippany, N. J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). La composición debe ser estéril y debe ser fluida para administrarse con una jeringa. Tales composiciones deben ser estables durante la fabricación y el almacenamiento, y deben conservarse frente a la contaminación por microorganismos, tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, poliol (tal como glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido) y otras mezclas adecuadas compatibles. Diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico y timerosal, pueden inhibir la contaminación por microorganismos. Los agentes isotónicos tales como azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol y cloruro de sodio, pueden incluirse en la composición. Las composiciones que pueden retrasar la absorción incluyen agentes tales como monoestearato de aluminio y gelatina. Los métodos de preparación de sólidos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles incluyen secado al vacío y liofilización para producir un sólido que contiene el complejo ferritina-hierro y cualquier otro ingrediente deseado.

15 La administración sistémica puede ser, por ejemplo, transmucosal o transdérmica. Para la administración transmucosal o transdérmica se seleccionan los agentes penetrantes que pueden permear la barrera o barreras diana. Los agentes penetrantes transmucosales incluyen detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Se pueden usar aerosoles nasales o supositorios para la administración transmucosal. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas.

20 Las composiciones que comprenden complejos de ferritina-hierro pueden prepararse con vehículos que protegen a los complejos evitando la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables o biocompatibles, como etileno acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Tales materiales pueden obtenerse en el mercado a partir de fuentes que incluyen, pero sin limitarse a ellas, ALZA Corporation (Mountain View, CA) y NOVA Pharmaceuticals, Inc. (Lake Elsinore, CA), o ser preparados por un experto en la técnica.

25 Las composiciones para administración oftalmológica se preparan en vehículos líquidos adecuados tales como solución salina tamponada o fisiológica, liposomas o aminoácidos básicos. Se pueden preparar cremas, lociones y pomadas para aplicación tópica usando una base apropiada tal como base de triglicéridos, liposomas o aminoácidos básicos. Tales cremas, lociones y pomadas también pueden contener un agente tensioactivo.

30 En un ejemplo, los complejos de ferritina-hierro se administran en forma de una cepa de levadura recombinante que expresa ferritina H a partir de una casete de expresión de ferritina H integrada cromosómicamente. Las cepas de levadura recombinante adecuadas para la suplementación nutricional de hierro pueden almacenar hierro en una forma que tiene una alta biodisponibilidad para los mamíferos, incluidos los seres humanos. La cepa de levadura incluye aquellas cepas que cumplen con los requisitos de consumo generalmente considerado como seguro (GRAS). Estos pueden incluir, por ejemplo, levadura de los géneros *Saccharomyces* y *Pichia*, así como otros que pueden usarse en procesos para producir compuestos terapéuticos. En esta forma de realización, el gen de almacenamiento de hierro (p. ej. la secuencia de codificación de ferritina H) se pone bajo el control de un promotor de levadura apropiado en una casete de expresión de almacenamiento de hierro para producir niveles suficientemente elevados de la proteína de almacenamiento de hierro para la levadura con el fin de servir como vehículo adecuado para la suplementación de hierro. La construcción de una cepa de levadura recombinante específica, que expresa constitutivamente ferritina rH y proporciona niveles de hierro biodisponible significativamente más altos que la suplementación dietética estándar con FeSO₄ o ferritina de bazo, se describe en el Ejemplo 2.

35 Los promotores de levadura adecuados son conocidos en la técnica e incluyen promotores que inducen un nivel elevado de expresión constitutiva y promotores cuya expresión puede regularse mediante condiciones ambientales. Además, la constitución genética de la levadura se puede manipular aún más para lograr una variedad de resultados potencialmente ventajosos. Por ejemplo, la proteólisis puede manipularse para potenciar la estabilidad de la proteína de almacenamiento de hierro o los mecanismos de transporte de hierro, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, los de la superficie celular, la vacuola o las mitocondrias, pueden manipularse para lograr resultados deseables, tales como alterar la concentración de hierro en compartimentos celulares específicos. Además, la levadura puede alterarse de otras maneras para manipular el nivel de hierro en la proteína de almacenamiento de hierro o en los compartimentos

celulares. El contenido de hierro de la levadura se puede regular añadiendo cantidades conocidas de un compuesto de hierro al medio en el que se cultiva la levadura. Usando la levadura recombinante, la suplementación con hierro para seres humanos u otros animales puede lograrse por uno cualquiera de una serie de medios que incluyen, pero sin limitarse a ellos, el consumo de la levadura recombinante como un suplemento nutricional o el consumo de complejos ferritina-hierro purificados o aislados de la levadura recombinante. La levadura se puede cultivar específicamente con el propósito de suplementación con hierro o puede ser el subproducto de otro proceso (por ejemplo, fermentación).

Alternativamente, o además, los complejos ferritina-hierro pueden comprender ferritina rH producida en otros sistemas de expresión conocidos en la técnica, que incluyen *E. coli*, baculovirus y plantas y animales transgénicos. En una forma de realización, los complejos de ferritina-hierro pueden formarse incubando subunidades de ferritina y moléculas de hierro en un tampón adecuado, seguido de separación de cualquier molécula de hierro no unida de los complejos de ferritina-hierro resultantes.

En ciertas realizaciones, el complejo ferritina-hierro comprende además un resto de direccionamiento, tal como un anticuerpo, aptámero, receptor, ligando o fragmento de unión del mismo. El resto de direccionamiento puede reconocer uno o más marcadores específicos de células, de tejidos y/o de órganos, mediando así o mejorando el suministro a una diana o ubicación deseada en el cuerpo. En una forma de realización, el complejo de ferritina-hierro puede comprender una proteína de fusión que comprende una subunidad de ferritina, tal como ferritina H, fusionada con un péptido diana. En otra realización, el complejo de ferritina-hierro puede suministrarse o administrarse encapsulado en un liposoma, una construcción liposómica u otra vesícula unida a la membrana tal como un glóbulo rojo fantasma. El liposoma, constructo liposomal u otra vesícula puede comprender un resto de direccionamiento, tal como un anticuerpo o ligando específico para una proteína o receptor de superficie celular particular (véase más arriba), incorporado en el liposoma o vesícula. El resto de direccionamiento puede dirigirse al complejo ferritina-hierro, o la vesícula que comprende el complejo de ferritina-hierro, al cerebro y/o a la barrera hematoencefálica. Los ejemplos de restos de direccionamiento adecuados incluyen transferrina, interleucina-13 (para administración a astrocitos) y lipopolisacárido (LPS).

En otro ejemplo, la propia ferritina H puede usarse para dirigirse a otros restos. Por ejemplo, la ferritina H se puede unir a un agente biológicamente activo para administrar ese agente al cerebro. En una realización, el péptido ferritina H se fusiona a otro péptido biológicamente activo. Alternativamente, o además, la ferritina H puede conjugarse a liposomas u otras vesículas para administrar las vesículas y los contenidos de vesículas al cerebro. En otra forma de realización más, la ferritina H se puede unir a agentes tales como compuestos potenciadores del contraste para mejorar la visualización del cerebro (por ejemplo, tractos de sustancia blanca y defectos en los mismos). De forma similar a los agentes biológicamente activos, los compuestos potenciadores del contraste pueden unirse a o dentro de la proteína ferritina H o encapsularse dentro de liposomas u otras vesículas que se dirigen a los receptores de ferritina H en el cerebro a través de la ferritina H conjugada con liposoma actuando como ligando del receptor.

En otro ejemplo, la ferritina H, por ejemplo en forma de una levadura o composición recombinante de la presente invención, puede usarse para tratar trastornos relacionados con la sobrecarga de hierro o hierro en exceso. La sobrecarga de hierro, conocida clínicamente como hemocromatosis, se asocia, por ejemplo, con un mayor riesgo de cáncer, insuficiencia cardíaca, disfunción hepática y diabetes. La sobrecarga de hierro en el cerebro puede presentarse en una amplia gama de enfermedades neurodegenerativas, como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis lateral amiotrófica, la enfermedad de Hallorvordeen-Spatz y la enfermedad de Huntington, así como la degeneración macular. Debido a la importante capacidad de unión del hierro de la ferritina H, los complejos de ferritina H y/o subunidades múltiples que comprenden ferritina H pueden usarse como agente quelante del hierro. Por "complejo de ferritina de subunidades múltiples" se entiende un complejo de proteína que comprende múltiples subunidades de ferritina y opcionalmente hierro. La ferritina H es ferritina de mamífero o un homólogo o variante del mismo como se definió anteriormente. Los complejos de ferritina de subunidades múltiples se pueden preparar en un entorno relativamente libre de hierro de modo que el complejo resultante esté a menos del 100% de su capacidad total de unión con el hierro. En ciertas realizaciones, el complejo tiene una capacidad de enlace de hierro del 50% o menos, tal como aproximadamente 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 5% o 1% de capacidad de unión de hierro. En una forma de realización, el complejo puede tener aproximadamente 0% de capacidad de unión con el hierro (es decir, apoferritina (ferritina libre de hierro) que tiene una capacidad de unión con el hierro del 100% o próxima al 100% restante). La ferritina H se puede modificar para disminuir la probabilidad de que sea reconocida por cualquier receptor endógeno o para aumentar la excreción del cuerpo. Tales modificaciones están dentro de la experiencia de las personas que han practicado la técnica y estas modificaciones no tienen por qué afectar a la capacidad de la proteína para unirse al hierro. Los complejos de ferritina de subunidades múltiples adecuados para uso como quelantes del hierro comprenden subunidades de ferritina H, pero también pueden comprender algunas subunidades de ferritina L. En ciertas formas de realización, el complejo de ferritina de subunidades múltiples comprende al menos 20% de ferritina H en comparación con ferritina L, tal como aproximadamente 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% de ferritina H en comparación con ferritina L.

El suministro del complejo de ferritina de subunidades múltiples para usar como quelante del hierro puede incluir la misma gama de mecanismos de suministro (por ejemplo, consumo de levadura que produce ferritina, administración de proteína de ferritina purificada, restos de direccionamiento y/o liposomas u otras vesículas) como se describe

anteriormente para el suministro de complejos ferritina-hierro para tratar trastornos por deficiencia de hierro. El complejo de ferritina de subunidades múltiples puede suministrarse en el tracto gastrointestinal, dentro de las células que recubren el tracto gastrointestinal o dentro del torrente circulatorio. Utilizando este planteamiento, se eliminaría el hierro que de otra manera obtendría de forma apropiada acceso al cerebro u otros órganos de una manera no regulada. Además, la quelación del hierro de la sangre y los órganos sistémicos promovería una redistribución del hierro dentro del cuerpo, incluyendo la liberación de hierro del cerebro. En algunos casos, los complejos de apoferritina o ferritina a menos del 100% de la capacidad total de unión al hierro pueden administrarse directamente en el líquido cefalorraquídeo, el cerebro o el torrente circulatorio.

La ferritina tiene la capacidad de unir no solo hierro sino también una diversidad de metales, muchos de los cuales son tóxicos para el cuerpo. Así también se describe en el presente texto el uso de apoferritina (u otros complejos de ferritina de subunidades múltiples a menos del 100% de la capacidad de unión total de hierro) para reducir y eliminar metales potencialmente tóxicos del sistema gastrointestinal, la sangre, el cerebro y el organismo en general.

En las transfusiones de sangre, al menos el 15% de las células se lisan durante el proceso de infusión, liberando hierro libre potencialmente nocivo. Las transfusiones se realizan en pacientes que necesitan glóbulos rojos (RBC) y que, por tanto, son anémicos. En el presente texto se describe un método para mezclar la apoferritina (u otros complejos de ferritina de subunidades múltiples a menos del 100% de la capacidad total de unión de hierro) con la transfusión. Esto no solo proporciona un quelante para el hierro liberado debido a la lisis celular sino que también sirve para que el hierro esté disponible para el cuerpo en una forma más fisiológica o biodisponible para el tratamiento de la anemia.

Una población de pacientes que requiere transfusiones frecuentes es la de pacientes con talasemia. Esta población eventualmente sufre daños hepáticos debidos a la acumulación excesiva de hierro. La ferritina H y/o los complejos de ferritina de subunidades múltiples que comprenden ferritina H pueden ayudar a distribuir el hierro de manera más efectiva en el cuerpo, limitando así la acumulación excesiva en el hígado. Otra población que recibe frecuentes transfusiones de sangre son los recién nacidos, en particular neonatos prematuros. Proporcionar ferritina H, complejos de ferritina de subunidades múltiples que comprenden complejos de ferritina H y/o complejos de ferritina-hierro con el material de transfusión, mejoraría generalmente la distribución de hierro así como la distribución de hierro al cerebro.

Las subunidades de ferritina, incluyendo las subunidades de ferritina H, se pueden expresar en el cuerpo del paciente. En esta forma de realización, el complejo ferritina-hierro se formaría *in vivo*. Están disponibles varios portadores de plásmidos y sistemas de reactivos de transfección para transfectar células *ex vivo* para generar transformantes estables o células transfectadas transitoriamente para la reinfusión en el animal o paciente huésped. Los plásmidos de expresión adecuados están disponibles comercialmente, como están los reactivos de transfección, muchos de los cuales son liposomas catiónicos de un tipo u otro. Para la transferencia de genes tanto *in vivo* como *ex vivo*, tal como la terapia génica, se conocen en la técnica vectores adecuados e incluyen vectores retrovirales, vectores adenovirales, vectores virales adenoasociados, vectores lentivirales y sistemas de electroporación.

Otros aspectos y ventajas de la presente invención se entenderán al hacer la consideración de los siguientes ejemplos ilustrativos. Los ejemplos no deben interpretarse en modo alguno como limitantes del alcance de esta invención.

Ejemplos.

Ejemplo 1. Absorción y transporte de ferritina.

Métodos.

Preparación de ferritina.

Todos los experimentos de este ejemplo usaron ferritina H humana recombinante o ferritina de bazo de caballo. La ferritina H humana recombinante se preparó transformando células Br21 químicamente competentes con un plásmido de ferritina H humana recombinante. Después de cultivar las células, la proteína se purificó con una columna de filtro de proteínas de níquel hasta una concentración final de 2,8 mg/ml. La ferritina del bazo de caballo se obtuvo comercialmente (Sigma), y se eligió porque contiene aproximadamente subunidades de ferritina L a H en la proporción 90:10.

Cultivo celular y preparación de la monocapa de células endoteliales.

Los autores de la presente invención utilizaron células endoteliales retinianas bovinas (BREC) como modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BBB) para probar la hipótesis de que la ferritina puede transportarse a través de una capa de células endoteliales y para comenzar a abordar el mecanismo del transporte de ferritina a través de la BBB. Se ha demostrado que este modelo bien estudiado posee todas las características y atributos necesarios de una barrera hemato-neural (Antonetti D. A., et al., J. Neurochem. 80: 667 - 677, 2002). Se obtuvieron ojos de vaca de un matadero local y las células endoteliales de la retina bovina (BREC) se aislaron y se procesaron de acuerdo con un procedimiento publicado con anterioridad (Gardiner T. A., et al., Lab Invest. 72: 439 - 444, 1995). Los BREC se

- cultivaron en medio MCDB-131 (Sigma, St. Louis, MO, EE. UU.) suplementado con 10% de FBS, 10 ng/ml de EGF, 0,2 mg/ml de IENDO GRO™ (VEC Technologies, Inc., Rensselaer, NY, EE.UU.), heparina 0,09 mg/ml, solución antibiótica/antimicótica (Gibco, Rockville, Maryland, EE. UU.) y antibiótico Tylosin (Sigma). Las células se cultivan inicialmente en matraces hasta que alcanzan al menos 80% de confluencia. A continuación, los BRECS se tripsinizaron suavemente y crecieron hasta confluencia en filtros porosos COSTAR® TRANSWELL™ de 0,4 µm (Corning, Acton Mass). Se añadió fibronectina a una concentración de 1 µg/cm² para favorecer la adherencia al filtro. Las células se lavaron después y se escalonaron a medio MCDB-131 libre de EGF y libre de suero, suplementado con 100 nm hidrocortisona durante 72 horas. La adición de hidrocortisona a estos cultivos celulares promovió la formación de uniones estrechas.
- 5
- 10 Transporte de ferritina en el modelo BBB.
- Se adquirió transferrina purificada previamente y se resuspendió hasta una concentración final de 2,5 mg/ml. Se marcaron aproximadamente 250 µg de ferritina H humana recombinante, ferritina de bazo de caballo (Sigma) y transferrina con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Pierce Biotechnology) en tampón de carbonato/bicarbonato 100 mM, pH 9,0. La eliminación del exceso de FITC hidrolizado se logró mediante la pasada a través de una columna de desalación G-25 de 5 ml. La ferritina H conjugada con FITC, la ferritina del bazo y la transferrina se concentraron, y el tampón se intercambió con PBS en un concentrador CENTRIPREP® (Amicon, Inc., 10.000 MWCO). La transferrina se incluyó como control de transporte positivo en el modelo BREC (Burdo J. R., et al., Neuroscience 121: 883 - 890, 2003).
- 15
- La velocidad de flujo a través de una monocapa de BREC confluyente se determinó como se describió con anterioridad en Burdo et al., 2003, con algunas modificaciones usando la ecuación: $(Bf / Tj) * (Vb / A) = (Flux) * t$. En forma resumida, los BREC se cultivaron hasta la confluencia en un aparato Transwell antes de añadir 140 µg de ferritina rH marcada con FITC, ferritina de bazo o transferrina, a la cámara superior (apical). El transporte del trazador se determina tomando muestras de partes alícuotas de 100 µl de la cámara inferior (basal) recogidas en varios tiempos (15, 30, 45, 60, 120, 180 y 240 min) después de la adición del trazador a la cámara apical. Las partes alícuotas de la cámara basal se analizan después para determinar la fluorescencia en un espectrofluómetro (SPECTRAMAX® GEMINI, Molecular Devices). La velocidad de flujo se obtiene como la pendiente (cm/s) de las representaciones de la fluorescencia de la cámara inferior por unidad de cantidad de fluorescencia de la cámara superior (Bf/Tf) frente al tiempo (t). Aquí, Bf, indicativo de la cantidad de trazador transportado a través de la monocapa, se normaliza respecto al volumen de la cámara basal (Vb) y también a la superficie disponible para el transporte (A). La concentración de Tf en la cámara superior no cambia significativamente a lo largo de las 4 horas en que se realiza el experimento, y por tanto se considera constante para calcular el flujo. La cantidad de fluorescencia en la cámara superior se obtiene a partir de una alícuota de 100 µl al final del ensayo de transporte (4 h).
- 20
- 25
- 30
- Como control para el flujo paracelular, se añadió dextrano RITC (70 kDa) simultáneamente a la cámara apical como control. El dextrano no se absorbe a un nivel apreciable por las células endoteliales (Raub T. J., et al., *J. Cell Physiol.*, 149: 141 - 151, 1991). Por lo tanto, cualquier acumulación de dextrano en la cámara basal se debería al transporte paracelular. Ninguna de las condiciones afectó a la velocidad de flujo de dextrano, que fue mínima en cada condición.
- 35
- También se usó un sistema quimioluminiscente para detectar inmunológicamente la ferritina rH marcada con FITC en la cámara basal. El medio basal se recogió y se concentró desde 1,5 ml hasta 100 µl usando un concentrador Centriprep. El medio concentrado se sometió a SDS-PAGE y se obtuvieron imágenes del gel bajo fluorescencia a 462 nm. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana y se realizó un análisis de inmunotransferencia con un anticuerpo contra ferritina rH. Estos experimentos demostraron que el FITC estaba asociado con ferritina rH, como se muestra en la Figura 4B.
- 40
- 45 Determinación del mecanismo de transporte.
- Para determinar si la pinocitosis contribuía significativamente al transporte de ferritina, se añadieron 50 µg/ml de filipina a las cámaras apicales del aparato transwell durante 30 minutos antes de añadir la ferritina y el dextrano. Se ha demostrado que la adición de filipina inhibe la acción del transporte no específico por medio de la pinocitosis (Stremmel W, et al., *Lipids* 36: 981 - 989, 2001). Para determinar si la absorción de ferritina H se produce a través de endocitosis dependiente de clatrina, los estudios se realizaron en medio deficiente en potasio (NaCl 100 mM/HEPES 50 mM). Las células se incubaron en medio deficiente en potasio durante 10 minutos antes de la adición de ferritina. La depleción de potasio intracelular inhibe los procesos endocitóticos mediados por receptores que ocurren a través de hoyos recubiertos de clatrina. Estos últimos experimentos solo se pudieron realizar durante una hora antes de que la depleción de potasio alterara la integridad de las uniones de célula a célula como se indica por un aumento en el transporte de dextrano. Cada condición de tratamiento (o estándar) se realizó un mínimo de seis veces. A lo largo de los experimentos, los cultivos se evaluaron visualmente para asegurar que los tratamientos experimentales y las manipulaciones no afectaban a la viabilidad celular. Al igual que en los experimentos de referencia, el dextrano RITC se incluyó como un indicador de la integridad de las uniones estrechas. Las diferencias entre los medios para FITC ferritina rH bajo las diferentes condiciones se analizaron usando un análisis de varianza de una vía. Para las
- 50
- 55

mediciones con medios significativamente diferentes, se realizó una comparación post hoc de Bonferroni para analizar las diferencias por pares. El nivel de significación se estableció en $p < 0,05$.

Experimentos de unión.

5 Los experimentos de unión en homogenados de células BREC se realizaron por duplicado en el cuarto pase de las células BREC usando ^{125}I ferritina H humana recombinante o ferritina de bazo de caballo. La actividad específica para ambas fue de aproximadamente 340.000 cpm/pmol. Para establecer la unión total específica y no específica, se añadió un intervalo de concentraciones de ^{125}I -ferritina H con o sin un exceso molar de 1000 veces de ferritina rH no marcada, a 100 mg de proteína total del homogenado de células BREC. El tampón de unión consistía en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), BSA al 0,1%. Las incubaciones se llevaron a cabo a 22 °C durante 2 h. La unión se terminó mediante la adición de 3 ml de Tris-HCl 50 mM enfriado con hielo. Utilizando un recolector de células, la radiactividad unida se aisló mediante filtración rápida y lavado sobre filtros de fibra de vidrio Whatman C, que fueron previamente recubiertos con 5% de leche en polvo sin grasa y 0,1 mg/ml de ferritina de bazo de caballo.

10 Se realizaron ensayos de unión competitiva de equilibrio, en los que la concentración creciente de ferritina H no marcada se incubó con 25 mg de proteína de homogenado BREC a 22°C con ^{125}I -ferritina rH 0,4 nM durante 120 minutos en el mismo tampón de unión descrito anteriormente. La terminación de la unión, el aislamiento de las membranas y los cálculos de unión específica se realizaron como se describió anteriormente.

Microvasculatura de cerebro de rata.

20 Se usaron seis ratas macho adultas para cada preparación de microvasos. Las ratas se anestesiaron con una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/kg de peso corporal) y luego se decapitaron. El cerebro se estirpó y se colocó en una placa Petri en hielo. Se retiraron el cerebelo y las meninges y se añadieron 5 volúmenes de tampón microvascular (1x MVB, 1x sal, 1x HEPES, 0,5% BSA y glucosa 5 mM) con inhibidores de proteasa. Los cerebros se homogeneizaron suavemente con 20 golpes usando un homogeneizador de vidrio-teflón (0,25 mm de separación) y el homogenado se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en 5 volúmenes de dextrano al 17% (relación 1:1 de 1x sal y HEPES 1x con dextrano) seguido por agitación vorticial y luego centrifugación a 3000 x g a 4 °C. Los microvasos se recogieron de la pared del tubo y se resuspendieron en 20 ml de tampón MVB 1x. Los microvasos se filtraron a través de una malla de 120 μm . A continuación, el preparado de microvasos se purificó más intensamente por adherencia a perlas de vidrio (Sigma) soportadas en una malla de 40 μm . Las perlas se lavaron con tampón al que se había añadido inhibidores de proteasa. Las perlas se aclararon en 5 ml de MVB y luego los microvasos se sedimentaron por centrifugación a 1000 x g a 4 °C durante 15 minutos. Los microvasos se resuspendieron en 1 ml de cóctel HES+ (10 μm de HEPES, 1 mM de EDTA, 250 mM de sacarosa, pH 7,4 e inhibidor de proteasa) (Sigma) y se determinó la concentración total de proteína. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Unión de ferritina a los microvasos.

35 La suspensión de unión consistió en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), BSA al 0,1% y 20 mg de preparación de proteína de membrana con o sin la adición de 1 mM de ferritina rH no marcada en un volumen final de 250 μl . La unión se terminó mediante la adición de 3 ml de Tris-HCl 50 mM enfriado en hielo. La radioactividad unida se aisló mediante filtración rápida sobre filtros Whatman de fibra de vidrio C que habían sido recubiertos con anterioridad en una solución de leche desnatada en polvo al 5% (Blotto) con 0,1 mg/ml de ferritina de bazo. Esta combinación se determinó empíricamente para reducir la unión no específica de la proteína radiomarcada a los filtros al 1 - 3% de los recuentos totales añadidos. Los filtros se lavaron 5 veces con 3 ml de Tris 50 mM enfriado en hielo que contenía NaCl 200 mM. Los filtros se contaron en un contador gamma automático MICROMEDIC 4/200 plus. La unión específica se calculó restando la unión en presencia de un exceso de ferritina rH no marcada (unión no específica) de la unión sin exceso de ferritina rH no marcada presente (unión total).

Análisis de saturación.

45 Cada experimento de unión se llevó a cabo por duplicado. Se añadieron concentraciones crecientes de ^{125}I -ferritina rH a suspensiones de unión que consisten en el mismo tampón de unión descrito anteriormente con 20 mg de preparado de proteína de membrana con o sin la adición de 1 μm de ferritina rH no marcada en un volumen final de 250 μl . Después de una incubación de 120 minutos a 22°C, la unión se terminó y se calcularon la unión total, la inespecífica y la específica como se describió anteriormente.

50 Ensayos de competición.

Se incubaron concentraciones crecientes de competidores no marcados (ferritina rH y ferritina del bazo) durante 60 minutos a 22 °C con 100 mg de proteína de membrana en presencia de 0,4 nM de ^{125}I -ferritina rH en el mismo tampón de unión descrito anteriormente. La unión, la terminación de la unión, el aislamiento de membranas y los cálculos de unión específica se realizaron como se describió anteriormente. Los experimentos de competición se realizaron por duplicado.

Estudios de absorción *in vivo*.

Se incubaron ferritina rH o ferritina de bazo (1,2 mg) en 40 μ l de ácido nitrilotriacético 1 mM (pH 6,0), 0,5 μ l de sulfato ferroso amónico, 2 μ l de bicarbonato sódico 0,5 M y 40 μ Ci de $^{59}\text{FeCl}$ durante 4 horas a 37 °C. Después de la incubación, la ferritina se dializó en un cartucho de 10.000 MW en 1x PBS durante 24 horas para eliminar cualquier posible ^{59}Fe no unido. La actividad específica fue de 0,04 μ Ci/g para ferritina rH y 0,08 μ Ci/g para ferritina de bazo.

5 Se inyectó proteína radiomarcada (3,4 μ g/gramo de peso) (n = 3) en la vena de la cola de ratas Sprague-Dawley hembras (aproximadamente 350 g de peso corporal). Después de 48 horas, las ratas se decapitaron y los órganos se extrajeron inmediatamente. Cada órgano se diseccionó y se aclaró minuciosamente en PBS 0,1 M. Para el encéfalo, el cerebro se separó del cerebelo y se dividió en dos, y las meninges se disecaron nítidamente del cerebro. Se usó un gramo de tejido (peso húmedo) de cada órgano para determinar la absorción de hierro.

10 Los ratones con deficiencia de ferritina H se evaluaron como modelo experimental para determinar si el manejo del hierro potencialmente comprometido en un órgano podría influir en el suministro de hierro a la ferritina. Se usó un planteamiento similar para investigar la absorción de ferritina en ratones testigo y en ratones deficientes en ferritina, como se describió anteriormente para las ratas, excepto que los ratones fueron inyectados por vía intraperitoneal. La actividad específica para la ferritina rH fue de 0,06 μ Ci/g y para la ferritina del bazo fue de 0,31 μ Ci/g. Se inyectó

15 ferritina y se dejó circular en el torrente circulatorio durante 48 horas hasta que se sacrificaron los ratones y se extrajeron los órganos.

La cantidad de radioactividad de cada órgano se determinó en un sistema well-counter analizador de canal único basado en yoduro sódico (NaI) (Canberra Industries Inc.) durante un minuto. Los recuentos gamma/min (cpm) se restaron de los recuentos de base, se dividieron por la eficacia del contador, y luego se dividieron por los recuentos de desintegraciones/min para calcular μ Ci. Para calcular el porcentaje total, el μ Ci del órgano se dividió entre el μ Ci total inyectado y luego se multiplicó por el 100%.

20

Resultados.

La absorción *in vivo* de hierro unido a la ferritina se examinó mediante la inyección de ferritina rH o de ferritina de bazo que contenía ^{59}Fe radiomarcado, en la vena de la cola de ratas adultas. La absorción de hierro por la ferritina rH fue significativamente mayor que la absorción de hierro de la ferritina del bazo en el cerebro, corazón, riñón, músculo y pulmón (FIG. 1A). La cantidad de ^{59}Fe fue dos veces mayor en el cerebro cuando se presentó unido a la ferritina rH en comparación con la ferritina del bazo ($p < 0,005$) (FIG 1B). Solo el hígado tuvo una absorción de hierro significativamente mayor de la ferritina del bazo en comparación con la ferritina rH ($p < 0,05$).

25

Para determinar la influencia de las posibles alteraciones de la capacidad de almacenamiento de hierro en varios órganos sobre el suministro de hierro de ferritina rH y de bazo a varios órganos, los autores de la presente invención investigaron la absorción de ^{59}Fe de estas proteínas en una línea de ratones que es deficiente en ferritina H (Thompson K. J., Fried M. G., Zheng Y., Boyer P., Connor J. R. *J Cell Sci.* 115: 2165 - 2177, 2002). El suministro de hierro por ferritina rH disminuyó en el bazo, el pulmón y el músculo ($p < 0,05$) en los ratones comprometidos con ferritina H en comparación con los testigos de la camada (FIG 2A). Se observó un hallazgo similar en el cerebro (FIG. 2B). La absorción de ferritina de bazo no se alteró en ningún órgano en los ratones comprometidos de almacenamiento de hierro (FIGs 3A y 3B).

30

35

Aunque la ferritina sérica podría tener acceso no restringido a órganos sistémicos, para suministrar hierro al cerebro debe cruzar una barrera de células endoteliales (la BBB). Para investigar si se produce la transcitosis de ferritina, los autores utilizaron un modelo de cultivo celular de la BBB. La ferritina H, pero no la ferritina de bazo, se transportó a través de la monocapa de células BREC en cantidades significativas (FIG. 4A). La tasa de ferritina H marcada con FITC que fue transportada a través de la monocapa de BREC fue cinco veces mayor que el dextrano marcado con RITC ($p < 0,001$). La velocidad de transporte de la ferritina de bazo fue similar al nivel observado en el control con dextrano. Para determinar el mecanismo por el que la ferritina H es transcitada, se realizaron los ensayos de transporte en un medio libre de potasio para bloquear la formación de vesículas recubiertas de clatrina. La ausencia de formación de revestimiento de clatrina se asoció con una disminución del 80% ($p < 0,001$) en la tasa de transporte de ferritina H. Por el contrario, el pretratamiento con filipina de los BREC, para bloquear la pinocitosis, no tuvo el resultado de una disminución significativa de la velocidad. Se incluyó un control de dextrano en cada condición experimental y la tasa no cambió de la que se muestra en la gráfica para la condición no tratada (datos no mostrados). El transporte de transferrina se incluyó como control positivo y se detectó como se informó anteriormente (Burdo J. R., Antonetti D. A., Wolpert E. B., Connor J. R. *Neuroscience* 121: 883 - 890, 2003). Las actividades específicas de la transferrina y la ferritina marcadas fluorescentemente fueron diferentes, por lo que no se pueden sacar conclusiones acerca de las tasas relativas de transporte para estas dos proteínas.

40

45

50

Para evaluar con más detalle el mecanismo de suministro de hierro al cerebro a través de ferritina, se realizaron estudios de unión para determinar si el transporte de ferritina en el modelo BREC estaba mediado por receptor. Además, para extender la evaluación de la unión de ferritina a un sistema *in vivo*, se aisló la microvasculatura del cerebro de rata (RBMV). La unión de ferritina a BREC y RBMV se realizó utilizando un experimento de saturación, así como un experimento de competición. Los valores de Kd y Bmax se obtuvieron usando regresión no lineal en GRAPHPAD PRISM™ 4.0 (GraphPad Software, Inc.).

55

Diversas concentraciones (1, 2, 3, 5, 7 y 10 nM) de ferritina marcada con ^{125}I (ferritina rH o ferritina de bazo) se incubaron con 100 mg de tejido (BREC o RBMV). La unión total y la no específica (en presencia de 1000 nM de ferritina no marcada) se obtuvo realizando el ensayo en filtros Whatman. Para obtener Kd y Bmax a partir de dicho ensayo de unión, se realizó una regresión global no lineal para la unión a un sitio. En este método, tanto la unión total como la no específica se representaron frente a la concentración de ferritina marcada. Los gráficos resultantes se ajustaron a las ecuaciones: No específico = $\text{NS} \cdot X$ y Total = Específico + No específico, donde, Específico = $B_{\text{max}} \cdot X / (K_d + X)$. En el planteamiento global, la unión específica no se deriva de los datos de unión total y no específica. En cambio, los valores de Kd y Bmax se obtienen compartiendo la constante de unión no específica (NS) entre los dos conjuntos de datos (total y no específica). Los datos de este análisis de regresión se muestran en las Figs. 5A y 5B. Solo la ferritina rH tiene una unión saturable significativa con los BREC o los RBMV. La Kd y Bmax para los RBMV son $7,9 \pm 1,6$ nM y $572,6 \pm 64,0$ fmol/mg de proteína, respectivamente. Para las BREC, la Kd es de $2,7 \pm 0,9$ nM y la Bmax es de $465,7 \pm 63,1$ fmol/mg de proteína. El valor R2 para el ajuste de la curva es $> 0,8$ tanto para BRECs como para RBMVs.

Se incubaron diversas concentraciones de ferritina no marcada (0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10; 30; 100; 300 y 1000 nM) con 100 μg de BRECs o tejido de RBMV junto con 0,4 nM de ferritina radiomarcada. La unión total se obtuvo realizando el ensayo en filtros Whatman. Se representó a continuación la unión total (fmol/mg de proteína) frente a log [concentración (nM)]. Estas representaciones se ajustaron a la ecuación de competición de un sitio: Total = Inferior + (Superior - Inferior) / (1 + 10 (X - logEC₅₀)). Estos datos se muestran en las FIGs. 6A y 6B e indican que la ferritina rH, pero no la ferritina del bazo, puede competir efectivamente por los sitios de unión. La determinación de Kd y Bmax a partir de las curvas de competencia para la BREC tuvo por resultado una Kd de 2,0 nM y Bmax de 235,1 fmol/mg de proteína. Los valores correspondientes para RBMVs son Kd = 3,4 nM y Bmax = 304,6 fmol/mg de proteína. El valor de R2 para el ajuste es $> 0,95$ tanto para BRECs como para RBMVs. Los dos métodos utilizados para calcular los datos no difirieron significativamente.

Se ha identificado un receptor específico para ferritina H, Tim-2, que se ha encontrado en el cerebro, el hígado, el riñón y las células inmunes (Todorich, et al., *J. Neurochem* 107: 1495 - 1505, 2008; Chen, et al., *J. Exp. Med.* 202: 955 - 965, 2005; Chakravarti et al., *J. Exp. Med.* 202: 437- 444, 2005). Para determinar si este receptor también está presente en el intestino, se utilizó un anticuerpo específico para el receptor de ferritina H para localizar el receptor de ferritina H en el intestino de la rata. El duodeno de rata hembra adulta fue congelado y se prepararon secciones de 10 μm de espesor para inmunocitoquímica. Las secciones se incubaron con anticuerpo primario (anti-Tim-2 de conejo) durante la noche a 4 °C. Las secciones se lavaron, y se incubaron con anticuerpo secundario IgG marcado con FITC a temperatura ambiente durante una hora. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI. Las secciones se examinaron con un microscopio de fluorescencia. La FIG. 15 es una fotoimagen que muestra los núcleos celulares (a), receptores de ferritina H (b) y doble tinción en el duodeno de rata (c). Los receptores de ferritina H están presentes en las vellosidades intestinales, que participan en la absorción mediada por receptor, demostrando que la ferritina H puede absorberse intacta del intestino.

Discusión.

Los resultados de estos estudios revelan que la ferritina puede suministrar hierro a múltiples órganos, incluyendo el intestino y el cerebro. Además, la cantidad de hierro administrado por la ferritina mejora cuando el hierro se administra a través de ferritina H en vez de ferritina L para la mayoría de los órganos, excepto el hígado. La cantidad de hierro de ferritina H absorbida por las células se puede alterar cuando se compromete la capacidad de almacenamiento de hierro, como se demuestra en ratones deficientes en ferritina H, mientras que el suministro de hierro por ferritina L no se ve afectado significativamente en este modelo. Estos resultados sugieren un sistema de retroalimentación para ferritina H. Por lo tanto, se ha identificado un nuevo sistema de transporte para el suministro de hierro al cerebro y uno que podría ser altamente significativo dada la cantidad de hierro (hasta 4500 átomos de Fe) que puede alojarse en una sola molécula de ferritina en comparación con la transferrina (un máximo de dos átomos de Fe). La identificación de un sistema de suministro de hierro al cerebro no dependiente de la transferrina es consistente con los informes previos de los autores de la presente invención que muestran el suministro de hierro al cerebro en ausencia de transferrina sérica (Malecki, et al., *J Neurosci Res.* 56: 113 - 122, 1999).

En el cerebro, además de unirse a un receptor, la ferritina debe experimentar transcitosis a través de la BBB. Los autores de la presente invención demostraron que la ferritina se puede transportar a través de un modelo de cultivo celular de la BBB. El transporte de ferritina en este modelo de cultivo celular es dependiente de la clatrina y mediada por receptor y favorece intensamente a la ferritina H. La preferencia por la unión a ferritina H es consistente con los datos de transporte. La unión de la ferritina también se demostró en la microvasculatura del cerebro de rata y esta unión, similar al modelo de cultivo celular, también favoreció fuertemente a la subunidad H. Los datos de unión y transporte son consistentes con los datos de absorción de hierro que revelaron un aumento en el suministro al cerebro si el hierro estaba asociado con ferritina H, en relación con la ferritina del bazo (rica en L).

La fuente de ferritina que une los receptores en la BBB y otros órganos es presumiblemente suero. La presencia de ferritina en el suero está bien establecida, pero tradicionalmente la ferritina sérica se considera predominantemente ferritina L. La fuente de esta ferritina sérica rica en L es principalmente de macrófagos lisados (McGowan S. E., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 111: 611 - 617, 1988). Sin embargo, sorprendentemente los autores han demostrado que la

unión de la ferritina a los receptores, el transporte de la ferritina y el suministro de hierro al cerebro favorecen intensamente a la ferritina rica en H.

Ejemplo 2.

Administración dietética de ferritina H.

5 Los autores de la presente invención han ideado un mecanismo para administrar ferritina rH como un suplemento dietético utilizando levadura recombinante en la que el gen de la ferritina H se integra en el genoma de la levadura. Inicialmente, la levadura se transformó para expresar el gen de la ferritina H humana, que puede traducirse en la proteína ferritina H. La inmunotransferencia que se muestra en la FIG. 7 indica que la proteína ferritina rH es producida por la levadura y que el anticuerpo ferritina H no presenta reacción cruzada con la ferritina L. Se realizó un estudio acerca de los efectos de la concentración de hierro en el medio de cultivo sobre el contenido de hierro de la ferritina rH en la levadura transformada. Las levaduras se cultivaron en medio YEPD que contenía cantidades estándar de hierro y en medio suplementado con hierro (YEPD más FeSO_4 6 mM). Los resultados se muestran en la FIG. 8. La levadura recombinante para la muestra en el carril 3 de la FIG. 8 se cultivó en un medio rico en hierro, mientras que la levadura para la muestra en el carril 4 se cultivó en condiciones estándar de hierro. La ferritina de la levadura cultivada en un medio rico en hierro parece contener 2-3 veces más hierro que la levadura cultivada en medio estándar.

Métodos.

Construcción de la levadura recombinante.

20 Se generó mediante PCR una casete de expresión de ferritina H para *S. cerevisiae*, que se muestra en la FIG. 16, que expresa ferritina H humana bajo el control del promotor transcripcional *TDH3* constitutivo de la levadura a partir del plásmido RLK/pL5659, que se derivó de pAG426GPD-ccdB (AddGene, Cambridge, MA), insertando la secuencia de codificación de la ferritina H y el gen *URA3*. El producto de la PCR fue transformado en la cepa de levadura BY4741 y se dejó integrar en el cromosoma de la levadura usando métodos estándar, por ejemplo como se describe en Hinnen et al., *PNAS USA* 75: 1929 - 1933, 1978. Los transformantes de levadura que contienen la casete de expresión fueron recuperados mediante un marcador seleccionable, y se prepararon lisados de levadura transformada en Tris-HCl 50 mM (pH 7,4), NaCl 150 mM usando perlas de vidrio. Veinticinco μg de proteína total, determinada por el ensayo de proteína DC (Bio-Rad), se fraccionaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a un filtro de nitrocelulosa. La transferencia se sondó con anticuerpo policlonal ferritina H diluido 1: 2000 (Covance PA 1192). El anticuerpo secundario fue IgG anti-conejo diluida 1: 5000 (GE Amersham) y la señal se detectó usando Western Lightning-ECL (Perkin Elmer). Los resultados, mostrados en la FIG. 17, indican que la cantidad de expresión de ferritina H recombinante depende del sitio de integración cromosómica. La cepa recombinante RLK3190, que contiene una casete de expresión de ferritina H integrada cromosómicamente, expresó inesperadamente niveles de ferritina H humana drásticamente más altos en comparación con otros sitios cromosómicos de integración. Este nivel coincide o excede la cantidad de ferritina H producida por la cepa RLK3177, que contiene un plásmido extracromosómico que lleva múltiples copias de la casete de expresión de ferritina H. En RLK3190, la casete de expresión integrada en la ubicación cromosómica de *TDH3* mediante recombinación homóloga se basa en la homología entre el promotor *TDH3* en la casete de expresión y el gen cromosómico. Esta casete y otras pueden diseñarse fácilmente para su inserción en este sitio usando técnicas estándar en este campo.

40 La casete de expresión en la cepa RLK3190 produce constitutivamente ferritina H humana a niveles elevados cuando se integra en el locus *TDH3* en el cromosoma de levadura. Cuando los transformantes de levadura se cultivan en un medio rico en hierro (por ejemplo, FeSO_4 6 mM), alcanzan un contenido de hierro celular de al menos 50.000 ppm de peso de células secas, una concentración suficientemente alta para la eficacia terapéutica.

Estudios de alimentación.

45 Utilizando un modelo animal preclínico de deficiencia de hierro estándar, los presentes autores han demostrado que la levadura suplementada con hierro que expresa ferritina es superior al planteamiento estándar de administración de sulfato ferroso para tratar la deficiencia de hierro.

50 Se realizaron ensayos de alimentación en ratas usando un modelo de rata bien establecido. El estudio fue diseñado para comparar directamente la eficacia de la levadura enriquecida en ferritina con el estándar para la reposición de hierro: sulfato ferroso. Ratas de 20 días de edad fueron alojadas 1 por jaula y alimentadas con una dieta deficiente en hierro (ID, 3 ppm de hierro). Todas las ratas recibieron alimentos y agua destilada desionizada *ad libitum* en una sala a temperatura (23 ± 2 °C) y humedad (40%) controladas, mantenida en un ciclo de luz/oscuridad de 12 h:12 h (las luces se encienden desde las 6:00 de la mañana hasta las 6:00 de la tarde). La dieta ID se preparó siguiendo la receta de la dieta del American Institute of Nutrition (Instituto Americano de Nutrición (AIN) - 93G, con almidón de maíz como única fuente de hidratos de carbono. Los niveles de hierro de la dieta se verificaron usando espectrofotometría de absorción atómica después de la digestión húmeda con ácido nítrico.

55

Se recogió un total de 50 µl de sangre de cada rata cada 3-4 días después de comenzar la dieta de ID para controlar los niveles de hematocrito y hemoglobina. Después de 23 días de alimentación con una dieta deficiente en hierro (día 43 postnatal), los niveles medios de hemoglobina y hematocrito fueron $5,47 \pm 0,24$ y $21,67 \pm 0,3\%$, respectivamente. Las ratas se dividieron aleatoriamente en 3 grupos (n = 4/grupo).

5 Cada dieta fue preparada con la dieta ID (3 ppm de hierro) como dieta base. La levadura suplementada con hierro (que no expresa ferritina) o el sulfato de hierro se agregaron a la dieta ID a 50 ppm para hacer las dietas de control o testigo. Las ratas fueron alimentadas con las dietas asignadas *ad libitum*, y los niveles de hemoglobina y hematocrito se midieron nuevamente cada 3-4 días hasta el día 61 postnatal (un total de 17 días). La ingesta de alimentos se midió durante todo el período de alimentación y no fue diferente entre los grupos. Las ratas se sacrificaron a P61 y se determinaron las medidas de hematología y del cerebro.

10 Los resultados se muestran en la FIG. 9. Los animales que continuaron en la dieta ID tenían los niveles más bajos de hemoglobina (Hb). Los animales que recibieron la levadura sin hierro tenían niveles de Hb similares a los animales ID. Se observaron mejoras en los niveles de Hb en los otros tres grupos, teniendo lugar el aumento más rápido de la mejora en los animales que recibieron la levadura que se suplementó con hierro y se fortificó con ferritina. Incluso los animales que recibieron levadura suplementada con hierro sin ferritina mostraron una mejora mayor en los niveles de Hb que el grupo de FeSO_4 .

15 Los niveles de hematocrito se controlaron también en el mismo grupo de animales. Estos datos se muestran en la FIG. 10. Estos datos indican que la levadura como vehículo para el hierro es igualmente eficaz para corregir el hematocrito en presencia o en ausencia de ferritina H y que ambos son significativamente mejores que la opción del tratamiento actual estándar, FeSO_4 . Los animales que continuaron en la dieta ID y los animales que recibieron levadura que no había sido suplementada con hierro no mostraron aumento en el hematocrito durante los 17 días examinados.

20 Un análisis importante que muestra la capacidad del cuerpo para movilizar el hierro, indirectamente una medida de la biodisponibilidad de hierro, es el análisis de los niveles de saturación de transferrina. La transferrina es la principal proteína de movilización de hierro y se encuentra en el suero en altas concentraciones. La saturación de transferrina fluctúa desde una altura normal del 30% a menos del 10% en condiciones de anemia. El análisis de la saturación de transferrina en el modelo animal que usaron los autores para evaluar la eficacia de la levadura suplementada con hierro fortificada con ferritina, se muestra en la FIG. 11. Estos datos indican que la levadura suplementada con hierro fortificada con ferritina tuvo por resultado el mayor incremento en la saturación de transferrina (Tf), seguido de la levadura suplementada con hierro sin ferritina. Este estudio demuestra una vez más la superioridad de la levadura que expresa ferritina como vehículo de suministro de hierro en comparación con el FeSO_4 en la dieta. Los animales mantenidos con la dieta ID o alimentados con la levadura de control (no enriquecida con hierro o ferritina) tenían las saturaciones de Tf más bajas. Estos estudios demuestran que las levaduras suplementadas con hierro y fortificadas con ferritina son hasta tres veces más efectivas que el FeSO_4 dietético para mejorar los niveles de hemoglobina, el hematocrito y la biodisponibilidad de hierro, y proporcionan un método superior para tratar los trastornos por deficiencia de hierro. Además, los animales deficientes en hierro se aproximaron a los niveles normales de hemoglobina (40-50%) y hematocrito (13,5-15,5) de forma tan temprana como 14 días después del tratamiento con levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina.

25 La sorprendente superioridad de la levadura suplementada con hierro fortificada con ferritina en el tratamiento de la deficiencia de hierro es incluso más chocante cuando se miden los efectos sobre la hemoglobina, el hematocrito y la saturación de transferrina con referencia a la cantidad de hierro consumido. Como se muestra en la FIG. 18, sobre la base del hierro consumido la levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina fue 2-3 veces más efectiva que el FeSO_4 , la norma asistencial actual, para mejorar la hemoglobina, el hematocrito y la saturación de transferrina. Estos resultados demuestran que se requiere menos consumo de hierro para restablecer los niveles de hemoglobina y hematocrito normales cuando se aumenta la biodisponibilidad del hierro usando ferritina H para liberar el hierro.

30 Efectos sobre el hierro cerebral.

35 Debido a que la deficiencia de hierro tiene un impacto significativo sobre el desarrollo cerebral, se controló el estatus del hierro de las regiones del cerebro específicas en los animales que recibieron las diferentes dietas. En la FIG. 12 se muestra el estatus del hierro de dos áreas del cerebro importantes desde el punto de vista del desarrollo, el mesencéfalo ventral y el caudado. Estas áreas están destinadas a hacerse relativamente enriquecidas en hierro a medida que madura el animal (por ejemplo, el ser humano). Estas regiones del cerebro están involucradas en la regulación de la actividad motriz; de ahí el deterioro de las habilidades motrices en la deficiencia de hierro, especialmente cuando la deficiencia ocurre durante el desarrollo. Los mismos animales descritos en los análisis de Hb y Hct se sacrificaron a los 14 días de edad y se midió la concentración de hierro del mesencéfalo ventral (VBM) y el caudado. Los animales que recibieron la levadura que había sido fortificada con ferritina H y suplementada con hierro tuvieron más en ambas regiones del cerebro que cualquier otro grupo. Este hallazgo interesante indica que el suplemento dietético fortificado con ferritina puede ser un mecanismo para limitar los déficits neurológicos asociados con la deficiencia de hierro. Esta observación podría tener un tremendo impacto en la lucha contra la deficiencia global de hierro no solo aumentando la salud general, sino optimizando la función neurológica.

- Para evaluar más detalladamente los cambios regionales en el estatus del hierro cerebral, se examinaron otras dos áreas del cerebro, el núcleo accumbens (NA) y la corteza prefrontal (PFC). Estos resultados se muestran en la FIG. 13. En esta figura, es evidente la especificidad regional del hierro liberado desde la levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina. En el NA, similar al VMB y al caudado mostrados en la FIG. 12, el contenido de hierro es elevado en comparación con los otros modos de suministro de hierro. En la PFC, sin embargo, el hierro liberado a partir de la levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina es similar al encontrado para los otros grupos. Estos datos sugieren que hay un mecanismo que regula de manera diferencial la administración de hierro de la levadura suplementada con hierro enriquecida con ferritina y es consistente con el descubrimiento por los autores de la presente invención, de receptores para la ferritina H en la microvasculatura del cerebro.
- 5
- 10 El aumento de la absorción de hierro en el cerebro y, quizás más importante aún, la especificidad regional de la absorción, son hallazgos inesperados pero altamente significativos asociados con la presente invención. Estos datos sugieren que el uso de levadura suplementada con hierro y enriquecida en ferritina debería mejorar los déficits neurológicos, cognitivos y conductuales asociados con la deficiencia de hierro durante el desarrollo postnatal. Los datos acerca de los parámetros hematológicos son inequívocamente convincentes e indican que la levadura
- 15 suplementada con hierro enriquecida con ferritina es un modo superior de suplementación de hierro en la dieta.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Chyna LLC

<120> LEVADURA RECOMBINANTE

5 <130> P16044S-PCT

<150> US 13/114,429

10 <151> 34-05-2011

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

15 <210> 1

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20 <400> 1

Met Thr Thr Ala Ser Thr Ser Gln Val Arg Gln Asn Tyr His Gln Asp
 1 5 10 15

Ser Glu Ala Ala Ile Asn Arg Gln Ile Asn Leu Glu Leu Tyr Ala Ser
 20 25 30

Tyr Val Tyr Leu Ser Met Ser Tyr Tyr Phe Asp Arg Asp Asp Val Ala
 35 40 45

Leu Lys Asn Phe Ala Lys Tyr Phe Leu His Gln Ser His Glu Glu Arg
 50 55 60

Glu His Ala Glu Lys Leu Met Lys Leu Gln Asn Gln Arg Gly Gly Arg
 65 70 75 80

Ile Phe Leu Gln Asp Ile Lys Lys Pro Asp Cys Asp Asp Trp Glu Ser
 85 90 95

Gly Leu Asn Ala Met Glu Cys Ala Leu His Leu Glu Lys Asn Val Asn
 100 105 110

Gln Ser Leu Leu Glu Leu His Lys Leu Ala Thr Asp Lys Asn Asp Pro
 115 120 125

His Leu Cys Asp Phe Ile Glu Thr His Tyr Leu Asn Glu Gln Val Lys
 130 135 140

Ala Ile Lys Glu Leu Gly Asp His Val Thr Asn Leu Arg Lys Met Gly
 145 150 155 160

Ala Pro Glu Ser Gly Leu Ala Glu Tyr Leu Phe Asp Lys His Thr Leu
 165 170 175

Gly Asp Ser Asp Asn Glu Ser
 180

ES 2 659 185 T3

<210> 2
<211> 591
<212> DNA
<213> Homo sapiens

5

<400> 2
atggctgata tcggatccat acatatgacg accgcgtcca cctcgcaggt gcgccagaac 60
taccaccagg actcagaggc cgccatcaac cgccagatca acctggagct ctacgcctcc 120
tacgtttacc tgtccatgtc ttactacttt gaccgcgatg atgtggcttt gaagaacttt 180
gccaaatact ttcttcacca atctcatgag gagagggaac atgctgagaa actgatgaag 240
ctgcagaacc aacgaggtgg ccgaatcttc cttcaggata tcaagaaacc agactgtgat 300
gactgggaga gcgggctgaa tgcaatggag tgtgcattac atttggaaaa aaatgtgaat 360
cagtcactac tggaaactgca caaactggcc actgacaaaa atgaccccca tttgtgtgac 420
ttcattgaga cacattacct gaatgagcag gtgaaagcca tcaaagaatt gggtgaccac 480
gtgaccaact tgcgcaagat gggagcgcgc gaatctggct tggcgggaata tctctttgac 540
aagcacaccc tgggagacag tgataatgaa agctaacctt ggcacctcga g 591

10

REIVINDICACIONES

- 5 1- Una levadura recombinante que comprende una secuencia de ácidos nucleicos que codifica ferritina H de mamífero o un homólogo de la misma que tiene al menos un 80% de identidad con la ferritina H humana bajo el control del promotor transcripcional TDH3 constitutivo de la levadura, en la que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica la ferritina H de mamífero, o un homólogo de la misma que tiene al menos un 80% de identidad con la ferritina H humana, se integra en el cromosoma de la levadura en el sitio TDH3.
- 2- Una levadura recombinante según la reivindicación 1, en la que la ferritina H de mamífero o un homólogo de la misma es la ferritina H humana o un homólogo de la misma.
- 10 3- Una composición que comprende una levadura recombinante según cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 4- Una composición según la reivindicación 3, en la que la composición es una composición farmacéutica, un alimento médico o un suplemento nutricional.
- 5- Una composición según la reivindicación 3 ó 4, que comprende uno o más compuestos activos adicionales.
- 15 6- Una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en la que la composición es para administración oral.
- 7- Una levadura recombinante según la reivindicación 1 ó 2, o una composición según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 6, para uso en terapia.
- 8- Una levadura recombinante o composición para uso en terapia según la reivindicación 7, en donde la terapia comprende el tratamiento de un trastorno del hierro.
- 20 9-. Una levadura recombinante o composición para uso en terapia según la reivindicación 8, en la que el trastorno del hierro se elige entre (i) un trastorno del hierro relacionado con una deficiencia de hierro en el cerebro, (ii) anemia ferropénica, (iii) un trastorno neurológico o un trastorno neurodegenerativo, (iv) enfermedad de Parkinson, enfermedad de Alzheimer, rendimiento cognitivo subóptimo asociado con anemia en mujeres, depresión, insomnio, esclerosis múltiple, síndrome de piernas inquietas, trastorno de déficit de atención o esclerosis lateral amiotrófica; (v)
- 25 déficits neurológicos, cognitivos, conductuales o motores asociados con la deficiencia de hierro durante el desarrollo postnatal; (vi) un trastorno de sobrecarga de hierro; (vii) talasemia o hemocromatosis; o (viii) déficits conductuales en niños, incluido ADHD.
- 10- Una levadura recombinante o composición para uso en terapia según la reivindicación 7, 8 ó 9, en la que se administra un complejo de ferritina H y hierro como una célula de levadura.

30

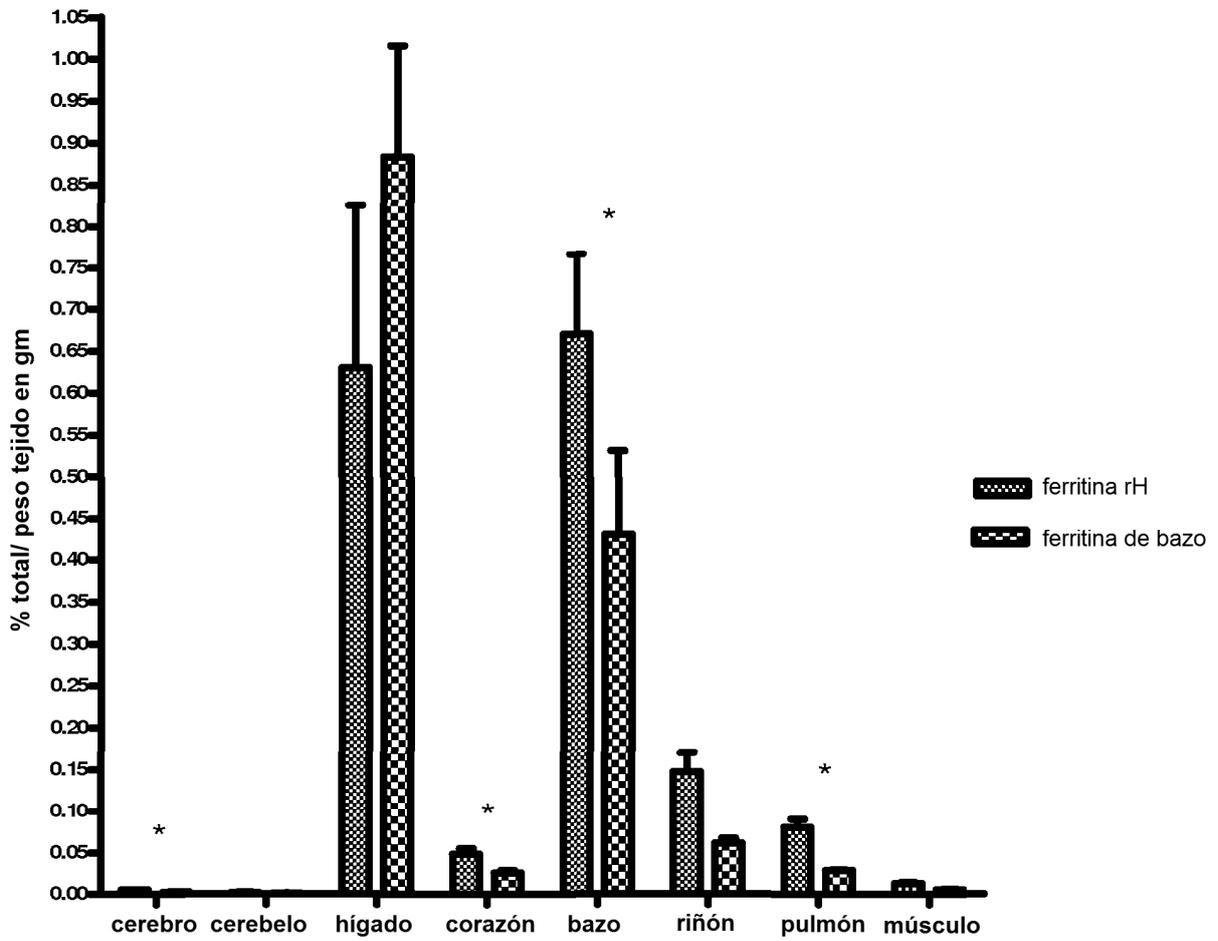


Fig 1A

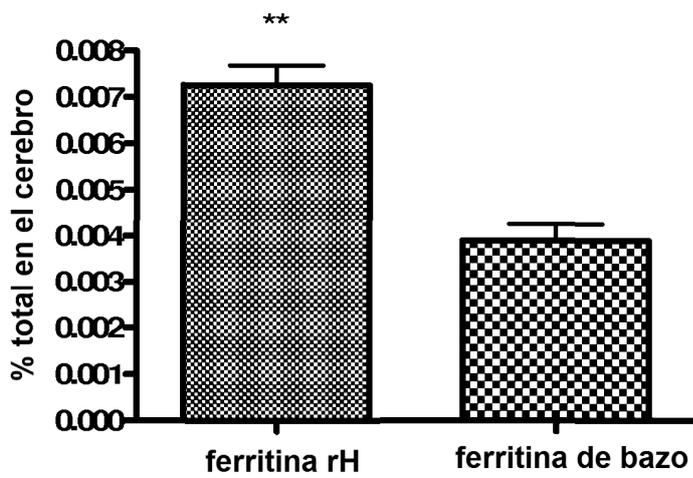


Fig 1B

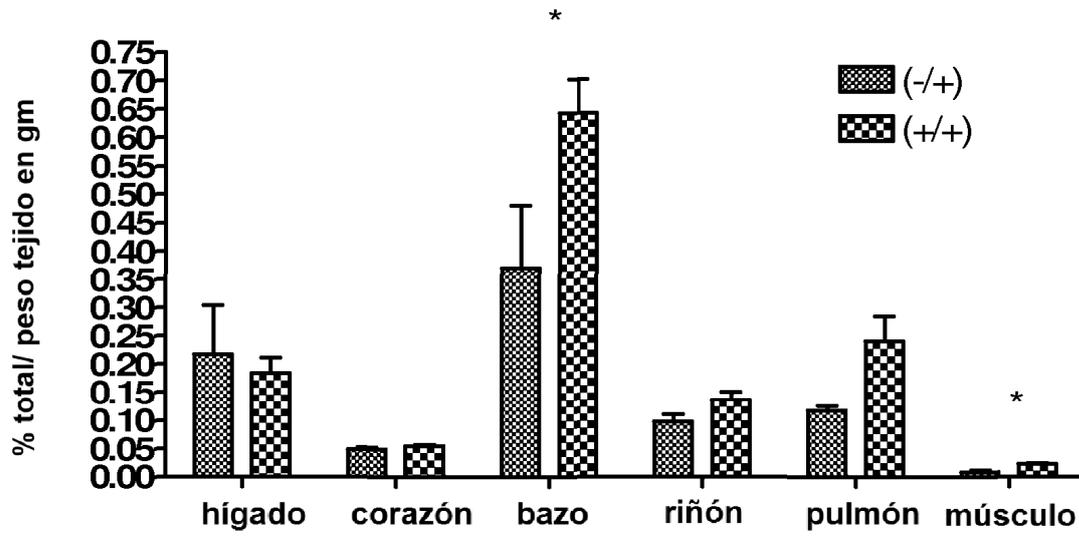


Fig 2A

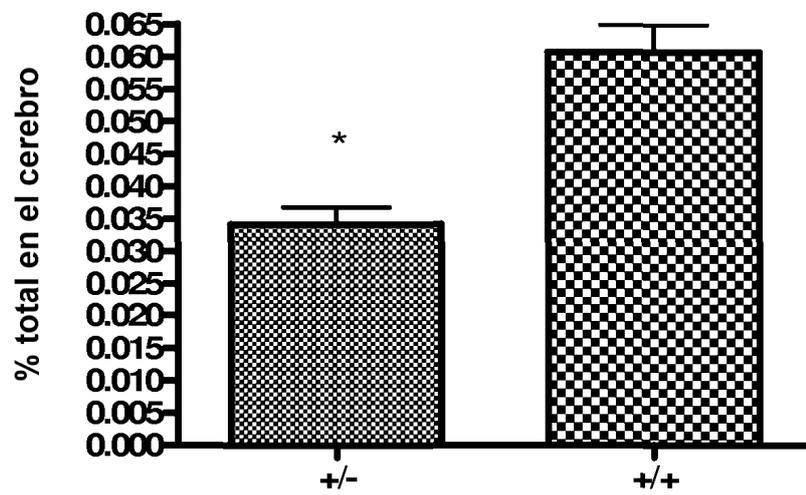


Fig 2B

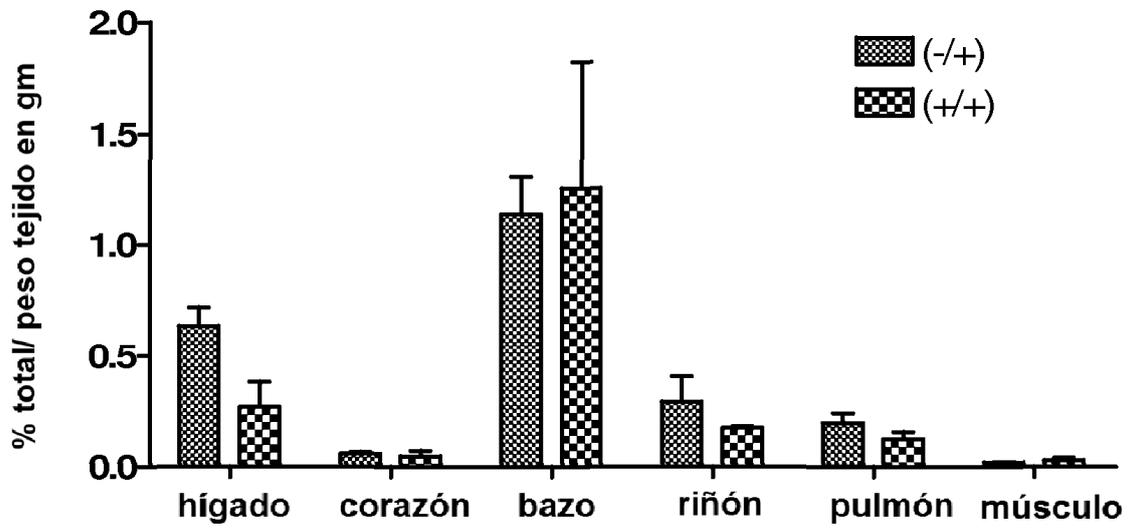


Fig 3A

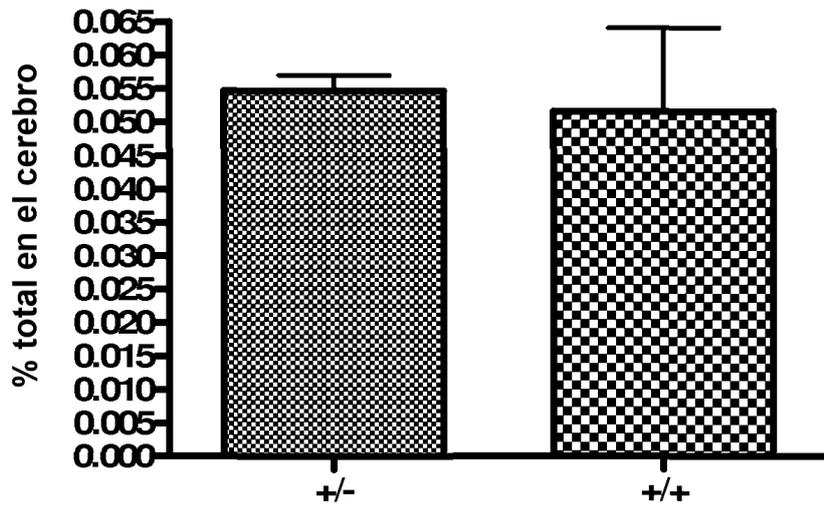


Fig 3B

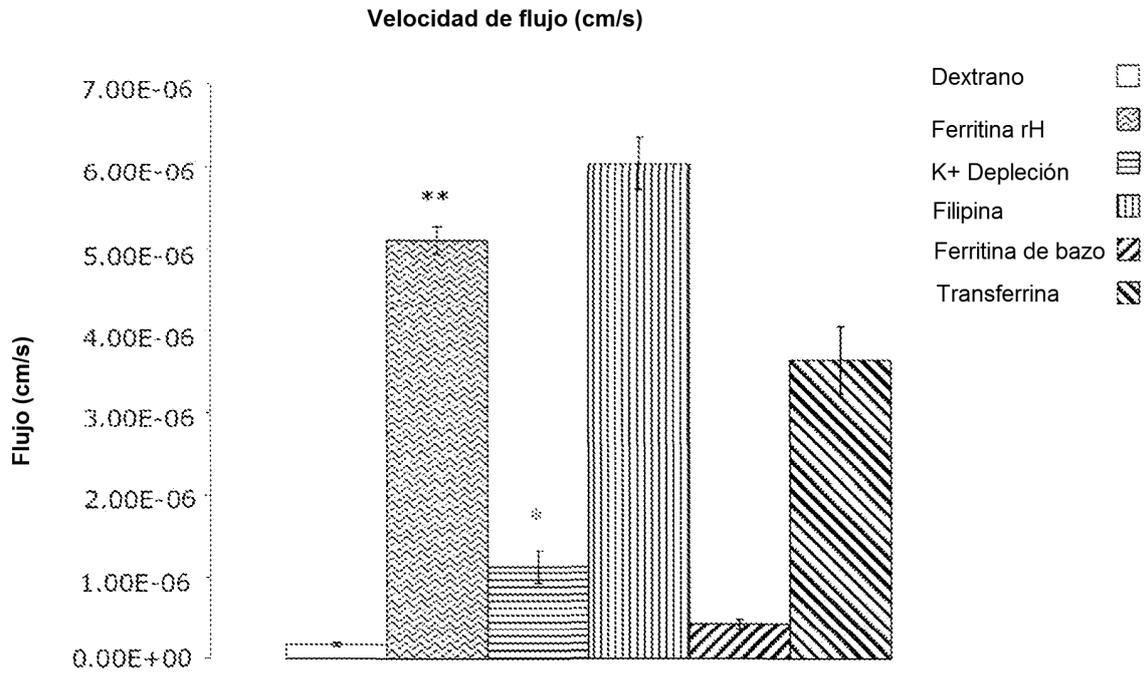


Fig 4A

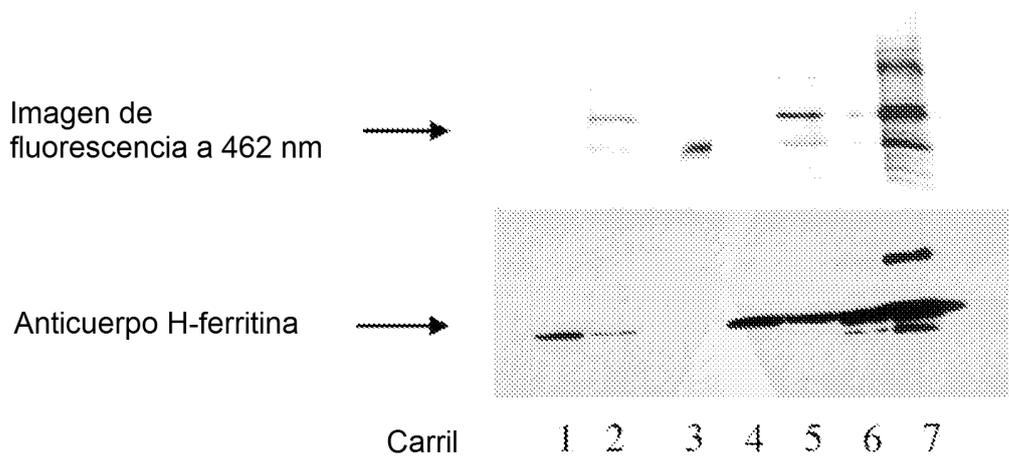


Fig 4B

CURVA DE SATURACIÓN DE UN SITIO (BREC)

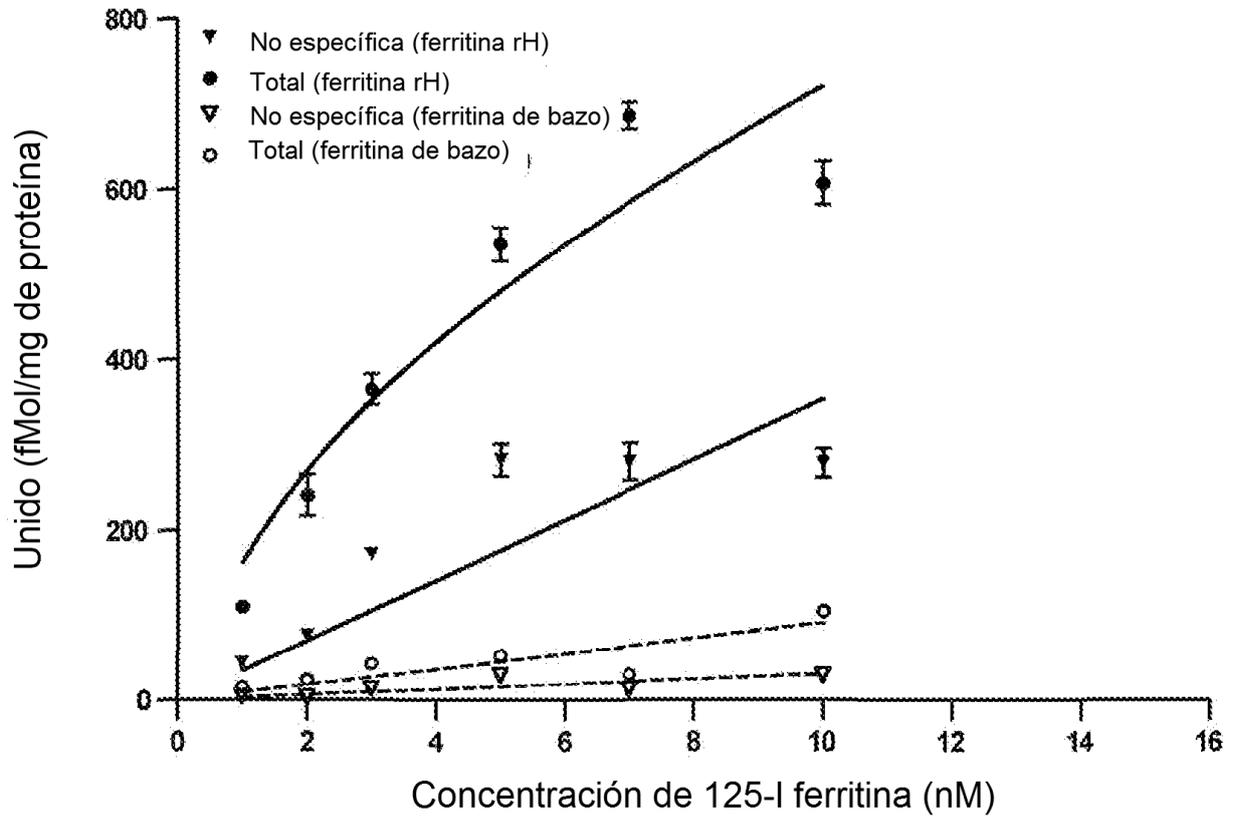


Fig 5A

CURVA DE SATURACIÓN DE UN SITIO (RBMV)

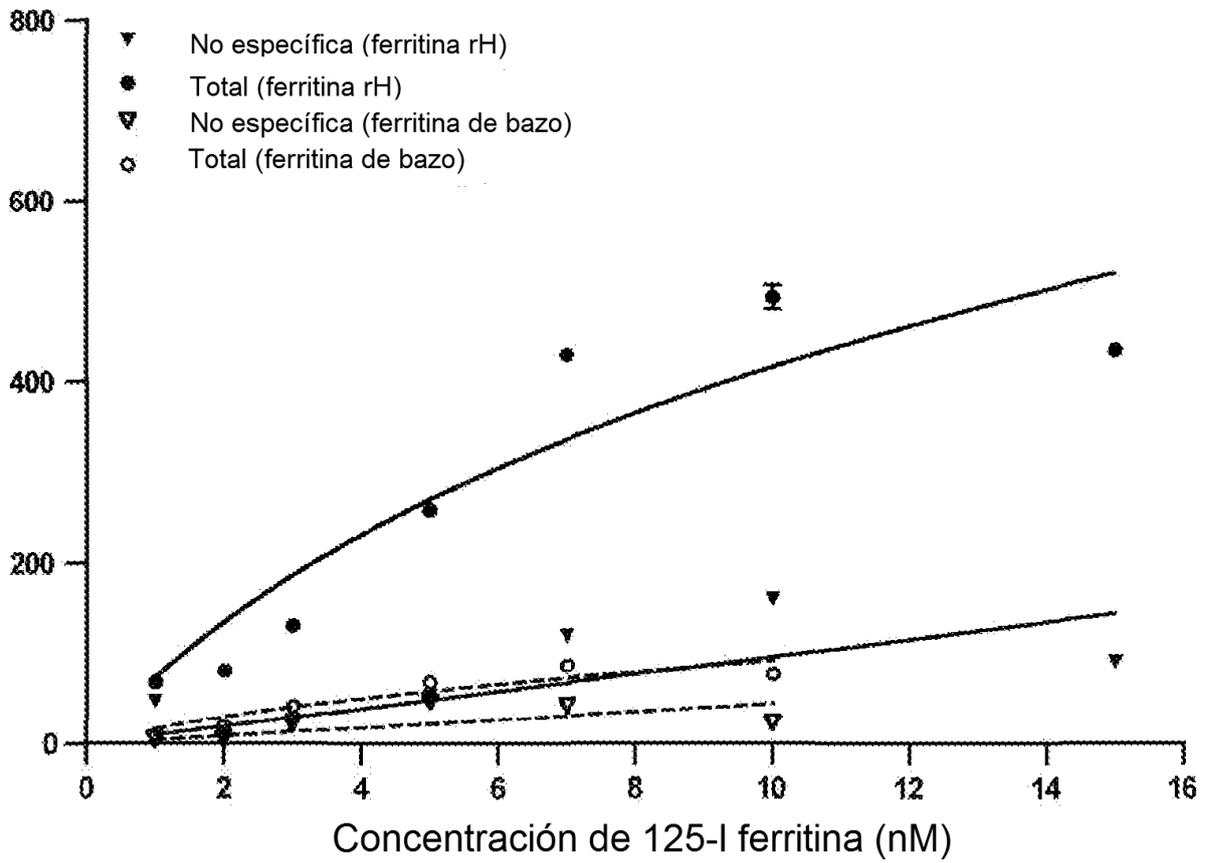


Fig 5B

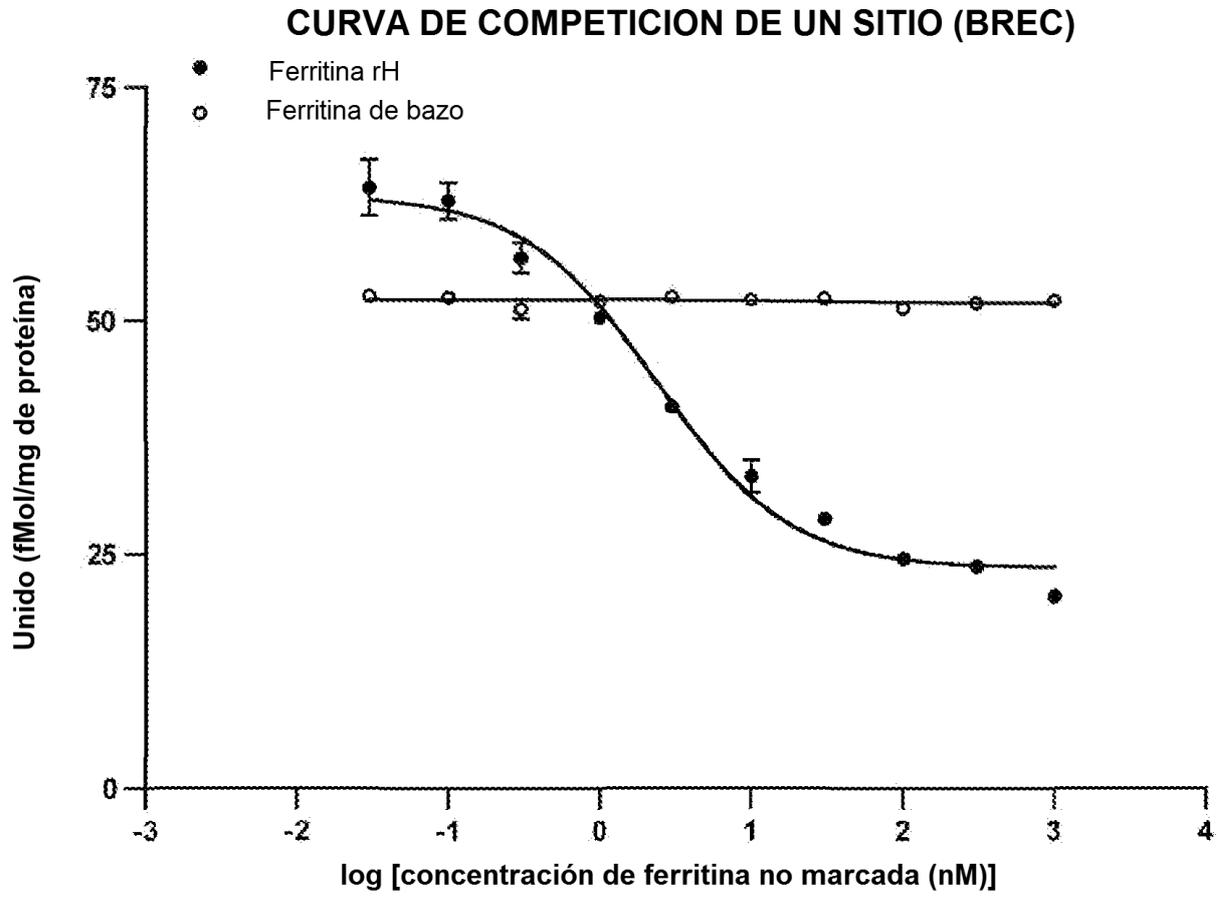


Fig 6A

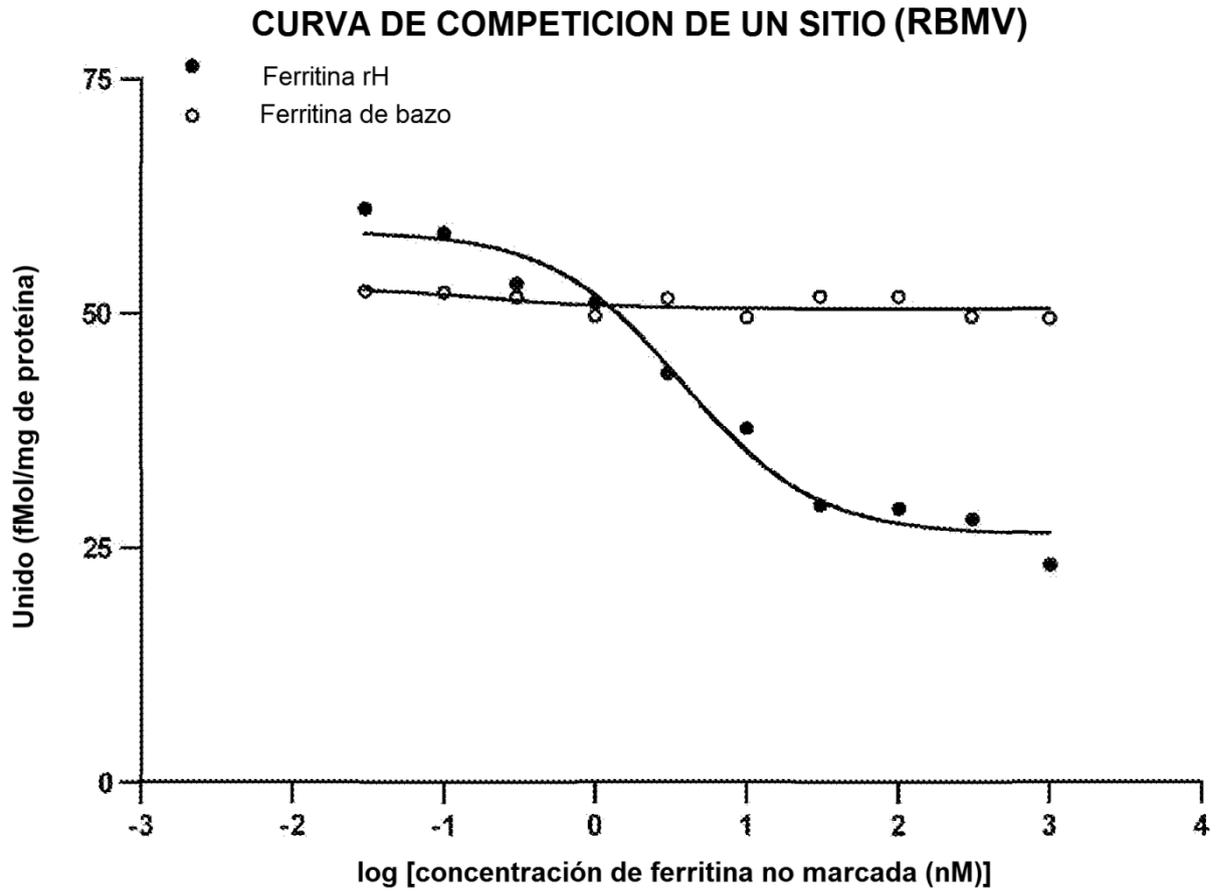


Fig 6B

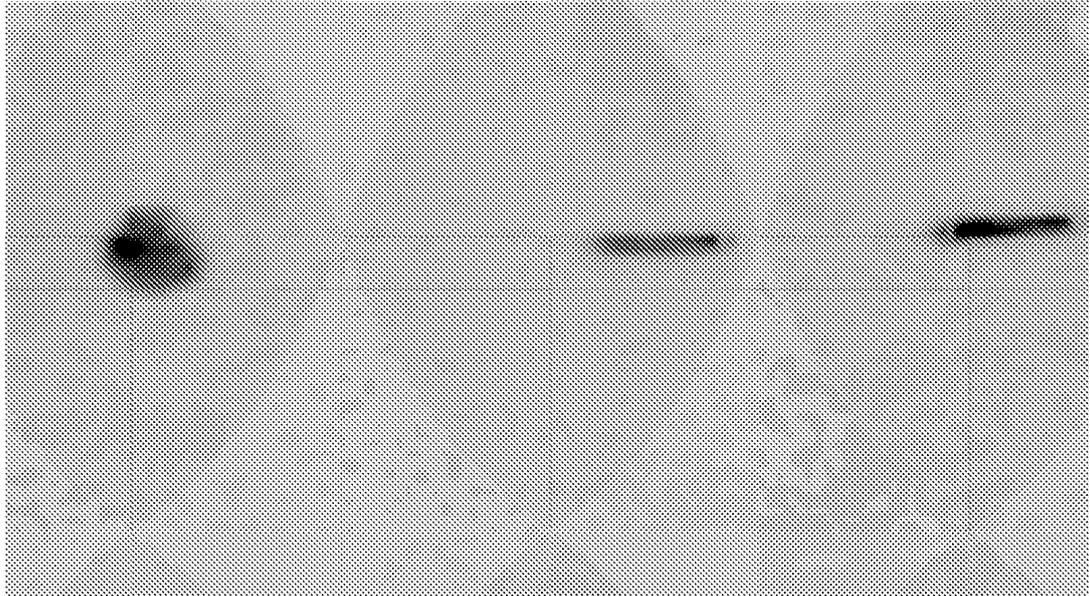


Fig 7

Carril 1 2 3 4 5 6

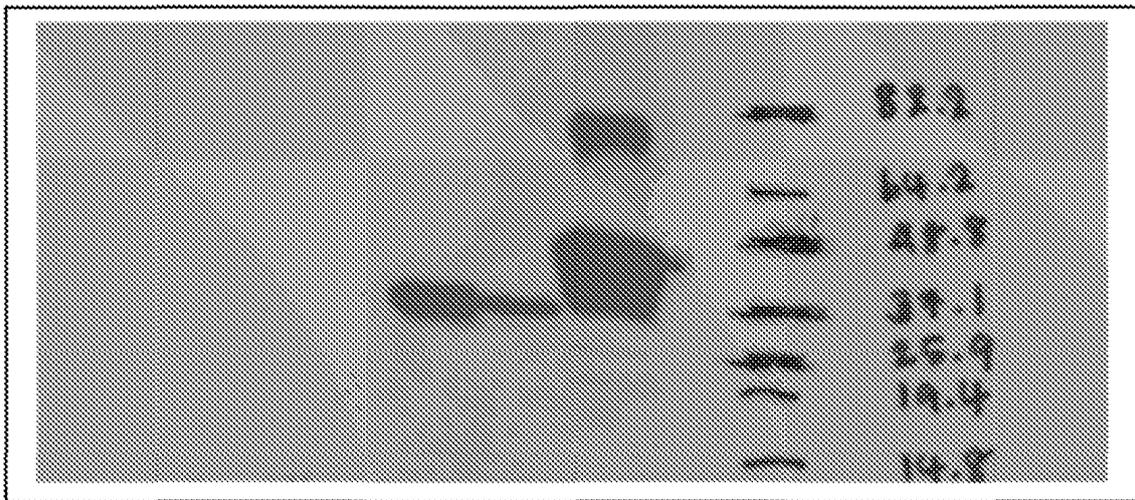


Fig 8

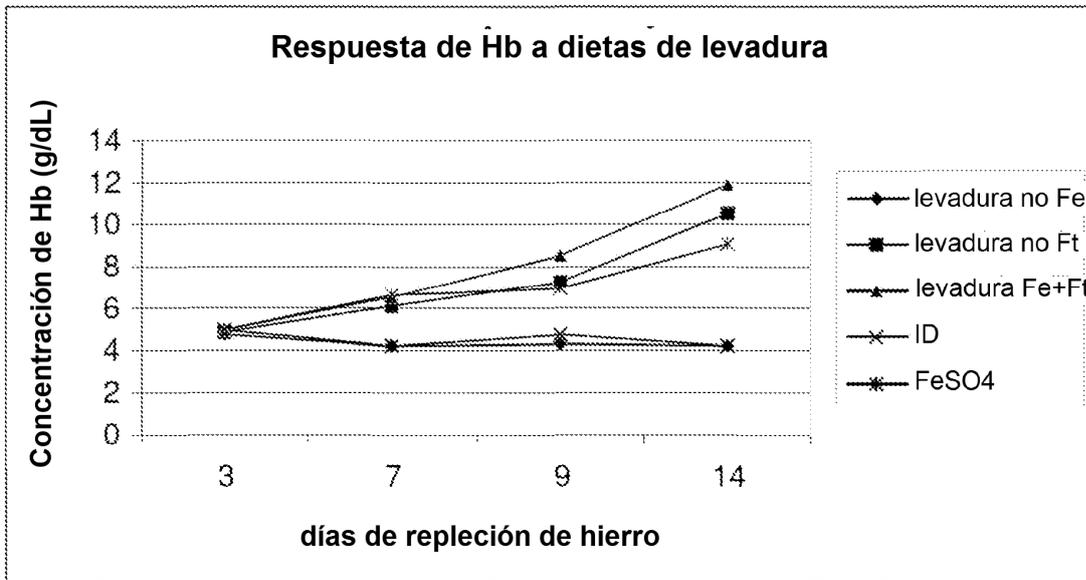


Fig 9

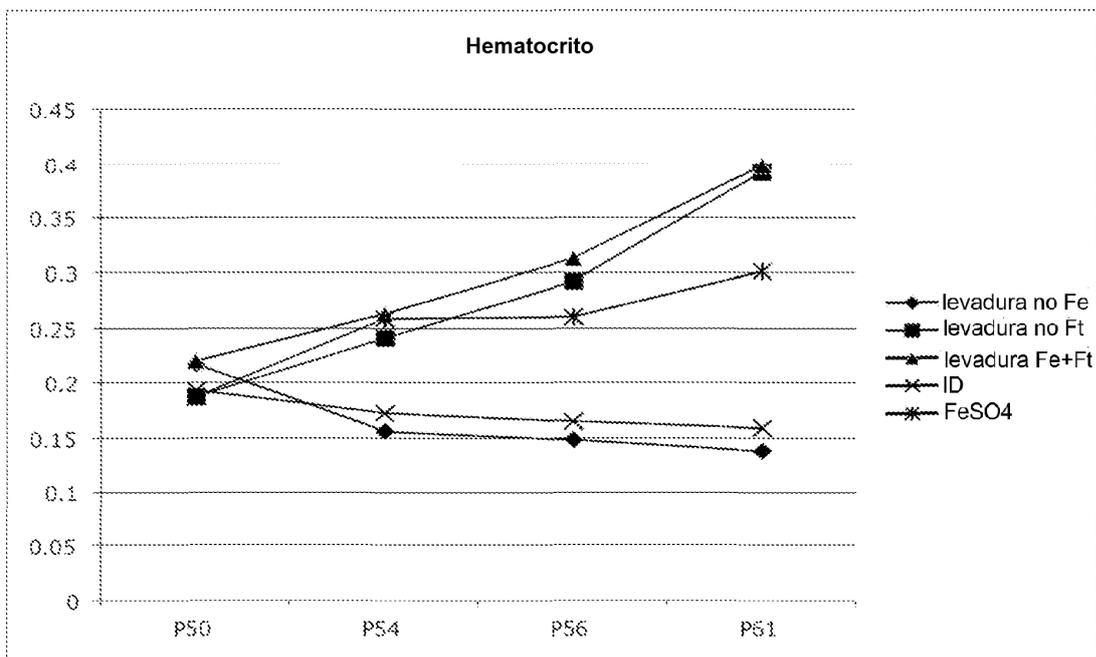


Fig 10

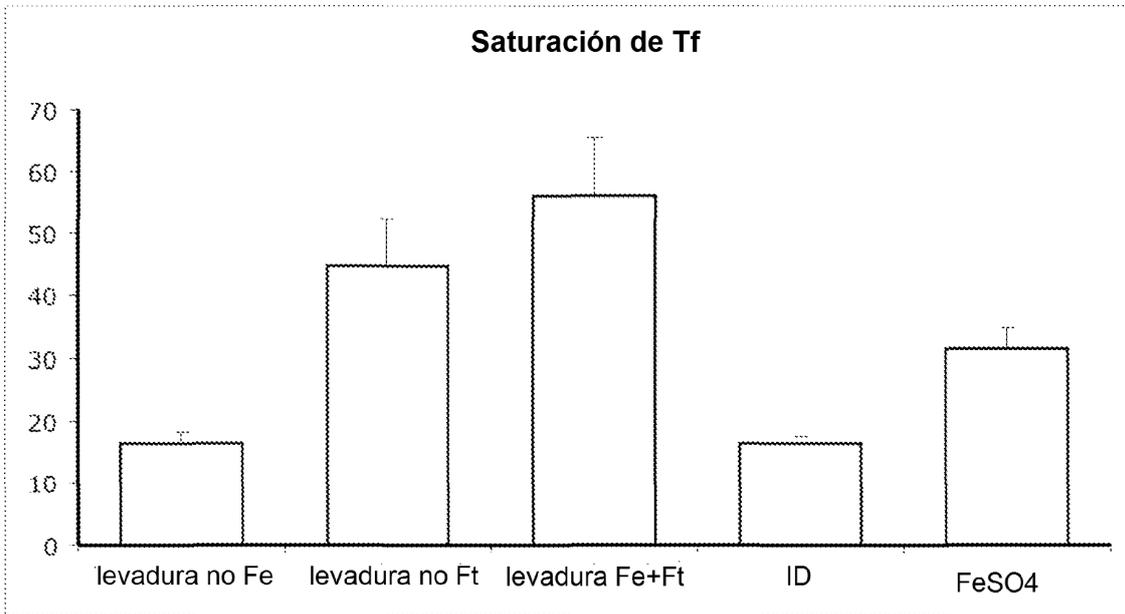


Fig 11

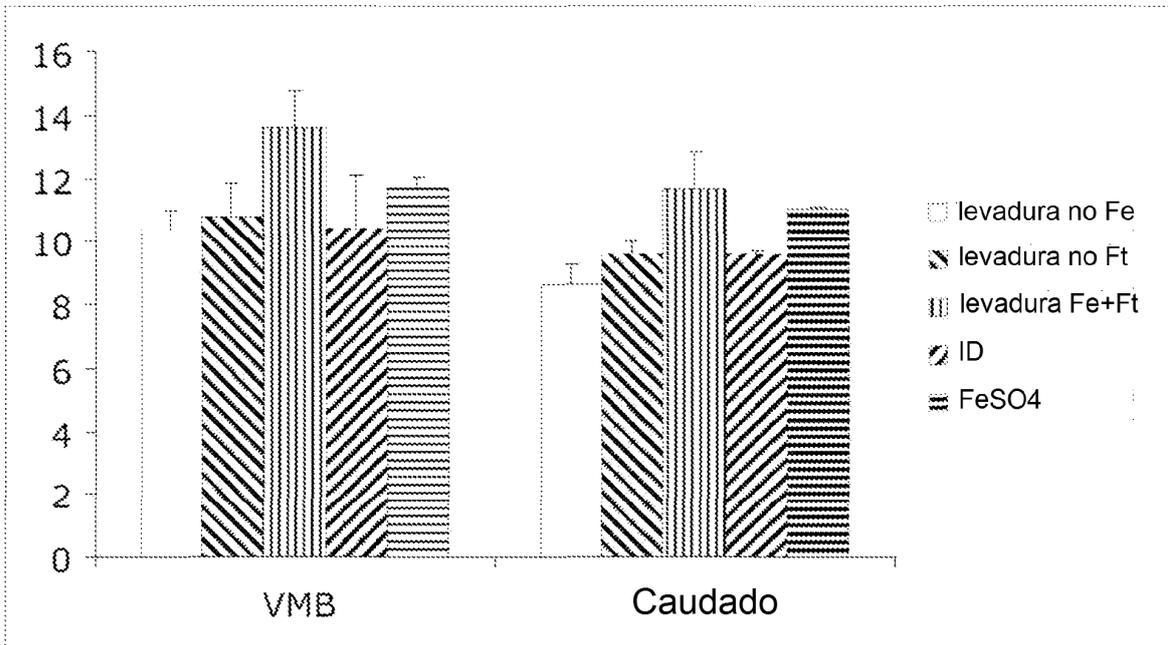


Fig 12

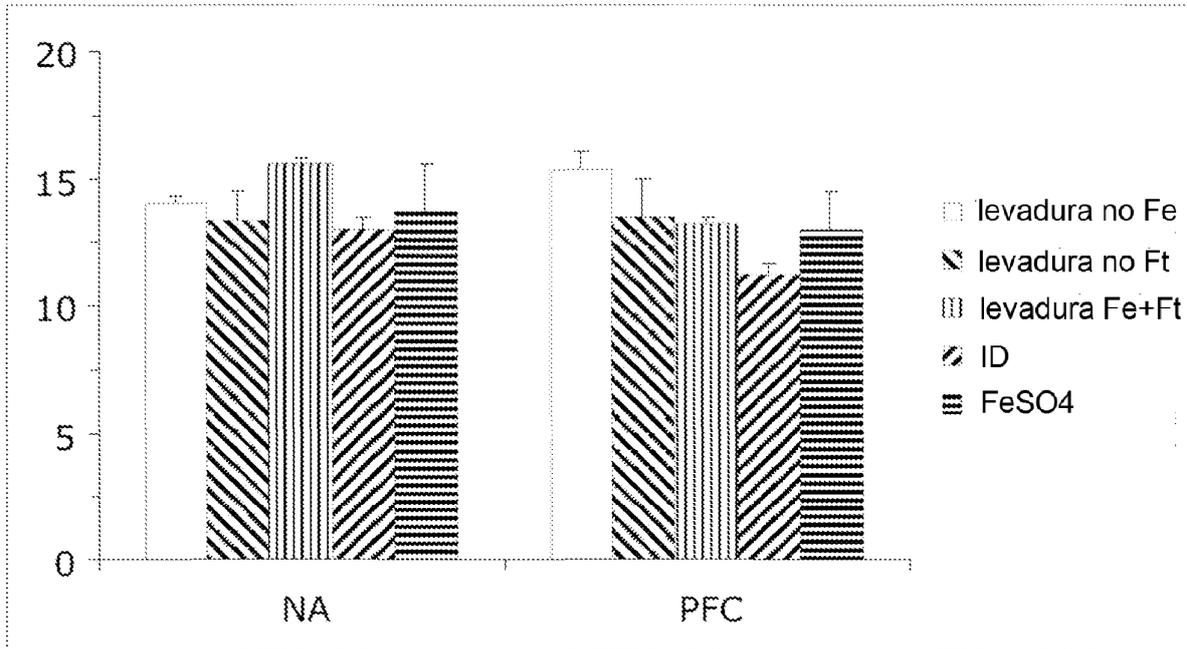


Fig 13

MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHHEER
 EHAEKLMKLNQRGGRIIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNSLLELHKLATDKNDP
 HLCDFIETHYLNEQVKAIKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNES

Fig 14A

ATGGCTGATATC
 GGATCCATACATATGACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCAG
 AGGCCGCCATCAACCGCCAGATCAACCTGGAGCTCTACGCCTCCTACGTTTACCTGTCCATGTC
 TTACTACTTTGACCGCGATGATGTGGCTTTGAAGAACTTTGCCAAATACTTTCTTCACCAATCT
 CATGAGGACAGGGAACATGCTGAGAAACTGATGAAGCTGCAGAACCAACGAGGTGGCCGAATCT
 TCCTTCAGGATATCAAGAAAACCAGACTGTGATGACTGGGAGAGCGGGCTGAATGCAATGGAGTG
 TGCATTACATTTGGAAAAAATGTGAATCAGTCACTACTGGAAGTGCACAAACTGGCCACTGAC
 AAAAATGACCCCATTTGTGTGACTTCATTGAGACACAPTACCTGAATGAGCAGGTGAAAGCCA
 TCAAAGAATTGGGTGACCACGTGACCAACTTGGCGAAGATGGGAGCGCCCGAATCTGGCTTGGC
 GGAATATCTCTTTGACAAGCACACCCTGGGAGACAGTGATAATGAAAGCTAACCTAGGCACCTC
 GAG

Fig 14B

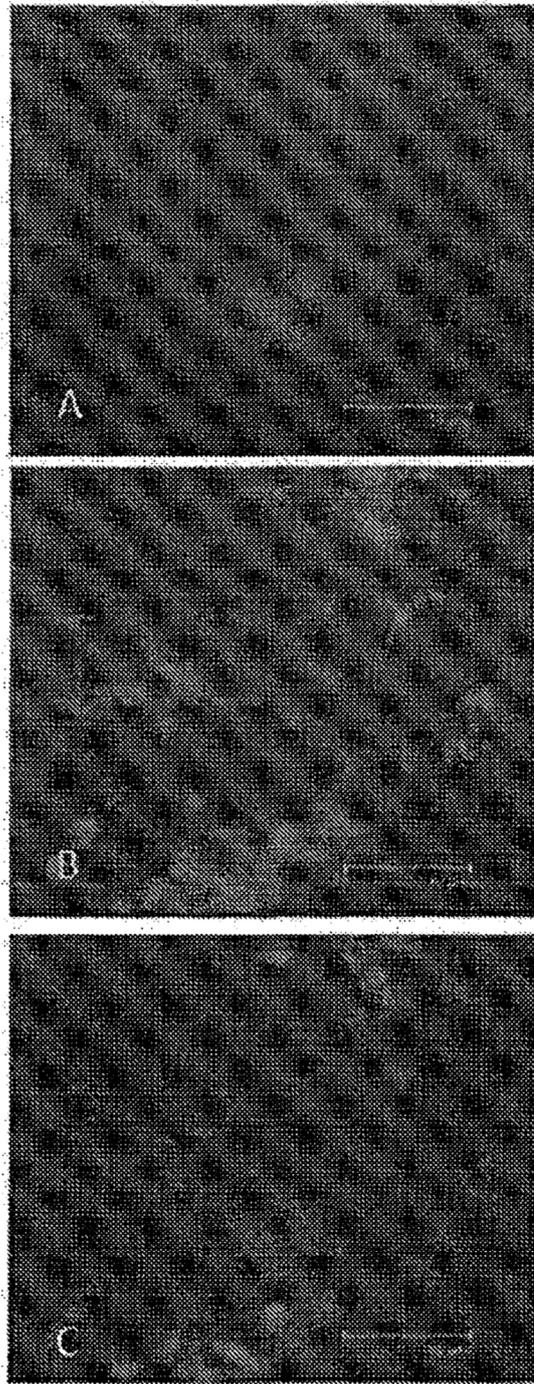


Fig 15

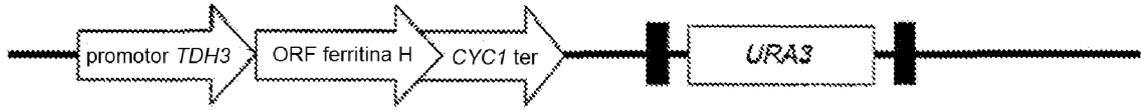


Fig 16

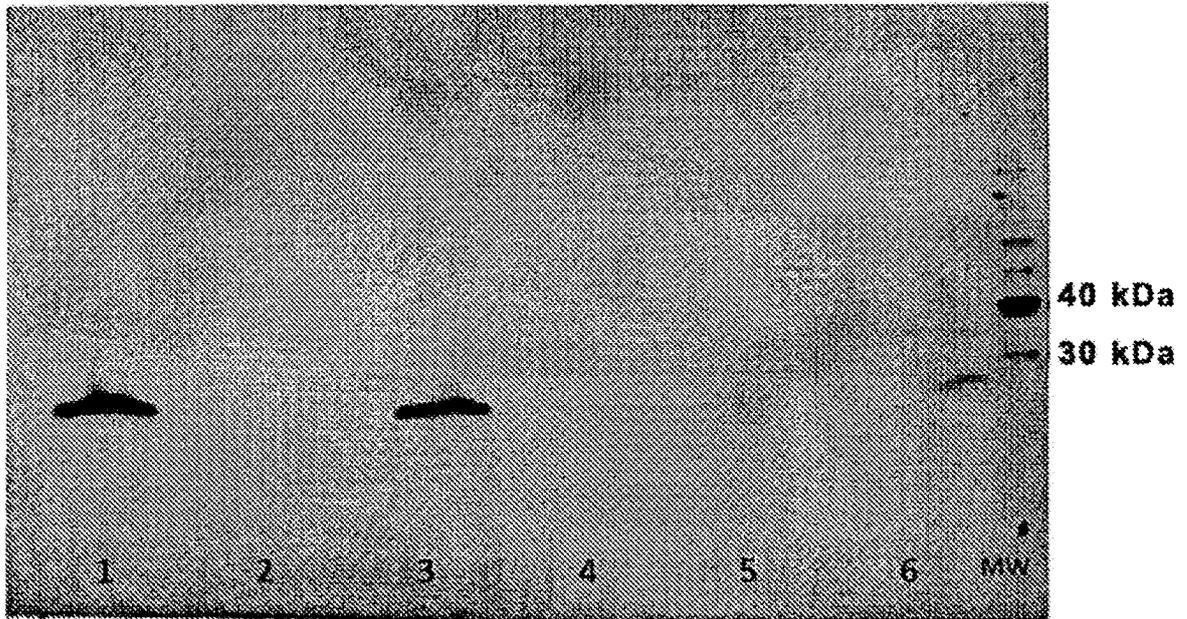


Fig 17

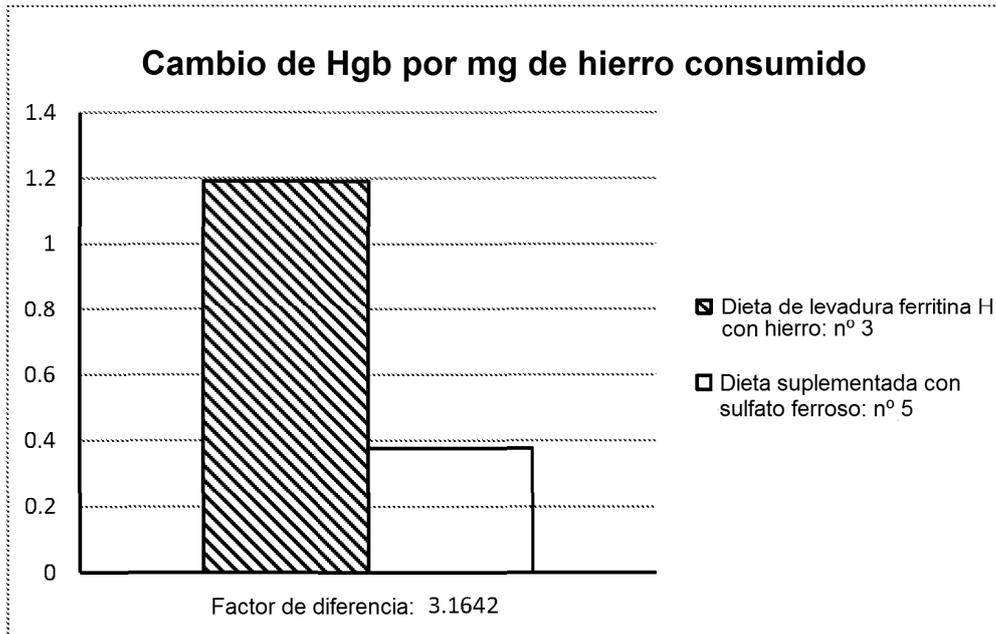


Fig 18A

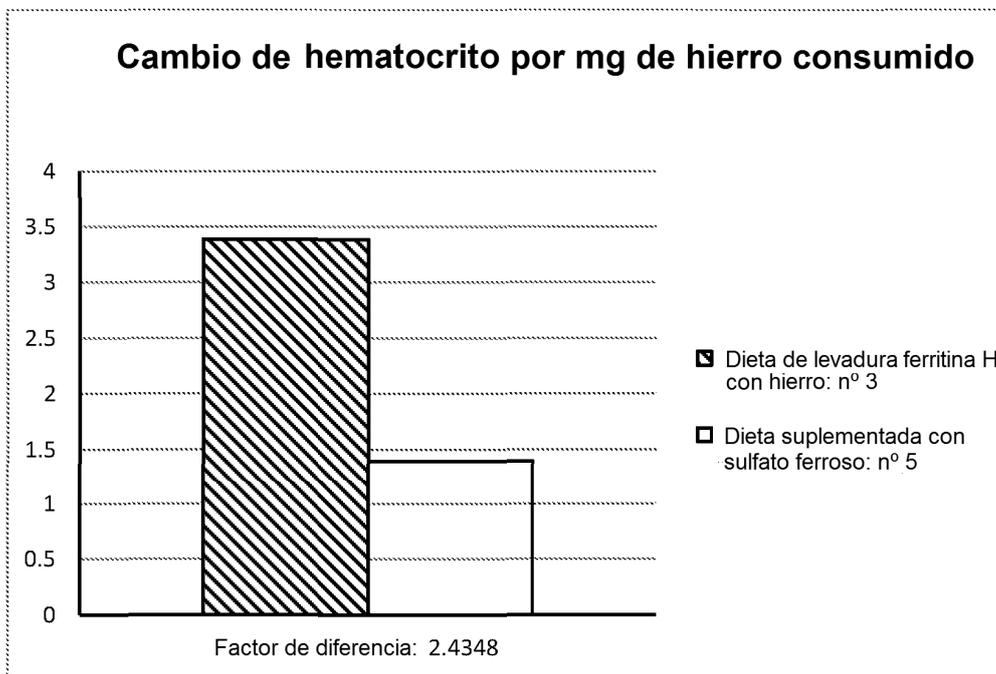


Fig 18B

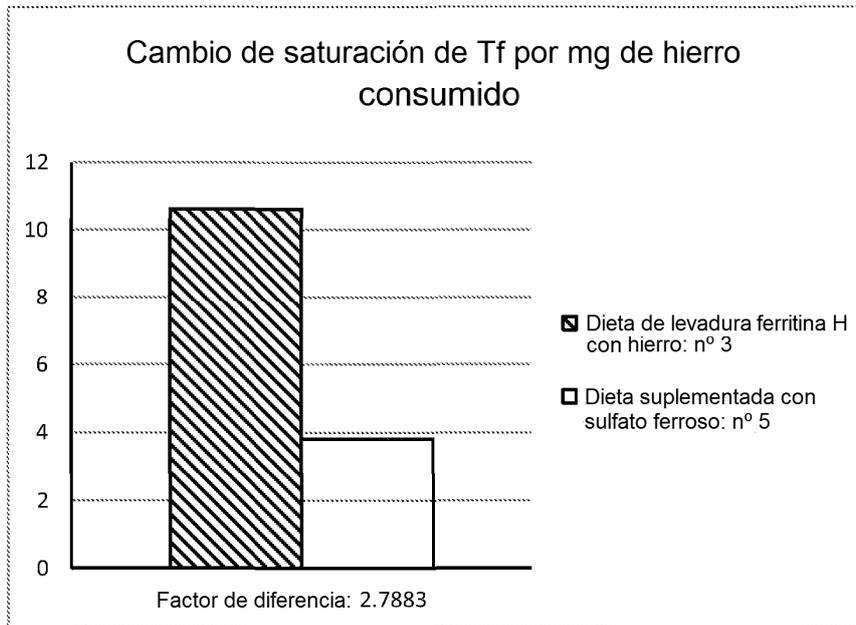


Fig 18C

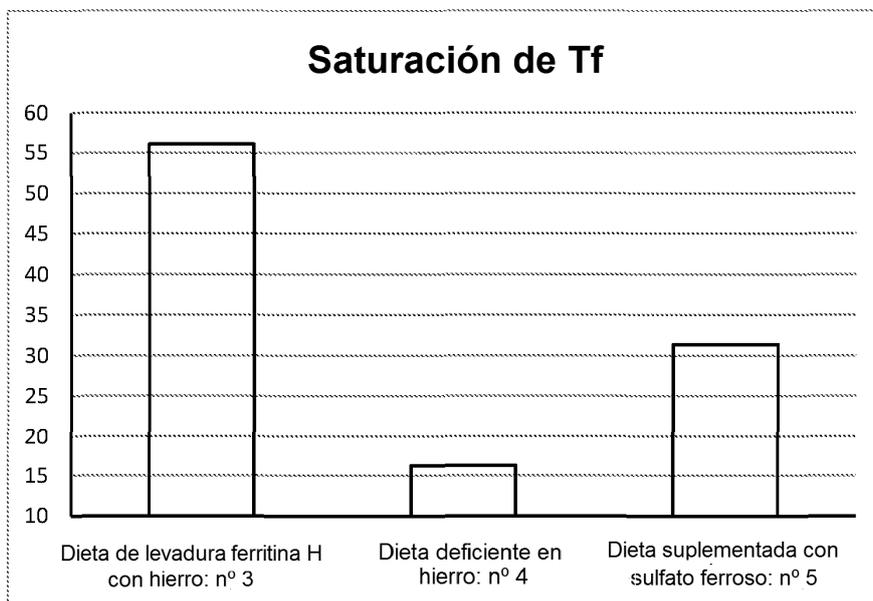


Fig 18D